

伤科灵喷雾剂特征图谱及4个成分含量测定方法的建立^Δ

支苑^{1*},肖婷¹,何旭洪²,朱志军²,曾丽²,陶玲¹,沈祥春¹,茅向军^{1,3#}(1.贵州医科大学贵州省天然药物资源高效利用工程中心/贵州省普通高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室/贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室/天然药物资源优效利用重点实验室/贵州医科大学药学院,贵阳 550025;2.贵州恒霸药业有限公司,贵阳 550008;3.贵州省药品审评查验中心,贵阳 550081)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)19-2369-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.19.13



摘要 目的 建立伤科灵喷雾剂的定性、定量分析方法,为伤科灵喷雾剂的整体质量控制奠定基础。方法 以11批伤科灵喷雾剂为样品,采用高效液相色谱(HPLC)法进行测定。色谱条件:采用Ultimate[®] XB-C₁₈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210 nm;柱温为35 ℃;流速为1.0 mL/min。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012版)》建立11批样品的HPLC特征图谱并进行相似度分析,通过与对照品图谱比对进行色谱峰的指认。采用HPLC法测定样品中苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶的含量。结果 11批样品共标定了18个共有特征峰,指认了其中4个共有特征峰,分别为峰2(苦参碱)、峰3(氧化苦参碱)、峰6(东莨菪内酯)、峰7(异嗪皮啶)。11批样品的特征图谱与对照特征图谱R的相似度均≥0.990。含量测定方法学考察结果均符合相关要求,11批样品中苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶的含量分别为14.48~44.86、32.53~69.76、11.28~20.96、10.36~22.49 μg/mL。结论 本研究成功建立了伤科灵喷雾剂HPLC特征图谱和4个指标成分的定量分析方法,可用于该制剂的质量控制。

关键词 伤科灵喷雾剂;高效液相色谱法;特征图谱;苦参碱;氧化苦参碱;东莨菪内酯;异嗪皮啶

Establishment of characteristic chromatogram and determination method of four components in Shangkeling spray

ZHI Yuan¹, XIAO Ting¹, HE Xuhong², ZHU Zhijun², ZENG Li², TAO Ling¹, SHEN Xiangchun¹, MAO Xiangjun^{1, 3}
(1. Guizhou Engineering Center of High Efficacy Application of Natural Medicinal Resources/High Educational Key Laboratory of Natural Medicinal Pharmacology and Drug Gability/Guizhou Medical University-Guiyang Joint Laboratory/Key Lab of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources/School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Hengba Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550008, China; 3. Guizhou Drug Evaluation and Inspection Center, Guiyang 550081, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish a method for qualitative and quantitative analysis of Shangkeling spray, which can be a certain foundation for the overall quality evaluation of Shangkeling spray. **METHODS** Eleven batches of Shangkeling spray were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The separation was performed on Ultimate[®] XB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was 35 °C. *Similarity Evaluation Software of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (2012 edition) was used for the establishment of HPLC characteristic chromatogram and similarity analysis; the chromatographic peaks were identified by comparing with the chromatogram of the reference substance. The contents of matrine, oxymatrine, scopoletin and isoazinoipyridine were determined by HPLC. **RESULTS** Totally 18 common characteristic peaks were demarcated for 11 batches of samples, 4 of them were identified, i.e. peak 2 (matrine), peak 3 (oxymatrine), peak 6 (scopoletin), peak 7 (isoazinoipyridine). The similarity between the characteristic chromatogram of 11 batches of samples and the control characteristic chromatogram R was ≥0.990. The results of content determination methodology conformed to the relevant requirements. The contents of matrine, oxymatrine, scopoletin and isoazinoipyridine in 11 batches of Shangkeling spray were 14.48-44.86, 32.53-69.76, 11.28-20.96 and 10.36-22.49 μg/mL, respectively. **CONCLUSIONS** HPLC characteristic chromatogram and quantitative analysis method of 4 indicator components are successfully established in this study, which can be used to evaluate the quality of this preparation.

^Δ 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.82060729);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础-ZK[2021]一般535, No.黔科合平台人才[2017]5802);贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(No.19NSP074)
* 第一作者 硕士研究生。研究方向:食品药品质量控制关键技术。E-mail:2287673190@qq.com
通信作者 主任药师,博士。研究方向:药物质量控制。E-mail:1074459931@qq.com

KEYWORDS Shangkeling spray; high performance liquid chromatography; characteristic chromatogram; matrine; oxymatrine; scopoletin; isoazinopyridine

伤科灵喷雾剂为贵州省苗药特色产品,由抓地虎、见血飞、仙鹤草、铁筷子、草乌、山豆根等10味药材组成。方中抓地虎、铁筷子、山豆根具有清热、消肿的功效^[1-3],见血飞、马鞭草具有活血化瘀的作用^[4-5],草乌抗炎镇痛效果显著^[6],白及、仙鹤草可收敛止血^[3],莪术、三棱为行气破血之要药^[7]。成方后的制剂具有清热凉血、活血化瘀、消肿止痛的主治功效,且喷雾剂给药方便,可直接作用于损伤部位,在软组织损伤、Ⅱ度烧烫伤、骨伤、湿疹、疱疹等方面临床疗效确切。有效可靠的药品质量控制是保证药物临床疗效的关键,伤科灵喷雾剂现行法定质量标准收录于《国家药品监督管理局国家药品标准》[WS-10226(ZD-0226)-2002-2012Z-20180]^[8],该标准中薄层鉴别项仅对见血飞和来源于山豆根的苦参碱进行了鉴别,含量测定项仅对苦参碱和氧化苦参碱进行了含量测定研究。现行标准过于简单,专属性不强,难以全面控制制剂的内在质量,确保其用药安全和有效性。中药特征图谱具有整体性和模糊性的特点,是一种综合的、量化的质量分析方法,能将中药制剂的内在质量综合地体现出来,在中药质量控制中应用广泛^[9]。为了更全面地控制伤科灵喷雾剂的质量,本研究拟采用高效液相色谱(HPLC)法建立伤科灵喷雾剂的特征图谱,并建立同步测定山豆根中苦参碱、氧化苦参碱和铁筷子中东莪苣内酯、异嗪皮啶4个成分含量的HPLC法,旨在为伤科灵喷雾剂的质量综合评价提供研究基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有UltiMate 3000型HPLC仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),ME104/02型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

11批伤科灵喷雾剂均由贵州恒霸药业有限责任公司提供,批号分别为19030103、19050102、19060101、19080202、19080402、20120101、20120102、20120103、21110101、21110102、21110103,编号S1~S11,规格分别为50 mL/瓶(S1)、70 mL/瓶(S2、S4)、100 mL/瓶(S3、S5~S11);氧化苦参碱对照品(批号GR-133-151-19,含量≥98%)购自南京广润生物制品有限公司;苦参碱对照品(批号wkq21030302,含量≥98%)购自成都彼样生物科技有限公司;东莪苣内酯对照品(批号CHB201202,含量≥95%)、异嗪皮啶对照品(批号CHB210112,含量≥95%)均购自成都克洛玛生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品贮备液的制备 分别精密称取苦参碱、氧化苦参碱对照品各5 mg以及东莪苣内酯、异嗪皮啶对照品各2.5 mg于不同5 mL容量瓶中,加适量甲醇超声(功率210 W,频率40 kHz,下同)5 min使溶解,加甲醇定容,摇匀,制得质量浓度为1 mg/mL的苦参碱、氧化苦参碱对照品贮备液和质量浓度为0.5 mg/mL的东莪苣内酯、异嗪皮啶对照品贮备液。分别精密量取苦参碱、氧化苦参碱对照品贮备液各1 mL和东莪苣内酯、异嗪皮啶对照品贮备液各0.5 mL于同一5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得苦参碱、氧化苦参碱、东莪苣内酯、异嗪皮啶质量浓度分别为200、200、50、50 μg/mL的混合对照品贮备液,4 °C冰箱保存,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取伤科灵喷雾剂5 mL,水浴蒸发除去溶剂,加浓氨水1 mL润湿,然后加入三氯甲烷70 mL,混匀,称质量,超声30 min,冷却至室温,再次称质量,加三氯甲烷补足减失的质量。取三氯甲烷层,旋转蒸发器浓缩除去溶剂,残渣加甲醇适量使溶解;用甲醇润洗3次,将溶液及润洗液均转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀;用0.22 μm的微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

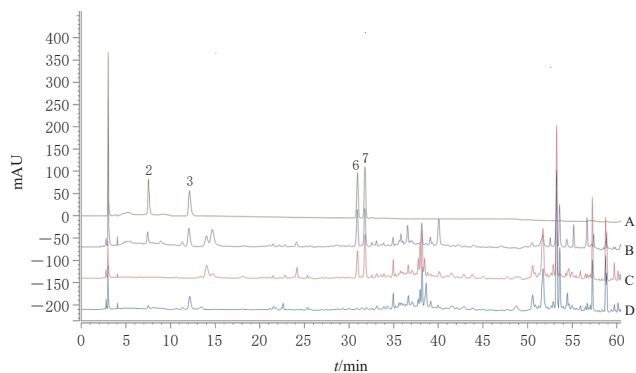
2.1.3 阴性制剂供试溶液的制备 缺山豆根阴性制剂及缺铁筷子阴性制剂根据处方量及工艺自制,并按“2.1.2”项下方法制成各阴性制剂供试溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

采用Ultimate[®]XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(A)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 5%B; 10~30 min, 5%B→25%B; 30~33 min, 25%B→33%B; 33~45 min, 33%B; 45~60 min, 33%B→90%B);检测波长为210 nm;柱温为35 °C;流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL。分别精密吸取“2.1”项下混合对照品贮备液、供试品溶液、缺山豆根阴性制剂供试溶液、缺铁筷子阴性制剂供试溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,混合对照品贮备液及供试品溶液中4个成分的理论板数均大于10 000,分离度均大于1.5,供试品溶液中各色谱峰与混合对照品贮备液中各对应色谱峰的保留时间基本相同,且阴性样品色谱图在对照品色谱图对应位置上无干扰峰,表明本方法的系统适用性较好。结果见图1。

2.3 HPLC特征图谱的建立

2.3.1 精密度试验 精密量取伤科灵喷雾剂(编号S5)5 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样6次,记录各共有峰的保留时间及峰



A:混合对照品贮备液;B:供试品溶液;C:缺山豆根阴性制剂供试溶液;D:缺铁筷子阴性制剂供试溶液;2:苦参碱;3:氧化苦参碱;6:东莨菪内酯;7:异嗪皮啶

图1 系统适用性考察的HPLC图

面积。以东莨菪内酯峰(峰6)为参照峰,计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.44%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于4.21%($n=6$),表明方法精密度高。

2.3.2 重复性试验 精密量取6份伤科灵喷雾剂(编号S5)各5 mL,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录各共有峰的保留时间及峰面积。以东莨菪内酯峰(峰6)为参照峰,计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.47%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于4.03%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 精密量取伤科灵喷雾剂(编号S5)5 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件分别在室温放置0、2、5、12、24 h时进样测定,记录各共有峰的保留时间及峰面积。以东莨菪内酯峰(峰6)为参照峰,计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.71%($n=5$),相对峰面积的RSD均小于4.97%($n=5$),表明供试品溶液在室温24 h内较稳定。

2.3.4 特征图谱的建立及共有峰的指认 精密量取11批样品(编号S1~S11)各5 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将11批样品的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012版)》,以样品S2的色谱图作为参照图谱,设置时间窗宽度为0.1 min,采用多点校正法生成11批样品的叠加特征图谱,并采用中位数法生成伤科灵喷雾剂的对照特征图谱R,见图2。结果,11批样品共确认了18个共有特征峰。将供试品图谱与混合对照品图谱对比,指认出了4个共有特征峰,分别为峰2(苦参碱)、峰3(氧化苦参碱)、峰6(东莨菪内酯)、峰7(异嗪皮啶),见图3。

2.3.5 相似度分析 以对照特征图谱R为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012版)》计算11批样品的特征图谱与对照特征图谱R的相似度。结果,样品S1~S11的色谱图与对照特征图谱R的相似度分别

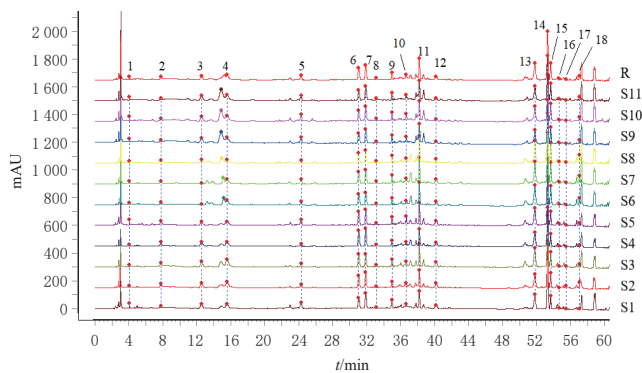
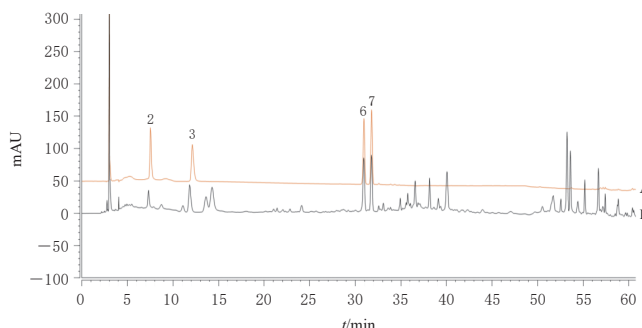


图2 11批伤科灵喷雾剂的HPLC叠加特征图谱与对照特征图谱R



A:混合对照品贮备液;B:供试品溶液;2:苦参碱;3:氧化苦参碱;6:东莨菪内酯;7:异嗪皮啶

图3 混合对照品与供试品的色谱图

为0.971、0.990、0.992、0.978、0.992、0.992、0.991、0.990、0.992、0.991、0.996,均 ≥ 0.990 ,表明11批样品之间的相似度较高。

2.4 苦参碱等4个成分的含量测定

2.4.1 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下混合对照品贮备液50、100、200、400、600、800 μL ,用甲醇定容至1 mL,得到系列线性工作液。取上述线性工作液,分别按“2.2”项下色谱条件进样测定,以对照品质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行回归分析,得苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶的回归方程分别为 $Y=0.1204X+0.9178$ ($R^2=0.9990$)、 $Y=0.1335X+0.9006$ ($R^2=0.9991$)、 $Y=1.3443X-0.2126$ ($R^2=0.9999$)、 $Y=1.6555X-0.1477$ ($R^2=0.9996$)。结果表明,苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶分别在10~160、10~160、2.5~40、2.5~40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度的试验 取“2.1.1”项下混合对照品贮备液600 μL ,以甲醇定容至1 mL,按“2.2”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶峰面积的RSD分别为1.31%、1.57%、0.54%、0.66%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取伤科灵喷雾剂(编号S5)5 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在室温下放置0、2、7、12、24 h时,分别按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录

峰面积。结果,苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶峰面积的RSD分别为1.46%、1.70%、0.95%、1.80% ($n=5$),表明供试品溶液在室温24 h内稳定。

2.4.4 重复性试验 精密量取伤科灵喷雾剂样品6份(编号S5),每份5 mL,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,通过外标法计算含量。结果,苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶的含量分别为30.40、47.66、13.60、12.39 $\mu\text{g/mL}$,RSD分别为1.79%、1.27%、1.36%、1.59% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的伤科灵喷雾剂6份(编号S5),每份2.5 mL,分别加入混合对照品贮备液(含90.00 $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱、125.00 $\mu\text{g/mL}$ 氧化苦参碱、36.00 $\mu\text{g/mL}$ 东莨菪内酯、32.00 $\mu\text{g/mL}$ 异嗪皮啶)1 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,分别计算4个成分的平均加样回收率。结果,苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶的平均加样回收率分别为102.36%、97.84%、103.02%、99.52%,RSD分别为1.49%、1.85%、1.41%、1.42% ($n=6$),表明本方法准确度良好。

2.4.6 样品含量测定 分别精密量取11批伤科灵喷雾剂样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,采用外标法计算4个成分的含量。重复测定3次,取平均值。结果,4个成分的含量范围分别为14.48~44.86、32.53~69.76、11.28~20.96、10.36~22.49 $\mu\text{g/mL}$ 。结果见表1。

表1 11批伤科灵喷雾剂中4个成分的含量测定结果 ($n=3, \mu\text{g/mL}$)

编号	苦参碱	氧化苦参碱	东莨菪内酯	异嗪皮啶
S1	16.55	56.89	11.51	12.34
S2	44.86	46.41	20.96	22.49
S3	30.78	69.76	14.04	10.36
S4	36.92	57.39	17.11	14.48
S5	37.72	50.49	14.75	12.50
S6	28.45	32.53	13.24	11.38
S7	27.56	43.18	13.52	12.00
S8	24.57	49.07	11.66	10.88
S9	17.97	65.58	11.55	11.72
S10	14.48	62.95	11.78	12.03
S11	16.09	67.30	11.28	12.18

3 讨论

3.1 定量分析指标的选择

伤科灵喷雾剂由10味药材组成,成分较复杂,原质量标准中测定了苦参碱和氧化苦参碱的含量,这2个成分均来源于本制剂中的山豆根药材^[10]。本品为贵州苗药特色药,而铁筷子为苗药习用中药材,东莨菪内酯、异嗪皮啶为铁筷子的主要活性成分^[12,11],具有抗菌抗炎、清热解毒、活血散瘀等功效^[12-14]。因东莨菪内酯与异嗪皮啶的作用与本品的功能主治相似,故本研究在苦参碱、氧

化苦参碱的基础上增加了东莨菪内酯、异嗪皮啶的含量测定,以更全面地控该制剂的质量。

3.2 供试品溶液制备方法 & 色谱条件的筛选

本研究比较了不同提取溶剂种类(乙醇、三氯甲烷、甲醇)、不同提取溶剂用量(三氯甲烷30、40、50、70 mL)、不同氨水用量(1、2、3 mL)下的供试品溶液色谱图结果,最终选择1 mL氨水浸润后以70 mL三氯甲烷超声提取的方法进行供试品溶液的制备。据2020年版《中国药典》(一部)及相关文献报道^[3,15-16],再结合二极管阵列检测器全波长(190~400 nm)扫描发现,苦参碱、氧化苦参碱的最大吸收峰分别在200.68、201.17 nm处,东莨菪内酯和异嗪皮啶的最大吸收峰在203.81、207.48 nm处,但4个成分在210 nm处左右均有吸收。为减少在梯度洗脱过程中变换波长引起基线漂移,本研究选择210 nm作为检测波长。此外,笔者分别考察了以甲醇、乙腈作有机相和磷酸水、三乙胺水作水相组合的流动相洗脱效果,结果以乙腈-0.1%磷酸水系统洗脱可使伤科灵喷雾剂样品得到较好地分离。最后,笔者分别对不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)进行了考察,结果样品在柱温35 $^{\circ}\text{C}$ 时以1.0 mL/min的流速进行分析可得到较好的分离效果。

3.3 HPLC 特征图谱和含量测定结果的分析

11批伤科灵喷雾剂的HPLC特征图谱研究结果显示,不同批次制剂共确认出18个共有峰,且各批次样品的相似度均 ≥ 0.990 ,表明制剂的质量较稳定。通过与混合对照品图谱比对,指认出了苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶4个共有特征峰。本研究采用HPLC法测定11批伤科灵喷雾剂中上述4个成分的含量发现,每1 mL样品中苦参碱与氧化苦参碱的总含量最低为0.061 mg,满足质量标准中要求的每1 mL含苦参碱与氧化苦参碱的总量不得低于0.035 mg的要求^[8]。而东莨菪内酯与异嗪皮啶两者的含量具有一定的相关性,即在东莨菪内酯含量较高的样品中异嗪皮啶的含量也相对较高;但不同批次样品间上述2个成分的含量存在差异,这可能与制剂原药材批次不同有关。

综上所述,本研究采用HPLC法,在同一色谱条件下建立了伤科灵喷雾剂的特征图谱和同时测定苦参碱、氧化苦参碱、东莨菪内酯、异嗪皮啶含量的方法,经方法学验证,该方法稳定、可行;结合特征图谱和含量测定可为伤科灵喷雾剂的整体质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 贵州省中医研究所. 贵州草药[M]. 贵州: 贵州人民出版社, 1970: 1014.
- [2] 黄文平, 温芝琪, 王萌萌, 等. 山腊梅叶中8种成分含量测定及主成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 799-803.

(下转第2377页)