

雪隆胶囊的质量标准研究

魏立新,张宝琛,陶燕铎,杜玉枝*

(中国科学院西北高原生物研究所,青海 西宁 810008)

摘要: 目的 制订雪隆胶囊的质量标准 方法 对雪莲花进行了薄层色谱鉴别;用分光光度法测定了 *L*-羟脯氨酸的含量 结果 含量测定平均回收率 101.1% ($RSD=1.7\%$, $n=6$) 结论 该方法稳定,专属性强,可作为该制剂的质量控制方法

关键词: 塞隆骨;雪莲花;薄层色谱鉴别; *L*-羟脯氨酸;胶原蛋白

中图分类号: R927.11

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2001)06-0510-02

Studies on quality control of XUELONG CAPSULE*

WEI Li-xin, ZHANG Bao-chen, TAO Yan-duo, DU Yu-zhi

(Biology Institute of Northwest Plateau, Chinese Academy of Sciences, Xining Qinghai 810008, China)

Key words Sailonggu; *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.; TLC; *L*-oxoproline; collagen;

* XUELONG CAPSULE is a recipe of Chinese medicine used against osteoarthritis.

雪隆胶囊由雪莲花和塞隆骨组成,功能为散寒除湿,补益肝肾;主治骨关节炎、寒湿阻络、肝肾不足症、关节疼痛、肿胀、屈伸不利、遇寒加重和腰膝酸软等,收载于卫生部颁布标准。方中的塞隆骨为新发现的国家一类动物新药材;雪莲花为常用藏药。为控制质量,保证其疗效,我们对雪莲花进行了薄层色谱鉴别;并用准确、方便的 Woessner 第 I 法^[1,2]测定了 *L*-羟脯氨酸的含量

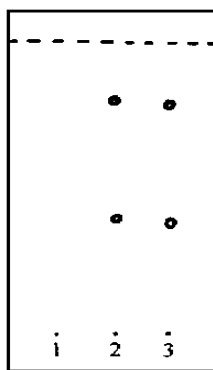
1 仪器与试药

724 微机型分光光度计(上海第三分析仪器厂),CSF-1A 超声波发生器,微量毛细管,硅胶 G 板,IMPACT 400 傅立叶变换红外光谱仪(美),BRUKER AM-500 核磁共振仪。

雪莲花对照药材:采自青海省玉树地区,经本所吴玉虎研究员鉴定为水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxima *L*-羟脯氨酸(含量 > 98.5%,购自 Sigma,经结构确证后作为对照品);雪隆胶囊为三河方大药业有限责任公司生产。其它化学试剂均为分析纯。

2 薄层鉴别

雪花莲鉴别:取雪隆胶囊内容物 3 g,加水 20 mL,置沸水浴中加热提取 30 min,滤过,滤液置分液漏斗中,加氨试液调 pH 值 9 以上,加氯仿 20 mL 萃取,取氯仿液挥干溶剂,残渣加氯仿 0.5 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取雪莲花对照药材 5 g,加水 100 mL 煮沸 1 h,滤过,滤液浓缩至约 10 mL,加氨试液调 pH 值 9 以上,同法制得对照药材溶液。再按



1-阴性对照 2-供试品 3-雪莲花对照药材

图 1 雪隆胶囊中雪莲花的 TLC 图

处方取不含雪莲花的其它药材,按本品工艺及上述供试品制备方法,制成阴性对照溶液。吸取上述供试品、阴性对照液和雪莲花对照药材溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-醋酸乙酯(1:1)为展开剂,展开,取出晾干,喷以碘化铯钾试液。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上(R 值约 0.45),显相同的橙红色斑点,而阴性对照无干扰,见图 1。

3 含量测定

3.1 含量测定方法的选择:药效学和化学成分研究都表明了塞隆骨中的胶原蛋白的重要性,文献资料和研究都证明 *L*-羟脯氨酸是胶原蛋白中的特征性氨基酸,含量约为 13.4%。因此选用测定雪隆胶囊中的 *L*-羟脯氨酸含量作为含量测定指标。

3.2 *L*-羟脯氨酸对照品的结构确证: *L*-羟脯氨酸($C_5H_9NO_3$),经红外 ^{13}C NMR 1H NMR 图谱分析并与 Sadtler 相应图谱比较后,确定为反式-4-羟基-*L*-脯氨酸(trans-4-hydroxy-*L*-proline,简称 *L*-羟脯氨酸)。

3.3 *L*-羟脯氨酸测定波长的选择:取 *L*-羟脯氨酸对照品溶液及样品溶液,按标准曲线制定项下的方法进行吸收波长的扫描,提示在波长 561 nm 处为

最大吸收,故确定最大吸收波长为 561 nm

3.4 空白试验:按处方取不含塞隆骨的其它药材,照本品制备工艺和含量测定项下方法测定阴性样品中的 *L*-羟脯氨酸的含量,结果为零,说明本品中其它药材及辅料并不干扰 *L*-羟脯氨酸含量的测定。

3.5 线性范围的考察:精密称取 *L*-羟脯氨酸对照品 50.0 mg,2 mL 浓盐酸溶解后,蒸馏水定容至 500 mL,配制成 0.1 mg/mL 的对照品母液。吸取上述对照品母液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 分别用蒸馏水定容至 100 mL,配成系列溶液。分别吸取上述系列溶液 1.0 mL (以 1.0 mL 蒸馏水作空白对照)于试管中,分别各加柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH= 6) 1.0 mL;再各加氯胺 T 氧化试剂 1.0 mL,摇匀,室温氧化 10 min 然后加 3.15 mol/L 高氯酸 1.0 mL,摇匀后室温静止 10 min 终止氧化;然后再各加对二甲胺基苯甲醛显色液 1.0 mL,于 65℃ 水浴加热显色 8 min;冷却至室温后照分光光度法 (中华人民共和国药典 1995 年版一部附录 V B),在 561 nm 处测定吸光度。以 *L*-羟脯氨酸浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标,吸光度 (*A*) 为纵坐标,绘制标准曲线。以浓度和吸光度进行回归分析,得回归方程 $Y = 12.1145X - 0.0903$, $r = 0.9995$, *L*-羟脯氨酸浓度在 0.5~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,吸光度呈良好的线形关系。

3.6 稳定性试验:精密量取上述对照品溶液 *L*-羟脯氨酸 (3 $\mu\text{g/mL}$) 1.0 mL,按 3.5 项下步骤进行操作,间隔 30 min 进行吸光度测定,连续 5 h,计算每次测定的减色率百分数,结果表明 1 h 减色率 0.2%, 2 h 减色率 2.8%,因此,显然完毕后在 1 h 内测定稳定可靠。

3.7 重复性试验:精密称取同一批样 (950802) 5 份各约 30 mg,按含量测定项下的方法测定 *L*-羟脯氨酸的含量,重复 6 次,测定结果经数据处理, $RSD = 1.6\%$,说明本测定方法的重复性良好。

3.8 回收率试验:采用加样回收法,取批号为 980402 的雪隆胶囊 20 份各 15 mg 左右,其中的 15 份用来做添加 *L*-羟脯氨酸对照品的回收试验,另外的 5 份用来做不加对照品的随行含量测定。前 15 份样品分成 5 组 (每组 3 份),分别添加 *L*-羟脯氨酸对照品溶液 (100 $\mu\text{g/mL}$) 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mL 和相对应的蒸馏水 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 后 5 份样品不加 *L*-羟脯氨酸,也不加蒸馏水。用作回收率测定的 15 份样品加 12 mol/L 的盐酸各 1.0 mL;用作随行含量测定的 5 份样品加 6 mol/L 的盐酸 20 mL 后全部的 20 份样品在 120℃ 酸解 2 h 按含

量测定项下的方法测定含量,计算回收率。结果平均回收率为 101.1%, $RSD = 1.7\%$ 。提示该方法操作损失小,方法可靠。

3.9 样品含量测定:精密称取雪隆胶囊内容物约 30 mg 于 5 mL 安瓿中,加 6 mol/L 盐酸 2.0 mL,熔封后 120℃ 烘箱中酸解 2 h。酸解液用 NaOH 调 pH 至 6.0,定量滤纸过滤,滤液用蒸馏水定容至 100 mL。取 1.0 mL 定容液于硬质试管中,加柠檬酸缓冲液 (pH6) 1.0 mL,再加氯胺 T 氧化液 1.0 mL,摇匀,室温氧化 10 min 然后加 3.15 mol/L 高氯酸 1.0 mL,摇匀后于室温下静置终止氧化 10 min 最后加对二甲胺基苯甲醛显色剂 1.0 mL 后,于 65℃ 水浴加热显色 8 min 冷却后于 561 nm 处测定吸光度值。从标准曲线上读出供试品溶液中 *L*-羟脯氨酸的含量 ($\mu\text{g/mL}$),然后算出胶囊中 *L*-羟脯氨酸的百分含量。结果见表 1。

表 1 雪隆胶囊 *L*-羟脯氨酸含量 ($n = 3$)

批号	<i>L</i> -羟脯氨酸含量 (%)	RSD (%)
950801	1.38	2.02
950802	1.36	1.50
950803	1.36	2.21
960901	1.29	1.80
960902	1.32	2.14
960903	1.37	2.01
980401	1.40	1.60
980402	1.38	1.70
980403	1.33	1.02
980404	1.35	0.80

4 讨论

4.1 采用薄层色谱法对雪隆胶囊中雪莲花生物碱进行鉴别,经不同温度、湿度及展开条件的摸索,以及对不同来源的药材平行对照,表明该方法条件重复性好,斑点清晰,分离完全,与对照药材的斑点大小和位置相同。

4.2 采用分光光度法对雪隆胶囊中的 *L*-羟脯氨酸作含量测定,具有方法简便,重复性好,专属性强的优点,但需注意氧化剂氯胺 T 需新鲜配制^[3]及氧化温度的固定 (25℃ 左右)等。并对 10 批样品进行了 *L*-羟脯氨酸的含量测定,结果各批次含量较稳定。从而为雪隆胶囊的质量控制提供了有效的方法。

参考文献:

- [1] Woessner J F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid [J]. Arch Biochem Biophys 1961, 93: 440-447.
- [2] 刘平译. 胶原蛋白实验方法学 [M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1992.
- [3] 关静,叶萍,武继民. 胶原海绵的羟脯氨酸含量测定 [J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(1): 52-54.