

甘露消渴胶囊质量标准研究

万焱, 许闽, 冯素香*

(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:甘露消渴胶囊定性定量方法研究。方法:采用薄层色谱法(TLC)对方中人参、枸杞子、麦冬进行了定性鉴别;采用高效液相色谱法对方中小檗碱进行了含量测定。结果:TLC 定性鉴别能检出人参、枸杞子、麦冬,薄层色谱特征明显,专属性强,且阴性无干扰;HPLC 测定小檗碱在 0.0463~0.3804 μg 线性关系良好,平均回收率 99.14%,RSD 0.98% ($n=6$)。结论:薄层色谱鉴别和含量测定方法准确可行,重复性好,能有效地控制甘露消渴胶囊的质量。

[关键词] 甘露消渴胶囊;薄层色谱;高效液相色谱;质量标准

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0105-03

甘露消渴胶囊由熟地黄、人参、黄连、当归、枸杞子、麦冬、党参等 19 味中药组成,功能滋阴补肾、健脾生津,用于非胰岛素依赖型糖尿病^[1]。甘露消渴胶囊为卫生部药品标准中药成方制剂第十三册收载品种。因该产品原质量标准中仅有熊果酸和小檗碱的定性鉴别,无含量测定项,为了保证产品的安全性、有效性及质量可控性,本文采用薄层色谱法对人参、麦冬及枸杞子进行了定性鉴别;并采用高效液相色谱法,以黄连中所含的小檗碱为指标性成分进行了分析,对色谱条件进行了研究。结果表明,本法操作简便、重现性好、测定结果准确,这将为进一步完善甘露消渴胶囊的质量标准提供科学依据。

1 仪器与试剂

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-M10Avp 二极管阵列检测器(日本岛津);1/10 万分析天平(瑞士梅特勒)。小檗碱对照品(批号 713-0502,供含量测定用);人参对照药材、枸杞子对照药材、麦冬对照药材,购自中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯;水为重蒸水;其他试剂都采用分析纯。甘露消渴胶囊(批号 080720,080721,080722)自制。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 人参 取胶囊内容物 2 g,加蒸馏水 30 mL 使溶解,加乙醚萃取 2 次,每次 20 mL,弃去乙醚液,

水溶液用水饱和正丁醇萃取 4 次,每次 15 mL,合并正丁醇液,加 1% NaOH 溶液洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去碱液,再用正丁醇饱和的水溶液洗涤 2 次,每次 20 mL,收集正丁醇液,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取人参皂苷 R_{g1} 和 R_e 对照品,加甲醇制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的混合溶液,作为对照品溶液,另取人参对照药材 1 g,加氯仿 40 mL,加热回流 1 h,弃去氯仿液,药渣挥干溶剂,用水 0.5 mL 拌匀湿润后,加水饱和的正丁醇 10 mL,超声处理 30 min,吸取上清液,加 3 倍量 1% NaOH 溶液,摇匀,放置分层,取上层液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。取阴性样品(缺人参的样品),按照供试品溶液的制备方法进行制备,即得。吸取对照品溶液、对照药材溶液各 4 μL 及供试品溶液、阴性对照溶液 6 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇-水(13:7:2)10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘约 5 min,供试品色谱中,在与对照品色谱、对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性色谱中无对应斑点出现。结果见图 1。

2.1.2 枸杞子 取胶囊内容物 1.5 g,加水 40 mL 煎煮 15 min,滤过,滤液用醋酸乙酯振摇提取 2 次,每次 15 mL,合并提取液,浓缩至 2 mL,作为供试品溶液。另取枸杞子对照药材 1.5 g,同法制成枸杞子对照药材溶液。取阴性样品(缺枸杞子的样品),按照供试品溶液的制备方法进行制备,即得。吸取上述供试品溶液 4 μL ,对照药材溶液 12 μL 、阴性对照溶液 6 μL 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以醋酸乙

[收稿日期] 2009-11-02

[通讯作者] * 冯素香, Tel:13526403080, E-mail: fengsx221@163.com

酯-氯仿-甲酸(3:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯下(365 nm)检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性色谱中无对应斑点出现。结果见图 2。

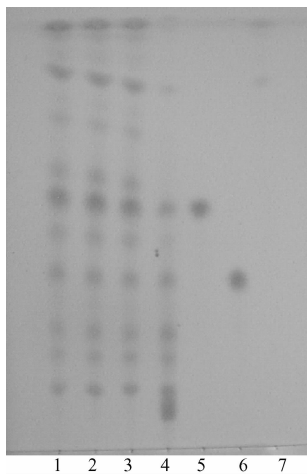


图 1 人参薄层色谱鉴别

- 1,2,3. 为供试品溶液;
4. 人参对照药材溶液;
5. 人参皂苷 R_{g1} 对照品溶液;
6. 人参皂苷 Re 对照品溶液;
7. 缺人参的阴性对照溶液。

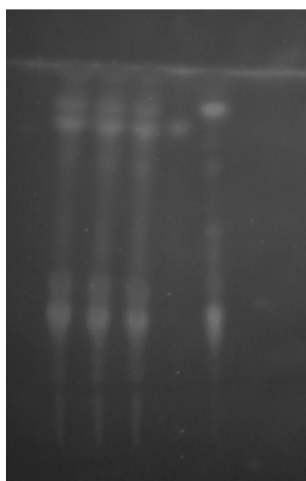


图 2 枸杞子薄层色谱鉴别

- 1,2,3. 为供试品溶液;
4. 人参对照药材溶液;
5. 缺枸杞子的阴性对照溶液。

2.1.3 麦冬 取胶囊内容物 2 g,加甲醇 40 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 20 mL 溶解,加盐酸 2 mL,沸水浴回流 45 min,放冷,溶液转移至分液漏斗中,加三氯甲烷提取 2 次,每次 30 mL,合并三氯甲烷液,水浴蒸干,残渣加甲醇 2 mL,溶解,作为供试品溶液。另取麦冬对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。取阴性样品(缺麦冬的样品),按照供试品溶液的制备方法进行制备,即得。分别吸取供试品溶液、对照药材溶液、阴性对照溶液各 10 μL,分别点样于同一块硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以三氯甲烷-丙酮(6:2)为展开剂展开,取出晾干,置紫外灯 254 nm 下观察。供试品色谱中,在与对照药材斑点相对应的位置上,显相同颜色的斑点。而阴性对照色谱中则无干扰斑点。结果见图 3。

2.2 小檗碱的含量测定

2.2.1 色谱条件 Betasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 3.5% 十二烷基硫酸钠 0.1 mol·L⁻¹ 酒石酸-甲醇(30:70)为流动相;流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 254 nm。理论塔板数按小檗碱峰计算应不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 16 μg 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备^[2] 取胶囊内容物,研细,混匀,取 1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 流动相,称定质量,85 °C 水浴回流加热 45 min,取出,放置至室温,称定重量,用流动相补足减失的质量,摇匀,即得。

2.2.4 阴性对照品溶液的制备 依据处方中的比例,按制法制备缺黄连的阴性对照样品,按供试品

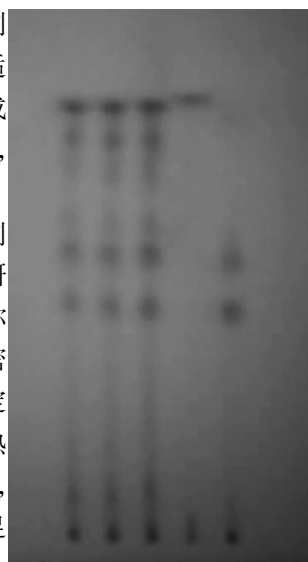


图 3 麦冬薄层色谱鉴别

- 1,2,3. 为供试品溶液;
4. 麦冬对照药材溶液;
5. 缺麦冬的阴性对照溶液。

溶液的制备方法制备阴性对照溶液。取供试品溶液、对照品溶液、阴性溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,结果表明阴性无干扰,结果见图 4。

2.2.5 线性关系的考察 精密吸取小檗碱对照品溶液,分别制成浓度为 4.63, 9.26, 18.52, 27.78, 38.04 μg·mL⁻¹ 的溶液。分别吸取上述溶液各 10 μL 进样测定,以峰面积积分为纵坐标,小檗碱的浓度为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 4.81 \times 10X - 7.19 \times 10^{-2}$, $r = 0.9996$,表明小檗碱在 0.0463 ~ 0.3804 μg 呈良好的线性关系。

2.2.6 精密密度试验 取同一对照品溶液,连续进样 6 次,进样量 10 μL,测定小檗碱峰面积,结果平均峰面积为 536 912, RSD 1.3% ($n = 6$)。结果表明,仪器精密密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批供试品(批号 080720),按供试品溶液制备方法平行制备 6 份,分别进样 10 μL,测定小檗碱峰面积,计算小檗碱含量。结果测得小檗碱平均含量为 67.18 μg/粒, RSD 1.8%。结果显示,该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样 10 μL,测定小檗碱峰面积,小檗碱平均峰面积为 529028, RSD 1.8% ($n = 5$)。结果表明,供试品溶液中小檗碱的含量在 8 h 内基本稳定。

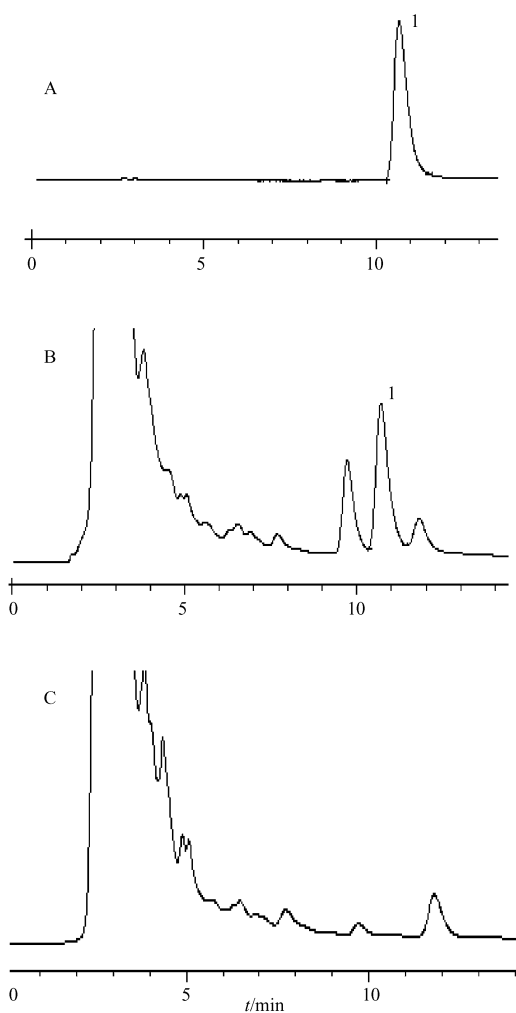


图 4 甘露消渴胶囊 HPLC 图

A. 对照品; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 盐酸小檗碱

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量同一批号供试品(批号 080720, 小檗碱含量 $67.18 \mu\text{g}/\text{粒}$) 0.70 g (取 5 份), 分别加入小檗碱对照品 $166.4 \mu\text{g}$, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 进样量 $10 \mu\text{L}$, 测定小檗碱含量。结果平均回收率为 99.1% , RSD 0.98% 。结果见表 1。

2.2.11 样品测定 按照供试品溶液制备方法对 3 批样品进行处理制备供试品溶液, 分别测定峰面积, 计算小檗碱含量。结果小檗碱的含量分别为 $67.61, 63.24, 62.86 \mu\text{g}/\text{粒}$ ($n=5$)。

表 1 小檗碱加样回收率

称样量 /g	样品中含量 / μg	测得值 / μg	回收率 /%	RSD /%
0.700 8	156.9	321.9	99.1	
0.707 2	158.4	318.9	96.4	
0.701 3	157.0	321.0	98.5	0.98
0.714 5	160.0	327.7	100.7	
0.711 8	159.4	327.0	100.7	

注: 加入量均为 $166.4 \mu\text{g}$ 。

3 讨论

3.1 小檗碱供试品回流提取时间的确定 参照有关文献^[2]供试品溶液的制备方法, 本研究对供试品提取时间进行了考察。取本品 1.5 g , 以流动相为溶剂, 分别加热回流提取 $15, 30, 45, 60 \text{ min}$ 。测定小檗碱含量, 结果显示, 回流提取 45 min 与 60 min 所得小檗碱含量非常接近, 回流提取 15 min 所得小檗碱含量则相对较低, 故按文献方法经试验后确定为 $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴回流加热 45 min 。

3.2 流动相的选择 小檗碱的含量测定方法主要有薄层扫描法^[3]、高效液相色谱法^[3]等。本研究采用高效液相色谱法测定甘露消渴胶囊中小檗碱的含量。比较了乙腈 - $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液 (30:70)、乙腈 - $0.033 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液 (40:60)、 1.7% 十二烷基硫酸钠 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酒石酸-甲醇 (40:60)、 3.5% 十二烷基硫酸钠 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酒石酸-甲醇 (30:70) 等多种流动相的分离效果, 以后者分离效果最好, 结果准确, 重复性好。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第 13 册. 北京: 人民卫生出版社, 1997:53.
- [2] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997:625.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005:213, 413.

[责任编辑 顾雪竹]