

文章编号: 1008-9926(2004)03-0186-03 中图分类号: R927.11 文献标识码: A

肾康口服液的质量标准研究

刘腊娥^①, 陈立新, 刘凌云, 代君

(中国人民解放军第163中心医院, 药剂科 湖南 长沙 410003)

摘要:目的 制订肾康口服液质量标准。方法 采用薄层色谱法(TLC)等, 对该制剂中黄柏、墨旱莲及总生物碱等进行定性鉴别; 高效液相色谱法, 对制剂中君药黄柏的有效成分盐酸小檗碱进行定量分析, 选用 Novapak C₁₈柱(2.5cm × 4.6mm, 5μm), 加 Novapak C₁₈预柱(2.5cm × 4.6mm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钠(20:35:45); 柱温 24℃; 检测波长 346nm; 流速 1.0ml/min。结果 采用 TLC 法鉴别, 专属性强, 含量测定盐酸小檗碱的线性范围为 4.00~20.00μg·ml⁻¹ (r = 0.9992), 平均回收率为 101.32%, RSD = 1.18% (n = 5)。结论 本文方法简便, 准确, 重现性好。可有效地控制该制剂的质量。

关键词: 肾康口服液; 盐酸小檗碱; 薄层色谱; 高效液相色谱

Study on Quality Standard of Kidney Health oral Liquid

LIU LaE, CHEN Li Xin, LIU Ling Yun, DAI Jun

(Department of Pharmacy, The 163th Hospital of PLA, Changsha 410003, Hunan China)

ABSTRACT: Aim To establish quality standard of Kidney health oral liquid. **Methods** The Cortex Pheudendri, Black lotus and total alkaloid were determined adopting TLC. The quantitative analysis of Berberine hydrochloride which is effective composition in Cortex Pheudendri was made using HPLC. The mobile phase was consisted of methanol- acetonitrile- 0.05mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate(20:35:45). Temperature was 24℃, measuring wavelength was 346nm and velocity was 1.0ml/min. **Results** This method has speciality with TLC. Linear range of berberine hydrochloride is 4.0 to 20.0μg·ml⁻¹ (r = 0.9992) by HPLC. The average rate of recovery is 101.32%, RSD = 1.18% (n = 5). **Conclusions** The results suggest that this method is simple, convenient and accurate on determining the nature and quality, which can be used to control the quality of this product.

KEY WORDS: Kidney Health Oral Liquid; Cortex Pheudendri; TLC; HPLC

肾康口服液为临床经验方, 由药剂科研制而成复方中药内服制剂。方中君药为黄柏, 臣药为墨旱

莲、白茅根等多味药材。具有清热燥湿, 凉血止血, 消肿利尿之功效。临床用于急性和慢性肾炎。本实

5 讨论

5.1 采用本法仅对三批活血通络口服液样品进行了含量测定, 故暂定每支口服液(10ml)黄芪甲苷含量不低于2.68mg。

5.2 本制剂为复方制剂, 成份复杂, 因此该试验采用氨试液洗后, 继用 D₁₀₁型大孔吸附树脂柱洗脱的方法, 有效地去除了水溶性色素成分, 采用饱和的正丁醇水洗至中性^[4], 有效地排除了背景干扰, 使薄层扫描含量测定更准确。

5.3 因无标准品, 在对川芎和当归的薄层鉴定中, 阴性无法排除干扰, 故在阴性中除去川芎和当归二味药材, 在同一薄层板上, 进行定性鉴别。

参考文献:

- [1] 赵如海, 杜劲松, 石静, 等. 双波长薄层扫描法测定胃安康口服液中黄芪甲苷和延胡索乙素的含量[J]. 解放军药学报, 1999, 15(5): 47
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 376, 434, 498
- [3] 谢景文, 马慧萍, 李茂星, 等. 薄层扫描法测定新新肝康片中五味子甲素和丹参酮 II_A 的含量[J]. 解放军药学报, 2000, 16(2): 96
- [4] 张春辉, 吴爱英, 杨小云, 等. 薄层扫描法测定养心氏片中黄芪甲苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(2): 91

(收稿日期: 2002-06-10; 修回日期: 2003-08-20)

(本文编辑 梁爱君)

^① 作者简介: 刘腊娥(1951-), 女, 湖南溆浦人, 副主任药师。研究方向: 药物分析及中药制剂学。Tel: (0731)-4569050, E-mail: lle163@21cn.com

验对方中黄柏、墨旱莲及总生物碱做了定性鉴别;应用 HPLC 法对该制剂中有效成分盐酸小檗碱进行含量测定。方法准确、重现性好,可有效地控制该制剂的内在质量。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 600 泵和控制器; 717 自动进样器; 486 检测器; PC800 色谱工作站(皆为美国 Waters 公司); 双量程电子分析天平(瑞士)。

对照品为盐酸小檗碱(中国药学生物制品检定所); 肾康口服液(本院生产, 批号 021026、021108、021224、030306、030512、030728); 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钠均为分析纯。

2 方法与结果

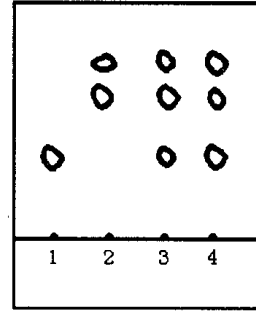
2.1 处方组成 本品由黄柏、白毛根、墨旱莲等多味中药组成按拟定处方制备成深棕色的肾康口服液。

2.2 鉴别试验

2.2.1 溶液的制备 (1) 对照品溶液 精密称取对照品盐酸小檗碱适量, 加甲醇溶解制成 $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液备用。(2) 阴性供试液 取处方药, 按肾康口服液生产工艺同法制备缺黄柏的阴性供试液及缺墨旱莲的阴性供试液备用。(3) 对照药材溶液 取对照药材墨旱莲按肾康口服液生产工艺同法制备对照药材溶液。(4) 供试液 取肾康口服液, 直接点样, 进行 TLC 试验。稀释后进行 HPLC 测定用。

2.2.2 鉴别 (1) 黄柏的鉴别^[1] 分别取供试液, 缺黄柏的阴性供试液, 对照品溶液适量分别置三支试管, 各加入乙醚(1:1) 分次提取二次, 分取醚层, 水浴蒸干。残渣加冰醋酸 1ml 溶解, 加浓 H_2SO_4 2~3 滴, 结果供试液与对照品溶液水层呈相同的紫棕色反应, 阴性供试液水层为无色。(2) 黄柏 TLC 鉴别^[2] 分别取供试液, 缺黄柏的阴性供试液, 对照品溶液适量, 用氯仿(1:1) 提取, 分取氯仿层。取上述氯仿提取液各 10 μl 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇-冰醋酸-水(6:3:1) 为展开剂, 展开, 晾干, 置紫外灯(365nm) 下检视, 结果供试液在与对照品溶液色谱相应位置上显相同的黄色荧光斑点(R_{f} 小檗碱= 0.58), 阴性供试液与其相应位置无显色斑点, 见图 1。(3) 墨旱莲的鉴别 分别取供试液, 缺墨旱莲的阴性供试液, 对照药材溶液适量点于同一定性滤纸, 待干后置紫外灯(365nm) 检视, 结果供试液与对照药材溶液均显相同的天蓝色荧光。加稀盐酸酸化, 边缘均呈

淡蓝色荧光, 氨熏后, 边缘显浅紫色荧光, 中心为黄色荧光, 阴性供试液无天蓝色荧光。



1 对照品 2 阴性样品 3、4 样品

图1 盐酸小檗碱 TLC 图

Fig 1 Chromatograms of TLC for Berberine Hydrochloride and Samples

(4) 总生物碱的鉴别^[1] 取本品适量分别置三支试管中, 一管加碘化铋钾试液 1~2 滴, 发生橙红色沉淀, 一管加碘化汞钾试液 1~2 滴, 发生褐白色沉淀, 另一管加硅钨酸试液 1~2 滴, 发生灰白色沉淀。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件及系统适应性 色谱柱 Novapak C_{18} (2.5cm \times 4.6mm, 5 μm), Novapak C_{18} 预柱(2.5 \times 4.6mm); 流动相为甲醇-乙腈-0.05mol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钠(20:35:45); 流速为 1.0ml/min; 检测波长为 346nm; 检测灵敏度为 0.01AUFS; 柱温 24 $^{\circ}\text{C}$; 拖尾因子为 1.02, 理论板数按盐酸小檗碱峰计大于 15 000。

2.3.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液制备 精密称取盐酸小檗碱约 4mg 置 100ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 备用。

(2) 供试液的制备 精密吸取肾康口服液 2ml 置 10ml 量瓶中, 加甲醇至近刻度, 超声 30min, 立即冷却, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即为供试品溶液。

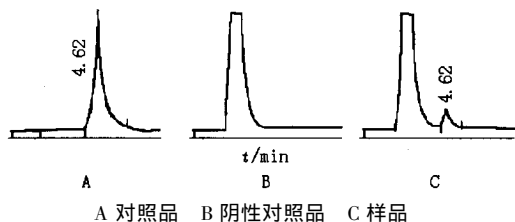
(3) 阴性供试液溶液的制备 精密吸取缺黄柏的阴性备用溶液 2ml, 按“2.3.2”项下制备阴性溶液。

2.3.3 方法的专属性试验 精密吸取盐酸小檗碱对照品备用稀释液、样品供试液及阴性溶液各 20 μl , 依法测定, 结果见图 2。由图 2 可见本品供试液与小檗碱对照品 4.62min 处显相同的色谱峰, 而阴性溶液在此不干扰。说明方法专属性强。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液 1、2、3、4、5ml, 置 10ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 进样 20 μl , 测定盐酸小檗碱峰面积。以盐酸小檗碱浓度为横坐标, 峰面积值为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为

$$C = 1.2616 + 8.1821 \times 10^{-6}A, r = 0.9992$$

结果表明, 盐酸小檗碱浓度在 4. 0~ 20. 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。



A 对照品 B 阴性对照品 C 样品
图 2 盐酸小檗碱及样品的 HPLC 图

药材的鉴别具有较强的专属性, 为今后该药材的质量控制提供了依据。

3.2 波长的选择 对照品盐酸小檗碱供试液在 200~ 600nm 处扫描, 结果最大吸收为 267. 6nm, 在 346nm 处亦有一吸收峰, 但实验证明样品在 267. 7nm 波长处干扰大, 而在 346nm 波长处样品中盐酸小檗碱能有效分离, 故选择该波长处为测定波长。

3.3 流动相的选择 流动相的比例参考文献报道^[3~7]均不能使本制剂中盐酸小檗碱的有效成分得以分离。本实验将流动相甲醇- 乙腈- 0. 05mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠经反复调整为 20: 35: 45, 结果该制剂中的主要成分盐酸小檗碱得到了有效分离, 保留时间明显缩短。

3.4 样品的处理 样品预处理用氯仿萃取挥发后残渣用甲醇溶解, 超声 30min, 滤过, 取续滤液进样, 结果含量测得值很低, 样品的平均回收率仅为 76. 23%。本实验用甲醇直接提取, 结果测得对照品的平均回收率为 99. 23%, 样品平均回收率为 101. 32% (n = 5), 结果准确, 含量重现性好。

3.5 本实验根据多批样品含量测得结果并结合临床疗效观察, 认为该制剂每毫升含盐酸小檗碱($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_4\cdot\text{HCl}$) 应不得少于 80 μg , 其量化指标明确可控, 且定性鉴别灵敏、专属性强、方法简便。

3.6 检查试验 经测定本品相对密度 1. 05~ 1. 15, pH5. 0~ 6. 0, 其它均符合中国药典 2000 年一部附录合剂项下各有关规定。

3.7 制剂稳定性观察 取本品三批样品(批号 030215、030318、030426) 留样观察一年, 每三个月测定一次含量、pH 值、相对密度等。结果基本无变化。

参考文献:

[1] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海: 科技出版社, 1996. 310, 496
 [2] 肖宗厚. 中药提取鉴定原理[M]. 上海: 科技出版社, 1983. 148
 [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 251, 373, 399, 463, 470, 545
 [4] 许丽杰, 黄庆柏. HPLC 法测定静灵口服液中含盐酸小檗碱的含量[J]. 药物分析杂志, 1995, 15(4): 38
 [5] 王玉杰, 朱红, 王大威, 等. RP-HPLC 法测定中药材黄柏中小檗碱的含量[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(7): 425
 [6] 黎小伟, 黄淑彰. HPLC 法测定连蒲双洁片盐酸小檗碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 25(2): 171
 [7] 李宝明, 何丽一. 高效液相色谱法测定制霉灭滴胶胶囊盐酸小檗碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 20(2): 171

(收稿日期: 2004- 03- 08; 修回日期: 2004- 04- 08)

(本文编辑 王绪明)

Fig 2 Chromatograms of HPLC for Berberine Hydrochloride and Sample

2.3.5 精密度试验 精密吸取对照品稀释液, 分别重复进样 5 次, 对照品中盐酸小檗碱峰面积值的 RSD 为 0. 67% (n = 5)。

2.3.6 重复性试验 取同一批号(030512) 供试液 5 份, 每份 2ml, 测定盐酸小檗碱的峰面积, 并计算盐酸小檗碱含量, 结果平均含量为 98. 72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 为 1. 02% (n = 5), 结果表明重现性良好。

2.3.7 稳定性试验 取同一浓度的对照品溶液和同一批号的供试品溶液每隔 1h 测定一次含量, 共测定 6 次, 结果表明对照品溶液和供试品溶液均在 6h 内稳定。

2.3.8 加样回收率试验 精密吸取已知浓度的供试品溶液(批号 030512) 2ml, 共 5 份, 分别精密加入对照品溶液 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1ml), 按拟定方法测定, 计算回收率。结果平均回收率为 101. 32%, RSD 为 1. 18% (n = 5)。

2.3.9 含量测定结果 精密吸取不同批号的肾康口服液 2ml, 按“2.3.3”项下同法制备供试液依法测定, 按外标法计算肾康口服液中盐酸小檗碱含量, 结果见表 1。

表 1 肾康口服液样品中小檗碱的含量测定结果 (n = 5)

Tab 1 Determination results of contents in samples (n = 5)

批号	$\bar{x}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD (%)
021026	85. 36	0. 72
021108	79. 88	0. 59
021224	102. 20	0. 43
030306	92. 52	0. 62
030512	98. 14	0. 31
030728	94. 35	0. 29

3 讨论

3.1 本实验发现该制剂的样品供试液直接点于定性滤纸上干后, 置紫外灯(365nm) 下检视呈明显的天蓝色荧光。本实验将方中药材逐一排除, 其天蓝色荧光确定为墨旱莲所具有的特征。实验证明缺墨旱莲的阴性对照液无天蓝色荧光特征。因此, 墨旱莲