

· 研究报告 ·

昆仙胶囊的质量标准提升研究

许春芳¹, 李泽璇¹, 邹洛颖¹, 张 倪^{1,2}, 杨 宏¹, 陶 霞¹ (1. 海军军医大学第二附属医院药剂科, 上海 200003; 2. 徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221000)

【摘要】 目的 提升昆仙胶囊质量标准, 以有效地控制产品质量。**方法** 以雷公藤甲素、淫羊藿苷、金丝桃苷为指标性成分, 增加或改进昆明山海棠、淫羊藿及菟丝子的薄层鉴别方法; 以 Agilent ZORBA SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 以 220 nm 为检测波长, 改良雷公藤甲素的 HPLC 含量测定方法。**结果** 昆明山海棠、淫羊藿及菟丝子的 TLC 法鉴别专属性强, 特征斑点分离度良好、清晰, 阴性无干扰; 定量分析结果显示雷公藤甲素的质量浓度在 40.16 ~ 502.00 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r=0.999\ 5$), 平均加样回收率为 98.12%, RSD 为 8.25%, 准确度良好。**结论** 本实验所建立的 TLC 鉴别方法和 HPLC 含量测定方法专属性强、重现性好, 能有效地控制昆仙胶囊的质量。

【关键词】 昆仙胶囊; 薄层色谱法; 雷公藤甲素; 高效液相色谱法; 质量标准

【中图分类号】 R917 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2022)02-0152-05

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202106102

Improvement of the quality standard for Kunxian capsules

XU Chunfang¹, LI Zhexuan¹, ZHOU Luoying¹, ZHANG Ni^{1,2}, YANG Hong¹, TAO Xia¹ (1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 2. School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China)

【Abstract】 Objective To improve the quality standards of Kunxian capsules (KC) and effectively control the product quality. **Methods** Triptolide, icariin and hypericin were used as the indicator components, to increase or improve the thin layer chromatography (TLC) identification methods of Kunming begonia, epimedium and dodder. Agilent ZORBA SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) as a chromatographic column, the HPLC method for the determination of triptolide was improved with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase and 220 nm as the detection wavelength. **Results** The spots in the TLC method of Kunming begonia, epimedium and dodder has strong specificity, good and clear separation of characteristic spots, negative and no interference. The quantitative analysis of the content of triptolide in KC showed that there is a good linear relationship ($r=0.999\ 5$) between the mass concentration of triptolide and the peak area in the range of 40.16-502.00 μg/ml, the average recovery was 98.12%, RSD was 8.25%, and the accuracy was good. **Conclusion** The TLC identification method and HPLC method established in this experiment have strong specificity and good reproducibility, and can effectively control the quality of KC.

【Key words】 Kunxian capsules; TLC; triptolide; HPLC; quality standards

昆仙胶囊是由昆明山海棠、淫羊藿、枸杞子、菟丝子四味中药组成的复方制剂, 是国家“九五攻关”项目成果转化的中药六类新药, 具有细胞因子拮抗、免疫抑制、抗炎镇痛等作用, 临床上用于风湿性关节炎等免疫性疾病的治疗, 疗效显著^[1-5], 这可能与各单味药材中富含生物碱、萜类及黄酮类等多种抗炎镇痛的化学成分密切相关^[6-9]。雷公藤甲

素为君药昆明山海棠中的二萜内酯类毒性效应成分, 且有效剂量和中毒剂量极为相近^[10-11], 因此, 为保证患者用药的安全性及有效性, 有必要对昆仙胶囊中雷公藤甲素的含量进行限定。目前, 昆仙胶囊现有的质量控制标准中仅对组方中的淫羊藿和枸杞子进行薄层鉴别, 含量测定项下则监测雷公藤甲素和淫羊藿苷的含量, 但通过实验发现雷公藤甲素的含量测定方法仍然存在前处理方法复杂, 含量低, 重现性及检测成分专属性差等亟待改进的问题, 同时, 原检验项目的设置也不够全面, 难以对昆仙胶囊实现整体性质量控制。因此, 本实验采用薄层色谱法补充建立方中所有药味的薄层鉴别方法,

【基金项目】 国家重点研发项目(2018YFC1707300)

【作者简介】 许春芳, 硕士, 药师, 研究方向: 中药活性成分、中药质量控制与心血管药理, Email: 215190465@qq.com

【通信作者】 陶 霞, 博士, 教授, 研究方向: 药物经济学、心血管药理学、中药质量控制研究, Email: taoxia2003@126.com

并改良了昆仙胶囊中微量毒效成分雷公藤甲素的含量测定方法,为提升该制剂的质量标准研究提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Linomat-VI 薄层色谱自动点样器、Reprostar3 薄层色谱摄影仪(瑞士 CAMAG 公司);Agilent1260 高效液相色谱仪,包括输液泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);BP211D 十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-250DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药

雷公藤甲素(含量:99.8%,批号:111567-201404)、淫羊藿苷(含量:94.2%,批号:111737-01516)、金丝桃苷(含量:94.9%,批号:111521-201809)对照品,以及对照药材:昆明山海棠(批号:121203-201503)、淫羊藿(批号:121632-201502)、菟丝子(批号:121232-201403)均购自中国食品药品检定研究院;21 批昆仙胶囊以及各阴性样品均由广州白云山陈李济药厂有限公司提供,胶囊的批号分别为:K31002、K31005、K31006、K31007、K31008、K31009、K31010、K31011、K31012、K31013、K31014、L31001、L31002、L31003、L31004、L31005、L31006、L31007、L31008、L31009、J31002,分别编号为 S1~S21。乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,水为杭州娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 昆明山海棠的薄层鉴别

取昆仙胶囊内容物 6 g,放入 500 ml 具塞锥形瓶中,加入 300 ml 甲醇,超声 30 min,过滤,将滤液减压浓缩至干,残渣加 40 ml 水溶解,二氯甲烷萃取 2 次,每次 40 ml,并于萃取过程中加 5 ml 饱和 NaCl 水溶液,合并二氯甲烷萃取液,减压浓缩至干,残渣加少量甲醇溶解,加 1 g 硅胶(200~300 目)拌样,称 4 g 硅胶装入直径为 2 cm 的柱子,上柱。先用 120 ml 石油醚-乙酸乙酯(3:1)洗脱,再以 120 ml 石油醚-乙酸乙酯(2:1)洗脱,收集洗脱液,减压浓缩至干,残渣加入 2 ml 甲醇溶解,作为供试品溶液。另取昆明山海棠对照药材 10 g,同法制备残渣后,加 2 ml 甲醇溶解,作为对照药材溶液。再

取雷公藤甲素对照品加甲醇制成 1 ml 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。按照薄层色谱法(通则 0502)试验,分别吸取对照品溶液 5 μ l,对照药材溶液及供试品溶液各 10 μ l,分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-丙酮(12:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 香草醛的 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。日光下,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性无干扰(见图 1)。

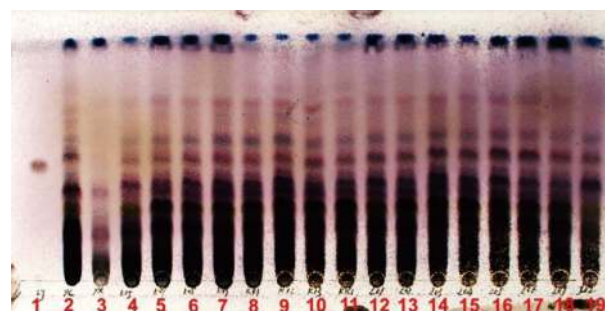


图 1 昆明山海棠 TLC 色谱图

注:1.雷公藤甲素标准品;2.昆明山海棠对照药材;3.昆明山海棠阴性对照品;4~19.16 个批次昆仙胶囊供试品

2.1.2 淫羊藿的薄层鉴别

取本品内容物 50 mg,加 70% 乙醇 2 ml 溶解,滤过,作为供试品溶液。另取淫羊藿对照药材 0.5 g,加乙醇 10 ml,40~60 $^{\circ}$ C 温浸 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1 ml 使溶解,作为对照药材溶液。再取淫羊藿苷对照品加乙醇制成 1 ml 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。按照薄层色谱法(通则 0502)试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ l,分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷:甲醇:水:甲酸(7:3:1:0.2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,烘干,置紫外光灯(365 nm)下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性无干扰(见图 2)。

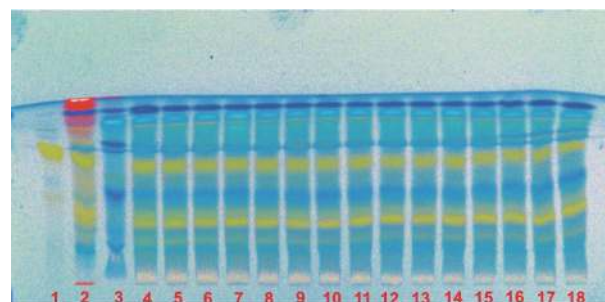


图 2 淫羊藿 TLC 色谱图

注:1.淫羊藿苷标准品;2.淫羊藿对照药材;3.淫羊藿阴性对照品;4~18.15 个批次昆仙胶囊供试品

2.1.3 菟丝子的薄层鉴别

取本品内容物 50 mg, 加 70% 乙醇 2 ml 溶解, 滤过, 作为供试品溶液。另取菟丝子对照药材 0.5 g, 加乙醇 40 ml, 超声 30 min, 滤过, 滤液浓缩至 5 ml, 作为对照药材溶液。再取金丝桃苷对照品加乙醇制成 1 ml 含 0.3 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502)试验, 吸取上述对照药材及金丝桃苷对照品溶液各 2 μ l, 供试品溶液 5 μ l, 分别点于同一聚酰胺薄膜板上, 以乙酸乙酯: 甲醇: 水: 甲酸(12: 2: 1: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性无干扰(见图 3)。

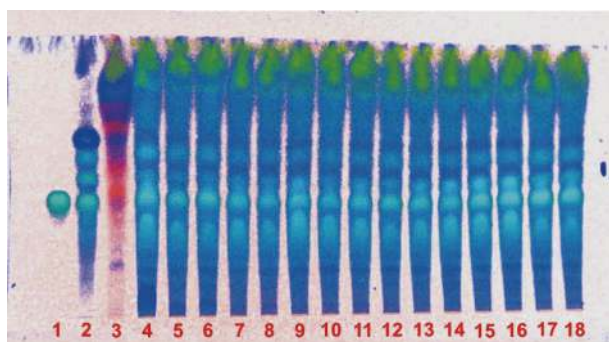


图 3 菟丝子 TLC 色谱图

注: 1. 金丝桃苷标准品; 2. 菟丝子对照药材; 3. 菟丝子阴性对照品; 4~18. 15 个批次昆仙胶囊供试品

2.2 雷公藤甲素的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBA SB-C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(C)-0.1% 甲酸水溶液(A); 梯度洗脱: 0~10 min, 15% $\rightarrow$ 23% C; 10~35 min, 23% $\rightarrow$ 26% C; 35~40 min, 26% $\rightarrow$ 26% C; 40~41 min, 26% $\rightarrow$ 98% C; 41~52 min, 98% $\rightarrow$ 98% C; 检测波长: 220 nm(紫外检测时间 40 min); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 0.8 ml/min; 进样量: 10 μ l。

2.2.2 对照品溶液的配制

取雷公藤甲素对照品, 加甲醇制成每毫升含 502 μ g 雷公藤甲素溶液, 作为对照品储备溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取昆仙胶囊内容物约 6 g, 精密称定, 其余步骤同“2.1.1”项下的方法, 制得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备

取缺昆明山海棠的阴性样品适量, 按照“2.1.1”项下的方法操作, 制得阴性对照溶液。

2.2.5 系统适应性及专属性考察

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性

对照溶液各 10 μ l, 按“2.2.1”项下色谱条件分析, 结果显示, 其与相邻色谱峰的分离度大于 1.5, 拖尾因子在 0.95~1.10, 理论塔板数在 5000 以上, 且阴性样品在各色谱峰的位置上未见干扰, 说明该方法专属性良好, 其 HPLC 图谱见图 4。

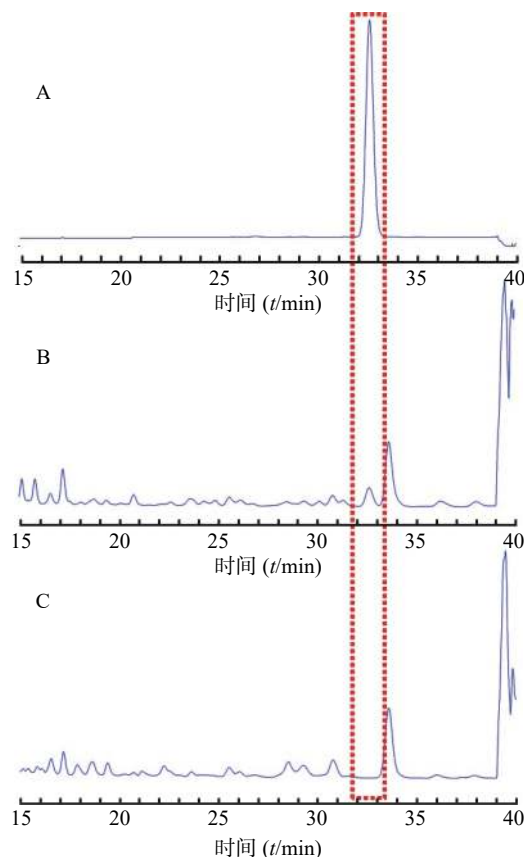


图 4 昆仙胶囊样品中雷公藤甲素的 HPLC 色谱图

注: A. 雷公藤甲素对照品; B. 昆仙胶囊样品; C. 昆明山海棠阴性样品

2.2.6 线性关系考察

将雷公藤甲素对照品储备液用甲醇稀释制成每毫升含 502.00、401.60、200.80、100.40、50.20、40.16 μ g 的系列溶液, 分别吸取 10 μ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积 Y 对质量浓度 X(μ g/ml) 进行线性回归, 得回归方程: $Y=24.459X+347.82$, $r=0.9995$, 线性范围为 40.16~502.00 μ g/ml。

2.2.7 精密度试验

取雷公藤甲素对照品溶液(100.4 μ g/ml), 进样 10 μ l, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果显示雷公藤甲素的平均峰面积为 2813.93, RSD 为 0.19%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验

按照供试品溶液制备方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样 10 μ l, 测定峰面积, 结果表明, 雷公藤甲素的平均含量为 0.0097 mg/粒, RSD 为 3.57%, 表明该方法重复性较好。

2.2.9 稳定性试验

取某一批次(L31008)样品,制备成供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、24、36、48 h 分别进样测定雷公藤甲素的峰面积,结果显示雷公藤甲素平均峰面积为 2647.16, RSD 为 1.53%,说明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.10 加样回收率试验

分别精密称取 6 份已知含量的样品约 6 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,按照接近 1:1 的量计算所需添加的雷公藤甲素对照品溶液,加入到样品中,按“2.2.3”项下方法平行制成 6 份供试品溶液,进样 10 μ l,记录峰面积,结果显示雷公藤甲素的平均回收率为 98.12%, RSD 为 8.25%,说明该方法准确度较好,计算结果见表 1。

表 1 雷公藤甲素的加样回收率试验结果 (n=6)

样品量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.097 6	0.097 9	0.188 7	92.98	98.12	8.25
0.097 6	0.097 9	0.181 8	85.92		
0.097 6	0.097 9	2.050 5	109.71		
0.097 6	0.097 9	1.937 0	98.11		
0.097 6	0.097 9	1.972 9	101.78		
0.097 6	0.097 9	1.957 8	100.23		

2.3 样品含量测定

分别取每批昆仙胶囊粉末约 6 g,精密称定,按“2.2.3”项下的方法制成供试品溶液,每批样品平行制备 2 份,每份进样 3 针,进样量 10 μ l,记录峰面积,计算结果见表 2。

表 2 21 批次昆仙胶囊中雷公藤甲素的含量测定结果

批号	平均含量(mg/粒)	批号	平均含量(mg/粒)
S1	0.010 3	S12	0.011 7
S2	0.009 2	S13	0.011 2
S3	0.009 1	S14	0.013 3
S4	0.005 9	S15	0.008 8
S5	0.011 7	S16	0.012 6
S6	0.009 0	S17	0.012 2
S7	0.006 5	S18	0.007 0
S8	0.007 6	S19	0.009 8
S9	0.011 6	S20	0.008 8
S10	0.010 2	S21	0.011 8
S11	0.008 4		

3 讨论

3.1 薄层色谱条件优化

本研究采用 TLC 法补充了昆仙胶囊全药味的鉴别方法,各项方法重复性好,专属性强,且阴性无干扰。与原标准相比,改良后的淫羊藿药材的薄层鉴别方法所获得的斑点分离度更佳,比移值适中;新增的昆明山海棠药材薄层法中点状点样优于条带状点样,喷以 2% 香草醛的 10% 硫酸乙醇溶液显色方式优于 10% 硫酸乙醇溶液显色;新增的菟丝子药材薄层鉴别中,按照 2020 版中国药典中菟丝子的鉴别方法以甲醇-冰醋酸-水(4:1:5)为展开剂时^[12],所获得的目标斑点分离度及成点性均差,而以乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(12:2:1:1)为展开剂时,所获目标斑点的成点性及分离度均得到有效改善。但由于所测成分化学性质相差较远,尚无法实现“一板多测”。

3.2 样品前处理方法的优化

由于本品成分复杂,雷公藤甲素又属于微量成分,需对昆仙胶囊的前处理条件进行优化。首先,我们参考了厂家的前处理方法,即利用甲醇提取蒸发浓缩后,直接过氧化铝-硅胶柱纯化,结果得到的目标化合物含量较低,操作方法可重复性差,且液相色谱中雷公藤甲素分离度较差,易受其他化合物干扰。为此,我们又尝试通过甲醇提取,再多次萃取富集纯化的方法,均不能实现有效的测定。进而,我们结合厂家的方法,对我们的方法进行了优化,最终确定为甲醇超声提取后,用二氯甲烷萃取,然后通过硅胶柱再次富集和纯化目标成分,最终不仅提高了 HPLC 法检测雷公藤甲素含量的上限,且大大减少了其他化合物对目标色谱峰的干扰。整个前处理过程,还比较了不同的提取溶剂和萃取溶剂的效果,结果均不如本法。

3.3 色谱条件的优化

由于样品中其他黄酮类成分的含量相对较高,按照现行部颁标准中的液相方法测定目标成分时,容易出现色谱柱对目标成分的分离效果差,含量测定结果的重复性、重现性不理想, RSD 较大等问题。为此,本实验又对定量测定雷公藤甲素含量的色谱条件进行了优化,主要比较了不同色谱柱(Diamonsil C₁₈、Agilent ZORBASB-C₁₈、Amethyst C₁₈及 Waters SunFire Tm C₁₈),不同流动相(乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.2% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液),不同柱温(25、30、35、40 $^{\circ}$ C)及不同体积流量

(0.8、0.9、1.0 ml/min)对雷公藤甲素色谱峰的影响,最终以 Agilent ZORBA SB-C₁₈ 为色谱柱、乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相、柱温为 30 ℃ 及流速为 0.8 ml/min 时,目标峰分离完全,效果最佳。

综上,本文建立的昆仙胶囊薄层鉴别及雷公藤甲素含量测定的方法,不仅弥补了昆仙胶囊全药味薄层鉴别的研究,同时也解决了现行标准中雷公藤甲素难测定,重复性差等难点,为完善昆仙胶囊的质量评价提供了依据。

【参考文献】

- [1] 崔莉莉,许春芳,鄢红霞,等. 昆仙胶囊临床应用的研究进展[J]. 世界中医药, 2021, 16(11): 1754-1758.
 - [2] TANG Y J, ZHANG Y, LI L, et al. Kunxian capsule for rheumatoid arthritis: inhibition of inflammatory network and reducing adverse reactions through drug matching[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 485.
 - [3] 刘枚,潘文友,孟德钎,等. 昆仙胶囊联合糖皮质激素治疗狼疮性肾炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(8): 919-922.
 - [4] LI Q X, LI L, BI L Q, et al. Kunxian capsules in the treatment of patients with ankylosing spondylitis: a randomized placebo-controlled clinical trial[J]. Trials, 2016, 17(1): 337.
 - [5] LI Q, LI L, HE D, et al. Efficacy and safety of Kunxian capsule for treatment of spondyloarthropathy (spa) and ankylosing spondylitis (as): results of a multi-center randomized placebo-controlled trial[J]. Clin Exp Rheumatol, 2014, 32(5): 790.
 - [6] 谢晨琼,周萍,李祥,等. 昆明山海棠化学成分及药理作用和临床应用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(13): 1996-2010.
 - [7] CHEN X J, TANG Z H, LI X W, et al. Chemical constituents, quality control, and bioactivity of epimedii folium (Yinyang-huo)[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(5): 783-834.
 - [8] DONNAPEE S, LI J, YANG X, et al. Cuscuta chinensis Lam. : a systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 157: 292-308.
 - [9] CHENG J, ZHOU Z W, SHENG H P, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 33-78.
 - [10] ZHOU Z L, YANG Y X, DING J, et al. Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms[J]. Nat Prod Rep, 2012, 29(4): 457-475.
 - [11] XI C, PENG S J, WU Z P, et al. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved[J]. Biomedicine Pharmacother, 2017, 90: 531-541.
 - [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2020年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 322.
- [收稿日期] 2021-06-18 [修回日期] 2021-10-19
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 151 页)

- [2] 周军,韦桂宁,吴超伟,等. 复方金钱草颗粒对肾结石的影响及其利尿、解痉、抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 206-209.
 - [3] 刘学,崔健,陈新. 广金钱草现代研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2006, 22(4): 84-85.
 - [4] 范文昌,梅全喜,赖海标. 广金钱草的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2961-2963.
 - [5] 钟鸣,柴玲. 广金钱草化学成分及药理作用研究进展[J]. 广西医学, 2018, 40(1): 80-82,91.
 - [6] 崔建敏,裴保方. 广金钱草多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(12): 986-989,993.
 - [7] 张雪芹,曲玮,梁敬钰. 车前草化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2013, 25(11): 1-8.
 - [8] 陈耀章. 玉米须化学成分药理作用最新研究[J]. 西部中医药, 2015, 28(2): 141-145.
 - [9] 张奇龙,徐红,何康. 光石韦化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 49-51.
- [收稿日期] 2021-05-26 [修回日期] 2021-10-28
[本文编辑] 陈盛新