

引用本文:任路路,姚大洋,任莹,等.五味子降酶胶囊质量控制研究[J].安徽医药,2022,26(4):676-679.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.04.008.

◇ 药物分析 ◇



五味子降酶胶囊质量控制研究

任路路¹,姚大洋²,任莹¹,李小伟¹

作者单位:¹太和县中医院制剂室,安徽 阜阳 236600;

²安徽守正中药饮片有限公司,安徽 阜阳 236600

摘要: 目的 探讨五味子降酶胶囊的质量控制方法。方法 采用薄层色谱法(TLC)鉴别五味子降酶胶囊中的五味子、板蓝根;采用高效液相色谱法(HPLC)测定五味子中五味子醇甲的含量。结果 薄层鉴别斑点清晰,分离效果好,专属性强;含量测定中五味子醇甲在0.033 37~0.533 92 μg 范围内,与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 5$)。结论 方法操作简单,专属性和重现性良好,可作为五味子降酶胶囊的质量控制方法。

关键词: 中草药; 五味子属; 色谱法,高效液相; 色谱法,薄层; 五味子降酶胶囊; 板蓝根; 五味子醇甲

Study on quality control of Schisandra Transaminase reduction capsule

REN Lulu¹, YAO Dayang², REN Ying¹, LI Xiaowei¹

Author Affiliations:¹Preparation Room, The Traditional Chinese Medical Hospital of Taihe County, Fuyang, Anhui 236600, China; ²Anhui Shouzheng Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces Co. Ltd, Fuyang, Anhui 236600, China

Abstract: **Objective** To explore the quality control method of Schisandra Transaminase reduction capsule. **Methods** The thin layer chromatography (TLC) method was used to identify qualification for Schisandra chinensis and Radix isatidis in Schisandra Transaminase reduction capsule; high performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the contents of Schisandrin A in Schisandra chinensis. **Results** The spot was clear in TLC identification with good separation effect and strong specificity. The content of Schisandrin A had a good linear relation with peak area ($r=0.999\ 5$), when ranged from 0.033 37 to 0.533 92 μg . **Conclusion** The method is simple with good specificity and reproducibility, and can be used as the quality control for Schisandra Transaminase reduction capsule.

Key words: Drugs, chinese herbal; Schisandra; Chromatography, high pressure liquid; Chromatography, thin layer; Schisandra transaminase reduction capsule; Radix isatidis; Schisandrin A

慢性肝炎在我国发病率高并呈上升趋势,其活动期往往伴随ALT(谷丙转氨酶)、AST(谷草转氨酶)、TBiL(总胆红素)等指标的升高。中医认为,慢性肝病的病因往往是正气不足、饮食不节,以致损伤脾胃,脾胃不能化湿,则湿热内生,因脾伤肝,造成肝胆脾胃不和,从而加剧了正气的损伤,导致肝炎的发生;另外,正气不足,极易感染疫毒。古人云:邪之所干,其气必虚。说明本证是本虚标实证。我院肝病科老中医经过多年临床摸索,认为慢性肝病病人正气虚为本,外感或内生湿热为标,治疗上要攻补兼施。五味子降酶胶囊正是在此基础上研制而出,其由五味子、女贞子、板蓝根、败酱草四味药组成,具有补益肝肾、清热解毒、凉血止痛的功效;用于肝胆湿热型胁痛、积聚证,症见乏力、纳差、腹胀、胁肋部疼痛等。方中五味子性温,味酸、甘,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效,现代药

理研究表明五味子具有保肝降酶的作用,是多种保肝药的主要成分,为君药^[1-2];女贞子味甘苦性凉,具有补益肝肾、清虚热、明目的功效,与五味子合用,增强其补益肝肾的作用,为臣药;板蓝根味苦性寒,具有清热解毒、凉血的功效;败酱草味辛、苦,具有清热解毒、消肿排脓、活血止痛的功效,与板蓝根辅助起到清肝胆祛湿热的作用,故二药为佐药。四药合用,攻补兼施,攻邪不伤正,扶正不留邪。五味子降酶胶囊在我院临床运用多年,效果显著。为了更好地控制制剂质量,保证临床疗效,特对方中各药味进行研究,以建立质量标准,严把制剂质量。

1 仪器与试药

1.1 仪器 U-3000型高效液相色谱仪(赛默飞);FA2004型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);ZF-2型三用紫外仪(上海安亭电子仪器厂);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器

有限公司);HH型数显恒温水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);DHG-9055A型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试药 五味子对照药材(中国食品药品检定研究院,批号120922-201309);五味子醇甲对照品(中国食品药品检定研究院,批号110857-201513);精氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号140685-201707);五味子降酶胶囊(太和县中医院,批号20190621、20190623、20190625);五味子(亳州市沪谯药业有限公司,批号1902220328),女贞子(亳州市沪谯药业有限公司,批号1901120124),板蓝根(亳州市沪谯药业有限公司,批号1904250252),败酱草(亳州市沪谯药业有限公司,批号1903210211),以上饮片经我院副主任中药师王虎鉴定均为正品;甲醇(SccBayer,色谱纯);水为娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯。

2 薄层鉴别

2.1 五味子的薄层鉴别^[3] 取五味子降酶胶囊的内容物1 g,加三氯甲烷20 mL,加热回流30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加1 mL三氯甲烷使溶解,作为供试品溶液;另取按处方比例及生产工艺制成的不含五味子的五味子降酶胶囊,按上述方法制成阴性对照溶液;再取五味子对照药材1 g,同法制成对照药材溶液;再另取五味子醇甲对照品,加甲醇溶解,制成每1毫升含五味子醇甲1 mg的溶液作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典2015年版四部通则0502)试验,分别吸取上述四种溶液各5 μ L,点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,上行展开,距薄层板上沿1 cm时取出,晾干,置三用紫外仪(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应R_f位置处,显相同颜色的斑点;而阴性样品在此位置处无斑点。说明该方法专属性强,可作为该制剂中五味子的鉴别方法。

2.2 板蓝根的薄层鉴别^[4] 取五味子降酶胶囊的内容物1.75 g,加水60 mL,加热回流1 h,滤过,滤液上钠型732型阳离子交换树脂(柱长10 cm,内径1.5 cm),水洗至洗液呈中性,再用2 mol/L的氨水溶液150 mL洗脱,弃去前50 mL洗脱液,收集后100 mL洗脱液,蒸干,残渣加稀乙醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取按处方比例及生产工艺制成的不含板蓝根的五味子降酶胶囊,按上述方法制成阴性对照溶液;再取板蓝根对照药材1 g,同法制成对照药材溶液;再另取精氨酸对照品,加甲醇溶解,制成每1毫升含精氨酸0.5 mg的溶液作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典2015年版四部通则0502)试

验,分别吸取上述四种溶液各5 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以无水乙醇-氨水(3:2)为展开剂,上行展开,距薄层板上沿1 cm时取出,晾干。喷以茚三酮试液,置105℃鼓风干燥箱中加热到斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应R_f位置处,显相同颜色的斑点;而阴性样品在此位置处无斑点。说明该方法专属性强,可作为该制剂中板蓝根的鉴别方法。

3 含量测定(中国药典2015年版四部通则0512试验)

3.1 波长的选择 用甲醇为空白试剂,在200~400 nm范围内对五味子醇甲进行波长扫描。结果显示,五味子醇甲在216 nm、251 nm附近有最大吸收。同时参考药典及文献中“五味子醇甲”的含量测定方法,确定本品的测定波长为250 nm。

3.2 色谱条件及系统适用性试验^[5-9] 色谱柱用ODS柱(依利特,Hypersil ODS2 5 μ m 4.6×250 mm);流动相为甲醇-水(65:35);流速为1 mL/min;柱温设30℃;检测波长为250 nm。理论板数以五味子醇甲峰计算应不低于2 000。进样量为5 μ L。

3.3 溶液的制备

3.3.1 对照品溶液的制备 精密称取五味子醇甲对照品适量,加甲醇制成每1毫升含30 μ g的溶液,即得。

3.3.2 供试品溶液的制备^[10-12] 精密称取混匀的装量差异项下的本品内容物0.75 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定重量,超声处理(功率250 W,频率20 kHz)20 min,取出,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密移取5 mL续滤液至10 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

3.4 专属性试验 取缺五味子的五味子降酶胶囊,按“3.3.2”方法制成阴性样品溶液。精密吸取对照品、供试品及阴性样品三种溶液各5 μ L,按“3.2”条件进样,记录色谱图。见图1。

结果可见,供试品的色谱图中,在与五味子醇甲峰相同保留时间处显相同的色谱峰;而阴性样品在此时间处无色谱峰。阴性无干扰,方法专属性强。

3.5 线性关系考察^[13-15] 精密称取五味子醇甲对照品适量,加甲醇溶解,制成浓度为0.333 7 g/L的对照品溶液作为储备液。精密移取1 mL储备液至10 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制成浓度为0.033 37 g/L溶液作为工作液。按“3.2”条件,分别精密吸取工作液1 μ L、2 μ L、4 μ L、8 μ L、12 μ L、16 μ L进样,记录峰面积。以五味子醇甲的进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $y=$

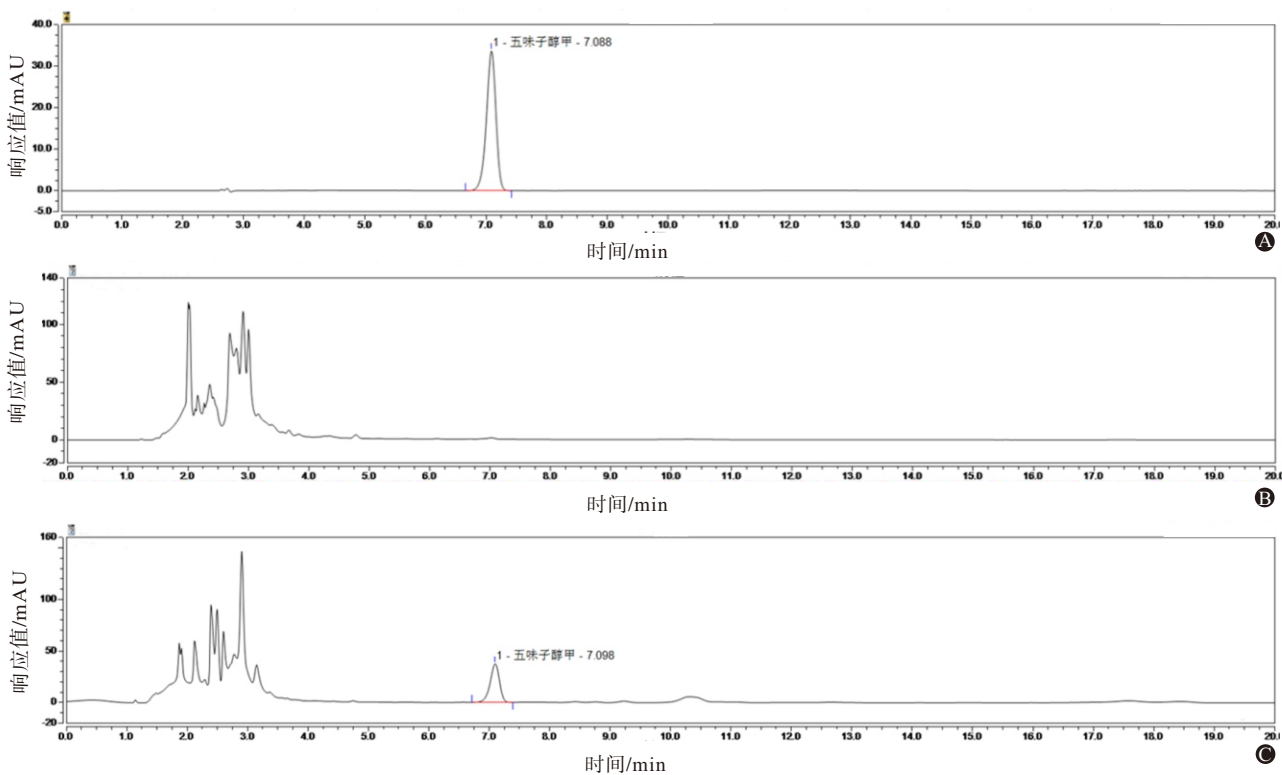


图1 五味子醇甲 HPLC 图:A为五味子醇甲对照品;B为阴性样品;C为样品(批号 20190621)

35.486x+0.174 6, $r=0.999\ 5$ 。由此说明,五味子醇甲在 0.033 37 ~ 0.533 92 μg 范围内与峰面积呈较好的线性关系。

3.6 精密度考察 精密吸取“3.5”中的工作液 5 μL ,在“3.2”条件下连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果五味子醇甲的平均峰面积 6.127 0,相对标准差(RSD)=0.16%,说明仪器具有较好的精密度。

3.7 重复性试验 精密称取五味子降酶胶囊(批号 20190621)内容物 0.75 g,共 6 份,分别制成供试品溶液,在“3.2”条件下进样并计算含量。结果 6 份样品的平均含量为 2.40 mg/g, RSD=0.32%,说明该方法重复性较好。

3.8 样品稳定性试验 精密称取五味子降酶胶囊(批号 20190621)内容物 0.75 g 制成供试品溶液,分别于制成后 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 进样,测定峰面积。结果平均峰面积 6.719 8、RSD=0.44%。由此可知,样品室温条件下 24 h 内基本稳定。

3.9 加样回收试验^[16] 精密称取已知含量的五味子降酶胶囊 6 份(每份约 0.40 g),精密加入“3.5”项下的储备液 2.5 mL,按上述方法及色谱条件进行测定,计算回收率,结果见表 1。由表 1 可知,样品平均回收率为 100.07%, RSD=0.57%。说明该方法准确度较高。

3.10 样品含量测定 取连续 3 批的五味子降酶胶囊,按所述的样品处理方法及色谱条件进样测定,

表 1 回收率测定结果

称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.407 8	0.978 72	0.834 25	1.811 3	99.80	100.07	0.57
0.408 8	0.981 12	0.834 25	1.824 5	101.09		
0.405 6	0.973 44	0.834 25	1.810 8	100.37		
0.407 7	0.978 48	0.834 25	1.811 9	99.90		
0.402 3	0.965 52	0.834 25	1.796 1	99.56		
0.401 8	0.964 32	0.834 25	1.796 1	99.70		

注:RSD 为相对标准差。

计算五味子醇甲的含量,批号 20190621、20190623、20190625 的制剂含量每粒分别为 0.84 mg、0.85 mg、0.85 mg。

4 讨论

4.1 含量测定指标成分及薄层鉴别方法的确定 五味子主要含五味子醇甲、五味子乙素等成分,根据《中国药典》2015 年版、《中药制剂质量及稳定性研究技术指导原则》首选君药、贵重药、毒性药材制订含量测定项目的要求,故选择君药五味子中五味子醇甲作为 HPLC 测定的指标成分;同时用五味子醇甲及五味子对照药材进行 TLC 鉴别,结果斑点清晰、专属性强,能清楚地反映五味子的薄层特征。板蓝根化学成分复杂,主要含(R,S)-告依春、靛蓝、精氨酸等化学成分。本研究曾用化学鉴别法鉴别板蓝根中的氨基酸,阴性虽无干扰,但化学鉴别方法简单,特异性差,不足以作为板蓝根的鉴别方法;

用TLC法鉴别板蓝根中的(R,S)-告依春,阴性亦有干扰,专属性不强^[17];靛蓝的含量较低,TLC鉴别斑点不清晰,不易检出;而精氨酸经过钠型732型阳离子交换树脂处理,再用氨水溶液洗脱提纯后,分离效果好,专属性强,斑点显色清晰,故可作为本制剂中板蓝根的鉴别方法。败酱草收载于地方炮制规范中,主要含齐墩果酸、败酱烯等化学成分,本研究曾用TLC法鉴别处方中的败酱草^[18],但阴性干扰明显,专属性不强。女贞子亦含有齐墩果酸,与败酱草相互干扰,同时含有女贞苷、特女贞苷等化学成分,由于工艺及处方量的影响,用TLC法鉴别女贞子中特女贞苷,斑点不清晰、分离效果差且阴性有微弱的干扰^[19]。根据《中药制剂质量及稳定性研究技术指导原则》鉴别项的要求“对主要药味进行研究,选择专属性强、灵敏度高、重现性好、操作简便的鉴别方法纳入标准正文”,故将五味子、板蓝根的薄层鉴别方法收入质量标准,女贞子、败酱草的薄层鉴别尚需进一步研究。

4.2 含量测定提取方法及溶剂的选择 药典及文献^[20-21]中五味子醇甲的提取有超声法及加热回流法两种。本研究曾考察了两种提取方法五味子醇甲的含量高低,发现超声提取含量略高但不明显。综合考虑操作的简易程度及能源消耗,故本试验选择超声法作为HPLC的提取方法。溶剂选择方面,本研究比较了分别用甲醇、乙醇、50%甲醇超声后五味子醇甲的含量高低,发现三种溶剂处理的色谱峰分离度及不对称性均较好,色谱图差别不明显;而甲醇处理五味子醇甲的含量最高,故选择甲醇作为五味子醇甲的提取溶剂。

4.3 含量限度的确定 受工艺及生产实际的影响,制剂含量往往较投料的理论含量下降明显。而制成制剂后,饮片指标成分含量进入制剂的比率称为转移率。本制剂五味子粉碎入药,有效成分损耗较少。研究测定了五味子降酶胶囊及投料的五味子的含量,计算平均转移率为75.59%。由处方计算,本制剂每粒含五味子饮片0.14 g,根据《中国药典》2015年版“五味子”的含量限度,并结合转移率及工业化生产实际,暂定本制剂的含量限度为不低于每粒0.40 mg。由于含量测定批次有限,故转移率及制剂含量限度尚需进一步考察。

5 结论

采用TLC法鉴别处方中的五味子及板蓝根的方法专属性强、斑点清晰,HPLC法测定五味子中五味子醇甲的含量方法分离度高、重现效果好,可作

为五味子降酶胶囊的薄层鉴别及含量测定方法收入质量标准中。

参考文献

- [1] 白文宇,王厚恩,王冰瑶,等.五味子化学成分及其药理作用研究进展[J].中成药,2019,41(9):2177-2183.
- [2] 代晓光,宋琳.五味子现代药理作用及临床应用研究进展[J].中医药信息,2017,34(5):121-124.
- [3] 国家药典委员会.中国药典:2015年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [4] 戴耀清,薛非凡.板蓝根颗粒质量标准研究[J].中国药业,2015,24(3):21-23.
- [5] 王艳伟.麦味地黄胶囊质量标准提高研究[J].中国药品标准,2016,17(6):411-415.
- [6] 黄若干,裴泽建,黄平权,等.九味补血口服液质量标准研究[J].中国民族民间医药,2016,25(23):16-19.
- [7] 初洪波,车毅,李海涛,等.应用高效液相法测定北五味子不同部位和不同炮制品中五味子醇甲的含量[J].中国中医药现代远程教育,2017,15(20):147-150.
- [8] 孔凡存,牛家丰,马梅芳.高效液相色谱法测定参味益气口服液中五味子醇甲的含量[J].中国实用医药,2017,12(12):189-191.
- [9] 申琳,曲佳,孙永跃.脉康合剂的质量标准研究[J].中国药房,2016,27(21):3000-3003.
- [10] 龚雪林,龚紫恒,祝保华,等.HPLC法测定脑灵素胶囊五味子醇甲的含量[J].江西中医药,2016,47(7):70-71.
- [11] 张强,冯华,王世俊,等.高效液相色谱法测定妇科止血灵中五味子醇甲的含量[J].甘肃中医药大学学报,2017,34(2):50-52.
- [12] 杨立志,姜雪敏.高效液相色谱法测定利肺片中五味子醇甲、五味子甲素及五味子乙素含量[J].中国药业,2017,26(2):38-40.
- [13] 张宁,郭阳,刘微,等.生脉饮(党参方)中五味子醇甲含量的测定方法[J].中国当代医药,2019,26(12):52-54.
- [14] 任燕,陈向明,赵娟娟,等.肺复康合剂化学成分及含量测定研究[J].中药材,2016,39(8):1800-1802.
- [15] 曾莉,刘运杰.平喘方配方颗粒内五味子醇甲含量检测方法研究[J].四川中医,2016,34(2):107-109.
- [16] 许广华,王虎,李小伟,等.芪精愈消胶囊薄层鉴别及含量测定研究[J].安徽医药,2016,20(4):660-663.
- [17] 吴贵辉,赵南,覃广源,等.金感胶囊中板蓝根薄层鉴别方法研究[J].海峡药学,2019,31(8):134-136.
- [18] 王利丽,周志远,陈随清.败酱草质量标准研究[J].中医学报,2012,27(9):1150-1152.
- [19] 刘莉,李婷婷,王欣,等.安神补心片的薄层色谱鉴别[J].中国药业,2019,28(19):43-45.
- [20] 林园园,周从辉.高效液相色谱法测定益生元胶囊中五味子醇甲的含量[J].湖北中医杂志,2018,40(8):55-57.
- [21] 唐小凡,徐文.不同提取工艺对泌尿宁颗粒中欧前胡素及五味子醇甲含量的影响[J].山东中医杂志,2018,37(4):334-337.

(收稿日期:2020-07-02,修回日期:2020-08-26)