

扎冲十三味丸 HPLC 指纹图谱建立及 4 种成分测定

马瑞丽, 李锦田, 马桂芝*

(新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 建立扎冲十三味丸(诃子、制草乌、石菖蒲等) HPLC 指纹图谱, 并测定 4 种成分的含有量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 40 ℃; 检测波长 225 nm。结果 没食子酸、鞣花酸、木香炔内酯、去氢木香内酯分别在 5.16~165.0、2.59~83.00、1.06~34.00、1.25~40.00 μg/mL 范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999 5$), 平均加样回收率分别为 102.4%、99.8%、98.4%、101.6%, RSD 分别为 1.84%、1.86%、1.33%、1.96%。10 批样品指纹图谱中有 13 个共有峰, 相似度均在 0.98 以上。结论 该方法简便稳定, 准确可靠, 可用于扎冲十三味丸的质量控制。

关键词: 扎冲十三味丸; 没食子酸; 鞣花酸; 木香炔内酯; 去氢木香内酯; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)06-1432-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.007

Establishment of HPLC fingerprints and determination of four constituents for Zhachong Shisanwei Pills

MA Rui-li, LI Jin-tian, MA Gui-zhi*

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: AIM To establish the HPLC fingerprints of Zhachong Shisanwei Pills (*Chebulae Fructus*, *Aconiti kusnezoffii Radix Cocta*, *Acori tatarinowii Rhizoma*, etc.) and to determine the contents of four constituents.

METHODS The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 40 ℃ thermostatic Kromasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 1 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 225 nm. **RESULTS** Gallic acid, ellagic acid, costundide, dehydrocostus lactone showed good linear relationships within the ranges of 5.16–165.0, 2.59–83.00, 1.06–34.00, 1.25–40.00 μg/mL ($r \geq 0.999 5$), whose average recoveries were 102.4%, 99.8%, 98.4%, 101.6% with the RSDs of 1.84%, 1.86%, 1.33%, 1.96%, respectively. There were thirteen common peaks in the fingerprints of ten batches of samples with the similarities of more than 0.98. **CONCLUSION** This simple, stable, accurate and reliable method can be used for the quality control of Zhachong Shisanwei Pills.

KEY WORDS: Zhachong Shisanwei Pills; gallic acid; ellagic acid; costundide; dehydrocostus lactone; fingerprints; HPLC

扎冲十三味丸是新疆博尔塔拉蒙古自治州蒙医院的院内制剂, 由诃子、制草乌、石菖蒲、木香等 13 味药材组成, 功效祛风通窍、舒筋活血、镇静安神, 用于半身不遂、左瘫右痪、口眼歪斜、四肢麻木、腰腿不利、言语不清、筋骨疼痛、神经麻

痹^[1-3], 对肩周炎气滞血瘀症也有确切的疗效^[4]。

中药指纹图谱是采用现代分析检测技术, 从中药物质基础角度出发, 系统、整体、稳定地表征其共有成分及内在特征, 在全面反映复杂体系的同时还能提供丰富的鉴别信息, 能客观地从整体上评价

收稿日期: 2020-02-24

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2017B03013-2)

作者简介: 马瑞丽(1993—), 女, 硕士生, 从事药品质量控制研究。E-mail: 2422435205@qq.com

* 通信作者: 马桂芝(1973—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事药品质量控制研究。Tel: (0991) 4362471, E-mail: maguizhi000@

126.com

中药复方制剂的质量^[4-8]。扎冲十三味丸现行医院药品质量控制标准仅限于性状、鉴别、检查项,故本实验建立该制剂 HPLC 指纹图谱,并测定其中没食子酸、鞣花酸、木香炔内酯、去氢木香内酯含量,以期保证临床用药安全性和有效性,为其质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司); New Classic MS 电子分析天平(0.01 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司); KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q 艾柯超纯水仪(美国密理博公司)。

1.2 药物与试剂 没食子酸、鞣花酸、木香炔内酯对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 YA0505YA14、S02N7G24008、Z23M8S36648,纯度均 $\geq 98\%$);去氢木香内酯对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-18101301,纯度 99.20%);扎冲十三味丸(新疆维吾尔自治区博尔塔拉州蒙医医院,批号分别为 20180820、20180917、20181018、20190219、20190326、20190418、20190515、20190611、20190719、20190812);甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~10 min, 10% A; 10~70 min, 10%~35% A; 70~95 min, 35% A; 95~100 min, 35%~33% A; 100~105 min, 33% A; 105~115 min, 33%~46% A; 115~130 min, 46% A; 130~135 min, 46%~42% A; 135~160 min, 42% A; 160~170 min, 42%~10% A);体积流量 1 mL/min;柱温 40 ℃;检测波长 225 nm;进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取木香炔内酯、去氢木香内酯对照品适量,甲醇制成两者质量浓度分别为 220、168 μg/mL 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液制备 取丸剂适量,研细,过 40 目筛,精密称取细粉 1 g,置于 25 mL 量瓶中,精密加入 20 mL 甲醇,封口,超声处理 30 min,放冷,甲醇定容至刻度,摇匀,静置,取上清液,即得。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密度试验 取同一批丸剂(批号

20181018),按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次,以 12 号峰(木香炔内酯)为参照峰,测得各共有峰相对保留时间 RSD<0.3%,相对峰面积 RSD<3%,表明仪器精密度良好。

2.1.4.2 重复性试验 取同一批丸剂(批号 20181018) 6 份,按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,以 12 号峰(木香炔内酯)为参照峰,测得各共有峰相对保留时间 RSD<0.4%,相对峰面积 RSD<3%,表明该方法重复性良好。

2.1.4.3 稳定性试验 取同一批丸剂(批号 20181018),按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,于 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得各共有峰相对保留时间 RSD<0.3%,相对峰面积 RSD<3%,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 相似度评价 取 10 批丸剂,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012A 版)进行峰匹配,得到指纹图谱(图 1),中位数法生成对照图谱(图 2),相似度(表 1)均大于 0.980。HPLC 指纹图谱中有 13 个共有峰,通过与对照品色谱图保留时间及全波长紫外扫描图谱比对,确定 12 号峰为木香炔内酯,13 号峰为去氢木香内酯。

表 1 10 批样品相似度

Tab. 1 Similarities of ten batches of samples

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.980	S6	0.997
S2	0.995	S7	0.997
S3	0.996	S8	0.993
S4	0.997	S9	0.986
S5	0.997	S10	0.986

2.2 4 种成分含量测定

2.2.1 色谱条件 参考文献[9-14]。Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 5%~10% A; 10~14 min, 10%~46% A; 14~25 min, 46% A; 25~30 min, 46%~70% A; 30~45 min, 70% A; 45~50 min, 70%~5% A);体积流量 1 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长 225 nm;进样量 10 μL,色谱图见图 3。由此可知,各成分均与相邻色谱峰分离度良好,理论塔板数均大于 5 000,阴性无干扰。

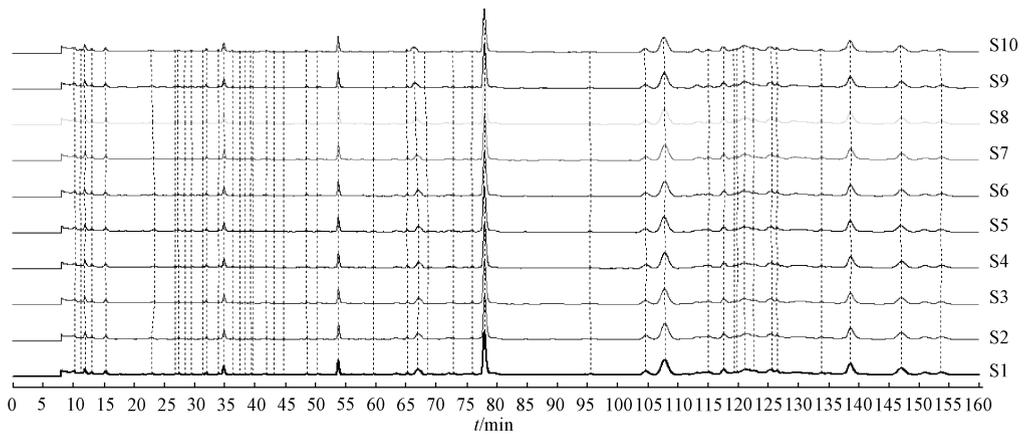
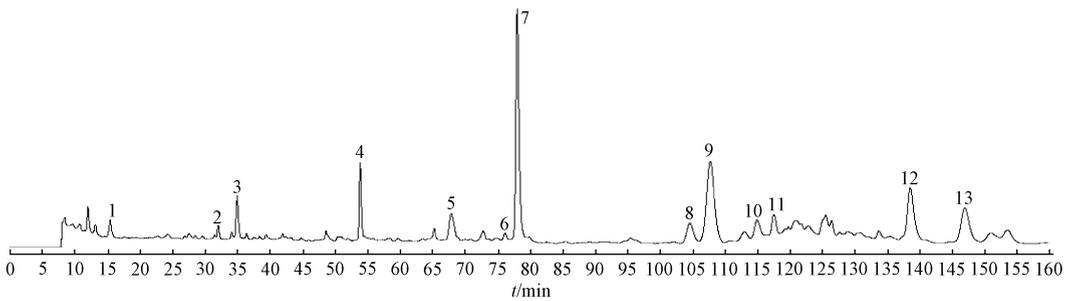


图1 10批样品 HPLC 指纹图谱

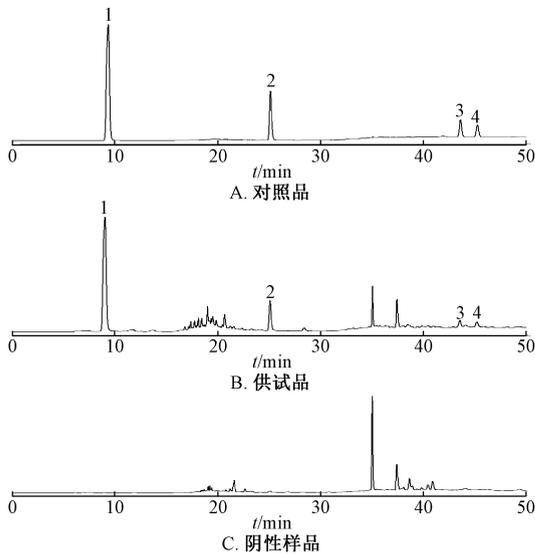
Fig. 1 HPLC fingerprints for ten batches of samples



12. 木香烃内酯 13. 去氢木香内酯
12. costundide 13. dehydrocostus lactone

图2 各成分对照图谱

Fig. 2 Reference chromatogram of various constituents



1. 没食子酸 2. 鞣花酸 3. 木香烃内酯 4. 去氢木香内酯
1. gallic acid 2. ellagic acid 3. costundide 4. dehydrocostus lactone

图3 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of various constituents

花酸、木香烃内酯、去氢木香内酯对照品适量，加甲醇制成四者质量浓度分别为 164、83、34、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液，即得。

2.2.3 供试品溶液制备 取丸剂适量，研细，过 40 目筛，精密称取细粉 0.25 g，置于 25 mL 量瓶中，精密加入 20 mL 甲醇，封口，超声处理 30 min，放冷，甲醇定容至刻度，摇匀，静置，取上清液，即得。

2.2.4 阴性样品溶液制备 按丸剂处方比例及工艺制备不含诃子、木香的阴性样品，精密称取 0.25 g 至 25 mL 量瓶中，精密加入 20 mL 甲醇，封口，超声处理 30 min，放冷，甲醇定容至刻度，摇匀，静置，取上清液，即得。

2.2.5 方法学考察

2.2.5.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液，依次倍量稀释，分别精密吸取 10 μL ，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归方程，结果见表 2，可知各成分在各

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取没食子酸、鞣

自范围内线性关系良好。

表2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
没食子酸	$Y=40\ 777X+45\ 908$	0.999 8	5.16~165.00
鞣花酸	$Y=25\ 267X-51\ 313$	0.999 5	2.59~83.00
木香烃内酯	$Y=22\ 606X+11\ 944$	0.999 9	1.06~34.00
去氢木香内酯	$Y=14\ 766X+4\ 698$	0.999 9	1.25~40.00

2.2.5.2 精密度试验 取同一批丸剂(批号20181018),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定6次,测得没食子酸、鞣花酸、木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积RSD分别为0.63%、0.43%、0.76%、1.23%,表明仪器精密度良好。

2.2.5.3 稳定性试验 取同一批丸剂(批号20181018),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶

液,常温下于0、2、4、6、9、12 h在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,测得没食子酸、鞣花酸、木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积RSD分别为0.57%、0.62%、0.79%、0.28%,表明溶液在室温下12 h内稳定性良好。

2.2.5.4 重复性试验 取同一批丸剂(批号20181018),按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,测得没食子酸、鞣花酸、木香烃内酯、去氢木香内酯含有量RSD分别为1.76%、2.18%、1.51%、0.81%,表明该方法重复性良好。

2.2.5.5 加样回收率试验 精密称取6份各成分含有量已知的丸剂细粉,加入各对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,计算回收率,结果见表3。

表3 各成分加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
没食子酸	1 822	1 805	3 679	102.9	102.4	1.84
	1 822	1 805	3 621	99.7		
	1 823	1 805	3 712	104.6		
	1 822	1 805	3 653	101.4		
	1 822	1 805	3 704	104.2		
	1 823	1 805	3 654	101.4		
鞣花酸	525.0	498.0	1 004	96.5	99.8	1.86
	525.0	498.0	1 022	99.8		
	525.2	498.0	1 022	99.8		
	524.9	498.0	1 031	101.5		
	525.0	498.0	1 021	99.7		
	525.2	498.0	1 030	101.4		
木香烃内酯	158.5	150.0	304.4	97.4	98.4	1.33
	158.5	150.0	306.4	98.7		
	158.6	150.0	309.5	100.6		
	158.5	150.0	305.7	98.2		
	158.5	150.0	303.4	96.8		
	158.6	150.0	306.9	98.9		
去氢木香内酯	205.2	198.0	404.2	100.5	101.6	1.96
	205.3	198.0	403.2	100.0		
	205.3	198.0	404.2	100.4		
	205.2	198.0	407.5	102.1		
	205.2	198.0	406.4	101.6		
	205.3	198.0	414.4	105.4		

2.2.5.6 样品含有量测定 精密称取10批丸剂细粉,每批0.25 g,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,平行3份,计算含有量,结果见表4。

3 讨论

3.1 指标成分选择 扎冲十三味丸中诃子具有涩

肠止泻、敛肺止咳等功效,其中没食子酸、鞣花酸含有量较高^[15-17];木香具有行气止痛、健脾消食的作用,其中木香烃内酯、去氢木香内酯含有量较高^[18-19],故本实验以上述四者作为指标成分。该制剂作为经典蒙药成方制剂,疗效明确,相关研究^[9,20-24]大多是在同一色谱条件下测定1~2种成分

表 4 各成分含有量测定结果 (µg/g, n=3)

Tab. 4 Results of content determination of various constituents (µg/g, n=3)

批号	没食子酸	鞣花酸	木香炔内酯	去氢木香内酯
20180820	6 938.58	2 144.80	626.73	822.33
20180917	6 980.81	2 184.84	641.69	821.38
20181018	6 866.35	2 172.64	629.11	815.08
20190219	7 025.80	1 998.76	632.48	803.95
20190326	7 025.65	2 179.71	633.46	820.56
20190418	7 125.19	2 182.20	648.96	829.08
20190515	7 164.71	2 270.19	640.77	809.92
20190611	6 941.64	2 247.97	630.69	804.29
20190719	7 055.43	2 088.42	641.80	802.14
20190812	7 205.58	2 215.94	652.77	810.84

含有量, 或者在多种色谱条件下测定多种化学成分; 本实验在前期研究的基础上建立了同一色谱条件下同时测定上述 4 种成分含有量的 HPLC 法, 有助于全面控制其质量, 节省时间和成本。

3.2 色谱条件选择 本实验采用二极管阵列检测器进行全波长扫描时发现, 没食子酸、鞣花酸、木香炔内酯、去氢木香内酯均在 225 nm 处有较好吸收, 故选择其作为检测波长。考察乙腈-水梯度洗脱、甲醇-水等度洗脱、甲醇-0.1% 磷酸梯度洗脱对检测结果的影响, 发现甲醇-0.1% 磷酸梯度洗脱时极性相差较大的 4 种成分均被检出, 而且峰型、分离度、保留时间较理想。再考察了不同柱温 (25、30、35 °C), 发现 30 °C 下各成分与相邻峰分离度最高。

3.3 HPLC 指纹图谱分析 本实验采取“指纹图谱+多指标成分含有量测定”模式, 对扎冲十三味丸进行质量评价, 发现 10 批样品相似度均大于 0.98, 4 种成分含有量比较接近, 表明该制剂整体质量一致性较好。同时, 该方法重复性好, 准确度高, 能较全面地反映扎冲十三味丸所含成分的种类及其内在品质, 可用于其质量控制。

参考文献:

[1] 刘 宏. 扎冲十三药理与临床研究进展[J]. 北方药学, 2017, 14(5): 135-136.
 [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准 (蒙药分册) [S]. 1998: 206.
 [3] 杨彩静, 顾艳丽, 刘 勋, 等. 蒙成药扎冲十三研究进展[J]. 北方药学, 2018, 15(5): 154-155.
 [4] 金建峰, 张经纬. 扎冲十三味丸对肩周炎气滞血瘀证的疗效及血清前列腺素 E2 (PGE2) 和缓激肽水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(4): 999-1002.

[5] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
 [6] 刘 文, 蒋世云. 中药指纹图谱研究与应用进展[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1819-1822.
 [7] 郑 恒, 魏日胞, 陈香美. 中药质量标准与中药指纹图谱[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(2): 112-113.
 [8] Xu Y, Yang H R, Yang Y S, et al. Research and prospect of fingerprint of traditional Chinese medicine [J]. *World Latest Med Inf*, 2018, 18(76): 91-94.
 [9] 李 伟, 吴秀清, 袁文洪, 等. UHPLC 法测定蒙药扎冲十三味丸中木香炔内酯和去氢木香内酯的含量[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(7): 24-25.
 [10] 黄 澜, 陈惠玲, 李玲玲. HPLC 法同时测定开胸顺气丸中 5 种成分的含量[J]. 海峡药学, 2019, 31(7): 40-42.
 [11] 彭飞城, 罗疆南, 丁 野, 等. HPLC 法测定调经活血胶囊中木香炔内酯与去氢木香内酯含量[J]. 中国药师, 2019, 22(3): 539-541.
 [12] 王 巍, 温聪聪, 解世全, 等. HPLC 法同时测定诃子中莽草酸、没食子酸及鞣花酸的含量[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 819-821.
 [13] 梁林金, 亓 旗, 叶 婷, 等. 基于总鞣质和 7 种成分同时测定的诃子药材质量控制研究[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2018, 20(9): 1638-1644.
 [14] 刘金坤, 应 敏, 王 琴, 等. 高效液相色谱法测定单叶化香果树序中没食子酸含量[J]. 中国药业, 2018, 27(6): 4-7.
 [15] 张媛媛, 曾慧婷, 袁源见, 等. 藏药诃子的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(14): 2002-2006.
 [16] 杨 雁. 诃子化学成分、生物活性及分析方法研究进展[J]. 西藏科技, 2016(9): 34-39.
 [17] 柳春霞, 刘 航. 蒙药诃子药理作用研究进展[J]. 北方药学, 2015, 12(1): 91-92.
 [18] 徐珍珍, 樊旭蕾, 王淑美. 木香化学成分及挥发油提取的研究进展[J]. 广东化工, 2017, 44(3): 77-78.
 [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 25.
 [20] 许 勇, 郑征伟, 诸艳蓉, 等. HPLC 法测定扎冲十三味丸中没食子酸的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(7): 1560-1562.
 [21] 许 勇, 诸艳蓉, 郑征伟, 等. 扎冲十三味丸的质量标准研究[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(6): 327-330.
 [22] 韩志强, 巴图德力根. HPLC 法测定蒙药嘎日迪-13 味丸中甘草苷、甘草酸铵、木香炔内酯、去氢木香内酯含量[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2015, 17(3): 692-697.
 [23] 郑 敏. HPLC 法测定扎冲-13 味丸中甘草苷含量[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(5): 53-54.
 [24] 韩国珍, 温爱平. 高效液相色谱法测定扎冲十三味丸中木香炔内酯和去氢木香炔内酯的含量[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(10): 796-797.