

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.017

高效液相色谱法筛查利肺片中南五味子代替五味子

张永萍¹, 李永鹏²

(1. 青海省海东市食品药品和质量技术检验检测中心, 青海 海东 810600; 2. 青海省药品检验检测院, 青海 西宁 810000)

摘要:目的 建立筛查利肺片中南五味子代替五味子的高效液相色谱(HPLC)法。方法 采用 HPLC 法同时测定五味子药材、南五味子药材、利肺片中的五味子酯甲和五味子醇甲, 计算五味子酯甲/五味子醇甲峰面积比值(R 值)。结果 五味子和南五味子 R 值分别为 0.025~0.043 和 16.516~32.115; 利肺片模拟制剂中, 五味子投料和南五味子投料 R 值分别为 0.011~0.040 和 19.260~29.995; 37 批利肺片样品中 R 值为 0.007~0.099, 14 家企业 37 批样品均未掺加南五味子。结论 以 $R < 0.1$ 作为利肺片中五味子药材投料的判定依据, 可用于利肺片中五味子和南五味子投料的鉴别, 该方法简便、快速、可行, 可确保利肺片投料的准确性。

关键词: 高效液相色谱法; 峰面积比值; 利肺片; 五味子; 南五味子; 五味子醇甲; 五味子酯甲

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0062-04

Screening of *Schisandrae Sphenantherae* Instead of *Schisandrae Chinensis* in Lifei Tablets by HPLC

ZHANG Yongping¹, LI Yongpeng²

(1. Haidong Inspection and Testing Center for Food Drug and Quality Technical, Haidong, Qinghai, China 810600; 2. Qinghai Provincial Institutes of Drug Control, Xining, Qinghai, China 810000)

Abstract: Objective To establish a method for the screening of *Schisandrae sphenantherae* in Lifei Tablets instead of *Schisandrae chinensis* by high performance liquid chromatography(HPLC). **Methods** Schisandrin and schisantherin were simultaneously determined by HPLC. R(the peak area ratio of *Schisandrae chinensis* and *Schisandrae sphenantherae*) were calculated. **Results** The R of *Schisandrae chinensis* and *Schisandrae sphenantherae* was 0.025-0.043 and 16.516-32.115, respectively; in the Lifei Tablets simulation preparation, the R of *Schisandrae chinensis* and *Schisandrae sphenantherae* were 0.011-0.040 and 19.260-29.995, respectively; in the 37 batches of Lifei Tablets samples from 37 enterprises, the R was 0.007-0.099; the Lifei Tablets samples from 14 enterprises did not add *Schisandrae sphenantherae*. **Conclusion** $R < 0.1$ is used as the judgment basis for feeding *Schisandrae chinensis* in Lifei Tablets. It can be used for the identification of *Schisandrae chinensis* and *Schisandrae sphenantherae* feeding in Lifei Tablets. The method is simple, reproducible, and accurate, and can ensure the accuracy of Lifei Tablets feeding.

Key words: high performance liquid chromatography; peak area ratio; Lifei Tablets; *Schisandrae chinensis*; *Schisandrae sphenantherae*; schisandrin; schisantherin

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 习称北五味子, 而南五味子为木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实^[1]。南北五味子功效相似, 但来源不同, 且五味子市场价格明显高于南五味子, 一般认为五味子的品质优于南五味子。利肺片处方规定投料为五味子, 其现行质量标准中以两者共有成分五味子甲素为鉴别指标, 难以反映投料情况^[2]。南五味子中五味子酯甲含量远高于五味子^[3-5]。本研究中对利肺片五味子药材的投料情况进行筛查, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定利肺片中五味子醇甲和五味子酯甲的含量^[6-10], 并以五味子酯甲峰面积和五味子醇甲峰面积的比值(R 值)判断产品是否有南五味子投料。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(包括二极管阵列

检测器, 美国沃特世公司); Milli-QA10 型超纯水器(德国默克密理博公司); BSA224SCW 型电子天平(赛多利斯公司, 精度为十万分之一); N-1001 型旋转蒸发仪(东京理化机械株式会社); KQ-500DE 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司, 功率为 250 W, 频率为 20 kHz)。

1.2 试药

五味子醇甲对照品(批号为 110857-200406), 五味子酯甲对照品(批号为 111529-200503), 均由中国食品药品检定研究院提供; 甲醇(色谱纯, 默克公司); 水为 Milli-Q 纯化水; 37 批利肺片(14 个厂家, 共 37 批次)均由 2017 年国家评价性抽验抽样所得; 利肺片模拟制剂(自购药材, 经检验符合《中国药典》标准, 按处方工艺提取所得); 五味子和南五味子药材各 10 批, 自购药材, 经青海省药品检验检测院刘亚蓉主任药师鉴定为木兰科五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥

成熟果实,南五味子为木兰科华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实,符合《中国药典》标准。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:依利特 C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇(A) - 0.1% 甲酸(B),梯度洗脱(0~10 min 时 30% A, 10~65 min 时 30% A $\rightarrow$ 80% A, 65~70 min 时 80% A $\rightarrow$ 95% A, 70~75 min 时 95% A $\rightarrow$ 15% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:250 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C。理论板数按五味子醇甲峰计不低于 3 000。

2.2 溶液制备

取五味子醇甲与五味子酯甲对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 28.4 μ g/mL 和 40.1 μ g/mL 的混合对照品溶液。取样品 20 片,除去包衣,研细,取约 1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理 30 min,取出,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。分别取五味子药材粉末、南五味子药材粉末各 1 g,精密称定,分别置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理 30 min,取出,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得药材溶液。按利肺片处方比例和工艺制备不含五味子的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

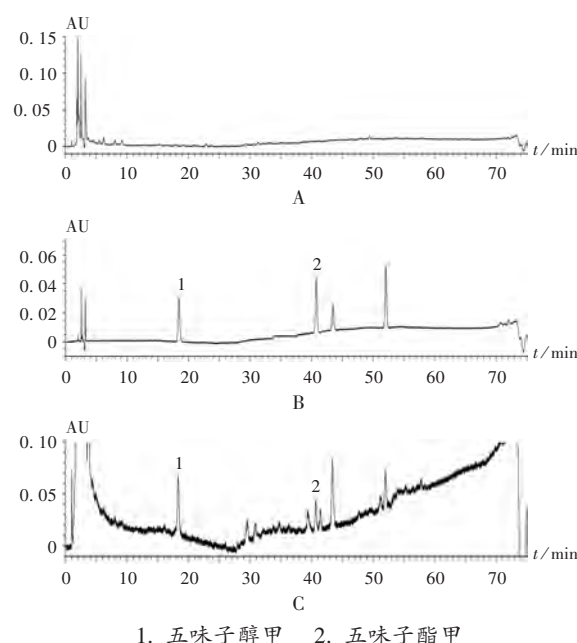
2.3 方法学考察

专属性试验:精密量取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μ L, 按拟订色谱条件进样测定。以进样量(X , μ g)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,五味子醇甲为 $Y_{醇} = 2\,083\,329.785\,7X_{醇} + 15\,733.935\,2$ ($r = 0.998\,7$),五味子酯甲为 $Y_{酯} = 1\,571\,706.640\,2X_{酯} + 16\,799.543\,3$ ($r = 0.999\,0$)。结果表明,五味子醇甲和五味子酯甲质量浓度分别在 0.056 8~0.568 0 μ g 和 0.080 2~0.802 0 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 10 μ L, 按拟订色谱条件连续进样测定 6 次,计算峰面积。结果五味子醇甲平均峰面积为 580 572、 RSD 为 0.74% ($n = 6$),五味子酯甲平均峰面积为 634 112、 RSD 为 0.72% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(吉林百姓堂药业有限公司,批号为 20150901)适量,依法制备供试品溶液,于 0, 4, 8,



1. 五味子醇甲 2. 五味子酯甲

A. 阴性对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图 1 专属性试验高效液相色谱图

12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果五味子醇甲平均峰面积为 710 018、 RSD 为 0.92% ($n = 6$),五味子酯甲平均峰面积为 84 489、 RSD 为 0.79% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批样品(吉林百姓堂药业有限公司,批号为 20150901)6 份,依法平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果五味子醇甲含量为 0.724 7 mg/g、 RSD 为 0.60% ($n = 6$),五味子酯甲含量为 0.102 7 mg/g、 RSD 为 1.81% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(吉林百姓堂药业有限公司,批号为 20150901,五味子醇甲含量为 0.721 6 mg/g,五味子酯甲含量为 0.102 2 mg/g)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入五味子醇甲对照品溶液(360 μ g/mL)和五味子酯甲对照品溶液(52 μ g/mL)0.8, 1.0, 1.2 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

2.4 R 值测定及评价

分别取五味子药材和南五味子药材各 10 批,依法制备药材溶液;分别取五味子投料模拟制剂和南五味子投料模拟制剂各 10 批,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,分别记录五味子酯甲和五味子醇甲的峰面积,计算 R 值。药材和模拟制剂的 R 值分布图见图 2。采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,结果五味子、南五味子的 R 值分别为 0.025~0.043 和 16.516~32.115;利肺片五味子投料和南五味子投料模拟制剂的 R 值分别为 0.011~0.040 和 19.260~29.995。方差分析检验结果显

表1 加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.500 8	0.500 8	0.361 4	0.051 2	0.288 0	0.041 6	0.645 9	0.091 2	98.78	96.15				
0.510 2	0.510 2	0.368 2	0.052 1	0.288 0	0.041 6	0.652 5	0.092 3	98.72	96.63				
0.501 2	0.501 2	0.361 7	0.051 2	0.360 0	0.052 0	0.719 6	0.102 5	99.42	98.65	99.14	96.92	0.41	0.99
0.503 7	0.503 7	0.363 5	0.051 5	0.360 0	0.052 0	0.720 1	0.101 6	99.06	96.35				
0.502 5	0.502 9	0.362 6	0.051 4	0.432 0	0.062 4	0.793 8	0.112 2	99.81	97.44				
0.504 3	0.504 3	0.363 9	0.051 5	0.432 0	0.062 4	0.791 9	0.111 6	99.07	96.31				

注:成分A为五味子醇甲,B为五味子酯甲。

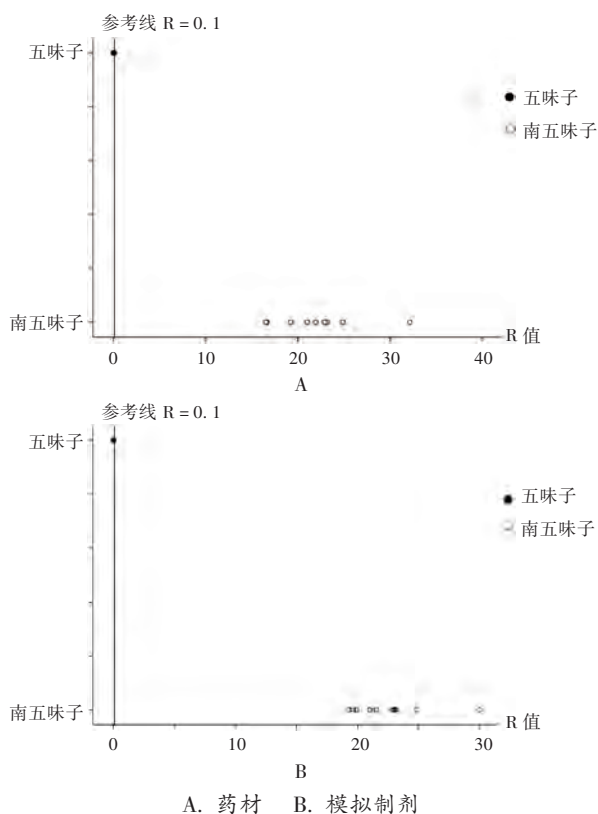


图2 药材和模拟制剂的R值分布图

示,五味子和南五味子R值有显著性差异($P<0.006$)。因此, $R<0.10$ 可作为五味子和南五味子在利肺片中投料的鉴别依据。结果显示,14个企业37批次利肺片样品R值在0.007~0.099之间,均小于0.10。可见,样品基本不存在以价格比较低廉的南五味子代替五味子投料现象。

2.5 含量测定及结果评价

对37批次样品分别进行五味子醇甲和五味子酯甲含量测定,结果见表2。可见,不同批次的五味子醇甲和五味子酯甲含量有一定差异。五味子醇甲含量范围为0.424 7~1.490 2 mg/g,平均0.789 6 mg/g;五味子酯甲含量范围为0.001 4~0.066 6 mg/g,平均0.026 1 mg/g。

3 讨论

试验中使用二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内扫描,发现五味子醇甲与五味子酯甲波长在

表2 37批次样品中2个成分含量测定结果(mg/g)

编号	五味子醇甲	五味子酯甲	编号	五味子醇甲	五味子酯甲
1	0.741 7	0.060 5	20	0.458 7	0.001 4
2	0.720 4	0.052 0	21	0.424 7	0.002 5
3	0.829 2	0.066 6	22	0.610 6	0.013 6
4	1.360 3	0.047 4	23	0.684 8	0.015 0
5	1.382 4	0.050 5	24	0.693 4	0.006 6
6	1.375 7	0.055 1	25	0.602 4	0.013 0
7	1.490 2	0.063 1	26	0.511 4	0.014 5
8	0.820 6	0.007 1	27	0.564 1	0.012 0
9	1.122 0	0.037 0	28	0.561 2	0.004 5
10	1.002 1	0.034 2	29	0.635 3	0.030 0
11	1.205 4	0.039 3	30	0.612 3	0.046 9
12	0.529 1	0.013 0	31	0.625 4	0.004 7
13	0.536 0	0.015 5	32	0.547 4	0.007 1
14	0.565 5	0.003 0	33	0.587 4	0.005 4
15	0.654 8	0.003 0	34	1.077 8	0.034 4
16	0.585 9	0.009 2	35	1.154 8	0.059 0
17	0.576 7	0.014 6	36	0.974 6	0.047 7
18	0.574 5	0.014 5	37	1.128 5	0.060 9
19	0.687 4	0.002 3			

(250±2)nm范围内均有最大吸收。故选择250 nm波长为检测波长。

流动相优化时分别考察了甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液等流动相系统,最终以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相时色谱分离度好,故选择此流动相。

分别考察了甲醇、80%甲醇、乙酸乙酯,结果表明,以甲醇为溶剂提取效果较好,故以甲醇为溶剂。

分别比较了超声处理15,30,60 min 3个提取时间。结果表明,15 min提取的含量低于提取30 min和60 min,且后两者含量基本相同,故确定提取时间为30 min。

综上所述,该方法准确、可靠,可用于利肺片中南北五味子投料的筛查和2种成分的含量测定。

参考文献:

- [1] WS₃-B-2152-96,卫生部药品标准·中药成方制剂(第十一册)[S].