

• 试验研究 •

提高更年期乐胶囊质量标准的研究

刘 凯 王清华(黑龙江省药品检验所 哈尔滨 150001)

摘要 目的:修订了更年期乐胶囊的质量标准。方法:采用 TLC 对方中的人参和淫羊藿进行鉴别;用高效液相色谱法测定淫羊藿苷的含量。结果:在 TLC 色谱中均能检出人参和淫羊藿;淫羊藿苷的含量限度不低于 0.13mg/粒。结论:所建立的方法简便可行,重现性好,提供了更年期乐胶囊较佳的质量控制方法。

关键词 更年期乐胶囊;淫羊藿苷;HPLC;薄层鉴别

Improvement of quality Standards for gengnianle capsules

Liu Kai, Wang Qing-hua (Heilongjiang Institute for Drug Control, Haerbin 150001, China)

Abstract **Objective:** To improve the quality standards for Gengnianle Capsules. **Methods:** Radix Ginseng and Herba Epimedii in this formula were identified by TLC. Icariin was determined by HPLC. **Results:** Radix Ginseng and Herba Epimedii could be detected by TLC. The limit of Icariin wasn't lower than 0.13mg/capsule. **Conclusion:** The methods improved is simple, feasible and reproducible. This study provides a better method for the quality control of Gengnianle Capsules.

Key Words Gengnianle Capsules; Icariin; HPLC; TLC

更年期乐胶囊系由人参、肉苁蓉及淫羊藿浸膏和几种维生素类组成的中药复方制剂,具益气补血,延缓衰老之功效。用于失眠多梦,心悸,未老先衰,性功能减退等男女更年期引起的各种症状。为进一步提高其质量控制标准,通过实验考察,对本品种增加了两项薄层鉴别,同时建立了高效液相色谱的含量测定方法。

一、仪器和试剂

Waters 2487-600 型高效液相色谱仪。人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Re 、人参皂苷 Rg_1 和淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定所)。更年期乐胶囊(黑龙江仁和堂药业有限责任公司提供)。试剂及试药均为分析纯。

二、薄层鉴别

1. 人参 取本品 12 粒的内容物,加水 40ml,振摇使溶解,滤过,滤液用正丁醇提取 2 次,每次 20ml,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 20ml,正丁醇层蒸干,残渣加甲醇 1ml 溶解,作为供试品溶液。另取人参对照药材 1g,加甲醇 25ml,加热回流 1 小时,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加水 20ml 使溶解,用乙醚提取 2 次,每次 10ml,水层用正丁醇提取 3 次,每次 15ml,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 20ml,正丁醇层蒸干,残渣加甲醇 1ml 溶解,作为对照药材溶液。再取人参皂苷 Rb_1 、

Re 和 Rg_1 对照品,加甲醇制成每 1ml 分别含 1、1 和 2mg 的混合溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2000 年版一部附录 V B)试验,吸取上述三种溶液各 5 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)10℃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,100℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材及对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2. 淫羊藿 取含量测定项下的供试品溶液。另取淫羊藿苷对照品,加甲醇制成每 1ml 含 0.05mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2000 年版一部附录 V B)试验,吸取上述两种溶液各 2 μ l,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以乙酰丙酮-乙醇-醋酸-水(1:1.5:0.3:5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2%三氯化铝乙醇溶液,在室温下放置过夜后,置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

三、含量测定

1. 色谱条件

色谱柱:钻石 C_{18} Cat. No. 99901 (5 μ m, 4.6 $\times$ 150mm);流动相:乙腈-水(30:70);流速:1ml/min;检测波长:270nm;进样量:10 μ l。

2. 淫羊藿苷的线性范围及精密度的测定

本对照品溶液浓度: 0.10mg/ml。进样量分别为 1、2、4、8、12 μ l, 按含量测定方法测定峰面积, 并以峰面积的 10^{-6} 为横坐标, 标准品进样量为纵坐标建立标准曲线。得相关系数 $r=0.99997$, 线性范围为 0.10~1.16 μ g。

取本对照品溶液, 每次进样量为 4 μ l, 重复进样 6 次, 计算得 $RSD=0.92\%$ 。

3. 样品的含量测定 取本品装量差异项下的内容物, 研细, 取 2.5g, 精密称定, 置 100ml 锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 50ml, 称定重量, 超声处理 (功率 250W, 频率 20kHz) 45 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 70%乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液为供试品溶液。另取在 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的淫羊藿苷对照品, 加水制成每 1ml 含 0.04mg 的溶液, 混匀, 为对照品溶液。吸取上述两种溶液各 10 μ l, 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得。

4. 回收率试验 据本标准中的取样量, 减半精密称取已知淫羊藿苷含量的样品约 1.25g, 精密加入 0.1147mg/ml 的淫羊藿苷对照品溶液 (70%乙醇) 10ml, 再精密加入 70%乙醇溶液 40ml, 按上述方法测定含量, 共测了 5 个样, 平均回收率和 RSD 分别为: 104.4% 和 2.4%。

5. 重复性试验 取同一批样品, 按上述方法测定含量, 共测定 5 次。其含量测定结果的平均值和 RSD 分别为: 0.16mg/粒和 2.0%。

6. 稳定性试验 取 3. 项中的供试品溶液, 室温、密闭放置, 于 0、2、5、12、24 小时, 分别进样 10 μ l, 以淫羊藿苷峰面积统计, RSD 为 1.1%。

7. 淫羊藿阴性色谱行为考察 表明无淫羊藿药材的阴性样品的 HPLC 色谱图中, 在与淫羊藿苷色谱峰相应的位置上, 无杂质峰干扰。

四、讨论

1. 淫羊藿苷的薄层鉴别 还曾试用《中国药典》(2000 年版) 中淫羊藿苷药材项下的薄层色谱条件, 但色谱背景较深, 且有一定的干扰。改用聚酰胺薄膜后, 分离效果较佳。实验中发现, 显色后放置一段时间, 淫羊藿苷的荧光斑点会更清晰, 便于检视, 因此把显色后放置过夜也加入到标准正文中。

2. 含量测定中不同提取方法间提取率的比较

取同一批样品试用 5 种方法提取, 简述如下: a. 样品加水溶解后温浸 1 小时, 取续滤液上聚酰胺柱 (2g, 过 100 目筛, 内径为 1.8cm), 收集 60%乙醇洗脱液, 蒸干, 用 50%乙醇定容。b. 样品加水溶解后温浸, 滤液用醋酸乙酯提取 4 次, 提取液蒸干, 用 50%乙醇定容。c. 样品用 70%乙醇浸泡过夜, 超声提取, 续滤液为供试品溶液。d. 样品加水 0.5ml 润湿后用醋酸乙酯浸泡过夜, 超声提取, 滤液蒸干, 用 50%乙醇定容。e. 样品加水溶解后温浸, 滤液用氯仿洗 2 次, 再用醋酸乙酯萃取, 提取液蒸干, 用 50%乙醇定容。

结果表明 c 法的提取率最高 (0.16mg/粒); a 法 (0.12mg/粒)、b 法 (0.11mg/粒) 和 e 法 (0.10mg/粒) 基本一致, 用醋酸乙酯萃取和过聚酰胺柱效果相同, 且用醋酸乙酯萃取之前是否用氯仿脱脂意义不大; d 法 (0.08mg/粒) 浸泡过夜后直接用醋酸乙酯超声提取, 色谱图同 b 法和 e 法相似, 杂质少, 干净美观, 但提取率低。因而最终选用 c 法。

3. 提取溶剂及超声提取时间的确定 淫羊藿苷溶于乙醇, 醋酸乙酯和水, 因上面的提取方法考察已表明醋酸乙酯超声提取率不高, 因此主要考察不同比例醇-水的提取效果。取同一批号的样品, 提取溶剂分别定为 30%、50%、70%、90%乙醇和乙醇, 含量测得结果表明 30%、50% 和 70%乙醇提取效果差异不大, 其中 70%乙醇相对提取率最高, 考虑到较高的含醇量可相对减少其它水溶性成分的溶出, 而确定用 70%乙醇为提取溶剂。

取同一批的样品, 提取时间分别定为浸泡过夜后超声提取 20、30、40 和 60 分钟与不浸泡过夜而直接超声提取 30 分钟, 结果表明浸泡过夜后超声提取 30、40 和 60 分钟提取率之间的差异不大; 而浸泡过夜与否的含量测定结果比较, 差异不明显。进一步考察是否须浸泡过夜, 结果表明浸泡过夜后超声提取 30 分钟与不浸泡过夜而直接超声提取 45 分钟的提取效果相同, 两种方法均可行, 出于缩短检验周期的考虑, 最终定为直接超声提取 45 分钟。

4. 淫羊藿苷含量限度的确定 共对 9 批样品测定含量, 结果均值为 0.156mg/粒, 则本品淫羊藿苷的含量限度定为 $0.156 \times 85\% = 0.13\text{mg/粒}$ 。