

· 研究报告 ·

乌金胶囊的质量标准研究

李 洋, 孙 森, 王 慧, 张国庆, 张 海 (第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

[摘要] **目的** 建立乌金胶囊的质量控制方法。**方法** 采用薄层色谱(TLC)法对乌金胶囊中的臣药郁金和使药山楂进行定性鉴别;采用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法测定乌金胶囊中通关藤苷 H 的含量,色谱柱:Waters Xbridge C₁₈柱(100 mm×3.0 mm, 3.5 μm),柱温:35 ℃,流动相为水-乙腈(50:50),等度洗脱;流速为0.8 ml/min;采用ELSD检测器进行检测,蒸发器温度:35 ℃,雾化器温度:60 ℃,氮气流速:1.50 L/min,运行时间:5 min。**结果** TLC法鉴别郁金、山楂,色谱斑点清晰,阴性样品无干扰;通关藤苷 H 出峰时间为2.98 min,且在11.60~580.00 μg/ml范围内线性关系良好($r=0.9990$),加样回收率为101.54%。**结论** 本实验建立的 TLC法鉴别郁金、山楂,操作步骤简单;建立的 HPLC-ELSD联用方法专属性强,灵敏度高,重复性好,可作为乌金胶囊质量控制的方法。

[关键词] 乌金胶囊;郁金;山楂;薄层色谱;通关藤苷 H

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)05-0438-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.012

Study on quality standard of Wujin capsules

LI Yang, SUN Sen, WANG Hui, ZHANG Guoqing, ZHANG Hai (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To establish the qualitative and quantitative analytic method for quality control of Wujin capsules. **Methods** *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling and *Crataegus pinnatifida* Bge. in Wujin capsules were identified by TLC method. The content of tenacissoside H was determined by HPLC. Chromatographic separation was achieved at Waters Xbridge C₁₈ column (100 mm×3.0 mm, 3.5 μm) with an evaporative light scattering detector (ELSD). Acetonitrile and H₂O were used as the mobile phase for isocratic elution. **Results** The qualitative identification by TLC was specific. The well separated clear spots were exhibited on each thin layer plate. Tenacissoside H had a linear equation in the range of 11.60-580.00 μg/ml ($r=0.9990$). The average recovery was 101.54%. **Conclusion** The TLC identification of *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling and *Crataegus pinnatifida* Bge. was simple and well established. The HPLC-ELSD method was specific, sensitive and reliable. Those methods can be used for the quality control of Wujin capsules.

[Key words] Wujin capsules; *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling; *Crataegus pinnatifida* Bge.; TLC; tenacissoside H

乌金胶囊为第二军医大学附属东方肝胆外科医院经验方,由乌骨藤、郁金、黄芪、延胡索、山楂五味中药组成,用于治疗痈肿疔毒、痰湿积聚、血淤气滞、胸胁胀痛及肝癌。其君药乌骨藤,主要化学成分为皂苷类,具有抗癌、散结止痛等功效^[1]。以该中药为主要成分的制剂(如消癌平注射液、消癌平糖浆、消癌平胶囊、消癌平片),在临床已广泛用于肺癌、肝癌

等的治疗^[2-4]。臣药郁金,主要化学成分为倍半萜类、姜黄素类及生物碱等^[5],具有保护肝细胞、促进肝细胞再生、抗肿瘤、抗菌、抗氧化、降血脂等多种作用^[6,7]。山楂在复方中多作为使药,含有黄酮类、三萜类及有机酸类等多种成分,具有降血脂、保肝、降压、抗肿瘤作用^[8]。

本课题组前期已对制剂中的通关藤苷进行高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法含量测定,对黄芪中毛蕊异黄酮进行高效液相色谱-紫外分光光度(HPLC-UV)法含量测定,同时也采用薄层色谱(TLC)法鉴定出了黄芪中黄芪甲苷及延胡索中延胡索乙素。目前,课题组对乌金胶囊传统制法进行工艺调整,采用先进的科学技术,如超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法(UHPLC-TOF/MS)实

[基金项目] 军队医疗机构制剂标准提高计划科研专项课题(14TG0699)

[作者简介] 李 洋,硕士,药师.研究方向:药物分析与临床药学. Tel: (021) 81875579; Email: 18601668214@126.com

[通讯作者] 张 海,博士,副主任药师.研究方向:基于ADME和作用靶点的药效物质筛选. Email: zhxdks2005@126.com

时监测乌金胶囊中主要化学成分的含量。本研究在调整传统制法的基础上,对乌金胶囊中通关藤苷 H 进行 HPLC-ELSD 含量测定,对郁金和山楂中主要成分莪术二酮^[9]和绿原酸^[10]进行 TLC 鉴别,旨在对乌金胶囊生产工艺的改进、质量控制的优化及临床运用提供更为全面的研究基础和技术支持。

1 实验材料

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、蒸发光散射检测器、Chem Station B 02.01 色谱工作站(安捷伦科技有限公司);METTLER AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);SB 3200-T 超声发生器(上海科导超声仪器公司)。

1.2 试剂 乌金胶囊(批号:20160401、20160501、20160601)由本院制剂室提供。标准品通关藤苷 H(批号:191729-45-0)、莪术二酮(批号:111800-201302)、绿原酸(批号:327-97-9)均由中国食品药品检定研究院提供。甲醇和乙腈(美国 Merck 公司)均为色谱纯,甲酸(SIGMA 公司)为色谱纯,石油醚、乙酸乙酯等为化学纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 郁金的薄层鉴别 取乌金胶囊 2 g(批号:20160501),加二氯甲烷 25 ml,超声提取 30 min,过滤,滤液置蒸发皿内蒸干,残渣加 1 ml 甲醇使溶解,制成供试品溶液,取缺郁金药材的其他中药饮片,根据处方制得膏滋,按照供试品溶液的制备方法制得阴性样品溶液,另取莪术二酮对照品,加甲醇制成浓度为 1 mg/ml 的溶液,作为对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液 5、5、2 μ l,分别点于同一块硅胶 HSG_{F254} 高效预制薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯(12:1)为展开剂,饱和 15 min,展开,晾干,挥干溶剂,喷以对二甲氨基苯甲醛试液,105℃加热至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上,显相同颜色的黄色斑点(图 1)。

2.1.2 山楂的薄层鉴别 取乌金胶囊 2 g(批号:20160501),加水 10 ml,超声处理 30 min,加稀盐酸调节 pH 值至 1~2,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用乙酸乙酯 30 ml 振摇提取,乙酸乙酯蒸干,残渣加乙酸乙酯 1 ml 使溶解,制成供试品溶液。取缺山楂的其他中药饮片,依据处方和制法制得膏滋,按照供试品溶液的制备方法制得阴性样品溶液,另取绿原酸对照品,加乙醇制成浓度为 1 mg/ml 的溶

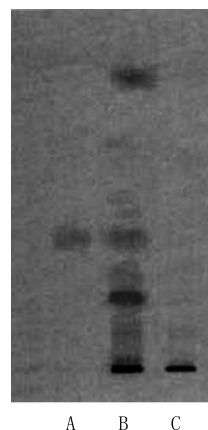


图 1 乌金胶囊中莪术二酮的 TLC 图
A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性样品溶液

液,作为对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液 5、5、2 μ l,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以乙酸乙酯-甲醇-甲酸(8:1:1)为展开剂,展开,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点(图 2)。

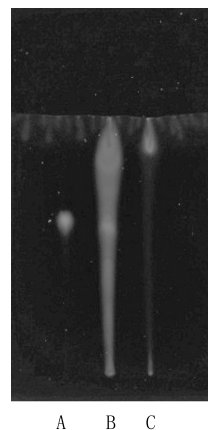


图 2 乌金胶囊中绿原酸的 TLC 图
A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性样品溶液

2.2 HPLC-ELSD 法测定通关藤苷 H 的含量

2.2.1 色谱条件 采用 Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 3.5 μ m),进样量为 10 μ l,流动相为水-乙腈(50:50),流速:0.8 ml/min,柱温:35℃;采用 ELSD 检测器进行检测,蒸发器温度:35℃,雾化器温度:60℃,氮气流速:1.50 L/min,运行时间:5 min。

2.2.2 样品溶液的制备 取本品装量差异项下的胶囊内容物,混匀,精密称取 1.061 g,置 50 ml 具塞锥形瓶中,甲醇溶解,密塞,称定重量,超声处理(50 kHz,120 W)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减少的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 除通关藤药材饮片外,取剩余四味药材饮片,按处方工艺制备阴性对照

样品,并按“2.2.2”项下条件制备阴性对照溶液。

2.2.4 对照品溶液的制备 精密称取通关藤苷 H 标准品 14.50 mg,置 25 ml 棕色容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 580.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准品储备液;加甲醇逐级稀释,依次配制成浓度分别为 580.0、232.0、116.0、58.00、23.20、11.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列标准溶液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

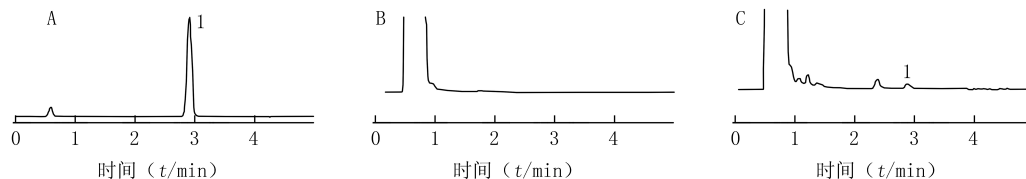


图 3 通关藤苷 H 的 HPLC 图

A. 对照品溶液 (116.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$); B. 阴性对照溶液; C. 样品溶液; 1. 通关藤苷 H

性对照无干扰。

2.2.7 标准曲线及线性范围 取不同浓度系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样。每个浓度点平行进样 3 针,以通关藤苷 H 溶液浓度的对数为横坐标 (X),通关藤苷 H 色谱峰面积的对数值为纵坐标 (Y) 进行线性回归,线性方程: $Y = 1.696 X - 1.424$, $r = 0.999 0$ 。结果表明,通关藤苷 H 在 11.60~580.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性关系良好。

2.2.8 定量限和检测限 将低浓度对照品溶液多次稀释,按“2.2.1”项下色谱条件进样,以信噪比 = 10 ($S/N = 10$) 为最低定量限,结果显示该方法的定量限为 11.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$,检测限为 3.867 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.2.9 日内和日间精密度的 取低、中、高 3 个浓度 (23.20、116.0、580.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 对照品溶液,在 1 d 内连续进样 3 次,以及连续 3 d 分别进样,根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。结果显示,日内精密度 $< 2\%$,日间精密度 $< 3\%$ 。

2.2.10 重复性试验 精密称取同一批号乌金胶囊样品,共 6 份,按“2.2.2”项下方法制备样品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。通关藤苷 H 的平均含量为 1.79 mg/g (RSD 为 0.92%, $n = 6$),结果表明该方法的重复性良好。

2.2.11 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备样品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定样品溶液中通关藤苷 H 的含量,考察样品常温放置的稳定性,通关藤苷 H RSD 为 1.72% ($n = 6$),结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.12 加样回收率试验 取乌金胶囊粉末 0.5 g,平行操作 6 份,分别加入一定量的标准品 (相当于样

2.2.5 系统适用性试验 取“2.2.4”项下浓度为 116.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,得通关藤苷 H 的 HPLC 图,见图 3A,通关藤苷 H 的保留时间为 2.98 min,色谱峰对称性为 0.96,塔板数 $> 3 000$ 。

2.2.6 专属性试验 取阴性对照溶液及样品溶液进样,记录色谱图 (图 3B、3C)。结果表明,通关藤苷 H 色谱峰与其他各成分色谱峰得到较好的分离,阴

品中通关藤苷 H 含量的 100%),按“2.2.2”项下方法制备样品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,结果通关藤苷 H 的平均加样回收率为 101.54% (RSD 为 1.33%, $n = 6$)。结果表明该方法回收率良好 (表 1)。

表 1 加样回收率测定结果 ($n = 6$)

称取量 (m/g)	原有量 (m/ μg)	加入量 (m/ μg)	测得量 (m/ μg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
0.5251	949.21	950.00	1 895.63	99.62	101.54	1.33
0.5351	948.56	950.00	1 899.65	100.11		
0.5125	946.87	950.00	1 921.54	102.60		
0.5541	951.20	950.00	1 918.36	101.81		
0.5235	945.38	950.00	1 922.54	102.86		
0.5211	944.25	950.00	1 915.25	102.21		

2.2.13 样品含量测定 取 3 个批号乌金胶囊各 2 粒,去壳取内容物,混合均匀,置 50 ml 锥形瓶中,按“2.2.2”项下方法操作,另按“2.2.4”项下配制标准曲线溶液,分别取上述溶液 10 μl 注入 HPLC 仪,记录峰面积,将样品峰面积代入标准曲线方程,计算供试品溶液的含量,测定结果见表 2。

表 2 通关藤苷 H 含量测定结果

批号	样品称量 (m/g)	测得含量 (mg/g)	平均含量 (mg/粒)	RSD (%)
20160401	1.060 9	1.78	0.89	0.62
20160501	1.027 5	1.77		
20160601	1.031 5	1.79		

警惕。

【参考文献】

- [1] 谭曼红,姜春燕,罗佳. 雷贝拉唑致免疫介导性药物性肝损伤1例[J]. 肝脏,2014,16(2):175-176.
- [2] 中华医学会肝病学会药物性肝病学组. 药物性肝损伤诊治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(11):810-820.
- [3] Johnstone D, Berger C, Fleckman P, *et al.* Acute fulminant hepatitis after treatment with rabeprazole and terbinafine [J]. Arch Intern Med, 2001,161:1677-1678.
- [4] Zaccardi F, Pitocco D, Martini L, *et al.* A case of esome-

prazole-induced transient diabetes and hepatitis: the role of liver inflammation in the pathogenesis of insulin resistance [J]. Acta Diabetol, 2014, 51: 151-153.

- [5] 董东方,王群英,钟慧闽. 埃索美拉唑致肝功能异常1例[J]. 山东医药,2008,48(4):21.
- [6] Gomez MR, Otero MA, Fobelo MJ, *et al.* Acute hepatitis related to omeprazole [J]. Am J Gastroenterol, 1999, 94(4): 1119-1120.

[收稿日期] 2016-12-15 [修回日期] 2017-03-25

[本文编辑] 顾文华

(上接第440页)

3 讨论

3.1 薄层鉴别 在乌金胶囊郁金的 TLC 鉴别中,课题组考察了不同的提取溶剂(石油醚、二氯甲烷、甲醇),不同的提取方法(超声提取、回流提取),不同的展开系统(石油醚-乙酸乙酯、环己烷-丙酮、甲苯-丙酮),不同薄层板(HSG_{F254}、SG_{F254}、硅胶G板),不同显色剂(10%硫酸乙醇溶液、10%磷钼酸乙醇溶液、对二甲氨基苯甲醛试液)对结果的影响,发现以二氯甲烷为提取溶剂,超声提取30 min,以石油醚-乙酸乙酯(12:1)展开于HSG_{F254}薄层板上效果最佳,选择对二甲氨基苯甲醛试液显色效果最好。

在乌金胶囊山楂的 TLC 鉴别中,课题组首先考察了熊果酸的鉴别,发现并不适合。而后改对山楂中水溶性酚酸类成分绿原酸进行鉴别。考察了50%甲醇和水2种提取溶剂,超声处理和回流提取两种方法,结果发现以水提,调节酸性,再用乙酸乙酯萃取的前处理较佳。同时考察了不同的薄层板(硅胶G板、硅胶H板、聚酰胺薄膜),以聚酰胺薄膜效果最好。

3.2 色谱条件 课题组考察了不同色谱柱、不同流动相,以及蒸发光散射检测器的实验参数,以 Waters Xbridge C₁₈为色谱柱,水-乙腈(50:50)为流动相,蒸发器温度:35℃,雾化器温度:60℃,氮气流速:1.50 L/min效果最佳。

3.3 乌金胶囊制剂的工艺改进 乌金胶囊是以君臣佐使组合进行配伍的抗癌经验方,课题组在考察传统工艺时,其君药有效成分含量并不高,因此对制

剂工艺进行调整,如以水煎法单独提取通关藤药材,经考察发现不同批次的通关藤苷H平均含量达到890 μg/粒。

4 结论

通过 TLC 法鉴别郁金中莪术二酮、山楂中绿原酸,HPLC-ELSD法测定通关藤中通关藤苷H的含量,填补了原乌金胶囊质量标准缺郁金和山楂薄层鉴别,以及通关藤苷H含量测定的空白。

【参考文献】

- [1] 张颖. 中药通关藤研究进展概况[J]. 研究进展,2008,5(27):15-16.
- [2] 赵晓民,候伟,闫金玉,等. 消癌平注射液治疗急性白血病6例[J]. 中国中医急症,2007,16(1):105.
- [3] 成冠篮,孔令义,陈仓. 通关散化学成分和药理活性的研究进展[J]. 药学与临床研究,2009,17(2):135-138.
- [4] 沈利君,周建设,李晓誉,等. 乌骨藤总苷H的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(8):585-588.
- [5] 胡润淮,邵清松. 温郁金化学成分研究进展[J]. 时珍国医国药,2007,18(7):1773-1775.
- [6] 尹国平,张清哲,安月伟,等. 温郁金化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,(22):3354-3360.
- [7] 朱晶晶,张清哲,王智民,等. 郁金质量标准研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2016-2018.
- [8] 吴士杰,李秋津,肖学风,等. 山楂化学成分及药理作用的研究[J]. 药物评价研究,2010,33(4):316-319.
- [9] 汤淙淙,秦坤良,黄可新. 温郁金茎叶化学成分及抗肿瘤活性[J]. 温州医学院学报,2007,37(2):110-113.
- [10] 梁睿姝,张川,邹豪,等. HPLC法测定中药山楂中有效成分绿原酸的含量[J]. 药学实践杂志,2012,30(6):457-458.

[收稿日期] 2016-07-01 [修回日期] 2016-11-16

[本文编辑] 顾文华