

引用:李林梅,邓芸,唐娟丽,李帅帅,肖豫湘,宋太发. 基于指纹图谱和含量测定评价脑得生丸的质量[J]. 湖南中医杂志, 2020,36(10):168-172.

基于指纹图谱和含量测定评价脑得生丸的质量

李林梅, 邓芸, 唐娟丽, 李帅帅, 肖豫湘, 宋太发
(湖南天济草堂制药股份有限公司, 湖南长沙, 410205)

[摘要] 目的:以高效液相色谱(HPLC)指纹图谱结合含量测定方法,为科学评价脑得生丸的质量提供理论依据。方法:采用HPLC建立脑得生丸的指纹图谱,色谱柱为Inertsil ODS-SP(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液,梯度洗脱;柱温30℃;检测波长为254 nm;流速为1 ml/min。采用HPLC方法测定脑得生丸中人参皂苷Rg1,色谱柱为Hypersil ODS2(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-0.05%磷酸(19:81),等度洗脱;检测波长为203 nm;流速为1.0 ml/min;进样量为10 μ l。基于指纹图谱和含量测定结果,对脑得生丸的质量进行评价。结果:建立了脑得生丸的指纹图谱,确定了11个共有峰,15批脑得生丸样品相似度均大于0.97。人参皂苷Rg1的线性方程为 $y = 13600x - 9.5581$,线性范围是19.2 μ g/ml ~ 1.920 mg/ml,相关系数是0.9992。15批脑得生丸中有5批样品为过期产品,仅批次为161003样品(过期5个月)含量检测不合格,其他均符合质量标准要求。结论:该方法简便、准确、重复性好,为脑得生丸质量的有效评价与整体控制提供了实验依据。

[关键词] 指纹图谱;含量测定;脑得生丸;质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.10.065

Quality assessment of Naodesheng pills based on fingerprint and content determination

LI Linmei, DENG Yun, TANG Juanli, LI Shuaishuai, XIAO Yuxiang, SONG Taifa
(Hunan Tianjicaotang Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410205, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the value of high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint combined with content determination in the quality assessment of Naodesheng pills, and to provide a theoretical basis for the scientific quality assessment of Naodesheng pills. Methods: HPLC was used to establish the fingerprint of Naodesheng pills on an Inertsil ODS-SP column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) with a mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid for gradient elution at a column temperature of 30℃, a detection wavelength of 254 nm, and a flow rate of 1 ml/min. HPLC was used to measure the level of ginsenoside Rg1 in Naodesheng pills on a Hypersil ODS2 column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) with a mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (19:81) for isocratic elution at a detection wavelength of 203 nm, a flow rate of 1 ml/min, and a sample size of 10 μ l. The quality of Naodesheng pills was assessed based on the results of fingerprint and content determination. Results: The fingerprint of Naodesheng pills was established, with a total of 11 common peaks identified, and 15 batches of Naodesheng pills had a similarity of >0.97. Ginsenoside Rg1 had a linear equation of $y = 13600x - 9.5581$, with a linear range of 19.2 μ g/ml to 1.920 mg/ml and a correlation coefficient of 0.9992. Among the 15 batches of Naodesheng pills, 5 were expired products, and only the batch 161003 (expired for 5 months) was tested unqualified; the other batches met the quality standard. Conclusion: This method is simple and accurate with good repeatability and provides an experimental basis for the quality assessment and overall quality control of Naodesheng pills.

[Keywords] fingerprint; content determination; Naodesheng pills; quality assessment

脑得生丸(浓缩丸)是由三七、川芎、红花、粉葛、山楂(去核)5味药材组成的中药复方制剂,为湖南天济草堂制药股份有限公司生产(批准文号:国药准字Z20153028^[1])。该

药具有活血化瘀、通经活络的功效,用于瘀血阻络所致的眩晕、中风,症见肢体不用、语言不利及头晕目眩。

目前脑得生复方制剂的含量测定项主要以三七的皂苷

基金项目:湖南省长沙市抗血栓药物技术工程研究中心项目(kq1706079,长财企指[2017]125号)

第一作者:李林梅,女,药学硕士,工程师,研究方向:药品研发分析

通讯作者:宋太发,男,药学硕士,工程师,研究方向:新药研发及研发管理工作, E-mail: 540982022@qq.com

类成分^[2]、葛根中的葛根素^[2]等作为质量控制成分; 仅有脑得生固体分散胶囊^[3]、脑得生软胶囊^[4]等对本品做了指纹图谱指认, 与脑得生丸(浓缩丸)相关的指纹图谱研究很少。

本研究通过建立脑得生丸(浓缩丸)的指纹图谱, 利用相似度评价软件分析, 并采用高效液相色谱(HPLC)方法测定脑得生丸(浓缩丸)中人参皂苷 Rg1 的含量, 评价脑得生丸(浓缩丸)产品质量的均一稳定性, 并为变更延长产品有效期提供支撑。

1 实验材料

1.1 药品 脑得生丸(浓缩丸)(湖南天济草堂制药股份有限公司, 具体批号见表 1; 葛根素(供含量测定用, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110752-201615); 阿魏酸(供含量测定用, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110773-201614); 人参皂苷 Rg1(供含量测定用, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110703-201832)。

表 1 脑得生丸(浓缩丸)样品批号

编号	批号	编号	批号
S1	161003(过期 5 个月)	S9	180306(有效期内)
S2	160801(过期 7 个月)	S10	181107(有效期内)
S3	160601(过期 9 个月)	S11	171002(有效期内)
S4	160702(过期 8 个月)	S12	171206(有效期内)
S5	160102(过期 14 个月)	S13	170503(有效期内)
S6	181202(有效期内)	S14	170604(有效期内)
S7	180202(有效期内)	S15	170802(有效期内)
S8	180107(有效期内)	S16	190112(有效期内)

注: 脑得生丸(浓缩丸)有效期为 2 年。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 甲醇(AR, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20180706); 乙醇(AR, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20180403); 乙腈(HPLC, Honeywell, S81A1H); 甲酸(AR, 天津科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20170706); 磷酸(AR, 湖南汇虹试剂有限公司, 批号: 20171219. 2)。

1.2.2 仪器 Agilent 1100(DAD 检测器, 二元高压); Waters 2695 型高效液相色谱仪(双波长检测器, 四元低压); Inertsil ODS-SP 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5μm); Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0μm); 超声波清洗器(KQ-2200DB, 江苏昆山市超声仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(DK-98-IIA, 八孔, 天津泰斯特仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(DK-98-IIA, 六孔, 天津泰斯特仪器有限公司); 十万分之一天平[EX125DZH, 上海奥豪斯仪器(常州)有限公司]; 万分之一天平(FA2004B, 上海越平科学仪器(苏州)制造有限公司); 千分之一天平(JA2003B, 上海越平科学仪器(苏州)制造有限公司); 超纯水净化系统(Direct-Q3, Merck)。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱

2.1.1 色谱条件 Inertsil ODS-SP 色谱柱(柱长 250 mm,

内径 4.6 mm; 粒度 5μm); 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 甲酸为流动相 B, 按表 2 中的规定进行梯度洗脱; 检测波长为 254 nm; 柱温 30℃; 流速 1 ml/min。

表 2 流动相梯度表

时间(min)	A(%)	B(%)
0	3.0	97.0
15	5.0	95.0
25	7.0	93.0
45	14.0	86.0
53	17.0	83.0
62	17.0	83.0
71	18.0	82.0
82	18.0	82.0
85	25.0	75.0
93	25.0	75.0
98	30.0	70.0
105	50.0	50.0

2.1.2 对照品溶液的制备 取对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成浓度分别为 0.1 mg/ml 的葛根素、阿魏酸对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 本品研成细粉, 取粉末 0.5 g(过二号筛), 精密称定, 加入甲醇-水(50:50) 25 ml, 超声 30 min(45 KHz, 100 W), 0.45μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密度实验 以“2.1.3”项下方法制备的同一份样品供试液重复进样 6 次, 对色谱峰进行积分, 以葛根素(6 号峰)为参照峰, 以分离度较好、吸收较强的 11 个色谱峰进行定位, 计算峰面积、相对峰面积、保留时间、相对保留时间及其相对标准偏差。结果显示, 保留时间和相对保留时间的 RSD 均在 0.5% 以内, 峰面积的 RSD 均在 2.9% 以内, 相对峰面积的 RSD 均在 2.4% 以内, 表明仪器精密度良好。

2.1.4.2 稳定性实验 16、24、48 h 时分别进样, 对色谱峰进行积分, 以葛根素(6 号峰)为参照峰, 以分离度较好、吸收较强的 11 个色谱峰进行定位, 计算峰面积、相对峰面积、保留时间、相对保留时间及其相对标准偏差。结果显示, 保留时间和相对保留时间的 RSD 均在 0.5% 以内, 峰面积的 RSD 在 2.8% 以内, 相对峰面积的 RSD 在 3.1% 以内, 表明样品在制备后 48 h 内较为稳定。

2.1.4.3 重复性实验 以“2.1.3”项下方法制备同一样品的样品, 平行制备 6 份供试液, 连续进样, 对色谱峰进行积分, 以葛根素(6 号峰)为参照峰, 以分离度较好、有较强吸收的 11 个色谱峰进行定位, 计算峰面积、相对峰面积、保留时间、相对保留时间及其相对标准偏差。结果显示, 保留时间和相对保留时间的 RSD 在 0.5% 以内, 峰面积的 RSD 在 3.1% 以内, 相对峰面积 RSD 均在 2.6% 以内, 表明该方法重复性较好。

2.1.5 样品测定 取 15 批脑得生丸(浓缩丸)样品, 按

“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,依照“2.1.1”项下的色谱条件依次进行分析,记录色谱图,提取 254 nm 图谱,共分别获得 11 个共有峰,指认其中 2 个共有峰,分别为葛根素(6

号峰)、阿魏酸(8 号峰)。葛根素对照品图谱见图 1-1,阿魏酸对照品图谱见图 1-2,样品指纹图谱见图 1-3,15 批样品指纹图谱见图 1-4。

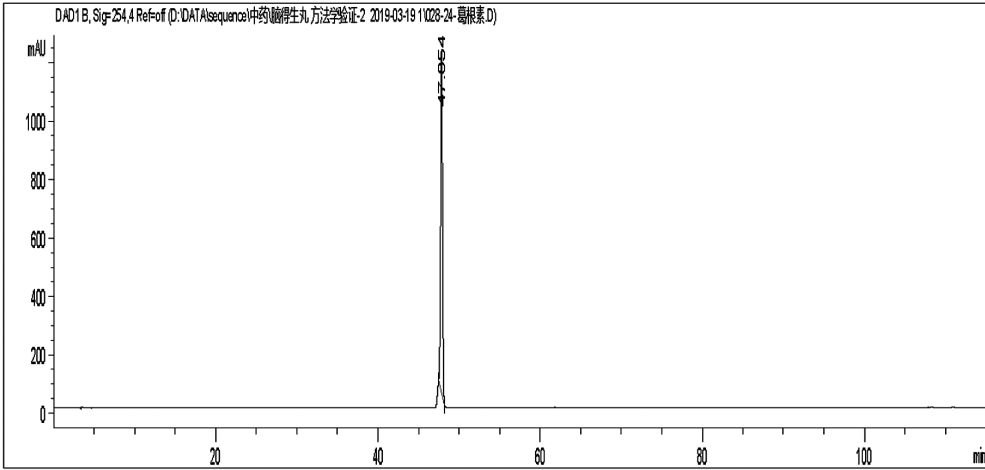


图 1-1 葛根素对照品色谱图

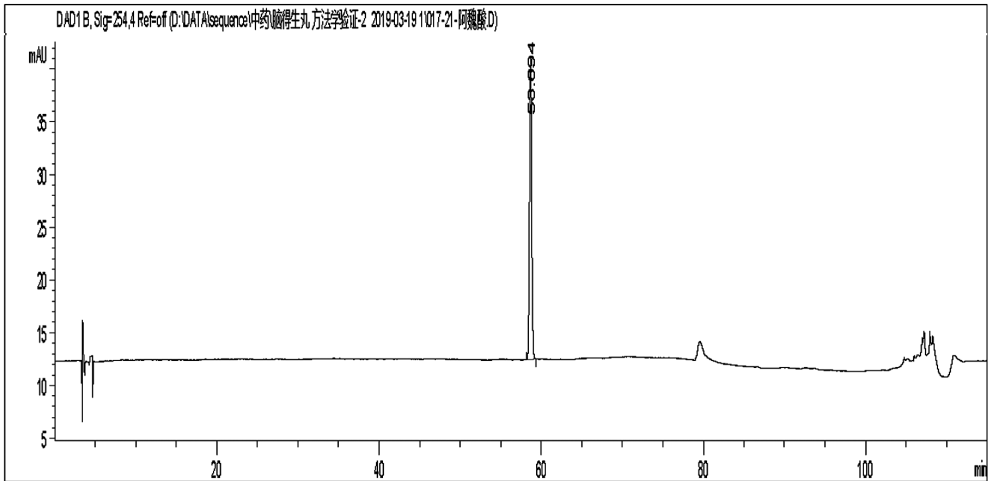


图 1-2 阿魏酸对照品色谱图

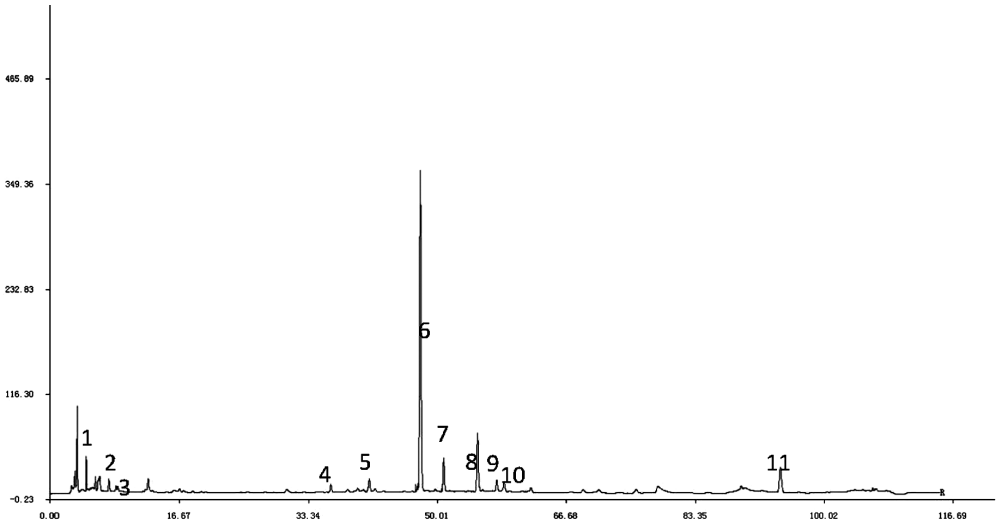


图 1-3 脑得生丸指纹图谱

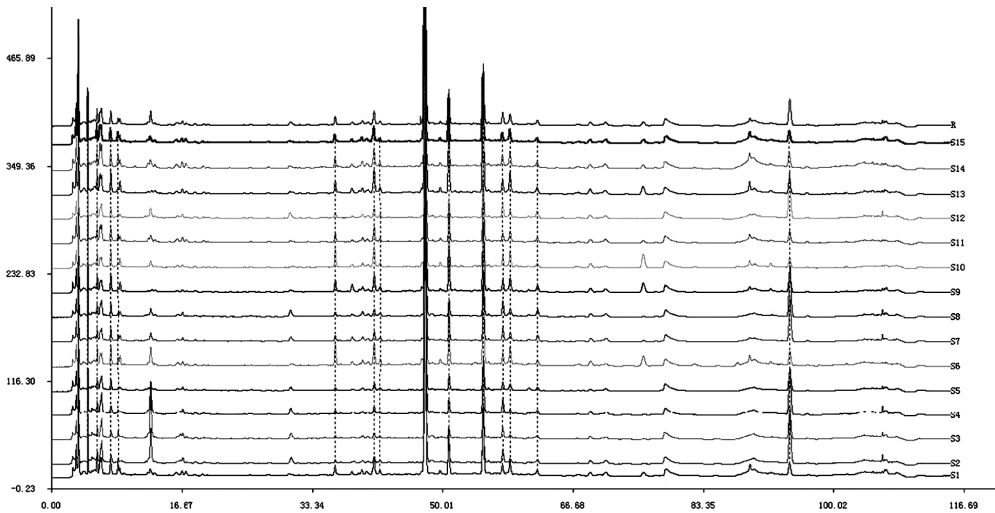


图 1-4 脑得生丸 15 批样品指纹图谱

图 1 对照品、样品图谱及指纹图谱

2.2 相似度评价 将 15 批脑得生丸(浓缩丸)样品色谱图导入国家药典委员会指定“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)”软件,利用中位法,时间窗为 0.1,将 S6 样品色谱图设置为参照色谱,多点校正,对色谱图进行自动匹配,生成脑得生丸样品指纹图谱的对照图谱(R),在分析检验模式下,以对照图谱作为参照图谱,计算相似度。结果如下表 3。

表 3 相似度评价结果

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.997	S9	0.998
S2	0.985	S10	0.995
S3	0.975	S11	0.997
S4	0.989	S12	0.991
S5	0.997	S13	0.996
S6	0.996	S14	0.997
S7	0.990	S15	0.997
S8	0.984	R	1.000

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 HypersilODS2 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5μm);流动相:乙腈-0.05%磷酸溶液(19:81)等度洗脱;检测波长为 203 nm;流速为 1.0 ml/min;进样量为 10 μl。

2.3.2 对照品溶液的制备 取人参皂苷 Rg1 对照品适量,精密称定,置于 25 ml 量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 0.1014 mg/ml 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取重量差异项下的本品,粉碎,取 1 g,精密称定,置于索氏提取器中,加适量甲醇,加热回流至回流液无色,甲醇液蒸干,残渣加水 30 ml 使溶解,转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇振摇提取 5 次(25、20、20、10、10 ml),合并提取液,用正丁醇饱和的水溶液洗涤 3 次,每次 25 ml,弃去洗涤液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至 25 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 线性关系考察 取人参皂苷 Rg1 对照品适量,精密

称定,置于 10 ml 量瓶,加甲醇溶解并定容至刻度,制备成浓度为 1.9200 mg/ml 的人参皂苷 Rg1 对照品母液;再精密吸取母液适量于 10 ml 量瓶,加甲醇稀释至刻度,依次制备成浓度为 0.9600、0.1920、0.0960、0.0384、0.0192 mg/ml 的人参皂苷 Rg1 对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件测定以上 6 个浓度中人参皂苷 Rg1 的峰面积。以浓度(mg/ml)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算线性范围。人参皂苷 Rg1 的线性方程为 $y = 13600x - 9.5581$, $R^2 = 0.9996$,线性范围是 19.2 μg/ml~1.920 mg/ml。(见图 2)

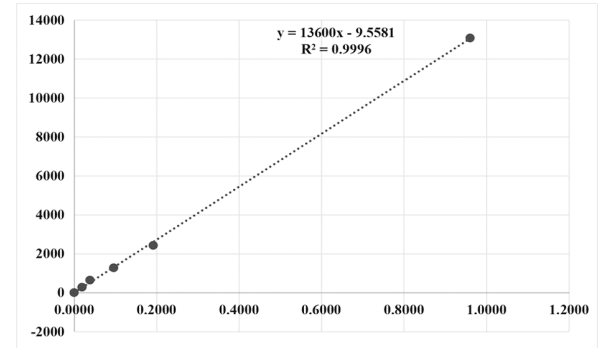


图 2 线性方程图

2.3.5 方法学考察

2.3.5.1 精密度实验 取对照品溶液依照“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录人参皂苷 Rg1 的峰面积,计算其保留时间及峰面积的 RSD 值。结果,其保留时间 RSD 值为 0.1%,峰面积 RSD 值为 0.5%,表明该法精密度良好。

2.3.5.2 稳定性实验 取批号为 190112 的脑得生丸(浓缩丸)5 袋,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件在供试品制备后 0、2、4、8、16、24 h 时分别进行测定,记录人参皂苷 Rg1 峰面积,计算含量及 RSD 值,其平均含量为 0.40%,即平均每袋含人参皂苷 Rg1 8.0mg, RSD 为 1.6%,表明供试品在制备后至少 24 h 内稳定。

2.3.5.3 重复性实验 取批号为190112的脑得生丸(浓缩丸)5袋,按“2.3.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录人参皂苷 Rg1 峰面积,计算含量及 RSD 值。6 份样品中人参皂苷 Rg1 的平均含量为 0.41%,即平均每袋含人参皂苷 8.2mg, RSD 为 2.8%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率 精密称取已知含量的批号为 190112 的脑得生丸(浓缩丸)粉末 0.5 g,共 6 份,置于索氏提取器中,分别加入 1 ml 人参皂苷 Rg1 对照品溶液(浓度为 2.1880 mg/ml)。按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进行测定,计算人参皂苷 Rg1 的平均回收率,结果见表 4。

表 4 人参皂苷 Rg1 回收率

样品量 (g)	实测含量 (mg)	样品含量 (mg)	加标量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.5098	4.46	2.09	2.19	108.22	105.26	2.57
0.5064	4.42	2.08	2.19	107.09		
0.5047	4.27	2.07	2.19	100.60		
0.5056	4.37	2.07	2.19	104.89		
0.5096	4.42	2.09	2.19	106.56		
0.4999	4.33	2.05	2.19	104.22		

2.3.7 含量测定 取 15 批脑得生丸(浓缩丸),分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进行测定,计算不同批次人参皂苷 Rg1 的含量,结果见表 5。

表 5 15 批脑得生丸(浓缩丸)人参皂苷 Rg1 含量

编号	批号	生产日期	有效期至	含量 (mg/袋)	结论 (≥7.0mg/袋)
1	161003	2016/10/07	2018/09	6.1	不合格
2	160801	2016/08/03	2018/07	8.2	合格
3	160601	2016/06/01	2018/05	10.4	合格
4	160702	2016/07/04	2018/06	7.0	合格
5	160102	2016/01/04	2018/12	15.5	合格
6	181202	2018/12/14	2020/11	9.9	合格
7	180202	2018/02/25	2020/01	10.0	合格
8	180107	2018/01/10	2019/12	9.2	合格
9	180306	2018/03/12	2020/02	12.4	合格
10	181107	2018/11/18	2020/10	10.1	合格
11	171002	2017/10/08	2019/09	9.2	合格
12	171206	2017/12/25	2019/11	10.4	合格
13	170503	2017/05/26	2019/04	8.5	合格
14	170604	2017/06/06	2019/05	9.8	合格
15	170802	2017/08/03	2019/07	10.4	合格

3 讨 论

根据脑得生丸(浓缩丸)样品的全波长扫描图,提取样品在 254、280、325 nm 波长下的色谱图,发现其在 254 nm 波长下,色谱峰较多且分离度较好,基线较为平稳,故而选择该波长指纹图谱检测波长。

以 15 批样品 254 nm 下的色谱图进行指纹图谱评价,其

相似度均大于 0.97。经对产品的起始投料药材、生产批记录、原始检测记录等追溯可知,本品药材来源和药材采收期固定,生产工艺稳定,样品贮藏符合要求,故而质量均一性及稳定性良好。由此可知,以该法评价脑得生丸(浓缩丸)产品的质量是可行的。

药品有效期是以药典通则规定的“原料药物与制剂稳定性试验指导原则”进行试验,以稳定性研究数据为制定依据。本次研究随机选择的 15 批次产品中,各批次产品性状无异常;以脑得生丸(浓缩丸)国家药品标准方法对人参皂苷 Rg1 的含量进行检测,15 批次脑得生丸产品中,仅有批号为 160103 的产品(过期 5 个月)含量不合格,其余批次均远高于含量限度。建议生产厂家进一步控制原药材质量、生产工艺、包材质量等,具有变更延长产品有效期的可能。

中药受土壤、气候等自然环境影响而质量差异较大,为保障产品质量的均一性,现在多提倡固定药材来源和采收期。中成药的均一性对于临床用药的有效性和安全性非常必要,我们认为中药指纹图谱技术能够反映药材及中成药全面特性的方法,以指纹图谱结合含量测定方法综合评价中药质量,是可行的必然趋势。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理局国家药品标准[S]. YBZ01542006-2009Z:55-56.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1387-1388,1389-1390.
[3] 罗兰,李明丽,康家珍,等. 脑得生固体分散体胶囊的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房,2017,28(27):3828-3831.
[4] 刘艳菊,张明,肖锦. 脑得生软胶囊高效毛细管的电泳指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(7):1605-1607.

(收稿日期:2020-04-29)

这“三觉”勿要睡(一)

人的一生有 1/3 的时间在睡觉,俗话说“宁可食无肉,不可睡不寐”“吃人参不如睡五更”,可见睡眠的重要性。但生活中,并不是每个人都会睡,比如不少人不知道有三种觉不能睡。具体是哪三种呢?

莫要生气时入睡

中医学认为,“喜、怒、忧、思、悲、恐、惊”是人体对外界环境的生理反应,一般不会直接致人生病。但如果情志活动剧烈、过度,并持久不得平静,那就必然影响脏腑气血功能。

常生气是百病之源,生气主要危害在肝。肝主疏泄,喜条达而恶抑郁。犯怒时,会影响肝的疏泄功能,肝气郁结,表现出胸膈满闷,两肋胀满;可进一步发展为肝火上炎,表现出目赤肿痛、口苦口干、烦躁易怒。

如果生气时入睡,则会导致肝血不足、肝气有余,长期以往,气血运行错乱,可导致睡眠失调,出现失眠。(http://www.cntcm.com.cn/2020-10/16/content_81624.htm)