

效产生一定的影响,因此,本试验就对当归渗漉液的处理方法采用正交试验设计,进一步探讨慈航片的制备工艺。

1 材料与仪器

β -环糊精(安徽山河药用辅料有限公司);乙醇、乙醚等试剂均为分析纯。81-1 恒温磁力搅拌器;高效液相色谱仪(Agilent1100 美国安捷伦)。

2 方法与结果

2.1 当归渗漉液的制备 取当归适量,酌于碎断,照流浸膏剂与浸膏剂项下的渗漉法(《中国药典》2005 年版一部附录 I O),用 80% 乙醇作溶剂,收集 6 倍药材量的渗漉液,回收乙醇,浓缩至相对密度为 1.22~1.25(80℃)的膏膏,备用。

2.2 包合物的制备 采用饱和水溶液法,取一定量的 β -环糊精,用蒸馏水在一定温度下制成饱和溶液,然后在恒温搅拌下,慢慢滴入上述制得的当归渗漉液,继续搅拌一段时间,得混悬液,室温静置过夜,抽滤,蒸馏水洗涤,40~50℃干燥即可。

2.3 因素水平表的建立及正交试验设计 以包合物中阿魏酸的含量为考察指标,根据预试验的结果,选择投料比、包合搅拌时间、包合温度、渗漉液的相对密度作为参考因素,各设 3 个水平,利用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,如下:

表 1 因素水平表

水平	A 投料比 β -环糊精: 当归渗漉液(重量比)	B 温度 /℃	C 包合搅拌时间 /min	D 渗漉液的 相对密度
1	1:1	20	20	1.23
2	1:2	30	30	1.24
3	1:3	40	40	1.25

2.4 正交试验的实施 按正交表进行试验,结果如下:

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及试验结果

试验号	A	B	C	D	包合物中阿魏酸的含量
(1)	1	1	1	1	0.0767
(2)	1	2	2	2	0.0795
(3)	1	3	3	3	0.0778
(4)	2	1	3	2	0.0751
(5)	2	2	1	3	0.0727
(6)	2	3	2	1	0.0772
(7)	3	1	2	3	0.0738
(8)	3	2	3	1	0.0784
(9)	3	3	1	2	0.0762
K1	0.2343	0.2256	0.2256	0.2323	
K2	0.2250	0.2306	0.2305	0.2308	
K3	0.2284	0.2315	0.2316	0.2243	
R	0.0093	0.0059	0.006	0.008	

由上表中的 K 值可以直观看出,最佳组合为 $A_1B_3C_3D_1$ 当归渗漉液与 β -环糊精的比例 1:1 最优;包合温度为 40℃ 最优;包合搅拌时间 40 min 最优;渗漉液的相对密度以 1.23 最优。

由极差 R 值比较分析可知 $A > D > C > B$,即投料比对包

合物中阿魏酸的含量影响最大,渗漉液的相对密度,包合搅拌时间,包合温度依次排后。

2.5 验证试验 为了验证所选工艺条件的可行性,增加实验的可信度,按照以上确定的最佳工艺条件 $A_1B_3C_3D_1$,即:当归渗漉液与 β -环糊精的重量比为 1:1,包合温度为 40℃,包合搅拌时间为 40 min,渗漉液的相对密度为 1.23。进行 3 个平行试验验证,以包合物的得率及所得包合物中阿魏酸的含量为指标进行评价,结果见表 3。

有没有包括游离在外的成分得率计算公式:

包合物得率(%)

$$= \frac{\text{所得包合物重量}}{\text{加入当归渗漉液的重量} + \text{加入 } \beta\text{-环糊精的重量}} \times 100\%$$

表 3 验证试验结果

试验号	包合物得率(%)	阿魏酸含量
1	99.52	0.0842
2	99.36	0.0835
3	99.40	0.0840
均值	99.43	0.0839

由以上结果可以看出,三批验证试验,包合物中的阿魏酸含量均高于正交表中的其它试验,包合物得率也较高,说明所选的工艺条件较好,该方法稳定、可行。

2.6 包合物的验证 采用薄层色谱法对所得的包合物进行验证。

取包合物 0.2 g,加适量乙醚洗涤 3 次,滤过,滤液挥干,残渣加无水乙醇 1 ml 使溶解,作为包合物乙醚洗涤液。洗涤后的包合物在干燥条件下挥去乙醚,加水溶解,用适量乙醚分 3 次萃取,合并乙醚萃取液,挥去乙醚,残渣加无水乙醇 1 ml 使溶解,作为包合物提取液。另取当归渗漉液,加无水乙醇制成 1 ml 含 6 μ l 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 5 μ l,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以正己烷-醋酸乙酯(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果:当归渗漉液包合物乙醚洗涤液无斑点,当归渗漉液包合物提取液和当归渗漉液对照品溶液斑点完全一致,结果说明当归渗漉液已被 β -CD 包合。

2.7 结果 本试验在原工艺不变的情况下,仅对当归渗漉液的处理作了优化选择,以当归渗漉液与 β -环糊精在 1:1 (重量比),包合温度 40℃,包合搅拌时间 40 min,渗漉液的相对密度 1.23 为最佳工艺组合。经小批量试产,且对试验成品作了加速稳定性试验,表明成品无渗油现象。

3 结论

β -环糊精包合技术属药物制剂新技术,用过本实验,大大改善了慈航片的制备工艺,进一步为研究中药制剂和开发新药在应用新辅料、新技术上奠定了基础。

HPLC 法测定三金软胶囊中羟基积雪草苷的含量

★ 王玉芳 徐建中 (安徽省肥东县人民医院药剂科 肥东 230000)

关键词:积雪草;羟基积雪草苷;三金软胶囊;HPLC

三金软胶囊是由中华人民共和国国家中成药标准汇编

内科肾系分册三金胶囊^[1](WS-10131(ZD-0131)-2002)剂型

改革而来。由金樱根、金沙藤、菝葜、羊开口、积雪草经加工制成的软胶囊。清热解毒,利湿通淋,益肾。用于下焦湿热,热淋,小便短赤,淋漓涩痛,急、慢性肾盂肾炎,膀胱炎,尿路感染属肾虚湿热下注证者。原三金胶囊质量标准中以薄层扫描法测定羟基积雪草苷的量,但薄层扫描法测定结果误差大,2005 年版中国药典三金片标准,以蒸发光散射检测器检测,仪器条件要求较高,参照药典标准,我们建立了 HPLC 法测定制剂积雪草中的羟基积雪草苷^[2]。方法学研究结果表明:本法准确、简便、灵敏度好、分离度好、重现性好,可作为该制剂的定量分析方法。

1 仪器和试剂

仪器:LC-10AT vp 型输液泵(日本岛津公司);SPD-10A vp 型检测器(日本岛津公司);N-2000 色谱工作站(浙大智达公司);超声提取器(SB2000 型)。

试剂:乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,大连江申公司);以乙腈为流动相 A,以水为流动相 B,按下表中的规定进行梯度洗脱;流速为每分钟 1.0 ml;检测波长为 204 nm。理论塔板数按羟基积雪草苷峰计算应不低于 5 000。

2.2 供试品溶液的制备 取内容物 5 g,精密称定,用乙醚 50 ml 振摇洗涤 2 次,每次 50 ml,滤过,弃去乙醚液,药渣挥干乙醚,精密加 70% 甲醇 100 ml,称定重量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)提取 30 分钟,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 50 ml,置水浴上蒸干,残渣加 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 20 ml,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 20 ml,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的 1% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次,每次 15 ml,弃去碱洗液,正丁醇液再以正丁醇饱和的水洗涤 3 次,每次 15 ml,弃去水洗液通常情况下,此水洗液要用水饱和的正丁醇液反提一次,正丁醇液浓缩至干,残渣加水 10 ml,微热使溶解,放冷,通过 D101 大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,长 15 cm),用水 150 ml 洗涤,弃去水洗液,继用 70% 乙醇 100 ml 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇分次溶解,转移至 5 ml 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适应性实验

2.3.1 检测波长的选择 波长选择参照有关文献,并在 190~300 nm 波长进行扫描羟基积雪草苷对照品溶液,羟基积雪草苷的最大吸收波长在 197 nm,和文献报道相符,由于羟基积雪草苷最大吸收波长在 197 nm,位于近紫外区,溶剂吸收有较大干扰,故参考文献选择 204 nm 作为检测波长,实验结果表明,在此条件下羟基积雪草苷灵敏度较高,溶剂干扰小,能够满足测定要求。

2.3.2 分离度 取供试品溶液,按色谱条件进样,记录色谱图,结果理论板数按羟基积雪草苷峰计为 114877 ($n > 5000$)。主峰与周围的峰分离度为 3.179 ($R > 1.5$)。

2.3.3 检测限 取对照品溶液适量,用水稀释,按上述色谱条件进样,结果测得最低检测浓度为 1 μg/ml,即最低检测限为 10 ng。(S/N≥3)。

2.3.4 干扰试验 按处方量称取缺积雪草的空白样品,照

样品溶液的制备方法配制测定液,精密吸取此液 10 μl,按上述色谱条件进行测定,结果在同样位置未见峰出现,因此证明本品中其它成分对羟基积雪草苷的测定无干扰。

2.4 线性关系考察 精密称取羟基积雪草苷对照品适量,加甲醇分别制成 0.1005、0.201、0.402、0.603、0.804 mg/ml 的溶液。分别吸取 10 μl,注入液相色谱仪,以进样浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,回归方程为 $C = 411\,625\,6.643\,6A - 739\,07.329\,3$ 。 $R = 0.999\,9$ ($n = 5$),表明在 0.1005~0.804 mg/ml 范围内,羟基积雪草呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取羟基积雪草苷对照品溶液,连续进样,根据主峰面积计算进样精密度,结果平均峰面积为 1555659, RSD 为 0.14%,表明精密度良好。

2.6 溶液稳定性试验 照含量测定项下方法配制供试品溶液,于室温下自然放置,分别于 0、2、4、8、12、24 小时进样,测定峰面积,考察溶液的稳定性。结果平均峰面积为 1542393, RSD 为 0.91%,表明供试品溶液在 24 小时内稳定。

2.7 重现性试验 取同一批号样品,研细,取粉末 6 份,每份约 1.2 g,精密称定,置锥形瓶中,照含量测定项下的方法测定,结果 RSD = 1.25%,表明本法的水重性符合要求。

2.8 加样回收率 取已知含量的本品粉末 6 份(每份约 2.5 g),分别精密称定,再分别加入羟基积雪草苷对照品 2.0 mg,按含量测定方法供试品溶液制备的方法操作测定,记录色谱图,考察本方法的加样回收率,结果平均回收率为 98.18%, RSD = 1.47%。

结果表明:本方法的回收率结果令人满意。

2.9 样品测定及含量限度的确定 按含量测定项下的方法,测定了七批小试样品和三批中试样品中羟基积雪草苷的含量,其中最低值为 0.371 mg/粒,最高值为 0.408 mg/粒,考虑大生产中的损失,并结合实测资料,将样品中羟基积雪草苷的含量限度暂定为 0.35 mg/粒。

3 讨论

(1)因为本品为软胶囊,含有大量的脂肪油,对羟基积雪草苷的提取有一定的干扰,本文先用乙醚提取,可以消除脂肪油干扰,且对最终的含量结果不会产生影响。

(2)在供试品溶液制备时,使用了水饱和的正丁醇作为提取溶剂,实验时发现,水饱和的正丁醇和药液分离较慢,需静置 6 小时以上才能达到满意分离效果,如分层时间较短,会对最终含量有较大影响。

(3)积雪草中主要含有积雪草苷和羟基积雪草苷等成分,对积雪草的含量测定文献有同时定量积雪草苷和羟基积雪草苷的方法;《中国药典》^[3]2005 年版三金片中含量测定采用的是羟基积雪草苷的方法,而积雪草中羟基积雪草苷的含量相对较高,故此,正文积雪草含量测定最终选择以羟基积雪草苷作为定量指标,研究结果表明本法较好。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. 国家中成药标准汇编·内科、肾系分册[S]. 2002;84.
- [2] 陈瑶等:RP-HPLC 法测定积雪草中积雪草苷、羟基积雪草苷的含量[J]. 中成药,2000,22(3):227.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:326.