

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.10.05

中兽药乌梅颗粒质量标准的研究

张远达,陈志强*,尚静雪,蔡小利,战文,张鹏举,付丽云,李海华

(内蒙古华天制药有限公司,内蒙古赤峰市,024070)

[收稿日期] 2019-06-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 10-0027-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了建立乌梅颗粒的质量标准,采用薄层色谱法(TLC)对乌梅、黄连进行鉴别;用高效液相色谱法测定乌梅颗粒中枸橼酸的含量。色谱条件为 Silgreen C18(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;流动相为乙腈-0.5%磷酸二氢铵溶液(3:97)(用磷酸调节 pH 值至 3.0);检测波长为 210 nm;流速为 0.6 mL/min;柱温为室温。研究建立了乌梅、黄连的薄层色谱定性鉴别的方法;建立了 HPLC 测定乌梅颗粒中枸橼酸含量的方法。建立的乌梅颗粒鉴别及枸橼酸含量测定方法简单、易于操作、准确度高、重现性好,可用于乌梅颗粒的质量控制。

[关键词] 乌梅颗粒;枸橼酸;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Chinese Veterinary Medicine Wumei Granule

ZHANG Yuan-da, CHEN Zhi-qiang*, SHANG Jing-xue, CAI Xiao-li,

ZHAN Wen, ZHANG Peng-ju, FU Li-yun, LI Hai-hua

(Inner Mongolia huatian pharmaceutical co., LTD., chifeng city, Inner Mongolia 024070, China)

Corresponding author: CHEN Zhi-qiang, E-mail: zhq_chen@163.com

Abstract: To establish the quality standard of Wumei Granules. Thin layer chromatography (TLC) was used to identify the black plum and coptis chinensis. The content of citric acid in wumei granules was determined by HPLC. The chromatographic condition was Silgreen C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was acetonitrile-0.5% ammonium dihydrogen phosphate solution (3:97) (pH value adjusted by phosphoric acid to 3.0). The detection wavelength was 210 nm. The flow rate was 0.6 mL/min. The column temperature is room temperature. A TLC method for the qualitative identification of fructus mume and rhizoma coptidis was established. HPLC method for determination of citric acid in wumei granules was established. The method is simple, easy to operate, accurate and reproducible. It can be used for quality control of Wumei Granules.

Key words: Wumei Granules; Citrate; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography

基金项目: 2018 年内蒙古科技重大项目

作者简介: 张远达, 中级工程师, 从事中药制剂方向研究。

通讯作者: 陈志强。E-mail: zhq_chen@163.com

乌梅颗粒由乌梅、柿饼、黄连、姜黄、诃子组成。原方乌梅散收载于《中国兽药典》二部^[1], 临床应用于治疗幼畜奶泻。但由于散剂服用剂量大, 服用不便, 且药材中的有效成分不易溶出, 吸收差^[2]。故对乌梅散进行工艺研究将其制成颗粒剂。为控制乌梅颗粒的质量, 本文对其进行质量研究, 复方中乌梅为制剂的君药, 含有大量的有机酸, 现代药理研究表明, 乌梅的抗菌和固涩作用与有机酸密切相关^[4], 因此将有机酸中含量最高的柠檬酸作为复方的有效成分之一。研究建立了高效液相色谱法测定乌梅颗粒复方中柠檬酸的含量, 并在保留原方中黄连的鉴别方法基础上又增加了乌梅的薄层色谱法进行定性鉴别。实验证明, 该方法简便、准确, 为乌梅颗粒的质量控制提供了依据。

1 仪器与材料

LC-2010CHT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); 集热式磁力加热搅拌器(型号为 DF-101S), 金坛市瑞华仪器有限公司生产; 旋转蒸发仪(型号为 RE52-99)、循环水式真空泵(型号为 SHZ-III), 上海亚荣生化仪器厂生产; 电子天平(BT25S); 青岛海洋化工厂硅胶 G 薄层板。

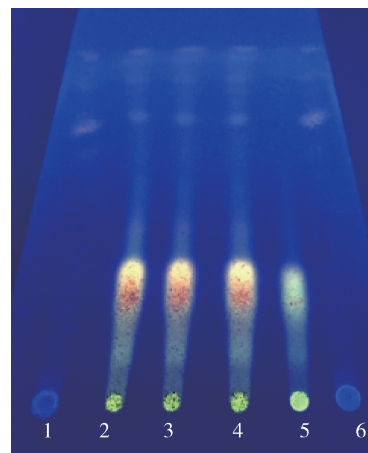
乌梅颗粒: 批号: 180601-180607, 来源: 内蒙古华天制药有限公司研制。乌梅对照药材: 规格: 5 g; 批号: 121208-201506; 供 TLC 含量测定比色检查用, 使用前不需要干燥处理; 来源: 中国食品药品检定研究院。黄连对照药材: 规格: 1 g; 批号: Z0010704; 供 TLC 含量测定比色检查用, 使用前不需要干燥处理; 来源: 中国兽医药品监察所。盐酸小檗碱对照品: 规格: 30 mg; 批号: 110713-201613; 含量: 86.8%; 来源: 中国食品药品检定研究院。枸橼酸对照品: 规格: 200 mg; 批号: 100396-201603; 含量: 100.0%; 来源: 中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 阴性对照溶液制备 根据处方去除各味药, 按制剂工艺制成相应阴性对照, 并按各自供试品溶液制备方法制成相应溶液, 即得^[3]。

2.1.2 乌梅薄层色谱鉴别 取乌梅颗粒样品粉末 20 g, 加甲醇 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 加乙醚振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣用石油醚(30~60℃)浸泡 2 次, 每次 15 mL(浸泡约 2 min), 倾去石油醚, 残渣加无水乙醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取乌梅对照药材 5 g, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法试验, 吸取上述供试品溶液 10 μ L 和对照药材溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(20:5:8:0.1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105℃ 加热至斑点显色, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。结果见图 1。由图可知, 供试品色谱在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 特征性强, 阴性无干扰。



1、6 乌梅对照药材 2、3、4 供试品溶液 5 阴性对照溶液

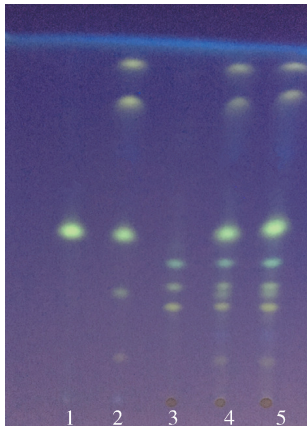
1、6 wumei control herbs 2、3、4 test solution 5 negative control solution

图 1 乌梅 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of Wumei

2.1.3 黄连薄层色谱鉴别 取乌梅颗粒样品 0.5 g, 加甲醇 10 mL, 超声 15 min, 滤过, 滤液浓缩至 5 mL, 作为供试品溶液。另取黄连对照药材 50 mg, 加甲醇 5 mL, 超声 15 min, 滤过, 滤液作为对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品, 加甲醇制成每 1 mL

含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述三种溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水(6: 3: 1.5: 1.5: 0.3)为展开剂,置氨蒸汽饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同的黄色荧光斑点;在与对照品色谱相应的位置上,显相同的一个黄色荧光斑点。结果见图 2。由图可知,供试品色谱在与各对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,特征性强,阴性无干扰。

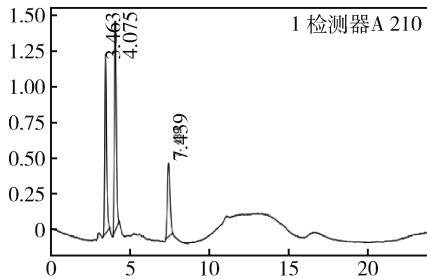


1 盐酸小檗碱对照品 2 黄连对照药材
3 阴性对照溶液 4、5 供试品溶液

1 berberine hydrochloride control 2 rhizoma coptidis control
3 negative control solution 4, 5 test solution

图 2 黄连 TLC 色谱图

Fig 2 TLC chromatogram of rhizoma coptidis



阴性对照色谱图(Xmin: YmV1.50)
Negative control chromatogram

2.2 HPLC 定量测定

2.2.1 色谱条件 Silgreen C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.5% 磷酸二氢铵溶液(3:97)(用磷酸调节 pH 值至 3.0);检测波长为 210 nm;流速为 0.6 mL/min;柱温为 30℃。含量测定结果采用外标法计算。

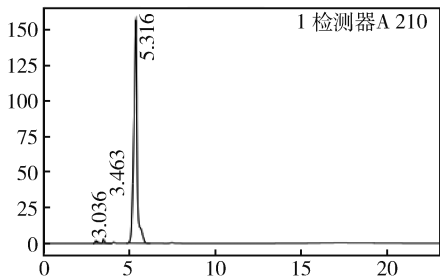
2.2.2 对照品溶液的制备 取枸橼酸对照品适量,精密称定,加水制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液制备 取本品约 1 g,精密称定,精密加入水 50 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用水补足减失的质量,过滤,取上清液,即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 专属性考察 如图 3 所示,阴性对照在对照品相同保留时间处未出现对应色谱峰,表明阴性无干扰。

2.2.4.2 线性关系考察 精密量取枸橼酸对照品溶液 10 mL,置于 50 mL 量瓶中混匀,用水定容至刻度,再将其倍半稀释为 6 个质量浓度,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,结果见表 1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。



对照色谱图(Xmin: YmV150)
Contrast chromatogram

图 3 对照色谱图

Fig 3 Controast chromatogram

表 1 枸橼酸线性关系

Tab 1 linear relationship of citric acid			
峰面积	回归方程	r	线性范围 (ug · mL ⁻¹)
1123	y = 39854x - 80300	0.9994	0.15 - 1.41
39902			
76380			
117589			
158673			
200598			

2.2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液(批号 180601),于 0、2、4、8、10、12、24 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定,测得枸橼酸面积 RSD 分别为 0.40%、0.57%、0.82%、0.91%、2.35%、2.91%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.4.4 精密度试验 精密吸取供试品溶液(批号 180601)10 μL,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次,测得枸橼酸面积 RSD 分别为 0.31%、0.96%、0.22%、0.12%、0.68%,表明仪器精密度良好。

2.2.4.5 重复性试验 取样品(批号 180601)6 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定,测得枸橼酸含量 RSD 分别为 0.40%、0.89%、0.33%、1.09%、1.15%,表明该方法重复性良好。

2.2.4.6 加样回收率试验 取已知枸橼酸含量的乌梅颗粒供试品溶液 6 份,分别精密加入对照品溶液,摇匀,按照上述色谱条件,10 μL 进样测定峰面积,计算得平均回收率为 99.21%,RSD 为 1.52%。见表 2。

表 2 回收率实验结果

Tab 2 Experimental results of recovery rate					
样品含量/mg	枸橼酸加入量/mg	测定总含量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.03	3.77	5.69	97.12	99.21	1.52
1.98	4.09	6.09	100.51		
2.06	10.76	12.95	101.23		
1.85	11.04	12.78	99.02		
1.93	15.56	17.20	98.11		
1.97	15.84	17.69	99.26		

2.3 样品含量测定 取 6 批样品,按上述“2.2.3”项下方法测定含量,结果分别为 0.18%、0.16%、0.14%、0.14%、0.12%、0.15%,可知 6 批样品枸橼酸平均含量为 0.15%。

3 讨论与结论

幼畜奶泻的中兽医治疗原则主要以清热解毒,涩肠止泻为主^[9],原方“乌梅散”来自于经典名方,乌梅颗粒即改变乌梅散的制备工艺,使其在应用、储存、交通中达到更好的效果。乌梅颗粒中乌梅、黄连等中药均有止泻、清热解毒的作用,在制备工艺中将乌梅颗粒进行提取、浓缩、制粒,使其质量可控。

乌梅颗粒原标准以黄连的薄层色谱定性鉴别作为其质量控制依据,为进一步完成检测的精密度准确性故本实验增加了 TLC、HPLC 法检测完善了质量标准。在 TLC 定性鉴别中,本实验不仅保留原标准黄连的鉴别,还增加了乌梅鉴别及含量测定的方法;薄层色谱定性鉴别测定中,黄连参照原标准检测结果符合规定。新增的乌梅鉴别参照《兽药典》的检测方法,但因本方为复方制剂,成分复杂,经研究将结果拟定为喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃加热至斑点显色,置紫外光灯(365 nm)下检视,供试品色谱中,在与乌梅对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。根据陈琳^[10]等人实

验结果,本研究将枸橼酸作为复方制剂质量控制指标,并参照《中国兽药典》中乌梅含量测定项下的检测方法,但因本方是由 5 味中药组成的复方制剂,成分复杂,测定时干扰严重,故本研究将检测流速设定为 0.6 mL/min,并通过方法学研究对其专属性、线性、稳定性、精密度、重复性和加样回收率进行考察,最终测定的 6 批样品其平均值为 0.15%,最小值为 0.12%。

研究建立了乌梅颗粒复方制剂中乌梅与黄连的薄层鉴别方法和枸橼酸含量测定方法,说明乌梅颗粒的质量可控,且方法简便准确、专属性强、准确度高,可用于乌梅颗粒的质量控制,为其复方制剂的质量控制提供了依据。

参考文献:

[1] 中国兽药药典委员会编. 中华人民共和国兽药典, 2015 年版[S]. China veterinary pharmacopoeia committee. Veterinary pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition [S].

[2] 王智云, 孙玉刚, 马正云, 等. 乌梅散颗粒的质量标准研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(04): 638-641.

Wang Z Y, Sun Y G, Ma Z Y, *et al.* Study on quality standard of wumeisan granules [J]. China Journal of Coal Industry Medicine, 2014, 17(4): 638-641.

[3] 尚静雪, 陈志强, 张远达, 等. 乌梅颗粒制备工艺研究[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(02): 33-39.

Shang J X, Chen Z Q, Zhang Y D, *et al.* Study on preparation technology of Wumei Granules [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 53(02): 33-39.

[4] 陈战国, 吕九如. 复方制剂“稚泻停口服液”中柠檬酸的 RP-HPLC 测定研究[J]. 中草药, 2000(12): 900-902.

Chen Z G, Lu J R. Rp-hplc determination of citric acid in compound preparation zhixieting oral liquid [J]. Chinese Herbal Medicine, 2000(12): 900-902.

[5] 张华月, 李琦, 付晓伶. 乌梅化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(S1): 296-300.

Zhang H Y, Li Q, Fu X L. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of ume [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 51(S1): 296-300.

[6] 邓婉婷. 乌梅各组分生物活性研究及提取工艺优化[D]. 广东药学院, 2015.

Deng W T. Study on the biological activity of various components

of ume and optimization of extraction process [D]. Guangdong Pharmaceutical University, 2015.

[7] 肖小河, 鄢丹, 马丽娜, 等. 中药现代化研究近十年概论[J]. 中国现代中药, 2012, 14(1): 7-12, 46.

Xiao X H, Yan D, Ma L N, *et al.* Research on modernization of traditional Chinese medicine in recent ten years [J]. China modern Traditional Chinese Medicine, 2012, 14(1): 7-12, 46.

[8] 刘红宁, 王玉蓉, 陈丽华, 等. 中药药剂学研究进展与发展思路[J]. 世界中医药, 2015, 0(3): 305-309, 314.

Liu H N, Wang Y R, Chen L H, *et al.* Research progress and development ideas of pharmacy of traditional Chinese medicine [J]. World Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 0(3): 305-309, 314.

[9] 向华军, 龙怡. 幼畜腹泻的中兽医治疗法则[J]. 山东畜牧兽医, 2016, 37(04): 25-26.

Xiang H J, Long Y. Principles of TCM veterinary treatment for diarrhea in young animals [J]. Shandong Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 37(04): 25-26.

[10] 陈琳, 刘丽梅, 王瑞海, 等. 高效液相色谱法测定乌梅丸中柠檬酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(01): 30-31.

Chen L, Liu L M, Wang R H, *et al.* Determination of citric acid in wumei pills by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Experimental form ulations, 2010(01): 30-31.

[11] 王璐, 张红宇, 王莉. 乌梅及其不同炮制品的药理作用比较[J]. 中药材, 2010, 33(03): 353-356.

Wang L, Zhang H Y, Wang L. Comparison of pharmacological effects of black plum and its different processed products [J]. Chinese Medicinal Materials, 2010, 33(03): 353-356.

[12] 高媛媛. 中兽药丹连花子宫灌注液的质量标准研究[D]. 西北农林科技大学, 2015.

Gao Y Y. Study on the quality standard of Chinese veterinary medicine Danlianhua uterus infusion [D]. Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2015.

[13] 王婧. 乌梅薄层色谱鉴别分析方法综述[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(09): 133-134.

Wang J. Review of TLC methods for identification and analysis of black plum [J]. Inner Mongolia journal of traditional Chinese medicine, 2016, 35(09): 133-134.

[14] 吴进, 李志浩, 李鹏. 高效液相色谱法测定喉痛片中枸橼酸的含量[J]. 山西医药杂志, 2015, 44(18): 2167-2169.

Wu J, Li Z H, Li P. Determination of citric acid in huatong tablets by HPLC [J]. Shanxi Medical Journal, 2015, 44(18): 2167

- 2169.
- [15] 张素娟. 食品中柠檬酸的检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(01): 352-354.
- Zhang S J. Research progress on detection methods of citric acid in food [J]. Food Industry Science and Technology, 2011, 32(01): 352-354.
- [16] 王 婵, 韦 刃, 黄晓玉, 等. 用高效液相色谱法测定银翘散配方颗粒中连翘酯苷 A 的含量[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(02): 156-158.
- Wang C, Wei R, Huang X Y, *et al.* Determination of forsythioside A in yinqiao powder form granules by HPLC [J]. Journal of Pharmaceutical Practice, 2015, 33(02): 156-158.
- [17] 樊惠民, 余 实, 谭远方. 食品中柠檬酸的检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(04): 205-208.
- Fan H M, Yu S, Tan Y F. Detection of citric acid in food [J]. Journal of Food Safety and Quality Detection, 2011, 2(04): 205-208.
- [18] 彭悦云, 朱文涛, 张庆莲, 等. 乌梅中柠檬酸的测定和提取工艺的优化[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(01): 59-61.
- Peng Y Y, Zhu W T, Zhang Q L, *et al.* Determination and extraction process optimization of citric acid in black plum [J]. Chinese Journal of Pharmacy, 2011, 26(01): 59-61.
- [19] 王永军, 王 敏, 王淑华. 高效液相色谱法测定柠檬酸的含量[J]. 河北化工, 2006(07): 46-49.
- Wang Y J, Wang M, Wang S H. Determination of citric acid content by high performance liquid chromatography [J]. Hebei Chemical Industry, 2006(07): 46-49.
- [20] 唐慧慧, 蔡清宇, 毛 翼. HPLC 法测定净乌梅及乌梅炭中柠檬酸和苹果酸的含量[J]. 中药材, 2007(01): 52-54.
- Tang H H, Cai Q Y, Mao Y. HPLC method for determination of citric acid and malic acid in the charcoal of pure black plum and black plum [J]. Chinese Medicinal Materials, 2007(01): 52-54.
- [21] 杨 燕, 田成旺. 现代中药发展的几个关键问题[J]. 中草药, 2016, 47(18): 3346-3350.
- Yang Y, Tian C W. Several key issues in the development of modern Chinese medicine [J]. Chinese Herbal Medicine, 2016, 47(18): 3346-3350.

(编辑: 陈 希)