

蒙药稳心 -7 味散质量标准研究

娜仁满都拉 斯日格 金宝 乌兰其其格 贡斯琴*

锡林郭勒盟蒙医医院 内蒙古锡林郭勒盟 026000

摘要: 目的: 建立蒙药稳心 -7 味散的质量标准, 为蒙药稳心 -7 味散的质量控制提供参考。方法 本项目以稳心 -7 味散为研究对象, 利用薄层层析法, 对 7 批样品中的广枣、葶苈、木香等成分进行薄层层析, 以没食子酸为指标成分, 利用 HPLC 法测定其含量; 然后, 利用线性关系、精密度、稳定性、重复性及重复使用等方法对其进行验证。结果: 该方法操作简单、特异性好、斑点明显、分离效果好, 与阴性对照相比不受干扰。HPLC 法具有较高的准确性, 方法学研究表明, 在 $182.4\mu\text{g/mL} \sim 912.0\mu\text{g/mL}$ 之间, 没食子酸的峰面积呈良好的线性关系 ($R^2=0.999$), 精密度好 (相对标准偏差低于 2.0%), 稳定性和重复性良好 (相对标准偏差均小于 1.0%), 平均加样回收率达 97.4%。结论: 该方法简便、准确, 重现性好, 所制定的该制剂的质量标准科学、可靠, 可作为该制剂的质控依据。

关键词: 稳心 -7 味散; 没食子酸; 质量标准

蒙药制剂稳心 -7 味散是锡林郭勒盟蒙医医院临床经验方, 蒙药稳心 -7 味散是匝迪 -5 散和赞丹 -3 味汤上加味转变来的, 哈达老师多年蒙医临床用药中发现蒙药匝迪 -5 味散^[1-2]和赞丹 -3 味汤加味丁香使用对心悸、胸闷、烦躁不安有很好的疗效。稳心 -7 味散方中肉豆蔻具有抑制心赫依之功效; 与广枣配合可有效增强养心安神的功能; 土木香具有解赫依血相让、止刺痛等功效; 木香具有调和体素的效果, 葶苈功效为滋补强壮, 主要用于治疗胃火衰败、不思饮食、消化不良等, 与其他药物联合治疗具有行气止痛以及安神镇静之功效; 白檀香可用于胸腹疼痛、调节胃肠运动, 有利于心脏病的治疗, 对心赫依热和血热引起的心悸、心赫依刺痛、心血刺痛、心痹刺痛等具有显著疗效^[3]; 丁香具有镇静、镇痛、平喘等作用。

蒙药稳心 -7 味散对心悸、心悸、心悸、心律失常等有较好的疗效, 但目前尚无质量标准。因此, 为确保临床用药安全、质量稳定、疗效显著, 我们拟在前期工作基础上, 利用 HPLC 技术, 对稳心 -7 味散中的君药 - 广枣的指标性成分 - 没食子酸进行定量分析, 以期完善其质量标准, 从而实现对其质量的有效控制提供科学的理论基础^{[4][5]}。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20303DPLUS 高效液相色谱仪; ME204/02 (梅特勒托利多); MS105DU 电子天平 (梅特勒托利多); KQ5200 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司);

稳心 -7 味散 (锡林郭勒盟蒙医医院制备) 7 个批号 (批号: 20230724、20230725、20230726、20230727、240319、240320、2312063); 胡椒碱对照品 (中检院 110775-202107); 去氢木香内酯对照品 (中检院 111525-201912); 没食子酸对照品 (中检院 110831-202306); 硅胶 G 板, GF254 板 (青岛海洋化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 葶苈的薄层色谱鉴别

2.1.1 对照品溶液的制备

取适量胡椒碱对照品, 将其放在无水乙醇里, 配成每 1ml 含有 4mg 的溶液, 此溶液当作对照品溶液。

2.1.2 葶苈阴性对照溶液的制备

取 5g 不含葶苈的葶苈阴性样品粉末, 向其中加入 20mL 无水乙醇, 超声处理 30 分钟后过滤, 从而得到葶苈阴性对照溶液。

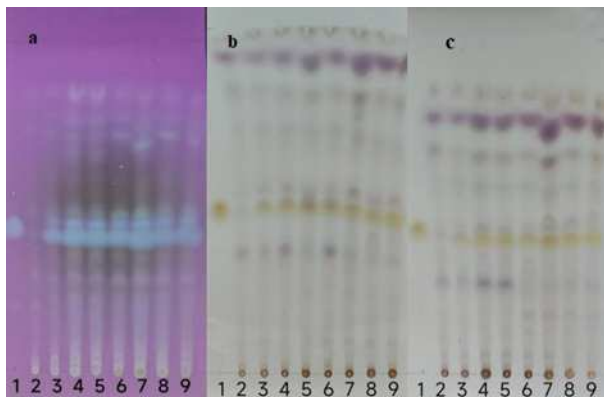
2.1.3 供试品溶液的制备

将稳心 -7 味散 5g 加入 20mL 无水乙醇, 超声 30 分钟, 过滤, 既得供试品溶液。

2.1.4 展开

点样, 将样品均匀地喷 10% 的硫酸乙醇, 将样品加热至 105°C , 使点清晰。展开剂为甲苯: 乙酸乙酯: 丙酮 (7:2:1), 结果显示, 在样品层与对照品层对应的水平线上出现了同样的灰绿色荧光斑点, 其 R_f 值为 0.54, 并且与阴性对照不存

在干扰, 结果见图 1。



注: 1. 胡椒碱对照品 2. 阴性对照 3-9. 稳心-7 供试品

图 1 萆薢薄层色谱图

a 紫外下的萆薢薄层色谱图 (365nm), b 室温下的萆薢薄层色谱图, c 低温下的萆薢薄层色谱图 (温度: -8°C , 湿度: 70%)

2.2 木香的薄层色谱鉴别

2.2.1 对照品溶液的制备

取适量的去氢木香炔内酯对照品, 利用甲醇将其制成每 1mL 含 0.5mg 的溶液, 此溶液用作对照品溶液。

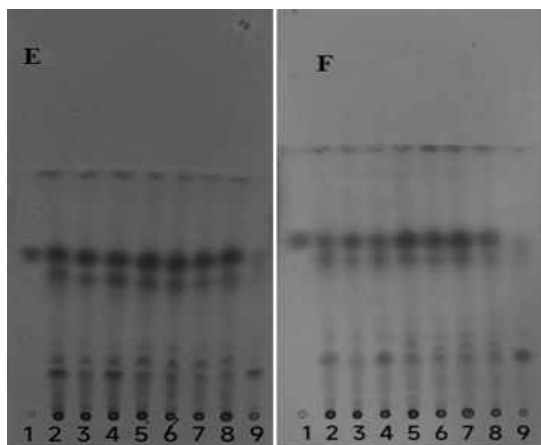
2.2.2 木香阴性对照溶液的制备

取 2g 木香阴性样品 (不含木香) 粉末, 加 20mL 甲醇, 超声 30min, 过滤, 制得木香阴性对照药材溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

定量称取 2g 的稳心-7 味散, 加 20mL 甲醇, 超声 30min, 过滤, 制得供试品溶液。

2.2.4 展开



注: 1: 去氢木香炔内酯对照品 2-8: 稳心-7 供试品 9: 阴性对照

图 2 木香薄层色谱图

点样, 喷显色剂 1% 香草醛硫酸溶液, 加热至 105°C 使斑点显色清晰, 日光下检视。如图 2{ 展开剂为环己烷-丙酮 (10:3) }, 结果显示: 供试品色谱和对照品色谱在相应的水平位置上呈现出相同颜色的蓝色斑点, $R_f=0.59$, 且阴性对照对测定没有干扰^[6], 结果见图 2。

E 室温下的木香薄层色谱图, F 低温下的木香薄层色谱图 (温度: -8°C , 湿度: 70%)

2.3 广枣的薄层色谱鉴别

2.3.1 对照品溶液的制备

把适量的没食子酸对照品取出, 利用 70% 的甲醇配制成每 1mL 包含 1mg 的溶液, 此溶液当作对照品溶液。

2.3.2 广枣阴性对照溶液的制备

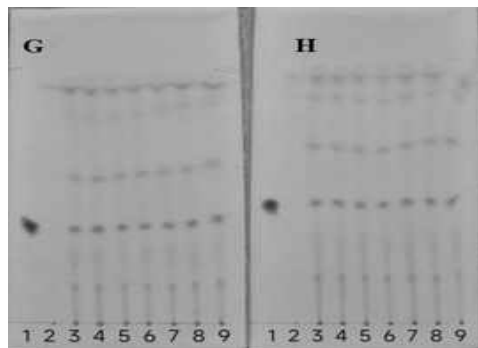
取 1g 不含广枣的广枣阴性样本, 往其中加入 20ml 浓度为 70% 的乙醇, 超声处理 30 分钟后进行过滤, 得到的滤液蒸至 2ml, 再加入 5ml 水将其溶解, 再使用乙醚振荡萃取 2 次, 每次用量为 15ml, 把乙醚液混合起来蒸干, 最后在残渣中加入 1ml 乙酸乙酯, 溶解后当作广枣阴性对照。

2.3.3 供试品溶液的制备

取稳心-7 味散粉末 1g, 加 20mL 70% 乙醇, 超声 30min, 滤过, 滤液蒸至 2ml, 再加入 5ml 水使其溶解, 再用乙醚震荡萃取 2 次, 每次用量为 15ml, 把乙醚液混合起来蒸干, 最后在残渣中加入 1ml 乙酸乙酯, 溶解后当作供试品溶液。

2.3.4 展开

点样, 以 $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯化铁溶液显色, 日光下检视。如图 3{ 三氯甲烷-丙酮-甲酸 (7: 2: 1) }, 结果表明, 广枣与对照品在对应的层次上呈同样的深蓝色斑点, $R_F=0.44$, 无干扰, 结果见图 3。



注: 1. 没食子酸对照品 2. 阴性对照 3-9. 稳心-7 供试品

图 3 广枣薄层色谱图

G: 室温下的广枣薄层色谱图, H: 低温下的广枣薄层色谱图 (温度: - 8℃; 湿度: 70%)

2.4 含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备

采用精密称量技术, 准确称取 9.12mg 的没食子酸对照品, 并将其置于 10mL 的棕色容量瓶中。随后, 加入 70% 的甲醇溶液进行定容, 确保溶液达到瓶颈刻度线。之后, 充分振荡容量瓶, 使没食子酸均匀分散在甲醇溶液中, 从而制备出浓度为 0.912mg/mL 的没食子酸对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液制备方法选择

2.4.2.1 提取时间考察

精密称取 3g 蒙药稳心 -7 味散 (批号: 20230727), 平行操作四份。将这四份蒙药稳心 -7 味散分别置入已标记序号的锥形瓶中, 随后向每个锥形瓶中加入 20mL 的 70% 甲醇溶液。确保锥形瓶密封后, 充分摇匀并称定其重量。接下来, 四组样品分别进行加热回流, 时间设定为 0.5、1、1.5 和 2 小时。加热结束后, 待样品冷却至室温, 再次称定其重量。若发现重量减少, 则使用相同配比的甲醇溶液补足至原始重量, 之后充分摇匀。通过滤纸对混合液进行初步过滤, 收集续滤液, 再使用针头式过滤器进行精细过滤, 按照先前确定的色谱条件, 分别取 10 μ L 各样品溶液进行进样测定。测定结果显示, 当加热回流提取时间为 1.5 小时时, 没食子酸的含量达到峰值。因此, 最终确定提取时间为 1.5 小时, 以确保提取效果的最优化。结果见表 1。

表 1 提取效率考察表

70% 甲醇加热回流时间 (h)	没食子酸峰面积	没食子酸含量 (mg/g)
0.5	932262	3.44
1	988117	3.48
1.5	1002792	3.74
2	994063	3.67

2.4.2.2 供试品溶液制备

精密称取蒙药稳心 -7 味散约 3g, 将研磨好的处方粉末按顺序放置在标有编号的锥形容器中, 向其中添加 20mL70% 甲醇溶液, 密塞并摇动均匀, 充分摇匀并称定其重量。进行加热回流, 时间设定为 1.5 小时。加热结束后, 待样品冷却至室温, 再次称定其重量。若发现重量减少, 则使用相同配比的甲醇溶液补足至原始重量, 之后充分摇匀。通过滤纸对混合液进行初步过滤, 收集续滤液, 再使用针头式过滤器进行精细过滤, 即得。

2.4.3 色谱条件的选择

采用 WR5-6065(250mm \times 4.6mm, 5 μ m) C18 色谱柱; 以甲醇 (A) -0.3% 冰乙酸水溶液 (B) (1:99) 作流动相, 等度洗脱 40 分钟; 流速 1.0mL/min; 检测波长 270nm; 柱温 30℃^[6]。

2.4.4 线性考察

本研究首先取用没食子酸对照品储备液, 并利用甲醇按照既定比例进行了稀释操作, 由此制备出浓度分别为 182.4 μ g/mL、364.8 μ g/mL、547.2 μ g/mL、729.6 μ g/mL 及 912.0 μ g/mL 的对照品溶液。随后, 依据 2.3 项下所规定的具体色谱条件, 对以上各浓度的对照品进行了系统的取样和测定。在此基础上, 以没食子酸对照品的浓度作为横轴, 以没食子酸峰面积作为纵轴, 绘制了标准曲线, 在 182.4 μ g/mL~912.0 μ g/mL 的标准曲线中, 没食子酸量和峰面积有很好的线性关系。回归方程为 $y=1822.1x-27320$, $R^2=0.999$, 可用于供试品中没食子酸的含量计算^[7]。结果见图 4。

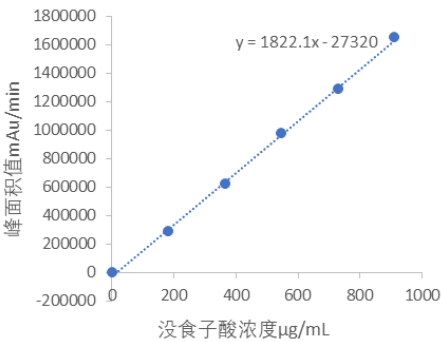


图 4 没食子酸线性图

2.4.5 精密度试验

从同一批次 (20230724) 中选择样品 6 份, 每一份准确称重 3g, 并按照 2.2.2 中所列的方法, 按 2.3 中所列的色谱条件进行分析。进样量各 10 μ L, 以保证实验结果的准确性和可靠性^[8]。结果见表 2。

表 2 没食子酸精密度试验结果

序号	峰面积值	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
1	776190	2.93	2.88	1.4
2	777020	2.93		
3	776007	2.85		
4	775413	2.84		
5	774530	2.86		
6	776886	2.86		

2.4.6 稳定性实验

按照“2.3”项下规定的色谱条件,对蒙药稳心-7 味散供试品溶液进行了多个时间点的进样测定。在供试品溶液制备完成后,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24h 对没食子酸的吸收峰面积进行测定,结果表明,没食子酸的峰面积为 0.52%,此期间具有高度的稳定性^[9]。结果见表 3。

表 3 没食子酸稳定性实验结果

时间 (h)	没食子酸峰面积值	峰面积平均值	RSD (%)
0	776753	779331	0.52
2	784427		
4	777748		
6	778115		
8	776323		
10	787161		
12	776940		
24	777179		

2.4.7 重复性试验

选择同一批蒙药稳心-7 味散(批号 20230724)6 份,按 2.2.2 所述方法制备样品。样品配制完毕后,取样测定,6 个样品的没食子酸的峰面积,其相对标准差为 1.9%。这个 RSD 值较低,表明在相同的制备和测定条件下,该方法所得到的没食子酸峰面积结果具有高度的重复性^[10]。因此,我们可以确认,该方法用于蒙药稳心-7 味散中没食子酸的

含量测定时,重复性良好,能够为蒙药稳心-7 味散的质量控制提供稳定可靠的分析手段。结果见表 4。

表 4 没食子酸重复性试验结果

样品号	取样量 (g)	峰面积	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
1	3.0095	774346	2.92	2.92	1.9
2	3.0067	773788	2.92		
3	3.0981	781978	2.87		
4	3.0812	772070	2.85		
5	3.0715	806564	2.99		
6	3.0703	810327	2.98		

2.4.8 回收率试验

精密称取 6 份蒙药稳心-7 味散供试品(批号 20230724),取约 2g,将研磨好的处方粉末按顺序放置在标有编号的锥形容器中,向其中添加 4mL 的没食子酸对照品溶液和 16mL 甲醇(甲醇-纯化水的比例为 7:3),密塞并摇动均匀,充分摇匀并称定其重量。进行加热回流,时间设定为 1.5 小时。加热结束后,待样品冷却至室温,再次称定其重量。若发现重量减少,则使用相同配比的甲醇溶液补足至原始重量,之后充分摇匀。通过滤纸对混合液进行初步过滤,收集续滤液,再使用针头式过滤器进行精细过滤,即得^[11]。按上述色谱条件 2.3 各进样 10 μ L 测定。结果见表 5。

表 5 回收率试验结果

序号	取样量 (g)	对照品加入量 (mg)	峰面积	测得总量 (mg)	供试品没食子酸量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	2.0574	5.232 (1.308mg/ml)	972434	10.97	4.98	95.2	97.4	2.6
2	2.0993		1008993	11.37	5.26	100.6		
3	2.0108		969592	10.94	5.09	97.3		
4	2.0672		978039	11.04	5.02	95.8		
5	2.0572		996463	11.24	5.25	100.3		
6	2.0664		973222	10.98	4.97	95.0		

2.4.9 供试品含量测定及含量限度确定

以“2.2.2”项下方法平行制备 3 份不同批次(20230724、20230725、20230726、20230727、240319、240320、2312063)稳心-7 味散供试品溶液,进样测定,记录峰面积,计算样品中没食子酸的含量^[12],计算得到含量分别为 3.16、3.57、2.97、3.36、3.14、3.17、2.91; RSD 分别为 5.2%、5%、1.3%、1.2%、1.2%、1.6%、2.7%。结果表明可以用此方法作为参考。结果见表 6。

表 6 样品中没食子酸含量测定结果

批号	样品号	峰面积	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
20230724	1	841303	3.17	3.16	5.2
	2	817382	2.99		
	3	904107	3.32		
	4	907870	3.36		
20230425	5	1005063	3.65	3.57	5.0
	6	982509	3.69		
	7	792803	2.95		
	8	802519	3.02		
20230726	9	779862	2.95	2.97	1.3
	10	895986	3.37		



20230727	11	880617	3.31	3.36	1.2
	12	926796	3.39		
	13	833740	3.13		
240319	14	824899	3.10	3.14	1.2
	15	845634	3.18		
	16	859636	3.23		
240320	17	887815	3.14	3.17	1.6
	18	834946	3.14		
	19	788775	2.96		
2312063	20	786074	2.96	2.91	2.7
	21	749846	2.82		

3 讨论

稳心-7 味散是蒙医多年的经验方，具有清热、益心、顺气安神、调气血之功效，但目前尚无有效的质控手段。采用高效液相色谱法测定了制剂中没食子酸的含量，其峰面积与 182.4~912.0 μg 之间有很好的线性关系。通过精密度、稳定性、重复性和回收率试验等一系列方法学上的检验，其结果表明，所有这些指标的相对标准差都是令人满意的，并且都满足了含量测定项目的要求。

本课题拟在前期工作基础上，以蒙药稳心-7 味散为研究对象，根据其功效主治和质控要求，以及处方药材的采集条件，采用薄层色谱法对其进行定性鉴别。本文以中药广枣为研究对象，建立了 HPLC 法测定其没食子酸的方法，并进行了方法学的验证。该方法专属性强，重现性好，精密度高，灵敏度高，可以作为该制剂的质控标准。

参考文献：

[1] 宣丽颖, 赵明, 王永. 蒙药匝迪-5 味丸治疗室性早搏的临床观察[J]. 大家健康(学术版), 2015, 9(02): 117.

[2] 乌日嘎, 威力斯, 乌日拉嘎, 等. 匝迪-5 味丸改善心肌缺血再灌注损伤的作用机制预测及验证[J]. 中国药房, 2024, 35(04): 442-448.

[3] 廉源. 蒙药赞丹-3 汤对心肌缺血再灌注损伤引发心律失常的作用研究[D]. 内蒙古民族大学, 2023.

[4] 史海燕, 郝艳丽. 没食子酸生物活性研究进展[J]. 吉

林医药学院学报, 2020, 41(2): 146-149.

[5] Tanaka M, Kishimoto Y, Sasaki M, et al. Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. extract and gallic acid attenuate LPS-induced inflammation and oxidative stress via MAPK/NF- κ B and Akt/AMPK/Nrf2 pathways[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018(1): 9364364-9364364.

[6] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)2020 年版[M]. 中国医药科技出版社, 2020.

[7] Kong J, Zhang L, Feng H, et al. Determination of Gallic acid, Epicatechin and Epicatechin gallate in Different Varieties, Manufacturers and Grades of Tea by HPLC[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2020, 1549(3).

[8] 包长龙. HPLC 法测定蒙药兴格格其乌日勒中没食子酸的质量标准研究[J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(04): 50-52.

[9] 格格塔娜, 成志平, 李强, 等. 高效液相色谱法测定那如三味丸中的没食子酸的含量[J]. 北方药学, 2021, 18(04): 7-8.

[10] 席琳图雅, 包英姝, 乌兰娜, 等. HPLC 法测定蒙药新 I 号滴丸中没食子酸的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2016, 22(06): 63-64.

[11] 韦新成, 薄彧坤, 杨丹, 等. HPLC 法测定蒙药哈敦嘎日迪-13 丸中总没食子酸的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(02): 49-52.

[12] 冯智翱, 薄彧坤, 杨丹, 等. HPLC 法测定蒙药嘎日迪-15 丸中没食子酸的含量[J]. 北方药学, 2020, 17(09): 21-24.

作者简介: 娜仁满都拉(1990-), 女, 内蒙古锡林郭勒盟蒙医医院蒙医药研究室主管蒙药师。

通讯作者: 贡斯琴(1969-), 女, 内蒙古锡林郭勒盟蒙医医院蒙医药研究室主任蒙药师。

基金项目: 内蒙古自治区蒙医药标准化项目: 蒙药稳心-7 味散质量标准研究(2023-[MB024])。