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;

* XUELOGN 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, 收载于卫生部部颁标准。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。

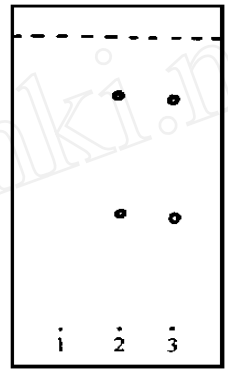
1 仪器与试药

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, MPACT 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* Maxim。*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 微沸 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 μL, 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, 喷以碘化铋钾试液。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上(R_f 值约 0.45), 显相同的橙红色斑点, 而阴性对照无干扰, 见图 1。



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

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, 文献资料和我们的研究都证明 *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}CNMR、^{1}HNMR 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

* 收稿日期: 2000-08-07
基金项目: 国家"八·五"科技攻关计划资助项目"抗风湿新药塞隆骨及其制剂的开发研究"

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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 年版一部附近 VB), 在 561 nm 处测定吸光度。以 *L*-羟脯氨酸浓度 (μg/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 $Y = 12.114\ 5X - 0.090\ 3$, $r = 0.999\ 5$, *L*-羟脯氨酸浓度在 0.5～5.0 μg/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 μg/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 μg/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 (pH 6) 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 (μg/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	*L*-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.

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net