

2.9 样品的体外释放度的评价 取溃结康片芯按拟定的包衣处方和工艺,制备3批 pH 依赖型溃结康结肠释药片,按2.4.1、2.4.2项所列方法测定各包衣片的释放度,以进一步评价该制剂制备工艺的可行性,试验结果见表1。结果表明,3批样品的释放特性均达到结肠定位释药的要求,且释放性能稳定,筛选的制剂工艺合理可行。

3 讨论

本实验以包衣法制备了 pH 和时间双重控制的溃结康对肠定位释药系统,体外释放度试验初步验证系统具有 pH 依赖性定位释药和缓释功能,同时为体内释放度试验打下基础。

本实验选择了将药物制成普通素片再进行包衣的方法,所用的丙烯酸树脂类包衣材料均为水分散体,

制备过程中不需加入有机溶剂,在实际生产中大大降低工作的危险性,有环保意义。且可操作性强,技术简单、成熟、无需特别设备,适合工业化大生产。

参 考 文 献

- [1] 欧阳钦.炎症性肠病发病机制与治疗研究的最新进展.中华消化杂志,2003,23(8):453-454
- [2] 郑红斌.溃疡性结肠炎全球发病情况比较.中华消化杂志,2001,21(4):242-243
- [3] 叶柏.溃疡性结肠炎症治管见.南京中医药大学学报,2005,21(4):266-268
- [4] 杨明,谢兴亮,马鸿雁,等.pH 依赖型愈肠宁结肠靶向片的制备及体内外释放评价.中草药,2006,37(5):680-684

(2007-02-01收稿)

高效液相色谱法测定灵芝孢子粉片中多糖含量的研究

钱一帆¹,张磊²,濮存海^{2*}

(1.南京中科药业有限公司,江苏南京 210008; 2.南京中山制药有限公司,江苏南京 210012)

摘要 目的:建立灵芝孢子粉片中多糖含量的 HPLC 测定方法。方法:采用 ShodexSH1011(苯)乙烯二乙烯苯共聚物键合磺酸基)糖柱,流动相 0.6% 硫酸溶液,检测波长 200 nm。结果:灵芝孢多糖在 0.25~8.00 mg/ml 范围线性关系良好, $r=0.9999$,平均加样回收率为 102.73% ($n=9$), $RSD=1.49\%$ 。结论:该方法简便快捷,无干扰,重复性好,可用于灵芝孢子粉片的质量控制。

关键词 灵芝孢子粉片;灵芝多糖;HPLC;含量测定

中图分类号: R286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4454(2007)08-1027-03

灵芝孢子粉片主要成分为灵芝孢子粉,系由灵芝孢子粉胶囊 [WS-5026(B-0026)-2004] 改剂型而成,具有健脾益气,养心安神功效。用于心脾两虚,病后体弱以及肿瘤患者的辅助治疗。其有效成分有灵芝多糖类、三萜类化合物等,其多糖的含量约 0.75%^[1],测定多糖含量常用硫酸蒽酮^[2]和硫酸-苯酚分光光度法^[3,4],上述方法误差较大、炒作比较繁琐。运用高效液相法测定多糖含量^[5,6]亦有报道,灵芝孢子粉制剂中运用高效液相色谱法测定多糖含量未见报道。本文选用高效液相色谱法为灵芝孢子粉片中灵芝多糖的含量测定建立了一种分离效率高、稳定性好、分析速度快的方法,为控制制剂质量提供了可靠的方法。经方法学考察,符合含量测定要求。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPO-10A vp 紫外可见检测器, N2000 色谱数据工作站, KQ-500DB 型数控超声波清洗器, 7725 六通进样阀。

D 无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110833-200302,共含量测定用);灵芝孢子粉片(南京中科药业有限公司,批号 20050301, 20050302, 20050303)硫酸分析纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱: ShodexSH1011(苯)乙烯二乙烯苯共聚物键合磺酸基)(8.00 mm × 300mm, 6 μm), 流动相:硫酸水(6:1000), 检测波长 200 nm, 流速 0.6 ml/min, 进样量 20 μl 柱温 30℃。在

作者简介:钱一帆,男,工程师,主要研究方向:中药质量标准和保健品开发。Tel 025-83608557。

*通讯作者:濮存海,男,高级工程师,主要研究方向:中药新药研究。Tel 025-52154693。

上述色谱条件, D 无水葡萄糖的保留时间为 4.987 min

2.2 供试品溶液与对照品溶液的制备 取本品 10 片,研细,取约 3.0 g 精密称定,置 50 ml 量瓶中,加流动相,置于 100℃ 水浴中 1 h 取出趁热滤过,取续滤液 2.0 ml 加入无水乙醇 8.0 ml 摇匀,放置 2 min 后,离心 (3000 r/min) 10 min 弃去上清液,沉淀物用 2.0 ml 流动相溶解后,置于 100℃ 水浴 1 h 冷却,滤过,即得。分别进行了水解时间的考察,结果见表 1。

表 1 水解时间的考察			
序号	溶剂	分钟	峰面积
1	0.6%硫酸	15	55787
2	0.6%硫酸	30	68967
3	0.6%硫酸	60	77913
4	0.6%硫酸	90	78725
5	0.6%硫酸	120	78136

结果 1 h 以上即可完全水解,故选择 1 h 作为水解时间点。

精密称定减压干燥 48 h 的 D 无水葡萄糖对照品 80.02 mg 置 10 ml 容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 ml 含 D 无水葡萄糖 8.02 mg 的溶液,滤过,即得。

对系统适应性进行了试验考察,结果见表 2。

表 2 系统适应性考察试验结果			
		保留时间 (min)	峰面积
柱温 (℃)	15	4.990	191949
	30	4.987	206042
	45	4.768	233536
流速 (ml/min)	0.4	7.373	309889
	0.6	4.987	208358
	0.9	3.278	141383

2.3 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液 5 ml 于 10 ml 容量瓶中稀释定容,依次用二倍稀释法配制的对照品溶液,照上述色谱条件,精密吸取 20 μl 注入液相色谱仪,连续进样 2 次,测定。以峰面积为纵坐标 (Y),以样品浓度为横坐标 (X),绘制标准曲线,得回归方程 $Y=36933X+237.59$,相关系数 $r=0.9999$,线性范围为 0.25-8.00 mg/ml 结果见表 3。

2.4 精密度试验 取同一样品 (批号 20050301) 供试液,连续进样 6 次,测得 RSD 值为 1.51% (n=6),符合试验要求。

表 3 标准曲线绘制试验结果			
序号	浓度 (mg/ml)	峰面积	平均峰面积
1-1	0.25	9632	9657
1-2		9682	
2-1	0.50	18753	18789
2-2		18824	
3-3	1.00	36821	37007
3-3		37193	
4-4	2.00	74819	73867
4-4		72914	
5-5	4.0	149274	148094
5-5		146914	
6-6	8.00	295123	295710
6-6		296296	

2.5 稳定性试验 取同一样品 (批号 20050301), 按 2.2 项方法制备,照上述色谱条件,精密吸取 20 μl 注入液相色谱仪,每隔 2.5 h 进样 1 次,测定供试液 12.5 h 的稳定性。其 RSD 值为 0.3%,符合实验要求。

2.6 重复性试验 取同一样品 (批号 20050301) 6 份,按 2.2 项方法制备,分别精密吸取 20 μl 连续进样 2 次,测得 RSD 值为 0.7%,符合试验要求。

表 4 药材含量测定结果					
药材批号	称样量 (g)	峰面积	平均峰面积	D 无水葡萄糖含量 (mg/g)	D 无水葡萄糖平均含量 (mg/g)
1号	1.0801	76822	75946	95.99	95.01
1号	1.0801	75070		93.80	
1号	1.0902	79812	76839	98.91	
1号	1.0902	73865		91.43	
2号	0.9241	141519	139583	206.98	197.50
2号	0.9241	137646		201.30	
2号	0.9434	135500	133240	194.10	
2号	0.9434	130979		187.62	
3号	1.0041	21239	21397	28.32	27.65
3号	1.0041	21555		28.74	
3号	0.9802	19150	19619	26.12	
3号	0.9802	20088		27.42	
4号	1.0801	109476	110171	136.92	137.43
4号	1.0801	110865		138.66	
4号	1.0202	104164	103527	137.91	
4号	1.0202	102890		136.22	

2.7 加样回收率试验 取同一样品 (批号 20050301) 9 份,加入一定量的对照品,按 2.2 项方法制备,即得。分别精密吸取 20 μl 注入高效液相色谱仪,连续进样 3 次,测定。计算平均加样回收率为 102.73%,其 RSD 值为 1.49%,符合实验要求。

表 5		十批样品含量测定结果			
样品批号	称样量 (g)	峰面积	D 无水 葡萄糖含量 (mg/g)	平均值 (mg/g)	D 无水葡萄 糖平均含量 (mg/片)
20050301	2.8921	94707	44.22	43.07	38.76
	2.8921	94840	44.28		
20050301	2.8201	93988	45.01	41.02	36.92
	2.8201	81031	38.79		
20050302	2.9499	88801	40.29	40.96	36.86
	2.9499	92019	42.12		
20050302	2.9801	89175	40.40	33.74	30.37
	2.9801	91108	41.28		
20050303	2.7131	81175	40.39	30.81	27.73
	2.7131	83448	41.52		
20050303	2.7199	84276	41.83	31.26	28.13
	2.7199	84276	41.83		
20050303	2.7199	80810	40.10	42.50	38.25
	2.8898	73717	34.42		
20050501	2.8898	71892	33.57	42.50	38.25
	2.9302	73537	33.87		
20050501	2.9302	71895	33.11	33.27	29.94
	2.9544	67687	30.89		
20050502	2.9544	66683	30.45	36.91	33.22
	2.8641	656756	30.97		
20050502	2.8641	65673	30.93	36.19	32.70
	2.8598	65796	31.03		
20050503	2.8598	64449	30.40	36.82	36.33
	2.7201	62040	30.76		
20050503	2.7201	66239	32.85	37.45	32.70
	3.0241	96118	42.92		
20050504	3.0241	94368	42.14	33.27	29.94
	2.9822	93687	42.42		
20050504	2.9822	93930	42.53	36.25	36.25
	2.7201	76862	38.14		
20050601	2.7201	74305	36.86	36.91	33.22
	2.7301	75779	37.46		
20050601	2.7301	71205	35.19	33.27	29.94
	2.7398	69590	34.27		
20050602	2.7398	68232	33.60	33.27	29.94
	2.7499	69257	33.98		
20050602	2.7499	63718	31.25	36.33	36.33
	3.1100	83505	36.25		
20050603	3.1100	84811	36.82	37.45	32.70
	3.0804	85457	37.45		
20050603	3.0804	79431	34.80	33.27	29.94
	3.0804	79431	34.80		

2.8 药材含量测定 取不同批号灵芝孢子粉药材约 1.0 g 精密称定,按 2.2 项方法依法制备,每次进样 20 μl 测定。结果见表 4。

四种不同批号的灵芝孢子粉药材因来源不同其含量有一定的差别,由于对灵芝孢子粉药材多糖含量没有现行的法定标准,生产中应制定内控标准,进行严格控制,其平均含量为 114.40 mg/g 下浮 20% 作为内控标准 91.52 mg/g。

2.9 样品含量测定 分别取 10 批 (批号 20050301, 20050320, 20050303, 20050501, 20050502, 20050503,

20050504, 20050601, 20050602, 20050603) 的样品 10 片,研细,取约 3.0 g 精密称定,按 2.2 项方法制备,即得。精密吸取供试品溶液 20 μl 注入,连续进样 2 次,测定,即得。结果见表 5。

由以上试验结果可见,该方法准确度较高,可用于样品的含量测定。10 批样品平均含量为 36.99 mg/g 且转移率为 84.28%。根据平均含量 33.29 mg/片,考虑药材及工艺可能引起含量的浮动,因此将样品平均含量下浮 20%,作为每片含量限度。成品含量限度确定为:即本品每片含灵芝多糖以 D 无水葡萄糖 (C₆H₁₂O₆) 计,不得少于 26 mg。

3 讨论

3.1 在流动相的选择上,曾考虑使用磷酸溶液,但水解多糖有一定困难,因此选用硫酸作为流动相。

3.2 在制备供试品溶液中发现,样品加入流动相 1 h 与 1.5 h 吸收峰面积接近,考虑省时,故选择 1 h 为最适水解时间。

3.3 在色谱柱的选择上,曾考虑用 TSK GEL G3000SWXL^[6] 和 PL apuagel OH MIXED^[5],前者需要匹配的预柱,后者需要示差折光检测器,经本实验证明,采用 Shodex SugarSH 1011 (苯乙烯二乙烯苯共聚物键合磺酸基) 色谱柱对灵芝多糖的含量测定灵敏度高,专属性好。本方法适合企业生产过程中以多糖为重要质量标准的产品质控及实验室中准确分析药品的多糖含量。

3.4 制剂所用辅料对硫酸 蒽酮和硫酸 苯酚分光光度法测定灵芝多糖的含量存在干扰,本方法结果表明辅料对测定无影响。

参 考 文 献

[1] 毛泉明,叶福媛,吴倩,等.栽培灵芝与灵芝孢子粉有效成分比较.药学实践杂志,1997,15(3):172-173.

[2] 白在贤,周雪梅,韩塔娜,等.破壁灵芝孢子粉中多糖的含量测定.中国民族医药杂志,2006,2(4):36-39.

[3] 刘敏,高岚.紫外分光光度法测定灵芝孢子粉胶囊中灵芝多糖含量.现代中药研究与实践,2005,19(4):34-35.

[4] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚 硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究.中国药学杂志,1996,31(9):550-553.

[5] 鲁萍,任莉,许爱华,等.HPLC 测定银杏外种皮多糖的分子质量及含量.中国中药杂志,2005,30(22):1749-1751.

[6] 陈芸芸,王伟,丁怡,等.SE-HPLC 测定太子神悦胶囊中多糖相对分子质量分布及含量.中国药学杂志,2005,40(7):540-542.

(2006-10-31 收稿)