

马海治瘫胶囊的HPLC指纹图谱及其5个成分含量测定研究[△]

刘满军^{1*}, 崔小敏², 石会丽^{1#}, 王晓萍¹, 陈志永², 牛安琦¹, 高蓉¹, 曹小平¹(1.陕西省中医医院制剂室, 西安 710003; 2.陕西省中医药研究院, 西安 710068)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2980-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.20

摘要 目的:建立马海治瘫胶囊的指纹图谱,并测定其中主要成分的含量,为其制剂工艺的稳定性及质量控制提供科学依据。方法:采用Inertsil ODS-3色谱柱,以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长为250 nm(0~23 min和31~120 min)、230 nm(23~31 min),柱温为30℃,流速为1.0 mL/min。应用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2012版)建立10批马海治瘫胶囊的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱并进行相似度评价,分别以对照药材、缺味药材阴性样品和对照品对色谱峰进行归属和指认,并对指认出的主要成分进行定量分析。结果:10批样品的相似度均在0.99以上,共确定了20个共有峰,并指认了其中10个色谱峰。其中,1、13、14、15、16、17、18、19、20号色谱峰来源于大黄,3、4、6、7号色谱峰来源于制马钱子,8号色谱峰来源于当归,2、5、9、10、11、12号色谱峰未发现相应的药材来源;通过与对照品比对,指认了1、4、6、7、8、16、17、18、19、20号色谱峰分别为没食子酸、马钱苷酸、士的宁、马钱子碱、阿魏酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。在对指认出的5个主要成分(马钱苷酸、士的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚)的含量测定中,方法学考察均符合相关标准,10批样品中马钱苷酸、士的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚含量分别为2.477 1~2.785 9、1.746 1~1.946 0、1.374 6~1.505 8、1.573 2~1.824 1和0.232 1~0.261 7 mg/g。结论:建立的方法可靠、准确、稳定、简便,可作为马海治瘫胶囊的制剂工艺与质量监控依据。

关键词 马海治瘫胶囊;指纹图谱;含量测定;高效液相色谱法

Study on HPLC Fingerprint and Content Determination of 5 Components in Mahai Zhitan Capsule

LIU Manjun¹, CUI Xiaomin², SHI Huili¹, WANG Xiaoping¹, CHEN Zhiyong², NIU Anqi¹, GAO Rong¹, CAO Xiaoping¹ (1.Dept. of Preparation, Shaanxi Provincial Hospital of TCM, Xi'an 710003, China; 2.Shaanxi Provincial Academy of TCM, Xi'an 710068, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of Mahai zhitan capsule, to determine the contents of main components, and to provide scientific basis for the stability and quality control of the preparation technology. METHODS: The determination was performed on Inertsil ODS-3 column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 250 nm (0-23 min and 31-120 min) and 230 nm (23-31 min). The column temperature was set at 30 °C. HPLC fingerprint for 10 batches of Mahai zhitan capsule was established by using "similarity evaluation software for chromatographic fingerprint of traditional chinese medicine" (2012 edition) and the similarity was evaluated. The chromatographic peaks were assigned and identified with reference substance, negative samples without ingredient and substance control respectively, and the identified main components were quantitatively analyzed. RESULTS: The similarity of 10 batches of sample was more than 0.99; 20 common peaks were found, and 10 common peaks were identified. Among them, No. 1, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 chromatographic peaks originated from *Rheum palmatum*; No. 3, 4, 6, 7 chromatographic peaks originated from processed *Strychnos nuxvomica*; No. 8 chromatographic peaks originated from *Angelica sinensis*; the corresponding source of medicinal materials was not found in No. 2, 5, 9, 10, 11, 12 chromatographic peaks. By comparing the reference substances, No. 1, 4, 6, 7, 8, 16, 17, 18, 19 and 20 chromatographic peaks were identified as gallic acid, loganin acid, strychnine, brucine, ferulic acid, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and emodin methyl ether, respectively. In the determination of identified five main components (loganin, strychnine, brucine, emodin and chrysophanol), the methodological investigation met the relevant standards. In 10 batches of samples, the contents of loganin, strychnine, brucine, emodin and chrysophanol were 2.477 1-2.785 9, 1.746 1-1.946 0, 1.374 6-1.505 8, 1.573 2-1.824 1 and 0.232 1-0.261 7 mg/g, respectively. CONCLUSIONS:

[△] 基金项目:陕西省重点研发计划项目(No.2017SF-341)

* 副主任药师。研究方向:中药炮制与制剂开发。E-mail: 512781572qq.com

通信作者:研究员。研究方向:中药化学与制剂开发。E-mail: 2364026342@qq.com

The established method is reliable, accurate, stable and simple, which could provide reference for the preparation technology and quality control of Mahai zhitan capsule.

KEYWORDS Mahai zhitan capsule; Fingerprint; Content determination; HPLC

马海治瘫胶囊是本院(即陕西省中医院)脑内科前辈依据中医阴阳平衡理论创立的具有中医药特色的制剂方之一,由黄芪、大黄、制马钱子、水蛭、当归、海风藤、千年健等七味药组成,具有益气通络、活血化瘀、醒脑开窍和健肢回语的功效,其在临床使用了四十余年,治疗软瘫中风的总有效率达95%以上^[1-2]。相关药理研究也表明,马海治瘫胶囊不仅具有延长小鼠缺氧存活时间、延长凝血时间以及有效改善机体微循环的作用,并能显著改善神经功能症状和行为学障碍、减轻脑水肿程度、缩小脑梗死面积^[3-4]。但目前,该制剂质量标准仅有大黄和黄芪的薄层鉴别^[5],无法全面控制药品的质量,更无法全面阐释本制剂治疗中风疾病的物质基础及其多靶点治疗的整体性和复杂性内涵。基于此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立马海治瘫胶囊的指纹图谱,确认指纹特征峰物质,同时对方中二味君药制马钱子与黄芪中含有的马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚5个成分建立含量测定方法,为马海治瘫胶囊制剂工艺稳定性考察和质量评价与控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 Infinity HPLC仪(美国Agilent公司);KQ-100超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);BT25S电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司, $d=0.01\text{ mg}$)。

1.2 药品与试剂

10批马海治瘫胶囊均由本院制剂室制备(批号:2017060101、2017060102、2017060103、2017060104、2017060105、2017060106、2017060107、2017060108、2017060109、2017060110,依次编号为S1~S10,规格:0.3 g/粒,每1 g中含生药量2.91 g);药材黄芪、大黄、制马钱子、水蛭、当归、海风藤、千年健(陕西兴盛德药业有限责任公司,批号:20170101、20170203、20170206、20170210、20170311、20170306、20170216),经陕西省中医医院石会丽研究员鉴定均符合药典标准;对照品马钱苷酸(批号: MUST-18040209,纯度:99.52%)、土的宁(批号: MUST-16053101,纯度:99.51%)、马钱子碱(批号: MUST-16041906,纯度:99.31%)、芦荟大黄素(批号: MUST-17030605,纯度:98.65%)、大黄素(批号: MUST-16110712,纯度:99.10%)、大黄素甲醚(批号: MUST-17030622,纯度:99.21%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;对照品阿魏酸(批号:0757-9804,纯度:99.41%)、大黄酚(批号:0796-20006,纯度:98.61%)、大黄酸(批号:0757-9804,纯度:98.65%)均购自中国食品药品检定研究院;对照品没食子酸为自制(批号:20180201,纯度:99.1%);乙腈(美国Honeywell公司,色谱纯);甲酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯);甲醇(成都市科隆化学品有限公司,分析纯);磷酸(国药集团化学有限责任公司,分析纯);其余试剂均为

分析纯。

2 方法与结果

2.1 马海治瘫胶囊指纹图谱的研究

2.1.1 色谱条件

色谱柱为Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温为30℃;流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸(B)溶液,梯度洗脱(0~10 min,5% A;10~70 min,5%→30% A;70~120 min,30%→100% A);检测波长为250 nm(0~23 min和31~120 min)、230 nm(23~31 min);流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL。

2.1.2 溶液的制备

(1)供试品溶液的制备。取马海治瘫胶囊内容物1.0 g,精密称定,置于50 mL具塞三角瓶中,加75%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声(频率:250 W、40 kHz)30 min,放至室温;再次称定质量,用75%甲醇补足缺失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

(2)单味药材样品溶液的制备。分别取7种单味药材粉末0.5 g,精密称定,依照“2.1.2(1)”项下供试品溶液的制备方法,制得各单味药材样品溶液。

(3)对照品溶液的制备。精密称取各对照品适量,分别置于10 mL量瓶中,用75%甲醇溶解并定容至刻度,制成每1 mL分别含没食子酸0.80 mg、马钱苷酸0.456 mg、土的宁0.15 mg、马钱子碱0.15 mg、阿魏酸0.21 mg、芦荟大黄素0.203 mg、大黄酸0.091 mg、大黄素0.475 mg、大黄酚0.36 mg和大黄素甲醚0.11 mg的单一对照品溶液。

(4)缺味药材阴性样品溶液的制备 按处方比例分别称取其中6味药材,照制剂工艺制得缺味药材阴性样品,再按“2.1.2(1)”项下方法分别制得各药材的缺味药材阴性样品溶液。

2.1.3 指纹图谱建立的方法学考察

(1)精密度试验。精密称取马海治瘫胶囊(批号:2017060104)内容物1.0 g,采用“2.1.2(1)”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次,以峰19为参照峰(峰面积居中、分离度良好),计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.02%($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于2.0%($n=6$),表明仪器精密度良好。

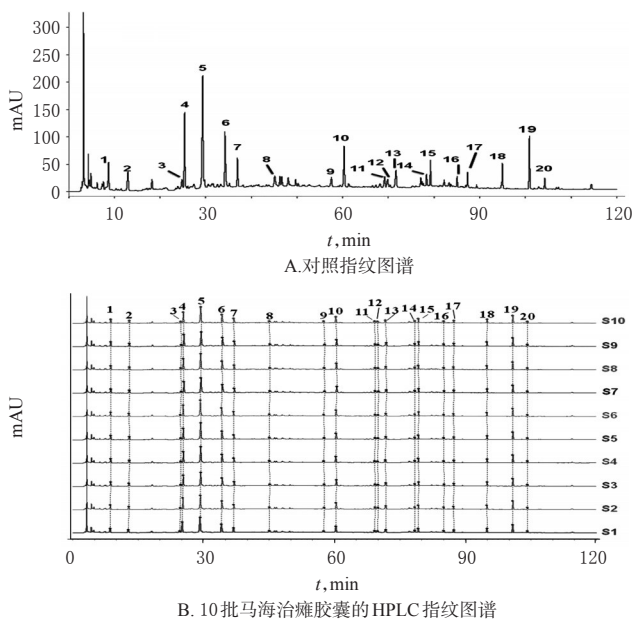
(2)重复性试验。取同一批马海治瘫胶囊(批号:2017060104)内容物1.0 g,精密称定,平行6份,采用“2.1.2(1)”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以峰19为参照峰计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.99%($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于3.01%($n=6$),表明该方法重复性良好。

(3)稳定性试验。取同一供试品溶液(样品批号:2017060104),分别在室温放置0、2、4、8、12、24 h后,按

“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以峰19为参照峰计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.83% ($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于2.02% ($n=6$),表明样品溶液在室温放置24 h稳定。

2.1.4 HPLC指纹图谱的建立与分析

(1)马海治瘫胶囊HPLC指纹图谱的生成。分别按“2.1.2(1)”项下方法制备10批马海治瘫胶囊的供试品溶液后,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录10批马海治瘫胶囊的色谱图。将所得图谱文件转换成“AIA”格式,批量导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2012版)中,以S9谱图作为参照图谱,将时间窗设为0.3 min,采用多点校正法进行色谱峰匹配,选择中位数法生成对照指纹图谱。对照指纹图谱和10批马海治瘫胶囊的HPLC指纹图谱见图1。



注:峰1~20为共有峰

Note: peaks 1-20 are common peaks

图1 10批马海治瘫胶囊的HPLC指纹图谱及对照指纹图谱

Fig 1 Control fingerprint and HPLC fingerprint of 10 batches of Mahai zhitan capsules

(2)相似度评价及共有指纹图谱的标定。因峰19(大黄素)峰面积居中、分离度良好,因此作为参照峰,标定20个峰的相对保留时间及峰面积大小,并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2012版),以对照指纹图谱R为参照,进行整体相似度评价。结果显示,10批马海治瘫胶囊的相似度均大于0.99,说明不同批次间样品的相似度较高,其生产工艺相对稳定。10批马海治瘫胶囊共有峰的相对保留时间见表1,相对峰面积见表2,相似度评价结果见表3。

(3)共有峰的归属。取各单味药材溶液、缺味药材阴性样品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样检测,记录

表1 10批马海治瘫胶囊共有峰的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of common peaks of 10 batches of Mahai zhitan capsules

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD, %
1	0.086	0.088	0.087	0.087	0.087	0.086	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.63
2	0.127	0.128	0.128	0.129	0.129	0.128	0.129	0.129	0.129	0.129	0.128	0.54
3	0.243	0.245	0.245	0.246	0.246	0.245	0.247	0.246	0.247	0.246	0.245	0.44
4	0.249	0.251	0.252	0.252	0.252	0.251	0.253	0.252	0.253	0.252	0.252	0.41
5	0.290	0.290	0.291	0.291	0.291	0.290	0.292	0.291	0.292	0.291	0.291	0.21
6	0.338	0.339	0.34	0.339	0.339	0.339	0.340	0.340	0.340	0.339	0.339	0.20
7	0.366	0.366	0.367	0.366	0.366	0.366	0.367	0.367	0.368	0.366	0.367	0.18
8	0.447	0.448	0.448	0.447	0.447	0.447	0.449	0.448	0.449	0.447	0.448	0.14
9	0.571	0.571	0.571	0.570	0.571	0.571	0.572	0.572	0.572	0.570	0.598	0.599
10	0.599	0.598	0.599	0.599	0.600	0.599	0.600	0.598	0.686	0.687	0.687	0.686
11	0.687	0.687	0.688	0.687	0.688	0.686	0.693	0.693	0.694	0.692	0.693	0.694
12	0.694	0.694	0.694	0.692	0.711	0.713	0.712	0.711	0.713	0.712	0.713	0.712
13	0.712	0.711	0.778	0.777	0.778	0.779	0.779	0.778	0.777	0.778	0.778	0.779
14	0.785	0.786	0.786	0.785	0.786	0.786	0.786	0.786	0.786	0.785	0.843	0.844
15	0.843	0.845	0.844	0.843	0.844	0.843	0.845	0.844	0.866	0.867	0.867	0.866
16	0.868	0.866	0.867	0.868	0.867	0.868	0.942	0.941	0.944	0.942	0.941	0.943
17	0.941	0.942	0.943	0.942	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18	1.000	1.000	1.033	1.034	1.032	1.032	1.033	1.034	1.033	1.034	1.034	1.033
19(参照)	0.571	0.571	0.571	0.570	0.571	0.571	0.572	0.572	0.572	0.570	0.598	0.599
20	0.599	0.598	0.599	0.599	0.600	0.599	0.600	0.598	0.686	0.687	0.687	0.686

表2 10批马海治瘫胶囊共有峰的相对保留峰面积

Tab 2 Relative retention peak area of common peaks in 10 batches of Mahai zhitan capsules

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD, %
1	0.485	0.474	0.486	0.474	0.476	0.476	0.484	0.486	0.466	0.474	0.478	1.45
2	0.519	0.513	0.537	0.517	0.554	0.534	0.541	0.534	0.516	0.517	0.528	2.59
3	0.208	0.212	0.232	0.219	0.224	0.230	0.226	0.235	0.213	0.220	0.222	2.10
4	1.463	1.378	1.403	1.427	1.447	1.437	1.460	1.450	1.408	1.402	1.427	2.02
5	2.696	2.435	2.602	3.025	3.178	2.975	2.825	2.999	2.453	3.001	2.819	2.19
6	1.285	1.188	1.242	1.233	1.281	1.251	1.238	1.280	1.183	1.224	1.241	2.91
7	0.554	0.509	0.533	0.537	0.546	0.540	0.529	0.534	0.510	0.533	0.533	2.63
8	0.397	0.396	0.392	0.399	0.406	0.404	0.402	0.398	0.388	0.399	0.398	1.33
9	0.268	0.245	0.259	0.284	0.284	0.270	0.268	0.298	0.251	0.285	0.271	2.09
10	1.021	0.869	0.924	0.913	0.956	0.945	0.934	0.934	0.896	0.897	0.929	2.47
11	0.305	0.295	0.297	0.294	0.305	0.301	0.301	0.299	0.301	0.294	0.299	1.32
12	0.277	0.268	0.285	0.247	0.256	0.269	0.271	0.265	0.288	0.265	0.269	2.63
13	0.565	0.596	0.565	0.522	0.497	0.528	0.535	0.524	0.582	0.522	0.544	2.83
14	0.232	0.218	0.234	0.233	0.227	0.234	0.229	0.232	0.230	0.233	0.230	2.08
15	0.352	0.312	0.355	0.376	0.389	0.385	0.368	0.374	0.338	0.376	0.363	2.55
16	0.185	0.193	0.183	0.180	0.176	0.179	0.180	0.179	0.188	0.180	0.182	2.74
17	0.246	0.261	0.235	0.249	0.230	0.242	0.233	0.236	0.251	0.242	0.243	2.85
18	0.500	0.475	0.515	0.494	0.501	0.503	0.503	0.474	0.474	0.494	0.493	2.92
19(参照)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
20	0.215	0.198	0.205	0.186	0.202	0.207	0.206	0.205	0.207	0.203	0.203	2.61

色谱图,通过色谱峰对比,对马海治瘫胶囊指纹图谱中20个共有峰进行归属。结果发现,马海治瘫胶囊20个共有峰中的1、13、14、15、16、17、18、19、20号色谱峰来源于大黄;3、4、6、7号色谱峰来源于制马钱子;8号色谱峰来源于当归;但2、5、9、10、11、12号色谱峰没有找到相应的药材来源,可能是在制剂制备过程中新产生的成分。各单味药材溶液与缺味药材药品溶液的色谱图见图2。

(4)色谱峰的指认。将对照品溶液按“2.1.1”项下色

表3 10批马海治瘫胶囊相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation of 10 batches of Mahai zhitan capsules

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.999	0.999	0.998	0.995	0.998	0.999	0.998	0.999	0.994
S2	0.999	1.000	0.999	0.994	0.990	0.994	0.996	0.995	1.000	0.993
S3	0.999	0.999	1.000	0.997	0.994	0.997	0.998	0.997	1.000	0.995
S4	0.998	0.994	0.997	1.000	0.999	0.999	0.999	1.000	0.995	0.995
S5	0.995	0.990	0.994	0.999	1.000	0.999	0.998	0.999	0.992	0.995
S6	0.998	0.994	0.997	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	0.995	0.996
S7	0.999	0.996	0.998	0.999	0.998	1.000	1.000	0.999	0.997	0.997
S8	0.998	0.995	0.997	1.000	0.999	0.999	0.999	1.000	0.996	0.995
S9	0.999	1.000	1.000	0.995	0.992	0.995	0.997	0.996	1.000	0.993
S10	0.994	0.993	0.995	0.995	0.995	0.996	0.997	0.995	0.993	1.000
对照指纹图谱	0.999	0.997	0.999	0.999	0.997	0.999	1.000	0.999	0.998	0.996

谱条件进样检测,记录色谱图,通过色谱峰对比,对马海治瘫胶囊中主要的共有峰进行指认。结果,指认了1、4、6、7、8、16、17、18、19、20号色谱峰分别为没食子酸、马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、阿魏酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚,对照品色谱图见图3。

2.2 马海治瘫胶囊中5个成分的含量测定

2.2.1 溶液的制备

(1)混合对照品溶液的制备。分别取马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚对照品适量,精密称定,置于同一10 mL棕色量瓶中,用适量75%的甲醇溶解后定容至刻度,制成每1 mL含马钱苷酸0.074 54 mg、土的宁0.120 35 mg、马钱子碱0.106 36 mg、大黄素0.035 33 mg、大黄酚0.094 5 mg的混合对照品溶液。

(2)供试品溶液的制备。制备方法同“2.1.2(1)”项下。

2.2.2 色谱条件与系统适用性试验

取混合对照品溶液和供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图。结果,各待测峰与相邻峰间的分离度均大于1.5,理论板数以马钱苷酸峰计为100 185,以土的宁峰计为56 395,以马钱子碱峰计为111 486,以大黄素峰计为1 168 203,以大黄酚峰计为1 131 014,色谱图见图4。

2.2.3 含量测定方法学考察及结果

(1)线性关系考察。精密吸取“2.2.1(1)”项下混合对照品溶液2、4、8、12、16和20 μL ,在“2.1.1”项下色谱条件下进样分析,记录色谱图并测定峰面积。以进样量为横坐标(x , μg)、峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,得到马钱苷酸的回归方程为 $y=1\ 097.8x-4.714\ 5$ ($r=0.999\ 8$),土的宁的回归方程为 $y=2\ 129.1x-35.112$ ($r=0.999\ 6$),马钱子碱的回归方程为 $y=1\ 152.5x+6.378\ 4$ ($r=0.999\ 9$),大黄素的回归方程为 $y=13\ 070x+19.5$ ($r=0.999\ 7$),大黄酚的回归方程为 $y=855.38x-3.030\ 4$ ($r=0.999\ 6$),表明马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚分别在进样量为0.149 1~1.491、0.240 7~

2.407、0.212 7~2.127、0.070 1~0.701、0.189~1.89 μg 范围内与其各自峰面积线性关系良好。

(2)检测限与定量限试验。取混合对照品溶液逐级稀释,分别以信噪比(S/N)为3和10时的对照品质量浓度为检测限和定量限。结果,马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚的检测限分别为 1.19×10^{-4} 、 1.60×10^{-4} 、 2.13×10^{-4} 、 2.36×10^{-4} 、 3.15×10^{-4} μg ,定量限分别为 3.58×10^{-4} 、 4.81×10^{-4} 、 6.38×10^{-4} 、 7.07×10^{-4} 、 9.45×10^{-4} μg 。

(3)精密度试验。精密吸取同一混合对照品溶液10 μL ,在“2.1.1”项下色谱条件下重复进样测定6次,测得马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚的峰面积RSD分别为1.15%、0.62%、0.89%、1.20%、1.19% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

(4)重复性试验。精密称取同一批马海治瘫胶囊粉末(批号:2017060104)6份,按“2.2.1(2)”项下方法制备成供试品溶液,在“2.1.1”项下色谱条件下进样分析,计算得马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚的平均含量分别为2.436 2、1.925 7、1.413 2、1.667 5、0.236 5 mg/g,RSD分别为1.68%、1.35%、0.96%、1.64%、0.62% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

(5)稳定性试验。取“2.2.1(2)”项下同一供试品溶液(批号:2017060104),室温放置0、2、4、6、8、12 h后,分别按“2.1.1”项下色谱条件下进样分析,计算得马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚峰面积的RSD分别为0.50%、0.94%、1.81%、1.43%、0.52% ($n=6$),表明供试品溶液室温放置12 h稳定。

(6)加样回收试验。精密称取已知含量的马海治瘫胶囊粉末(批号:2017060104)0.5 g,共称取6份,置于具塞三角瓶中,分别按待测成分质量比为1:1的比例加入相应对照品溶液,按“2.2.1(2)”项下方法制备供试品溶液后,按“2.1.1”项下色谱条件下进样分析,测定其含量并计算其回收率。结果,5个成分的平均回收率为98.88%~100.31%,RSD为0.71%~1.31% ($n=6$)。回收率测定结果见表4。

(7)样品含量测定。取10批马海治瘫胶囊样品粉末各1.0 g,精密称定,按“2.2.1(2)”项下方法制备供试品溶液后,按“2.1.1”项下色谱条件下进样分析,计算得马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素和大黄酚的含量分别为2.477 1~2.785 9、1.746 1~1.946 0、1.374 6~1.505 8、1.573 2~1.824 1和0.232 1~0.261 7 mg/g,结果见表5。

3 讨论

3.1 色谱条件优选

在前期研究中,笔者参考文献报道^[6-8],分别对不同色谱柱[Inertsil ODS-3(250 mm \times 4.6 mm,5 μm)、Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μm)、Diamonsil C₁₈

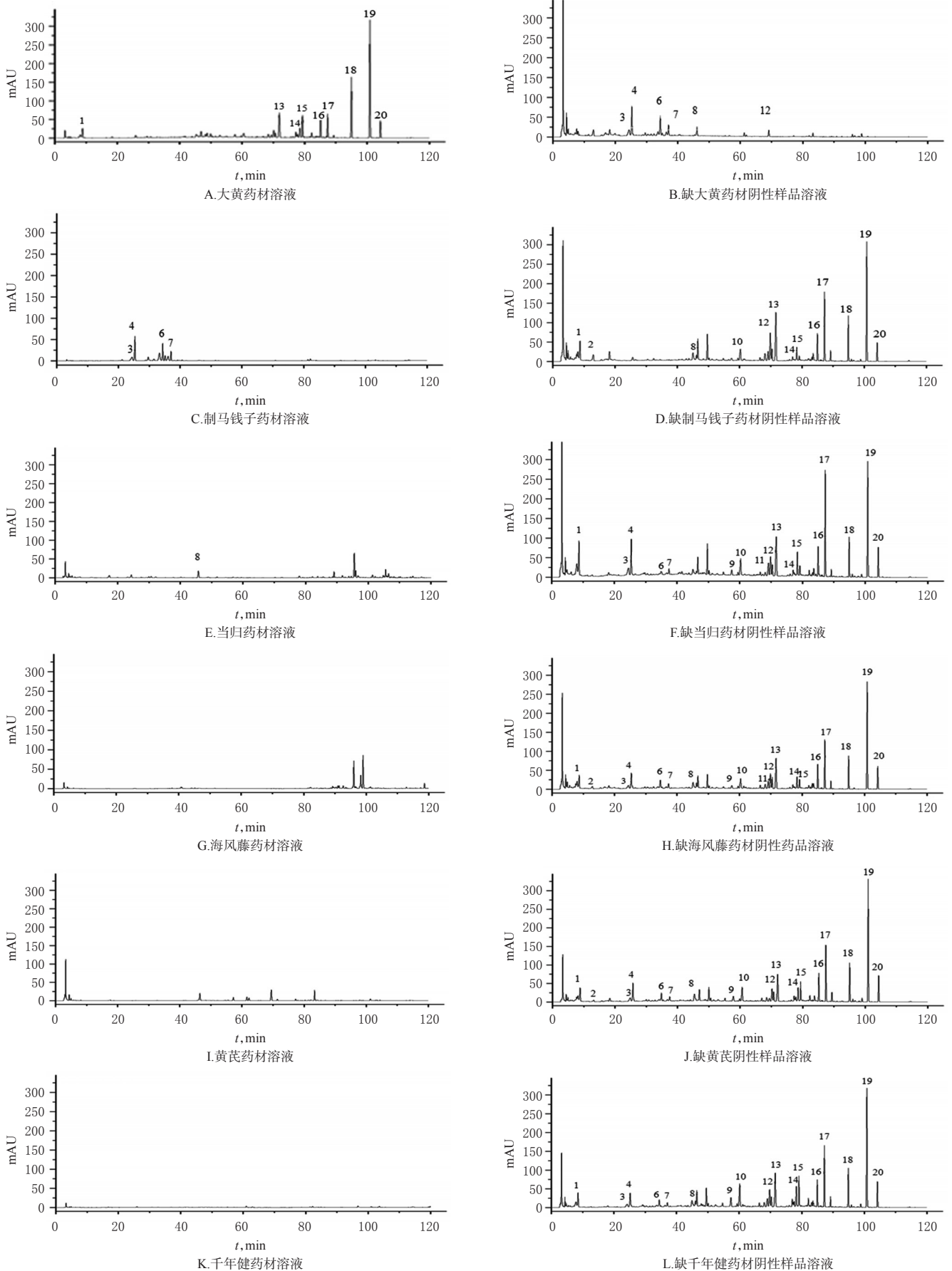
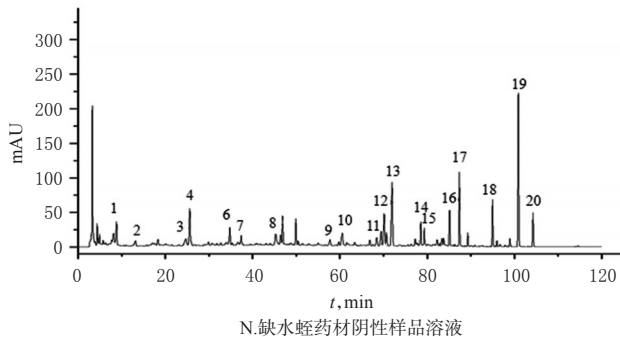
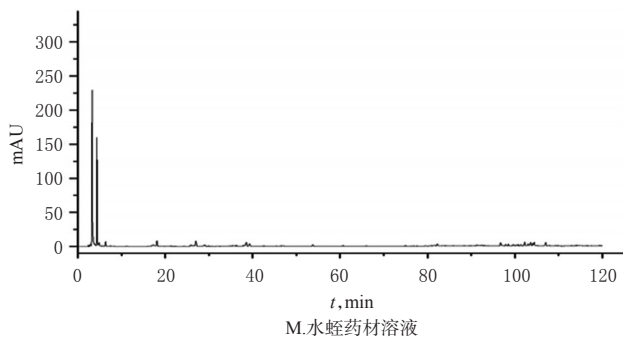


图2 单味对照药材和缺味药材阴性样品的色谱图

Fig 2 Chromatograms of reference substance, negative sample lacking single herb



续图2

Continued fig 2

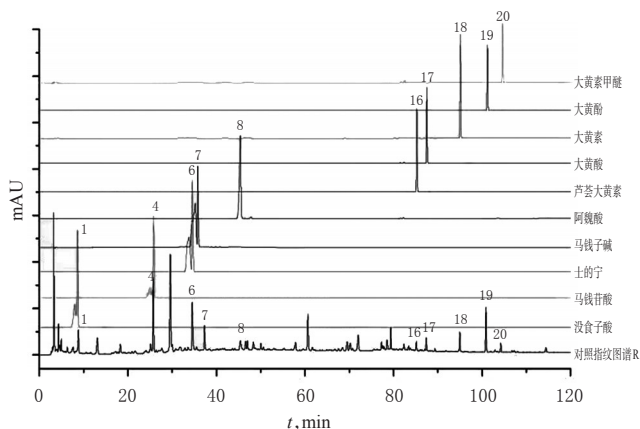


图3 10种对照品的色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of 10 kinds of substance control

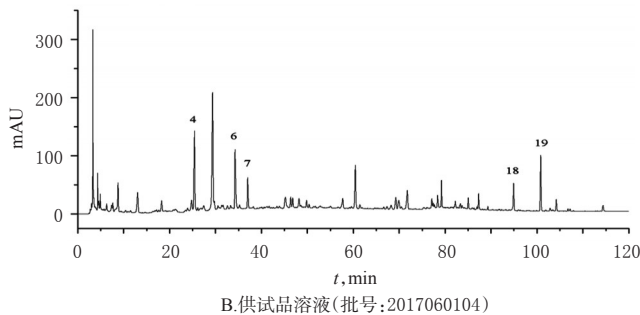
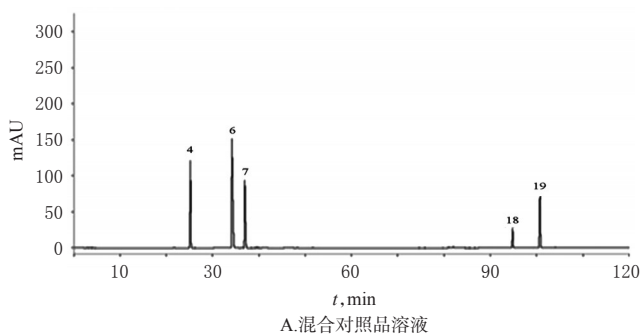


图4 高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram

(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]和不同流动相系统(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸、乙腈-磷酸)以及不同柱温(25、30、

表4 5个待测成分的回收率测定结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery tests of the five analytes (n=6)

化合物	称样量,g	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
马钱苷酸	0.518 5	1.263 2	1.393 8	2.638 4	98.67	99.42	0.71
	0.500 9	1.220 3	1.393 8	2.617 8	100.27		
	0.482 2	1.174 7	1.393 8	2.556 1	99.11		
	0.485 8	1.183 5	1.393 8	2.573 1	99.70		
	0.485 3	1.182 3	1.393 8	2.577 4	100.09		
士的宁	0.467 7	1.139 4	1.393 8	2.514 7	98.68	100.87	1.31
	0.518 5	0.998 5	0.900 7	1.917 0	101.98		
	0.500 9	0.964 6	0.900 7	1.867 3	100.22		
	0.482 2	0.928 6	0.900 7	1.840 0	101.19		
	0.485 8	0.935 5	0.900 7	1.822 6	98.49		
马钱子碱	0.485 3	0.934 5	0.900 7	1.849 9	101.62	98.88	1.19
	0.467 7	0.900 6	0.900 7	1.816 9	101.73		
	0.518 5	0.732 7	0.734 1	1.475 8	101.22		
	0.500 9	0.707 9	0.734 1	1.429 6	98.32		
	0.482 2	0.681 4	0.734 1	1.401 1	98.04		
大黄素	0.485 8	0.686 5	0.734 1	1.409 8	98.52	100.31	1.00
	0.485 3	0.685 8	0.734 1	1.408 0	98.38		
	0.467 7	0.661 0	0.734 1	1.386 2	98.80		
	0.518 5	0.122 6	0.126 4	0.247 8	99.06		
	0.500 9	0.118 5	0.126 4	0.245 2	100.28		
大黄酚	0.482 2	0.114 0	0.126 4	0.242 4	101.54	100.23	0.93
	0.485 8	0.114 9	0.126 4	0.242 5	100.97		
	0.485 3	0.114 8	0.126 4	0.240 1	99.18		
	0.467 7	0.110 6	0.126 4	0.238 0	100.82		
	0.518 5	0.864 6	0.832 6	1.691 6	99.32		
士的宁	0.500 9	0.835 3	0.832 6	1.676 8	101.07	100.23	0.93
	0.482 2	0.804 1	0.832 6	1.645 0	101.00		
	0.485 8	0.810 1	0.832 6	1.652 2	101.15		
	0.485 3	0.809 2	0.832 6	1.635 4	99.23		
	0.467 7	0.779 9	0.832 6	1.609 4	99.63		

35 ℃)进行了考察,结果分别以 Inertsil ODS-3 为色谱柱、乙腈-磷酸为流动相系统以及在柱温为 30 ℃ 时的分离效果最好。

3.2 检测波长和溶剂的优选

在单一检测波长下,很难反映一个复方中药制剂所有成分的特征,因此在本研究中选择 DAD 检测器在 190~400 nm 波长范围内进行扫描。结果发现,在 230 nm 和 250 nm 波长下指纹图谱的色谱峰数量最多且峰形好、峰高度合适,呈现良好的色谱图,再结合参考文献^[9-13]

表5 10批马海治瘫胶囊中5个成分的含量测定结果
(n=3, mg/g)

Tab 5 Results of content determination of five components in 10 batches of Mahai zhitan capsules
(n=3, mg/g)

批号	马钱苷酸	土的宁	马钱子碱	大黄素	大黄酚
2017060101	2.583 3	1.946 0	1.505 8	1.824 1	0.250 1
2017060102	2.772 9	1.867 3	1.476 0	1.819 7	0.261 7
2017060103	2.557 5	1.746 1	1.376 1	1.645 0	0.234 6
2017060104	2.568 3	1.811 1	1.409 8	1.637 2	0.240 1
2017060105	2.571 2	1.813 8	1.424 4	1.573 2	0.232 1
2017060106	2.585 7	1.799 9	1.428 3	1.609 4	0.238 0
2017060107	2.613 8	1.786 1	1.404 8	1.614 6	0.236 3
2017060108	2.582 0	1.823 9	1.421 0	1.585 1	0.239 1
2017060109	2.785 9	1.885 6	1.488 1	1.726 6	0.261 6
2017060110	2.477 1	1.853 5	1.374 6	1.669 6	0.239 1

反复试验后,摸索得此复方样品23~31 min时间段在波长230 nm下色谱峰信号更强,故在本研究中采用切换波长法,设置23~31 min时间段的检测波长为230 nm,其余检测时段的波长均为250 nm。在前期研究中,笔者参考文献^[14-16]选择以甲醇为溶剂制备对照品溶液,但在试验中发现,土的宁和马钱子碱在设定色谱条件下峰形分叉。根据笔者以往经验,分析这可能是由于对照品溶剂甲醇与起始流动相极性相差太大所致,改为75%甲醇后峰形即对称、良好,故最终以75%甲醇作为制备对照品与供试品溶液的溶剂。

3.3 指纹图谱及含量测定分析

本研究建立的马海治瘫胶囊HPLC指纹图谱,共得到了20个共有峰,且共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%,差异较小。通过与混合对照品溶液、组方单味药材提取溶液及缺味药材阴性药品溶液色谱图的对比,最终确定了14个特征峰的药材来源归属和10个特征峰的化学成分归属。但是海风藤、水蛭、黄芪、千年健这四味药材在此检测条件下信号较弱,未发现其对应的特征峰,希望在后期的研究中对此有所突破。

另外,方中马钱子具有益气强肌、扶助正气、解毒散结、通络化痰的功效,主要有效成分为生物碱类(如土的宁、马钱子碱、马钱苷酸等),含量为2%~5%,其中土的宁和马钱子碱占总生物碱的80%,既是马钱子最主要的有效成分也是毒性成分^[17]。药理研究也显示,马钱子所含成分有改善微循环作用,体内给药后能抗血栓形成^[9]。方中大黄有“涤实痰”作用,其活性成分为大黄素和大黄酚等。本研究建立了二味君药中性质稳定、含量较高的马钱苷酸、土的宁、马钱子碱、大黄素、大黄酚的含量,经过仪器精密度、方法重复性和稳定性考察,表明本研究建立的马海治瘫胶囊指纹图谱与含量测定方法

重复性好,方法可靠,并可简便快速测定有效物质的含量,可以为控制其工艺稳定与评价质量优劣提供有效的方法保证。

参考文献

- [1] 曹胭莉,张晓乐,韩祖成,等.“刚柔相济”联合西医药综合康复方案治疗中风病恢复期多中心随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志,2015,29(10):6-9.
- [2] 李宝华,马青云,李敬慈,等.刚柔相济法治疗中风50例小结[J].陕西中医,1985,6(2):55-56.
- [3] 蒙麦侠,袁秋贞,张小丽,等.马海治瘫胶囊对局灶性脑缺血大鼠的作用[J].陕西中医,2015,36(6):755-756.
- [4] 蒙麦侠,陈志永,陈瑞明,等.马海治瘫胶囊治疗脑中风后遗症的作用机理研究[J].四川中医,2018,36(6):82-84.
- [5] 蒙麦侠,陈瑞明,张红.马海治瘫胶囊提取工艺及质量标准的研究[J].陕西中医,2013,34(6):748-749.
- [6] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法探析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282-287.
- [7] 黄杰英,郭元满,高慧娟,等.愈伤灵胶囊高效液相色谱指纹图谱研究[J].中南药学,2018,16(7):913-916.
- [8] 唐清,朱晓泉,郑玉莹,等.补肺活血胶囊高效液相色谱指纹图谱研究[J].中南药学,2018,16(9):1200-1204.
- [9] 明凯利,向阳,杨艳霞,等.小金胶囊的HPLC指纹图谱建立及主成分分析[J].中国药房,2019,30(2):188-192.
- [10] 曹瑞,窦志华,倪丽丽,等.HPLC指纹图谱、Q-TOF/MS定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究[J].中草药,2019,50(5):1100-1110.
- [11] 严维花,曹虹虹,郭爽,等.当归不同炮制品的UPLC指纹图谱与多成分含量测定研究[J].中国中药杂志,2019,44(12):2499-2510.
- [12] 温学逊,牛研,王书芳.当归不同药用部位活性成分含量的HPLC分析方法及特征图谱研究[J].药物分析杂志,2014,34(2):317-324.
- [13] 徐佳,杨瑶珺,刘晓帆,等.水蛭的高效液相指纹图谱研究[J].环球中医药,2013,6(8):596-599.
- [14] 王月辉,乔斌,蒋建兰,等.马钱子药材HPLC指纹图谱的研究[J].中草药,2006,37(8):1252-1255.
- [15] 马恩耀,高明,蒋丽芸,等.岭南特色饮片醋马钱子炮制前后HPLC指纹图谱研究[J].中药材,2017,40(1):77-80.
- [16] 崔小敏,石会丽,雷琨.愈银片的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2017,28(3):397-400.
- [17] 况时祥,王强,刘琛.马钱子治疗重症肌无力机制探讨[J].上海中医药杂志,2015,49(5):83-84.

(收稿日期:2019-03-21 修回日期:2019-08-12)

(编辑:林 静)