

抗骨增生片的质量标准提高研究

陈 希*,万林春,张文婷[#](江西省药品检验检测研究院/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心,南昌 330029)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0838-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.32

摘 要 目的:完善和提高抗骨增生片的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中骨碎补、淫羊藿、鸡血藤进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中毛蕊花糖苷和淫羊藿苷的含量;色谱柱为 Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为270 nm(淫羊藿苷)、334 nm(毛蕊花糖苷),柱温为25 ℃,进样量为10 μL。结果:骨碎补、淫羊藿、鸡血藤的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。毛蕊花糖苷、淫羊藿苷检测进样量线性范围分别为0.018 8~1.88 μg($r=0.999\ 9$)、0.107~2.14 μg($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为100.2%~105.0%(RSD=1.6%, $n=9$)、96.2%~99.5%(RSD=1.4%, $n=9$)。结论:该标准能更加有效地控制抗骨增生片的质量。
关键词 抗骨增生片;柚皮苷;淫羊藿苷;毛蕊花糖苷;鸡血藤;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Improving the Quality Standards of Kanggu Zengsheng Tablet

CHEN Xi, WAN Linchun, ZHANG Wenting(Jiangxi Institute for Drug Control/Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop and improve the quality standard for Kanggu zengsheng tablet. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of *Drynaria fortunei*, *Epimedii Folium* and *Spatholobus suberectus*; HPLC was used for the contents determination of icariin and acteoside; the column was Diamonsil C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min; detection wavelength was 270 nm for icariin and 334 nm for acteoside, Cdumn temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. RESULTS: The TLC spots of *D. fortunei*, *Epimedii Folium* and *S. suberectus* were clear and well separated, negative control without interference. The linear range was 0.018 8-1.88 μg for acteoside ($r=0.999\ 9$) and 0.107-2.14 μg for icariin ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 100.2%-105.0% (RSD=1.6%, $n=9$) and 96.2%-99.5% (RSD=1.4%, $n=9$). CONCLUSIONS: The improved standard can more effectively control the quality of Kanggu zengsheng tablet.

KEYWORDS Kanggu zengsheng tablet; Naringin; Icariin; Acteoside; *Spatholobus suberectus*; TLC; HPLC

抗骨增生片具有活血、止痛和补肾的功效^[1-3],适用于肥大性脊椎炎、跟骨刺、颈椎病、大骨节病、增生性关节炎的治疗。该制剂由熟地黄、骨碎补、鸡血藤、淫羊藿和肉苁蓉等7味中药组成,其糖衣片和薄膜衣片分别收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂》^[4]和《国家药品标准》^[5],内容均只有鸡血藤的薄层色谱(TLC)鉴别和片剂的常规检查,标准较简单,不利于产品的质量控制。笔者采用TLC对骨碎补、淫羊藿和鸡血藤进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定制剂中毛蕊花糖苷、淫羊藿苷的含量,以期为提高抗骨增生片的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010C型HPLC仪,包括紫外检测器(日本Shi-

madzu公司);BT125D型电子分析天平(德国Sartorius公司);BUG25-06型超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司,功率:250 W,频率:25 kHz)。

1.2 药品与试剂

抗骨增生片(陕西济康药业有限公司,批号:100301、090701;陕西白云制药有限公司,批号:091101、090901;江门名盛制药有限公司,批号:20080801,规格均为0.26 g/片);淫羊藿苷对照品(批号:110737-200415,纯度:100%)、柚皮苷对照品(批号:110722-200610,纯度:100%)、毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-200303,纯度:96.8%)均购自中国食品药品检定研究院;鸡血藤对照药材(笔者购自江西樟树中药材市场,经本单位万林春副主任中药师鉴定为真品);羟甲基纤维素钠、硅胶G(青岛海洋化工厂分厂);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

* 主管检验师,硕士。研究方向:药物分析和食品分析。电话:0791-88158796。E-mail:89276794@qq.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0791-88158630。E-mail:2819176959@qq.com

2.1.1 骨碎补、淫羊藿 取样品20片,除去包衣,研细,加石油醚(60~90℃)30 mL,加热回流1 h,放冷,滤过,滤液备用;残渣加乙酸乙酯70 mL,加热回流1 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取淫羊藿苷、柚皮苷对照品各适量,分别加甲醇制成质量浓度均为0.5 mg/mL的单一对照品溶液。按抗骨增生片处方和工艺分别制备缺骨碎补、淫羊藿的单一阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成单一阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述5种溶液各5 μL,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,以乙酸乙酯-丁酮-甲醇-水(10:1:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,加热至紫外光灯(365 nm)下可见。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图1。

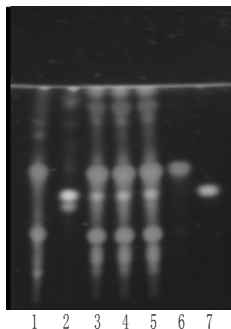


图1 骨碎补、淫羊藿的薄层色谱图

1.缺骨碎补的阴性对照;2.缺淫羊藿的阴性对照;3~5.供试品;6.淫羊藿苷对照品;7.柚皮苷对照品

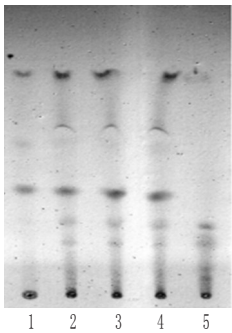
Fig 1 TLC chromatograms of *Drynaria fortunei* and *Epimedii Folium*

1.negative control without *D. fortunei*; 2.negative control without *Epimedii Folium*; 3-5.test samples; 6.reference substance of icariin; 7.reference substance of naringin

2.1.2 鸡血藤 取“2.1.1”项下石油醚提取液,挥干,残渣加三氯甲烷1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取鸡血藤对照药材1 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按抗骨增生片处方和工艺制备缺鸡血藤的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述3种溶液各20 μL,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,以石油醚(30~60℃)-乙酸乙酯(19:5, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃下加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图2。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B),洗脱程序(0~12 min, 20% A; 12~30 min, 30% A; 30~40 min, 20% A);流速:1.0 mL/min;检

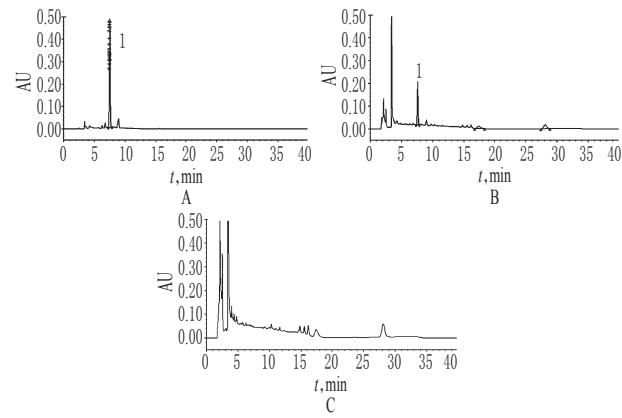


1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

1.reference medicinal herb; 2-4.test samples; 5.negative control

图2 鸡血藤的薄层色谱图

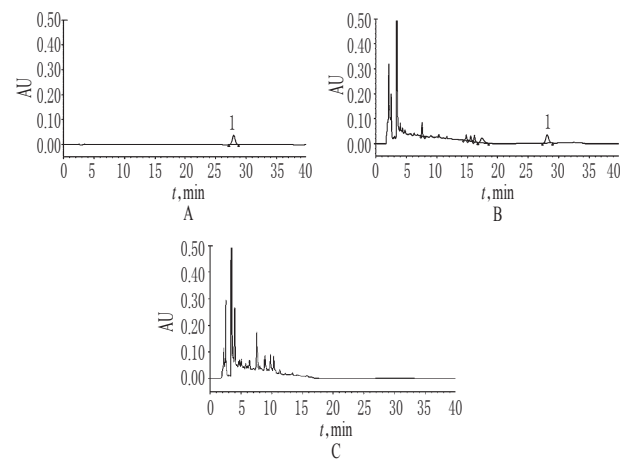
Fig 2 TLC chromatogram of *spatholobus suberectus* 测波长:270 nm(淫羊藿苷)、334 nm(毛蕊花糖苷);柱温:25℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以毛蕊花糖苷和淫羊藿苷峰计>3 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图3、图4。



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.毛蕊花糖苷
A.mixed reference substance; B. test sample; C. negative control; 1.ac-teoside

图3 高效液相色谱图(334 nm)

Fig 3 HPLC chromatograms (334 nm)



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.淫羊藿苷
A.mixed reference substance; B. test sample; C. negative control; 1.icariin

图4 高效液相色谱图(270 nm)

Fig 4 HPLC chromatograms(270 nm)

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取待测成分对照品适量,精密称定,加甲醇制成毛蕊花糖苷、淫羊藿苷质量浓度分别为10、60 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品20片,除去包衣,精密称定,研细,取约1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加50%甲醇25 mL,称定质量,超声处理60 min,放冷,再次称定质量,加50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察 取待测成分对照品适量,加甲醇制成毛蕊花糖苷、淫羊藿苷质量浓度分别为9.09、10.70 μg/mL的单一对照品溶液,分别精密量取上述毛蕊花糖苷对照品溶液2、5、10、20、50、100、200 μL,淫羊藿苷对照品溶液1、2、5、10、20 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得毛蕊花糖苷、淫羊藿苷的回归方程分别为 $y=3\,201\,368x-31\,313$ ($r=0.999\,9$)、 $y=412\,757x-17\,158$ ($r=0.999\,9$)。结果表明,毛蕊花糖苷、淫羊藿苷检测进样量线性范围分别为0.018 8~1.88、0.107~2.14 μg。

2.2.5 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,毛蕊花糖苷、淫羊藿苷峰面积的RSD分别为1.5%、0.2%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:20080801)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,毛蕊花糖苷、淫羊藿苷峰面积的RSD分别为0.60%、1.90%($n=6$),表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20080801)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,毛蕊花糖苷、淫羊藿苷峰面积的RSD分别为1.9%、0.9%($n=5$),表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:20080801)适量,共9份,分别加入低、中、高质量的待测成分对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

2.2.9 样品含量测定 取5批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 定性指标的选择

骨碎补和淫羊藿中的鉴别大多都是单独鉴别,鉴于提取方法和极性近似^[7],笔者考虑在同一TLC中同时鉴别,原设计还打算同时鉴别毛蕊花糖苷,但因阴性干扰,

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)							
待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
毛蕊花糖苷	0.494 1	0.203 7	0.181 8	0.389 3	102.1	103.0	1.6
	0.499 3	0.205 8	0.181 8	0.388 1	100.3		
	0.501 3	0.206 7	0.181 8	0.388 8	100.2		
	0.503 6	0.207 5	0.227 3	0.441 2	102.8		
	0.504 0	0.207 7	0.227 3	0.442 3	103.2		
	0.505 6	0.208 4	0.227 3	0.443 1	103.3		
	0.507 3	0.209 1	0.272 7	0.493 2	104.2		
	0.507 4	0.209 2	0.272 7	0.495 4	105.0		
	0.509 3	0.210 0	0.272 7	0.489 9	102.6		
	0.494 1	0.774 8	0.592 8	1.346 7	96.5	98.0	1.4
淫羊藿苷	0.499 3	0.783 0	0.592 8	1.370 3	99.1		
	0.501 3	0.786 1	0.592 8	1.376 2	99.5		
	0.503 6	0.789 7	0.741 0	1.502 4	96.2		
	0.504 0	0.790 4	0.741 0	1.527 2	99.4		
	0.505 6	0.792 9	0.741 0	1.520 9	98.2		
	0.507 3	0.795 5	0.889 2	1.673 2	98.7		
	0.507 4	0.795 7	0.889 2	1.667 7	98.1		
	0.509 3	0.798 7	0.889 2	1.656 9	96.5		

表2 样品含量测定结果($n=3, \mu\text{g}/\text{片}$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=3, \mu\text{g}/\text{tablet}$)		
样品批号	毛蕊花糖苷	淫羊藿苷
100301	29.6	408
090701	25.4	570
091101	44.3	623
090901	26.8	515
20080801	108.4	412

未加入。处方中含有鸡血藤原粉,笔者考虑采用鸡血藤对照药材进行鉴别。前两者先采用石油醚除去杂质,后采用乙酸乙酯提取后进行鉴别,而鸡血藤的鉴别又正好利用了上述石油醚提取液作为供试液,这样不但操作简便,并且节省了分析成品量和时间,同时阴性均无干扰,专属性好。

3.2 含量测定条件的选择

已有文献大多是针对抗骨增生片(丸)中淫羊藿苷进行含量测定研究,很少有毛蕊花糖苷含量的研究报道,更未见两者同时测定的研究^[7-10]。因甲醇提取样品中的毛蕊花糖苷和淫羊藿苷效果良好,所以选择双波长同时测定这两个成分,而流动相中加入0.1%甲酸溶液可以改善峰形^[11-15],但两者出峰时间相隔较远,所以采用梯度洗脱的方法,使出峰时间大大缩短。本试验含量测定方法简便快捷、结果准确、重复性好,可用于该制剂的质量控制。

参考文献

[1] 周军,刘晓海,宋亚玲,等.抗骨增生胶囊对大鼠骨性关节炎的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):145-147.
[2] 陈履平,李龙.抗骨增生胶囊治疗膝骨关节炎的临床[J].实用临床医药杂志,2010,14(15):98-100.
[3] 邹文孝,田维君,张春,等.抗骨增生片联合骨肽片治疗骨

氧氟沙星滴眼液的抑菌效力测定

李 昊^{1*}, 邹 宇¹, 张 帆², 张亚杰¹(1.辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036; 2.沈阳三生制药有限责任公司, 沈阳 110027)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0841-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.33

摘要 目的:建立测定氧氟沙星滴眼液抑菌效力的方法。方法:按照2015年版《中国药典》“抑菌效力检查法”项下要求,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、黑曲霉和白色念珠菌为试验菌,对氧氟沙星滴眼液样品进行菌落计数方法适用性试验,并按该试验确定的方法测定不同时间点的存活菌数,计算1 mL供试品中各试验菌所加的菌数及各间隔时间的菌数,并换算成lg值。结果:氧氟沙星滴眼液样品能达到“B”的抑菌效力标准。结论:采用该方法可有效判定氧氟沙星滴眼液的抑菌效力是否达标。

关键词 氧氟沙星滴眼液;菌落计数;抑菌效力检查法

Determination of Antibacterial Effect of Ofloxacin Eye Drop

LI Hao¹, ZOU Yu¹, ZHANG Fan², ZHANG Yajie¹(1.Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China; 2.Shenyang Sunshine Pharmaceutical Co. Ltd., Shenyang 110027, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of antibacterial effect of Ofloxacin eye drop. METHODS: According to the requirements in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition) “antibacterial effect test”, using *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans* as test bacteria, colonycount method suitability test was conducted for Ofloxacin eye drop samples, the verified method was used to determine the number of viable bacteria at each time point, calculate the bacteria number of 1 mL in the sample and the number of bacteria at each time point and convert to lg value. RESULTS: Ofloxacin eye drop sample can reach the standard of antibacterial effectiveness of the “B”. CONCLUSIONS: The method can effectively determine whether the antibacterial effect of Ofloxacin eye drop fits the standard.

KEYWORDS Ofloxacin eye drop; Colony count; Antibacterial effect test method

氧氟沙星滴眼液在临床上常用于细菌性结膜炎和角膜炎的治疗,具有良好的效果及安全性,能在较短时间内控制感染^[1]。而眼用制剂常为多剂量包装,需要加入抑菌剂抑制微生物的生长与繁殖,以保证产品的质量和疗效^[2]。抑菌剂通过干扰微生物的生长、繁殖和新陈

代谢过程发挥抑菌作用^[3]。氧氟沙星滴眼液虽为广谱抗菌药物,但是在生产、贮藏、运输以及反复使用和开启包装过程中,仍然有污染微生物的风险^[4],故亦需要加入抑菌剂。从2015年版《中国药典》开始,将“抑菌效力检查法”由以往的指导原则变为正式检查项目。本试验按照

质增生症 60 例[J]. 中国药业, 2012, 21(8): 93-94.

[4] 国家卫生部. 卫生部药品标准: 中药成方制剂: 第 7 册[S]. 北京: 化学工业出版社, 1993: 74-75.

[5] 国家食品药品监督管理总局. 国家药品标准[S]. WS3-B-1338-93-1.

[6] 刘湘豫, 彭词艳, 胡焰, 等. 抗骨增生片制备工艺及质量标准研究[J]. 中南药学, 2013, 11(8): 572-574.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 57-57.

[8] 杨立芳, 宋文著. 高效液相色谱法测定抗骨增生丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房, 2006, 17(18): 1420-1422.

[9] 杨小妹, 朱俊彦. 高效液相色谱法测定抗骨增生片中淫羊藿苷含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(4): 314-315.

[10] 刘淑姝, 张妮瑜, 辛秀, 等. 抗骨增生片定性定量方法研究[J]. 中南药学, 2014, 12(6): 574-575.

[11] 顾利红, 张莹. HPLC 测定护心胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(7): 1092-1094.

[12] 杨增明. HPLC 法测定淫羊藿苷含量研究[J]. 中国药品标准, 2008, 9(1): 143-144.

[13] 蒋桂平. 高效液相色谱法测定抗骨增生丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中南药学, 2008, 6(3): 322-323.

[14] 张贵财, 朱旭江, 杜兴, 等. HPLC 法测定兰州肉苁蓉中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国药事, 2010, 24(8): 801-803.

[15] 柴茂, 董诚明, 江道会, 等. 不同品种怀地黄中梓醇和毛蕊花糖苷的高效液相色谱法测定[J]. 中医学报, 2013, 28(5): 690-692.

* 主管药师, 硕士。研究方向: 微生物检验。电话: 024-31266313。E-mail: h-o-lee@163.com