

综合加权评分法预测山茱萸饮片有效期*

刘影,肖洋,段金芳,宋洪伟,窦志英
(天津中医药大学,天津 300193)

摘要:[目的]探究山茱萸饮片的有效期,为其临床用药的安全性和有效性提供实验依据。[方法]通过加速实验和留样观察实验,以马钱苷、莫诺苷的含量为考察指标,建立高效液相色谱(HPLC)测定方法,按药典要求测定浸出物量,采用综合加权评分法研究含量和浸出物量3个指标随时间的变化规律,预测山茱萸饮片室温下的有效期。[结果]加速实验6个月山萸肉和酒萸肉下降率分别为9.3%和1.07%,结果没有发生显著性变化,初步预测山茱萸饮片有效期可能为2a;酒萸肉长期实验12个月的下降率为13.31%,但总含量和浸出物量仍符合中国药典标准。[结论]加速实验预测山茱萸饮片有效期的方法可行,实际有效期应以长期实验具体数据为准。

关键词:山茱萸;加速实验;留样观察实验;综合加权评分法;有效期

中图分类号:R285.6

文献标志码:A

文章编号:1673-9043(2017)05-0378-04

国家食品药品监督管理局规定,化学药品和生物制品的有效期是指药品在规定的贮藏条件下,质量能够符合规定要求的期限;或者说,药品在规定的贮藏条件下,其含量下降到90%所需要的时间。而对中药的有效期并没有明确规定。为保障临床用药的安全有效,研究制定中药有效期至关重要^[1-5]。

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果肉。味酸、涩,微温,归肝、肾经。其功效为补益肝肾,涩精固脱。临床用于内热消渴,眩晕耳鸣,腰膝酸痛,阳痿遗精,遗尿、尿频,崩漏带下,大汗虚脱等,是中医临床常用的抗衰老药物之一^[6]。为考察山茱萸饮片的有效期,笔者依据2015版《中国药典》以马钱苷、莫诺苷和浸出物量为指标,通过加速实验和留样观察实验^[7],采用综合加权评分法^[8]对其3个指标进行综合评价,使预测出的山茱萸饮片有效期更加真实。

1 材料与仪器

1.1 研究对象 山茱萸购于天津中药饮片厂(批号1506024),产地河南。山萸肉:除去杂质和残留果核。酒萸肉:按黄酒用量25%,闷润2h,蒸制4h的方法炮制,取出,烘干即得。

1.2 仪器 岛津LC-2010AHT高效液相色谱系统,

LC solution 工作站;Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);BPS-100CH恒温恒湿箱(上海一恒科学仪器有限公司);FW100高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);FA210电子分析天平(上海舜宇恒科学仪器有限公司);KQ-300B超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);SFY-20红外快速水分测定仪(深圳市冠亚电子科技有限公司)。

1.3 试剂 马钱苷对照品(批号111640-200604),莫诺苷对照品(批号111640-200605)均购自中国药品生物制品检验所,供含量测定用。甲醇为色谱纯,其余所用试剂均为分析纯,市售。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-0.1%甲酸水(24:56),流速:0.8 mL/min,检测波长:240 nm,柱温:35℃,进样量10 μL。上述色谱条件下,各组分分离度良好,高效液相色谱(HPLC)图见图1。

2.2 对照品溶液配制 精密称取马钱苷5.08 mg、莫诺苷4.98 mg,分别加甲醇溶解并定容至5 mL,各取0.25 mL至5 mL容量瓶,加80%甲醇定容,最终得到含马钱苷0.050 8 g/L、莫诺苷0.049 8 g/L的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液配制 取本品粉末(过三号筛)约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25 mL,称定质量,超声45 min(功率250 W,频率35 kHz),放冷,再称定质量,用80%甲醇补足缺失的质量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

* 基金项目:国家科学技术基础性工作专项基金项目(2014FY111100)。

作者简介:刘影(1992-),女,硕士研究生,从事中药炮制和质量控制研究。

通讯作者:窦志英, E-mail: zhiyingdou@163.com。

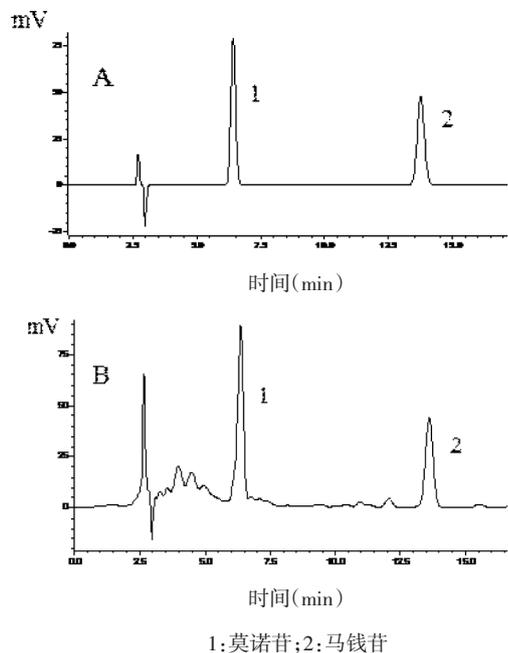


图1 混合对照品(A)和样品(B)HPLC 色谱图

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取马钱苷和莫诺苷对照品溶液,用80%甲醇稀释成0.12、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 5 g/L的系列混合对照品溶液,进样10 μL,按2.1项下色谱条件测定峰面积,以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y),得到各成分的回归方程、相关系数分别为马钱苷 $\hat{Y}=18\ 241X+1\ 026.6, r=0.999\ 8$;莫诺苷 $\hat{Y}=20\ 627X+1\ 107.4, r=0.998\ 9$ 。表明马钱苷和莫诺苷在0.025~1.2 μg呈良好线性关系。

2.4.2 稳定性实验 取酒萸肉粉末,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24 h进样,测定各成分峰面积。结果马钱苷和莫诺苷峰面积RSD值分别为1.13%和0.44%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.3 精密度实验 精密吸取2.2项下混合对照品溶液10 μL,重复进样6次,测定各成分色谱峰峰面积。结果马钱苷和莫诺苷峰面积的RSD分别为0.97%和0.85%,表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性实验 取同一酒萸肉粉末6份,按2.3项下方法制备供试品溶液,进样,测定马钱苷和莫诺苷含量。结果马钱苷和莫诺苷RSD值分别为1.83%和1.68%。表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率实验 精密称取6份已知含量的酒萸肉粉末约0.1 g,按照表加入马钱苷和莫诺苷的对照品溶液,按2.3项下方法制备供试品溶液,进

样,测定马钱苷和莫诺苷含量,计算回收率,见表1,结果表明该方法回收率良好。

表1 马钱苷和莫诺苷回收率实验结果(n=6)

成分	称样量(g)	样品含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
马钱苷	0.100 4	5.237 5	5.20	10.520 2	101.6		
	0.101 3	5.356 2	5.20	10.518 6	99.3		
	0.100 6	5.459 8	5.20	10.652 8	99.9	100.1	0.70
	0.101 2	5.185 3	5.20	10.449 7	101.2		
	0.100 4	5.340 0	5.20	10.491 1	99.1		
	0.100 7	5.281 8	5.20	10.461 4	99.6		
	0.100 4	5.088 3	5.30	10.536 0	102.8		
莫诺苷	0.101 3	5.124 7	5.30	10.415 3	99.8		
	0.100 6	5.173 9	5.30	10.443 4	99.4	100.3	0.93
	0.101 2	4.924 7	5.30	10.313 8	101.7		
	0.100 4	5.064 5	5.30	10.271 4	98.2		
	0.100 7	5.040 3	5.30	10.342 7	100.0		

3 实验内容及结果

3.1 加速实验

3.1.1 样品制备 将山萸肉和酒萸肉按市售包装(密封于小包装袋中),置于相对湿度为(75±5)%、温度(40±2)℃的恒温恒湿箱中放置6个月,分别于0(1个月内)、1、2、3、4、5、6个月取样,每次3份,研成粉末备用。

3.1.2 水分测定 采用红外快速水分测定仪测定。

3.1.3 浸出物量测定 按水溶性浸出物测定法项下冷浸法(2015年版四部通则2201)以水为溶剂测定浸出物量。

3.1.4 含量测定 按2.3项下制成供试品溶液,进样测定。含量和浸出物量以去除水分折合后的干燥品计算。

3.1.5 数据处理 综合加权评分的计算方法:根据莫诺苷、马钱苷含量和浸出物量测定结果,分别赋以A、B、C系数,即综合评分 $OD=45 \times A_i/A_{MAX}+45 \times B_i/B_{MAX}+10 \times C_i/C_{MAX}$ (总分以100计)。以OD均值进行直观综合分析,数据结果见表2,山萸肉和酒萸肉加权前后均值图见图2。

从表2和图2可以看出,山萸肉0~2个月和4~6个月OD均值呈递减趋势,下降率分别为9.13%和6.23%;2~4个月OD均值呈递增趋势,增长率为6.06%,0~6个月总体下降率为9.3%。酒萸肉0~2个月、3~4个月和5~6个月,OD均值呈现递增趋势,增长率分别为8.67%、6.04%和2.42%,2个月OD均

表2 山茱萸加速试验结果(n=6)

时间	外观性状		A 均值(%)		B 均值(%)		C 均值(%)		OD 均值	
	生品	炮制品	生品	炮制品	生品	炮制品	生品	炮制品	生品	炮制品
0月	紫红色	黑色	0.96	0.80	0.65	0.65	69.51	63.30	96.86	90.54
1月	紫红色	黑色	0.92	0.75	0.65	0.63	67.18	61.40	95.41	92.03
2月	紫红色夹有紫黑色	黑色	0.81	0.86	0.62	0.64	66.55	60.76	88.02	98.39
3月	紫黑色夹有紫红色	黑色	0.91	0.78	0.57	0.56	67.58	58.79	90.08	88.64
4月	紫黑色	黑色	0.90	0.85	0.63	0.57	68.04	58.96	93.35	93.99
5月	紫黑色	黑色	0.83	0.78	0.56	0.53	67.67	59.22	88.96	86.20
6月	紫黑色	黑色	0.83	0.78	0.64	0.55	70.96	63.92	87.53	88.29

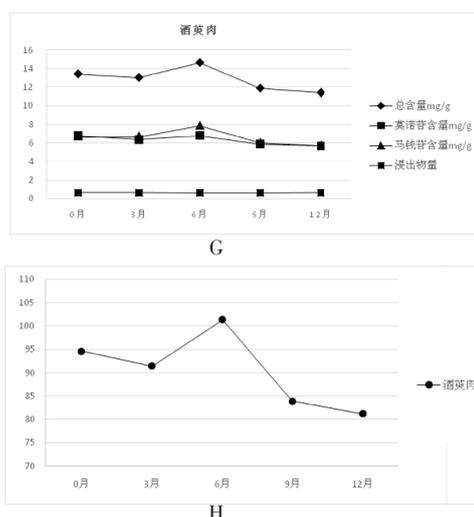
值达到极大值;2~3个月和4~5个月OD均值呈递减趋势,下降率分别为9.91%和8.29%,0~6个月总体下降率为1.07%。综合评价山萸肉和酒萸肉下降率均低于10%,总含量和浸出物量符合2015版《中国药典》规定要求。

3.2 长期实验 将酒萸肉按市售包装(密封于小包装袋中),放置于室温,每3个月取样1次,分别于0、3、6、9、12、18、24、36个月取样分析(按加速实验项下步骤测定样品含量和浸出物量)。长期实验正在进行中。数据结果见表3,加权前后的均值见图3。

表3 酒萸肉长期实验结果(n=6)

时间	外观性状	A 均值(%)	B 均值(%)	C 均值(%)	OD 均值
0月	黑色	0.68	0.67	64.00	94.62
3月	黑色	0.64	0.67	64.00	91.43
6月	黑色	0.68	0.79	61.35	101.32
9月	黑色	0.59	0.60	61.85	83.92
12月	黑色	0.57	0.57	64.17	81.23

从表3和图3可以看出,0~3个月和6~12个月,OD均值呈递减趋势,下降率分别为3.37%和19.83%;3~6个月OD均值呈递增趋势,增长率为9.89%,6个月OD均值达到极大值;0~12个月总体下降率为13.31%,大于10%,但总含量和浸出物量仍符合2015版《中国药典》规定要求。

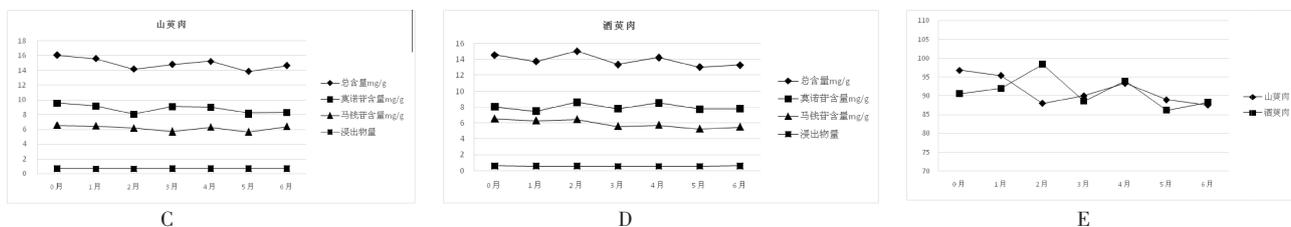


G:酒萸肉各指标均值图;H:加权后OD均值图
图3 酒萸肉长期实验加权前后均值图

4 小结

4.1 山茱萸初始、加速实验和留样观察实验前后性状描述 山茱萸呈不规则的片状或囊状,山萸肉表面紫红色,皱缩,有光泽,研粉,粉末呈红棕色。经加速实验后,表面颜色由紫红色逐渐变为紫黑色,质变柔软,研粉,粉末由红棕色逐渐变为红褐色。酒萸肉表面黑色,有光泽,研粉,粉末红褐色,微有酒香气。经加速实验和留样观察后,颜色变化不明显,酒香气减弱,质滋润柔软。山萸肉较酒萸肉变化明显,实验前后的性状变化均在药典要求范围内。

4.2 加速实验和留样观察实验结果分析 对山萸



C:山萸肉各指标均值图;D:酒萸肉各指标均值图;E:加权后OD均值图
图2 山茱萸饮片加速试验加权前后均值图

肉和酒萸肉均做了加速实验,比较2种饮片稳定性差异,综合加权结果酒萸肉较山萸肉下降率低,稳定性更好;而且临床应用主要以酒萸肉为主,因此,留样观察实验仅选择了酒萸肉。

莫诺昔和马钱昔是环烯醚萜类的2个主要活性成分,从功效上看,马钱昔的药理报道较多,如马钱昔的昔元马钱素对免疫反应有双向调节作用和抗休克作用^[9]。可见,马钱昔的功效高于莫诺昔。从含量上看,莫诺昔高于马钱昔。从功效和含量两方面考虑,莫诺昔和马钱昔评分相当,高于浸出物,因此,将两者权重系数定为45%,浸出物量权重系数定为10%。

加速实验研究山茱萸中有效成分莫诺昔、马钱昔含量及浸出物量随时间增加的化学成分反应变化过程,满足阿累尼乌斯(Arrhenius)定律的适用条件(用于化学反应速度研究)。40℃加速实验6个月,山萸肉OD均值总体下降率为9.3%,酒萸肉总体下降率为1.07%,下降率均小于10%。再根据加速实验的“活化能估算法”^[10](大多数药物降解反应活化能在41.86~83.72 kJ/mol之间,可估算出某一温度下,样品加速实验含量不低于起始量的90%时所对应的室温下的有效期)预测山茱萸饮片常温下的有效期可能为2a。留样观察实验12个月酒萸肉的

OD均值下降率为13.31%,高于10%,但总含量和浸出物量仍符合2015版《中国药典》要求。可能是室温下的温度、湿度不恒定所致,酒萸肉具体有效期有待后面留样观察实验数据的进一步验证。

参考文献:

- [1] 张志国,曹 臣,欧阳荣,等.丁香有效期的研究[J].中国现代中药,2007,9(11):19-22.
- [2] 曹 臣,欧阳荣,张志国,等.牡丹皮饮片的有效期研究[J].中国现代药物应用,2014,8(16):15-17.
- [3] 王金梅,李昌勤,康文艺.初匀速法测定中药薄荷有效期[J].中国中药杂志,2012,37(21):3185-3187.
- [4] 杨 磊,朱 青,张志国,等.大黄有效期的研究[J].安徽农业科学,2012,40(36):17534-17535.
- [5] 薛志平,王金梅,刘 杰,等.初均速法预测金银花的有效期[J].中国中药杂志,2012,37(21):3179-3181.
- [6] 刘 洪,许惠琴.山茱萸及其主要成分的药理学研究进展[J].南京中医药大学学报,2003,19(4):254-256.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:354-355.
- [8] 宋 崎,周小初,宋 英,等.正交设计法优化酒萸肉炮制工艺条件[J].上海中医药杂志,2008,42(6):85-87.
- [9] 楚 晋.山萸肉化学成分及其药理活性的研究[J].中国自然医学杂志,1999,11(1):46-47.
- [10] 张兆旺.中药药剂学[M].北京:中国中医药出版社,2007:45.

(收稿日期:2017-05-28)

The period validity of Cornus Ficalis by comprehensive weighted scoring method

LIU Ying, XIAO Yang, DUAN Jin-fang, SONG Hong-wei, DOU Zhi-ying
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] Explore the validity period of Cornus of ficinalis, to provide experimental basis for its safety and effectiveness of clinical medication. [Methods] The Cornus Ficalis by accelerated test and sample observation test, determination of loganin in Cornus, mornoniside in HPLC, determination of the amount of extract in accordance with the requirement of Pharmacopoeia. Adopt comprehensive weighted scoring method and research contents and extract three index changing with the time, predict the validity of Cornus at room temperature. [Results] Accelerated test for 6 months, Cornus and Fructus Corni decrease rate was 9.3% and 1.07% respectively. the results had no significant change, preliminary prediction of Cornus Ficalis is valid for 2 years; Fructus Corni long-term test 12 months decline rate is 13.31%, but the total content and extract amount is still in accordance with the standard of Chinese pharmacopoeia. [Conclusion] The accelerated test prediction method of Cornus Ficalis is valid and feasible, practical and effective period should be based on the specific data for the long-term test.

Key word: Cornus Ficalis; accelerated experiment; sample observation experiment; comprehensive weighted scoring method; validity period