

护肾康片质量标准研究

刘华钢*, 赖茂祥, 陆石英
(广西医科大学, 广西 南宁 530001)

[摘要] 目的: 探讨护肾康片质量控制方法。方法: 用薄层层析法(TLC 法) 鉴别其中绵萆藨、白花蛇舌草。用高效液相色谱法(HPLC 法) 测定绵萆藨中薯蓣皂苷元含量、白花蛇舌草中齐墩果酸含量。色谱条件为 lichrospher C₁₈ 柱, 流动相分别为甲醇-0.1% 磷酸(92: 8), 甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(87: 13: 0.04: 0.02), 检测波长为 201 nm, 205 nm。结论: 所用方法可用于护肾康片质量控制。

[关键词] 绵萆藨; 白花蛇舌草; 薯蓣皂苷元; 齐墩果酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)05-0010-03

护肾康片是用于治疗慢性肾衰的中药制剂, 方中含绵萆藨、白花蛇舌草等 4 味中药, 具有利尿消肿、化瘀降浊及增强机体免疫功能的作用。用于治疗急慢性肾炎、慢性肾功能衰竭等疾病。为了控制护肾康片的质量, 本文采用 TLC 法鉴别其中绵萆藨、白花蛇舌草; 采用 HPLC 法测定绵萆藨中薯蓣皂苷元含量、白花蛇舌草中齐墩果酸含量。据报道薯蓣皂苷元含量测定方法有比色法、薄层扫描法和高效液相色谱法^[1-3]。齐墩果酸含量测定的方法有薄层扫描法、高效液相色谱法^[4,5]。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); 8453 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦科技有限公司)。对照品: 薯蓣皂苷元(供含量测定用, 批号 1539-200001), 齐墩果酸(供含量测定用, 批号 0709-9803), 均由中国药品生物制品检定所提供。甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 绵萆藨的鉴别 取本品 10 片, 研细, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加 4mol/L 盐酸 50% 乙醇溶液 100 mL, 回流水解 5 h, 滤过, 弃去滤液, 滤渣水洗至中性, 烘干, 加石油醚(60~90) °C, 提取 3 次, 每次 1 h,

每次用量 60 mL, 滤过, 合并滤液, 蒸干。残渣用 10 mL 甲醇溶解作为供试品溶液。取薯蓣皂苷元对照品。加甲醇制成浓度为 0.04 mg/mL 对照品溶液。另取缺绵萆藨的护肾康片, 同法制成阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液 10 μL 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-丙酮(9: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 10% 硫酸乙醇溶液, 105 °C 烘 10 min 至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色斑点, 而阴性溶液在此位置上没有显相同颜色的斑点。结果见图 1。

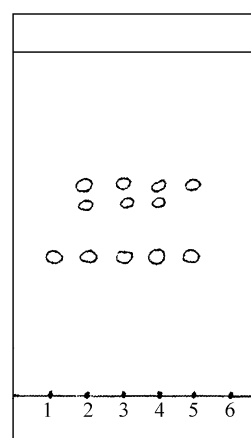


图 1 护肾康片及绵萆藨药材薄层色谱图

1 薯蓣皂苷元对照品; 2~4 3 批护肾康片样品(4 mol/L 盐酸 50% 乙醇); 5 绵萆藨药材; 6 阴性(缺绵萆藨)样品

2.1.2 白花蛇舌草的鉴别 取本品 10 片, 研细, 加甲醇超声处理 40 min, 放冷, 滤过, 滤液浓缩至 10 mL, 作为供试品溶液。另取齐墩果酸对照品, 加甲醇溶解制成浓度为 0.5 mg/mL 对照品溶液。另取缺白花蛇舌草的护肾康片, 同法制成阴性对照溶液。

[收稿日期] 2006-07-26

[通讯作者] * 刘华钢, Tel: (0771) 5350964; E-mail: hgliu@263.net

吸取上述3种溶液各10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-丙酮-醋酸乙酯(5:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷10%硫酸乙醇溶液,105℃烘10 min至斑点显红色。供试品色谱中在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,而阴性对照溶液在相应的位置上没有显相同颜色的斑点。结果见图2。

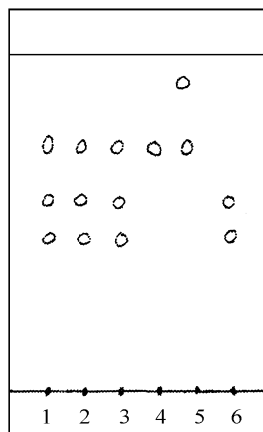


图2 护肾康片及白花蛇舌草药材薄层色谱图

1~3 3批样品;4 齐墩果酸对照品;5 白花蛇舌草药材;6 阴性(缺白花蛇舌草)样品

2.2 薯蓣皂苷元的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Lichrospher C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 以甲醇-0.1% 磷酸(92:8) 为流动相,检测波长 201 nm, 理论塔板数按薯蓣皂苷元计算大于2 500。

2.2.2 溶液的制备 对照品溶液的制备:精密称取薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成每1 mL 含 4.76 mg 的溶液,即得。

供试品溶液的制备:取本品10片,研细,置150 mL 圆底烧瓶中,加4 mol/L 盐酸50% 乙醇溶液60 mL,回流水解5 h,放冷,滤过,弃去滤液,滤渣水洗至中性,将沉淀转移至10 mL 量瓶中,加甲醇溶解滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液的制备:取缺绵萆薢、白花蛇舌草的护肾康片同法制成阴性对照品溶液。经过检测,阴性对照品在供试品相应的检测位置没有干扰。

2.2.3 线性关系的考察 精密量取上述浓度为4.76 mg/mL 制成一系列浓度的溶液(0.19, 0.29, 0.38, 0.48, 0.57 mg/mL) 分别精密吸取上述5种溶液10 μL,注入高效液相色谱仪,将所得的峰面积(Y) 作纵坐标,浓度(X) 作横坐标做回归计算,其相关系数, $r = 0.99991$, $Y = 8.787 \times 10^2 X + 13.07$, 薯蓣皂苷

元在(0.19~ 0.57) mg/mL 有良好的线性范围。

2.2.4 精密度的考察 精密称取同1批样品,按供试品制备方法制备成供试品溶液,连续进5针测定。平均峰面积5 276, RSD 为 1.32%, $n = 5$,说明精密度较高。

2.2.5 重复性实验 精密称取同1批样品1.0 g(5份) 按供试品制备方法制备成待测溶液,进行测定。平均峰面积5 299, RSD= 2.0%, $n = 5$,结果表明方法的重复性好。

2.2.6 稳定性实验 精密称取同一批样品,按供制实验制备方法制备成待测溶液,分别于0, 2, 4, 8, 10, 24 h, 进行测定。平均峰面积为5 254, RSD 为 2.1%, $n = 6$,结果表明样品在24 h 内稳定性较好。

2.2.7 加样回收率考察 精密称取已知含量的同1批样品0.5 g(共9份) 准确加入薯蓣皂苷元对照品溶液0.82 mg,按供试品制备方法制备成待测溶液,进行测定。平均加样回收率 101.0%, RSD= 2.9%, $n = 5$,结果说明样品加样回收率好,方法可行。结果见表1。

2.2.8 样品的含量测定 每批样品取10片成品,精密称定,研细,精密称取1 g,按供试品的制备方法制备。精密称取对照品溶液和供试品溶液各10 μL 注入高效液相色谱仪测定。结果见表2。

表1 薯蓣皂苷元加样回收率的实验结果

| 样品中含量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 加样回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| 1.60 | 0.82 | 2.40 | 97.56 | | |
| 1.61 | 0.82 | 2.47 | 104.9 | | |
| 1.60 | 0.82 | 2.41 | 98.78 | 101.0 | 2.9 |
| 1.62 | 0.82 | 2.46 | 102.4 | | |
| 1.60 | 0.82 | 2.43 | 101.2 | | |

表2 批护肾康片薯蓣皂苷元含量测定结果(mg·片⁻¹)

| 批号 | 测定值 | | | 平均值 |
|----------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 20040916 | 0.59 | 0.62 | 0.58 | 0.60 |
| 20040917 | 0.60 | 0.63 | 0.62 | 0.62 |
| 20040918 | 0.61 | 0.59 | 0.63 | 0.61 |

2.3 齐墩果酸的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Lichrospher C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 以甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(87:

13: 0.04: 0.02) 为流动相, 检测波长为 205 nm, 理论踏板数按齐墩果酸计算应大于 2 500。

2.3.2 溶液的制备 对照品溶液的制备: 精密称取齐墩果酸对照品适量, 用甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 5.44 mg/mL 的溶液, 备用。

供试品溶液的制备: 取护肾康成品研细, 约 1.0 g, 精密称定, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 加甲醇 40 mL, 超声处理 40 min, 放冷, 补足重量, 混匀。精密吸取上清液 5 mL, 用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶, 即得。

阴性对照品溶液的制备: 取缺白花蛇舌草的护肾康片, 同法制成阴性对照品溶液。经过检测, 阴性对照品在供试品相应的检测位置没有干扰。

2.3.3 线性关系考察 精密量取浓度为 5.44 mg/mL 对照品溶液配成一系列浓度 (0.544, 1.008, 1.632, 3.176, 2.72 mg/mL) 的溶液。吸取上述 5 种溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 进行测定, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 浓度 (X) 为横坐标作回归计算, 其相关系数 $r = 0.999\ 94$, 回归方程 $Y = 1.209 \times 10^2 X + 12.07$, 齐墩果酸标准品在 (0.544~ 2.72) mg/mL 有良好的线性范围。

2.3.4 精密度考察 精密称取同 1 样品 0.5 g, 按供试品制备方法制备成供试品溶液, 连续进 5 针测定, 平均峰面积 1 138, RSD 为 1.9%, $n = 5$, 说明精密度较高。

2.3.5 重复性实验 精密称取同 1 批样品 (6 份) 按供试品制备方法制备成待测溶液, 进行测定。平均峰面积为 1 152, RSD = 2.0%, $n = 5$, 结果表明方法的重复性好。

2.3.6 稳定性实验 精密称取同 1 样品, 按供试品的制备方法制备成待测溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 10, 24 h, 进行测定。平均峰面积为 1 534, RSD 为 1.6%, $n = 6$, 结果表明样品在 24 h 内稳定性较好。

2.3.7 加样回收率考察 精密称取的同 1 批样品 0.5 g (共 5 份) 准确加入齐墩果酸对照品溶液 4.00 mg, 按供试品制备方法制备成待测溶液, 进行测定。平均加样回收率 100.2%, RSD = 0.70%, $n = 5$, 结果说明样品加样回收率好, 方法可行。

2.3.8 样品含量测定 每批样品取 10 片成品, 精密称定, 研细, 精密称取 1 g, 按供试品的制备方法制备。精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 分别注入液相色谱仪中, 测定, 结果见表 4。

表 3 齐墩果酸加样回收率的实验结果

| 样品中含量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 加样回收率 (%) | 平均加样回收率 (%) | RSD (%) |
|------------|----------|----------|-----------|-------------|---------|
| 10.40 | 4.00 | 14.38 | 99.50 | | |
| 10.34 | 4.10 | 14.48 | 101 | | |
| 10.36 | 4.40 | 14.86 | 100.7 | 100.2 | 0.70 |
| 10.36 | 4.00 | 14.38 | 100.5 | | |
| 10.45 | 4.00 | 14.43 | 99.50 | | |

表 4 3 批护肾康片齐墩果酸的含量测定结果 (mg·片⁻¹)

| 批号 | 测定值 | | | 平均值 |
|----------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 20040916 | 0.29 | 0.28 | 0.31 | 0.29 |
| 20040917 | 0.30 | 0.32 | 0.29 | 0.30 |
| 20040918 | 0.32 | 0.31 | 0.28 | 0.30 |

3 讨论

试验中对薄层层析均采用对照品与对照药材同时对照, 以提高专属性, 结果比较满意。经紫外吸收扫描发现薯蓣皂苷元和齐墩果酸分别在 201 nm 与 203 nm 有最大吸收, 这与文献报道一致, 故采用 201 nm 和 205 nm 为检测波长。分别采用醇-水系统作流动相避免了缓冲液对色谱柱及泵的损害。加入少量冰醋酸, 可以在较短时间内得到良好的峰形。该方法的准确度和精密度均符合质量测定分析要求, 且样品提取方法简便, 易于操作, 可供制剂制订质量标准的参考。

[参考文献]

[1] 敖冬梅, 陈树和, 刘焱文. 比色法测定薯蓣丸中薯蓣皂苷元的含量[J]. 湖北中医杂志, 1999, 1(21): 121.

[2] 刘玉珍, 钱本余, 夏莉杰, 等. 蒺藜中薯蓣皂苷元的双波长薄层扫描定量法[J]. 中成药, 1992, 14(10): 35-36.

[3] 徐雄良, 张志荣, 柯尊洪. RP-HPLC 法测定穿山龙中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 885-887.

[4] 卢文彪. 薄层扫描法测定白花蛇舌草中齐墩果酸含量[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(11): 961-962.

[5] 邹盛勤, 冷桂华. 高效液相色谱法测定白花蛇舌草中齐墩果酸和乌索酸的含量[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1785-1787.