

· 研究报告 ·

地龙参麦口服液质量标准提高研究

刘 栋¹, 华之卉², 郝 哲¹, 屈 俊¹, 王丽军¹, 李明春³ (1. 中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院药剂科, 河南 郑州 450042; 2. 郑州人民医院药学部, 河南 郑州 450003; 3. 中国人民解放军海军第九七一医院药剂科, 山东 青岛 266071)

[摘要] 目的 完善地龙参麦口服液的质量标准。方法 采用薄层色谱法(TLC)对地龙参麦口服液中黄芪、麦冬和五味子进行定性鉴别。采用 HPLC 法测定制剂中五味子醇甲、羟苯乙酯的含量, 色谱柱为 Wondasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃。结果 TLC 色谱图斑点清晰, 分离度良好, 阴性无干扰。五味子醇甲和羟苯乙酯检测质量浓度线性范围分别为 5.81 ~ 58.06 μg/ml ($r=0.999\ 9$)、25.29 ~ 252.94 μg/ml ($r=0.999\ 9$); 平均加样回收率分别为 99.35% (RSD 为 1.02%) 和 99.72% (RSD 为 0.76%)。结论 该方法简便、快速、准确, 能更全面有效地控制地龙参麦口服液的质量。

[关键词] 地龙参麦口服液; 高效液相色谱; 薄层色谱; 五味子醇甲; 羟苯乙酯

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)01-0068-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202003189

Study on the quality control improvement of Dilong Shenmai oral liquid

LIU Dong¹, HUA Zhihui², HAO Zhe¹, QU Jun¹, WANG Lijun¹, LI Mingchun³ (1. Department of Pharmacy, No.988 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Zhengzhou 450042, China; 2. Department of Pharmacy, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; 3. Department of Pharmacy, No.971 Hospital of Navy of PLA, Qingdao 266071, China)

[Abstract] **Objective** To improve the quality control of Dilong Shenmai oral liquid. **Methods** TLC was used for the qualitative identification of Astragali Radix, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus in Dilong Shenmai oral liquid. HPLC was used to determine the contents of schisandrin and ethylparaben in the preparation. Wondasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water as the mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min for gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was 30 ℃. **Results** TLC spots were clear and well-separated without negative interference. The linear ranges of schisandrin and ethylparaben were 5.81–58.06 μg/ml ($r=0.999\ 9$) and 25.29–252.94 μg/ml ($r=0.999\ 9$). The average recoveries were 99.35% (RSD=1.02%) and 99.72% (RSD=0.76%). **Conclusion** This method is simple, quick and accurate. It can be used for effective quality control of Dilong Shenmai oral liquid.

[Key words] Dilong shenmai oral liquid; HPLC; TLC; schisandrin; ethylparaben

地龙参麦口服液(曾用名: 健心乐口服液)是由地龙、红参、黄芪、麦冬、五味子等五味中药材加工制成的复方非标准制剂, 具有利尿、降压、强心、补益气血、养心安神之功效^[1-2], 在临床上用于各种病因引起的慢性心功能不全、心慌、胸闷、胸痛及各种心律失常, 并有利水、抗凝、营养心肌之功效。原质量标准制定年代久远, 只有检查项, 不能全面控制制剂质量。根据全军医疗机构制剂标准

提高课题要求, 增加了麦冬、黄芪和五味子的薄层色谱(TLC)鉴别方法。五味子醇甲是方中五味子的有效成分之一, 能够保护心肌结构和功能, 降低心肌耗氧量, 延长供体心的保存时间^[3]; 羟苯乙酯为方中的化学防腐剂, 具有广谱抑菌作用, 但过量使用会产生变态反应以及类激素作用^[4]。为保证制剂的有效性和安全性, 本研究采用 HPLC 法同时测定制剂中有效成分五味子醇甲和防腐剂羟苯乙酯的含量, 为提高和完善地龙参麦口服液的质量标准提供可靠的试验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-10A 型高效液相色谱仪, 包括 SPD-10A 型

[基金项目] 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题 (14ZJZ02)

[作者简介] 刘 栋, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物制剂研发与质量控制, Email: liudong13673546650@163.com

[通信作者] 王丽军, 学士, 副主任药师, Email: 153wlj@163.com

紫外检测器、手动进样器、LC-solutionLite 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司); BT125D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂); 电热恒温水浴锅(天津华北实验仪器有限公司); 硅胶 G 薄层板、硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试药

黄芪甲苷对照品(含量: 95.8%, 批号: 110781-201314)、五味子醇甲对照品(含量: 99.9%, 批号: 110857-201513)、羟苯乙酯对照品(批号: 100847-201604, 含量: 99.9%)、黄芪对照药材(批号: 121462-201304)、麦冬对照药材(批号: 121013-201310)、五味子对照药材(批号: 120922-201309)均购自中国食品药品检定研究院; 地龙参麦口服液(批号: 170926、171208、180312)和阴性样品为中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院自制; 乙腈为色谱纯; 水为重蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别^[5-6]

2.1.1 黄芪^[7]

取本品 30 ml, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 20 ml, 合并正丁醇液, 用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 3 次, 每次 20 ml, 再用水洗涤 2 次, 每次 20 ml, 分取正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取缺黄芪的阴性样品, 同法制成阴性对照溶液。取黄芪对照药材 2.0 g, 加水饱和的正丁醇 60 ml, 加热回流 30 min, 放冷, 滤过, 滤液同法制成对照药材溶液。再取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按照 TLC 法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)试验, 吸取上述 4 种溶液各 10 μl, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-甲醇-水(25: 11: 3)10 °C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰。结果显示, 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, 显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰, 见图 1。

2.1.2 麦冬

取本品 20 ml, 加 30% 盐酸溶液 3 ml, 加热煮沸 5 min, 放冷, 用二氯甲烷振摇提取 2 次, 每次 30 ml, 合并二氯甲烷液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取缺麦冬的阴性样品, 同法制成阴性对照溶液。取麦冬对照药材 2 g, 加水 50 ml, 煎煮 30 min, 滤过, 滤液加 30% 盐酸溶液 6 ml, 同

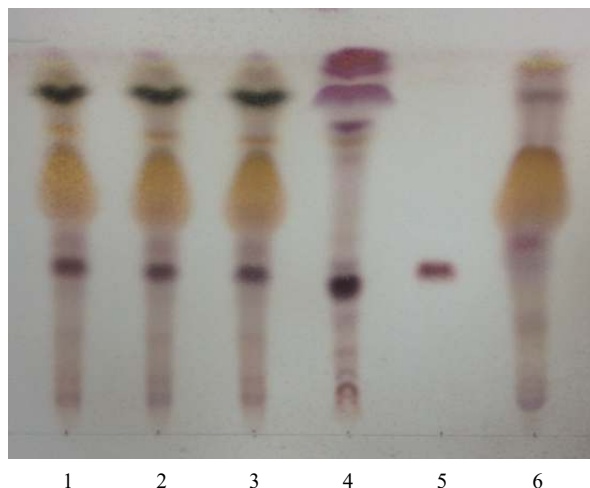


图 1 黄芪 TLC 图

1~3.供试品; 4.黄芪对照药材; 5.黄芪甲苷对照品; 6.阴性对照溶液

法制成对照药材溶液。按照 TLC 法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)试验, 吸取上述 3 种溶液各 10 μl, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-丙酮(12: 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰。结果显示, 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, 且阴性对照无干扰, 见图 2。



图 2 麦冬 TLC 图

1.麦冬对照药材; 2~4.供试品; 5.阴性对照溶液

2.1.3 五味子^[8]

取本品 30 ml, 用二氯甲烷振摇提取 2 次, 每

次 30 ml, 合并二氯甲烷液, 蒸干, 残渣加二氯甲烷 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取缺五味子的阴性样品, 同法制成阴性对照溶液。取五味子对照药材 1.0 g, 加二氯甲烷 30 ml, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加二氯甲烷 1 ml 使溶解, 作为对照药材溶液。再取五味子醇甲对照品, 加二氯甲烷制成每 1 ml 含 1 mg 五味子醇甲的溶液, 作为对照品溶液。按照 TLC 法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)试验, 吸取上述 4 种溶液各 2 μ l, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(10:7:1)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254 nm)下检视。结果显示, 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, 显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰, 见图 3。

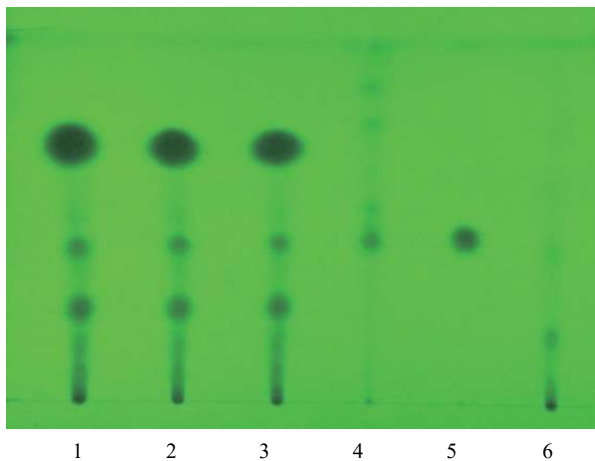


图 3 五味子 TLC 图

1~3. 供试品; 4. 五味子对照药材; 5. 五味子醇甲对照品; 6. 阴性对照溶液

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 Wondasil C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 35%A; 10~20 min, 35%A \rightarrow 47%A; 20~30 min, 47%A \rightarrow 55%A。流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ l。

2.2.2 溶液的制备

(1)混合对照品溶液: 精密称取羟苯乙酯、五味子醇甲对照品各适量, 加甲醇溶解并定容, 制成每 1 ml 含羟苯乙酯、五味子醇甲分别为 505.89、116.12 μ g 的混合对照品储备液。精密量取上述混合对照品储备液 2 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得羟苯乙酯、五味子醇甲质量浓度分

别为 101.18、23.22 μ g/ml 的混合对照品溶液。

(2)供试品溶液: 精密量取样品 2 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

(3)阴性对照溶液: 分别取羟苯乙酯、缺五味子的阴性样品, 按照供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。

2.2.3 专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μ l, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 4。结果表明, 在该色谱条件下, 供试品溶液在与对照品溶液相同保留时间处出峰, 阴性对照溶液对羟苯乙酯、五味子醇甲的测定无干扰。

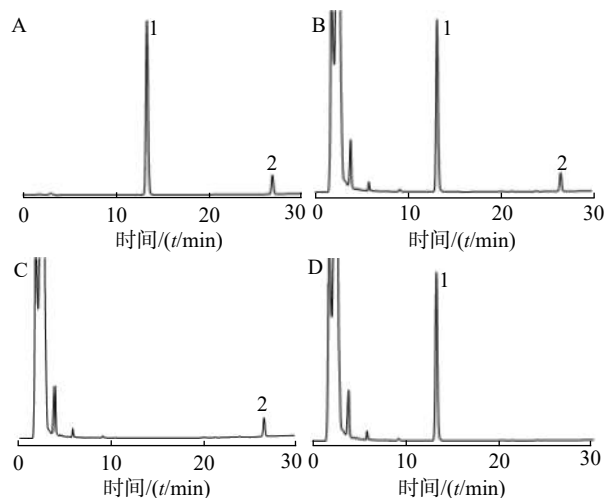


图 4 地龙参麦口服液 HPLC 图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺羟苯乙酯的阴性对照; D. 缺五味子的阴性对照; 1. 羟苯乙酯; 2. 五味子醇甲

2.2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下混合对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液定容, 摇匀, 进样, 记录峰面积。以羟苯乙酯和五味子醇甲质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得羟苯乙酯回归方程为 $Y=58\ 559.18X-90\ 593.32$ ($r=0.999\ 9$), 五味子醇甲回归方程为 $Y=27\ 155.08X-7\ 196.072$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明, 羟苯乙酯和五味子醇甲检测质量浓度线性范围分别为 25.29~252.94、5.81~58.06 μ g/ml。

2.2.5 精密度试验

取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果显示, 羟苯乙酯和五味子醇甲峰面积的 RSD 分别为 0.62%、0.45%, 表明

仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验

取已知含量的供试品溶液,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时按进样测定,记录峰面积。结果显示,羟苯乙酯和五味子醇甲峰面积的 RSD 分别为 1.03%、0.85%,表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验

取同一批样品,平行制备 6 份供试品溶液,进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果显示,羟苯乙酯和五味子醇甲的含量平均值分别为 0.468 8、0.115 6 mg/ml, RSD 分别为 0.75%、0.85%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:170328) 1.0 ml,共 9 份,分别置于 10 ml 量瓶中,各加入低、中、高质量的羟苯乙酯和五味子醇甲对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 1。

2.3 样品含量测定

取 3 批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测

定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 TLC 鉴别

黄芪 TLC 鉴别时,样品的正丁醇提取液用 1% 氢氧化钠溶液洗涤,既可以除去酸性、酚类非指标成分,又能促进其他黄芪皂苷转化成黄芪甲苷,增加黄芪甲苷的量^[9-11],提高鉴别效果。

试验过程中,曾进行过红参和地龙的薄层鉴别研究。在对红参的鉴别中,采用不同的展开系统阴性均出现干扰;而在地龙的研究中采用不同供试品处理方法、不同的展开系统均无法显示出地龙的特征性斑点,故质量标准中舍弃了对红参和地龙的薄层鉴别。

3.2 含量测定

本试验考察了甲醇-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液和乙腈-水 3 种不同的流动相体系,在满足基线平稳、指标峰分离度良好、峰型对称度好的基础上,从经济环保的角度出发,选用乙腈-水体系。但羟苯乙酯和五味子醇甲极性有一定差别,故采用梯度洗脱法来达到快速检测的目的。

由紫外吸收图谱可知,羟苯乙酯和五味子醇甲在 254 nm 附近均有最大吸收,故选择 254 nm 作为

表 1 加样回收率试验结果 ($n=9$)

成分	样品量(m/mg)	加入量(m/mg)	测得量(m/mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
羟苯乙酯	0.468 8	0.252 9	0.717 6	98.38	99.72	0.76
	0.468 8	0.252 9	0.719 1	98.97		
	0.468 8	0.252 9	0.721 9	100.08		
	0.468 8	0.505 9	0.976 3	100.32		
	0.468 8	0.505 9	0.970 9	99.25		
	0.468 8	0.505 9	0.972 6	99.58		
	0.468 8	0.758 8	1.231 9	100.57		
	0.468 8	0.758 8	1.232 2	100.61		
	0.468 8	0.758 8	1.225 3	99.70		
五味子醇甲	0.115 6	0.058 1	0.172 6	98.11	99.35	1.02
	0.115 6	0.058 1	0.172 7	98.28		
	0.115 6	0.058 1	0.173 2	99.14		
	0.115 6	0.116 1	0.230 0	98.54		
	0.115 6	0.116 1	0.230 6	99.05		
	0.115 6	0.116 1	0.232 6	100.78		
	0.115 6	0.174 2	0.288 5	99.25		
	0.115 6	0.174 2	0.291 1	100.75		
	0.115 6	0.174 2	0.290 2	100.23		

表2 样品含量测定结果 (n=3, mg/ml)

样品批号	羟苯乙酯	五味子醇甲
160903	0.437 1	0.102 6
170112	0.531 9	0.106 1
170328	0.468 8	0.115 6

检测波长,操作更加简单、普适性更强^[12]。

试验中考察了水、甲醇、乙醇、稀乙醇和50%甲醇作为提取溶剂,结果显示50%甲醇作溶剂时,指标成分无干扰,提取率高。

本研究曾尝试测定红参中有效成分的含量,将样品采用直接过滤法、蒸干后甲醇超声法、正丁醇萃取法等均无法有效检测出红参中的有效成分,故最终放弃对红参的含量测定。

3.3 羟苯乙酯含量测定的意义

《中国药典》(2015年版)四部通则0181【合剂】项下规定羟苯酯类防腐剂的用量不得超过0.05%,但所有抑菌剂都有一定的毒性,添加到制剂中的抑菌剂应是在抑菌效力测试试验基础上的最低有效量^[13]。样品处方中羟苯乙酯的用量为0.05%,但3批样品的测定结果显示羟苯乙酯的含量差异较大,因而把羟苯乙酯含量也作为质量控制项符合制剂的安全性要求。

【参考文献】

[1] 刘清源,冯志祥,张正臣,等. 健心乐口服液对心力衰竭的疗

效观察[J]. 河南医药信息, 1999(5): 46-47.

[2] 刘清源,冯志祥,张正臣. 健心乐口服液强心作用的实验研究[J]. 河南中医药学刊, 2001, 16(2): 27-28.

[3] 郑夺,张婷,陈冠,等. 多指标正交试验优选养心颗粒制备工艺[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(7): 1218-1222.

[4] 王发英,吴查青,陈张金,等. 复方鱼腥草合剂中3个有效成分及防腐剂的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 399-403.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版):一部,四部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 66, 155, 302, 通则0502.

[6] 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.

[7] 于春艳,邱世鑫,包晗,等. 延胡索与常见伪品的快速鉴别方法[J]. 甘肃医药, 2018, 37(10): 932-933.

[8] 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.

[9] 周亚萍,谈瑄忠,毛春芹,等. 芪术益气润肠颗粒质量控制方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 67-71.

[10] 王艳,胡娟妮,赵勇,等. 补中益气丸中黄芪甲苷转移率异常干扰因素研究[J]. 中国药师, 2013, 16(8): 1156-1159.

[11] 韩宵,闫春风,朱磊,等. HPLC-ELSD测定益心舒分散片中人参皂苷Rg₁, Re, Rb₁, Rd和黄芪甲苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16): 68-71.

[12] 叶隽,陈斌,余岳林,等. 高效液相色谱法同时测定清肺抑火片中8个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 968-974.

[13] 沈秋莲,杨育儒,王庆芬,等. 枸橼酸钾溶液中抑菌剂的抑菌效果观察[J]. 安徽医药, 2017, 21(4): 623-626.

[收稿日期] 2020-03-29 [修回日期] 2020-05-14

[本文编辑] 李睿旻

(上接第61页)

[2] 王星,张秀丽. 皮肤癣菌的感染与炎症因子的相关性研究[J]. 医学美容(中旬刊), 2014, 23(5): 135-135.

[3] 于国平,王萍,陈俭宏,等. 驻闽某部队官兵浅部真菌病调查[J]. 华南国防医学杂志, 2015, 29(8): 642-643.

[4] 岳喜昂,柳君如,孙晓静,等. 驻黄海北部某地部队浅部真菌病调查分析[J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(5): 293-295.

[5] 吴博. 复方酮康唑软膏的制备与评价[D]. 福州:福建医科大学, 2016.

[6] 张星一. 透皮吸收促进剂在经皮给药系统中的质控和评价方法[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(4): 273-276.

[7] 刘秀洁,刘泽莹,余伟民,等. 几种促渗剂对巴布剂中双氯芬酸钠体外透皮的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(8): 604-606.

[8] XU D H, ZHANG Q, FENG X, et al. Synergistic effects of ethosomes and chemical enhancers on enhancement of naloxone permeation through human skin[J]. Pharmazie, 2007, 62(4): 316-318.

[9] HU L S, SILVA S M C, DAMAJ B B, et al. Transdermal and transbuccal drug delivery systems: Enhancement using iontophoretic and chemical approaches[J]. Int J Pharm, 2011, 421(1): 53-62.

[10] LANE M E. Skin penetration enhancers[J]. Int J Pharm, 2013, 447(1-2): 12-21.

[11] 夏林虹,邱杞达. 月桂氮革酮和薄荷醇对复方积雪草苷凝胶体外透皮吸收的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(18): 1538-1541.

[收稿日期] 2020-08-15 [修回日期] 2020-11-19

[本文编辑] 李睿旻