

散结镇痛胶囊中皂苷类成分的指纹图谱研究

颜月园^{1,3}, 萧伟^{2,3*}, 吴云^{2,3}, 王伟^{2,3}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立散结镇痛胶囊中皂苷类成分的 HPLC 指纹图谱。方法 经水饱和正丁醇提取后, 用氢氧化钠溶液萃取, 采用 D-101 大孔树脂富集制备供试品溶液。色谱条件为 Waters Symmetry[®] C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱; 检测波长 203 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。采用国家药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价》(2004 年 A 版) 软件, 对 11 批不同批次的散结镇痛胶囊中皂苷类成分指纹图谱进行相似度计算。结果 11 批散结镇痛胶囊指纹图谱中有 9 个共有峰, 各峰分离度良好, 各批次间共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 样品间相似度均 > 95%。结论 本方法具有良好的精密性、重现性、稳定性, 各共有峰间分离度高, 可用于散结镇痛胶囊质量综合评价。
关键词: 散结镇痛胶囊; 皂苷类成分; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 相似度

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0496-05

Fingerprint analysis of saponins in Sanjie Zhentong Capsule by HPLC

YAN Yue-yuan^{1,3}, XIAO Wei^{2,3}, WU Yun^{2,3}, WANG Wei^{2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Key words: Sanjie Zhentong Capsules (SZC); saponins; fingerprint; HPLC; similarity

散结镇痛胶囊是由三七、龙血竭等药味组成的中药成方制剂, 具软坚散结、化瘀定痛之功能, 临床用于子宫内位症所致的继发性痛经、月经不调、盆腔包块和不孕等病症^[1-2]。其临床应用广泛, 疗效确切。散结镇痛胶囊中的主要成分有皂苷类、黄酮类、生物碱类及油脂类。为保证制剂的质量和临床疗效, 有必要对制剂中的多成分进行控制。本研究以制剂中皂苷类成分为主要分析对象, 采用 HPLC 法对散结镇痛胶囊中皂苷类成分进行指纹图谱研究, 为散结镇痛胶囊的质量控制提供科学依据。

1 仪器与材料

Waters 2695—2487 高效液相色谱仪 (美国沃特斯公司), AB204—S 电子天平 (Mettler Toledo), KQ—250DB 型数控超声波清洗仪 (昆山市超声波

仪器有限公司), HH—4 数显恒温水浴锅 (上海浦东物理光学仪器厂)。甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司), 正丁醇、乙醇 (分析纯, 南京化学试剂有限公司), 氢氧化钠 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 水为 Milli-Q 超纯水。

散结镇痛胶囊 (批号 Z110501、Z110504、Z110602、Z110603、Z110506、Z110606、Z100607、Z100606、Z100806、Z110806、Z111006, 分别编号为 S1~S11, 江苏康缘药业股份有限公司); 人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-200424)、人参皂苷 Rb₁ (批号 110704-200420)、人参皂苷 Re (批号 110754-200320)、三七皂苷 R₁ 对照品 (110705-200420) 购于中国药品生物制品检定所。三七药材产自云南文山, 经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主任药师鉴定为五加

收稿日期: 2011-10-21

基金项目: 科技部重大新药创制资助项目 (子宫内位症首选用药-散结镇痛胶囊大品种技术改造, 2011ZX09201-201-20)

作者简介: 颜月园 (1988—), 女, 江苏盐城人, 南京中医药大学 2009 级硕士研究生, 研究方向为生物药剂学。

Tel: 15961378521 E-mail: yanyueyuanyezi@163.com

*通讯作者 萧伟 E-mail: wzhzh-nj@tom.com

科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根; 龙血竭药材产自云南西双版纳, 购于云南省西双版纳制药厂, 经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主任药师鉴定为剑叶龙血树 *Dranaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材经提取得到的树脂; 浙贝母药材产自浙江东阳, 经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主任药师鉴定为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎; 薏苡仁药材产自贵州兴仁, 经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主任药师鉴定为禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf 的干燥成熟种仁。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Symmetry[®] C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~20 min, 20%乙腈; 20~60 min, 20%~45%乙腈; 检测波长 203 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃。

2.2 对照品溶液的制备

取人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 R_e 适量, 加入适量甲醇, 配成质量浓度分别为 0.308、0.257、0.307 mg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

取三七皂苷 R₁ 适量, 加入适量甲醇, 配成质量浓度为 0.187 mg/mL 的对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取散结镇痛胶囊内容物 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入水饱和的正丁醇 100 mL, 密塞, 称定质量, 超声 1 h, 放冷, 称定质量, 再用水饱和的正丁醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 50 mL 置分液漏斗中, 加正丁醇饱和的 1% NaOH 溶液萃取 5 次 (20、10、10、5、5 mL), 合并正丁醇液, 蒸干^[1], 残渣加水 5 mL 使溶解, 通过预处理好的 D-101 大孔树脂 (内径 1.2 cm, 柱高 15 cm 左右), 用 5 BV 水、5 BV 50%乙醇依次洗脱, 收集 50%乙醇洗脱液, 蒸干, 甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中。

按照胶囊处方比例分别称取各单味对照药材, 精密称定, 同法制备对照药材溶液。

2.4 测定方法

分别精密量取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件操作, 考察 120 min 内供试品溶液的色谱分离情况, 记录 60 min 色谱图。

2.5 方法学考察^[3]

2.5.1 精密度试验 取批号为 Z100607 的散结镇痛胶囊适量, 按“2.3”项下制备供试品溶液, 在“2.1”项下的色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱图, 以人参皂苷 R_{g₁} 为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及相对峰面积, 结果各峰相对保留时间 RSD 均小于 0.22%; 相对峰面积 RSD 均小于 3.08%。

2.5.2 稳定性试验 取批号为 Z100607 的散结镇痛胶囊适量, 按“2.3”项下制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 以人参皂苷 R_{g₁} 为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及相对峰面积, 结果各峰相对保留时间 RSD 均小于 0.31%; 相对峰面积 RSD 均小于 4.88%, 表明供试品溶液在 12 h 内保持稳定。

2.5.3 重现性试验 取批号为 Z100607 的散结镇痛胶囊适量, 按“2.3”项下分别制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以人参皂苷 R_{g₁} 为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及相对峰面积, 结果各峰相对保留时间 RSD 均小于 0.23%; 相对峰面积 RSD 均小于 3.73%。

2.6 指纹图谱的建立^[4-5]

2.6.1 共有指纹峰的标定 采用相对保留时间标定共有指纹峰, 以图谱中人参皂苷 R_{g₁} 色谱峰为参照峰 (S), 将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照峰的保留时间比较, 其比值为各色谱峰的相对保留时间, 计算 11 批样品指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间, 见表 1。其中 9 个色谱峰为各样品所共有, 故标定它们为共有指纹峰。

2.6.2 共有峰的相对峰面积 以图谱中人参皂苷 R_{g₁} 峰为参照峰, 将各色谱峰峰面积与同一图谱参照峰的峰面积比较, 其比值为各色谱峰的相对峰面积, 其 RSD 均小于 4.89%。见表 2。

2.6.3 非共有峰峰面积 计算非共有峰占总峰面积的比值。结果表明, 其比值小于 5%, 符合指纹图谱的要求。

2.6.4 指纹图谱相似度评价 采用中国药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价》软件 (2004 年 A 版) 进行相似度计算。设置批号为 Z100607 的样品图谱为参照图谱, 对照图谱生成方法采用中位数法, 时间窗宽度为 0.10, 多点校正后自动匹配, 生成对照指纹图谱 (R), 见图 1。结果 11 批胶囊的相似度均在 0.95 以上, 表明建立的指纹图谱的技术稳定、重现性好。见表 3。

表 1 11 批散结镇痛胶囊中皂苷类成分各峰相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks of saponins for 11 batches of SZC

编 号	相对保留时间								
	1	2 (S)	3	4	5	6	7	8	9
S1	0.725	1.000	1.029	1.657	1.689	1.730	1.740	1.913	2.005
S2	0.724	1.000	1.030	1.659	1.692	1.732	1.741	1.915	2.007
S3	0.727	1.000	1.028	1.650	1.683	1.723	1.732	1.905	1.997
S4	0.727	1.000	1.027	1.652	1.689	1.726	1.737	1.915	2.007
S5	0.728	1.000	1.027	1.647	1.683	1.719	1.731	1.907	1.998
S6	0.727	1.000	1.026	1.649	1.686	1.723	1.734	1.914	1.911
S7	0.726	1.000	1.026	1.623	1.690	1.726	1.738	1.916	2.008
S8	0.729	1.000	1.026	1.646	1.682	1.719	1.730	1.907	1.999
S9	0.725	1.000	1.027	1.654	1.690	1.727	1.738	1.916	2.009
S10	0.725	1.000	1.027	1.654	1.690	1.727	1.738	1.916	2.009
S11	0.724	1.000	1.027	1.656	1.692	1.729	1.741	1.919	2.011
平均值	0.726	1.000	1.027	1.652	1.688	1.725	1.736	1.913	2.005
RSD / %	0.217	0.000	0.124	0.251	0.222	0.242	0.223	0.229	0.227

表 2 11 批散结镇痛胶囊中皂苷类成分各峰相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks of saponins for 11 batches of SZC

编 号	相对峰面积								
	1	2 (S)	3	4	5	6	7	8	9
S1	0.181	1.000	0.105	0.045	0.450	0.024	0.048	0.155	0.038
S2	0.166	1.000	0.100	0.044	0.410	0.023	0.045	0.143	0.037
S3	0.164	1.000	0.099	0.044	0.399	0.021	0.045	0.140	0.035
S4	0.166	1.000	0.099	0.043	0.400	0.021	0.044	0.144	0.036
S5	0.179	1.000	0.099	0.043	0.446	0.021	0.046	0.145	0.038
S6	0.170	1.000	0.099	0.042	0.419	0.021	0.046	0.141	0.037
S7	0.153	1.000	0.101	0.040	0.416	0.023	0.046	0.148	0.035
S8	0.159	1.000	0.106	0.041	0.409	0.021	0.050	0.145	0.034
S9	0.172	1.000	0.110	0.041	0.447	0.022	0.050	0.156	0.035
S10	0.170	1.000	0.099	0.039	0.432	0.023	0.049	0.151	0.034
S11	0.167	1.000	0.109	0.041	0.431	0.021	0.049	0.157	0.034
平均值	0.168	1.000	0.103	0.042	0.424	0.022	0.047	0.148	0.036
RSD / %	4.798	0.000	4.015	4.141	4.425	4.885	4.703	4.038	4.290

2.6.5 共有指纹峰的归属 分别吸取药材供试品溶液, 注入液相色谱仪, 采集色谱图。通过保留时间及光谱信息对比, 归属于龙血竭的色谱峰有 0 个, 归属于三七的色谱峰有 9 个, 归属于浙贝母的色谱峰有 0 个, 归属于薏苡仁的色谱峰有 0 个, 实验结果反映制剂中的皂苷类成分主要来源于三七, 说明制剂和原料药三七具有明显的相关性, 见图 2。

3 讨论

3.1 供试品溶液的处理

经对提取溶剂 (50%、70%、100% 甲醇、正丁醇)、提取方式 (超声、加热回流) 及提取时间进行考察, 选择用正丁醇超声 60 min, 方法简便, 得到的色谱峰信息丰富; 用碱液进行萃取, 可去除对皂苷类成分色谱峰有干扰的酚酸类成分; 采用 D-101 大孔树脂除杂, 50% 乙醇洗脱, 可进一步除去一部

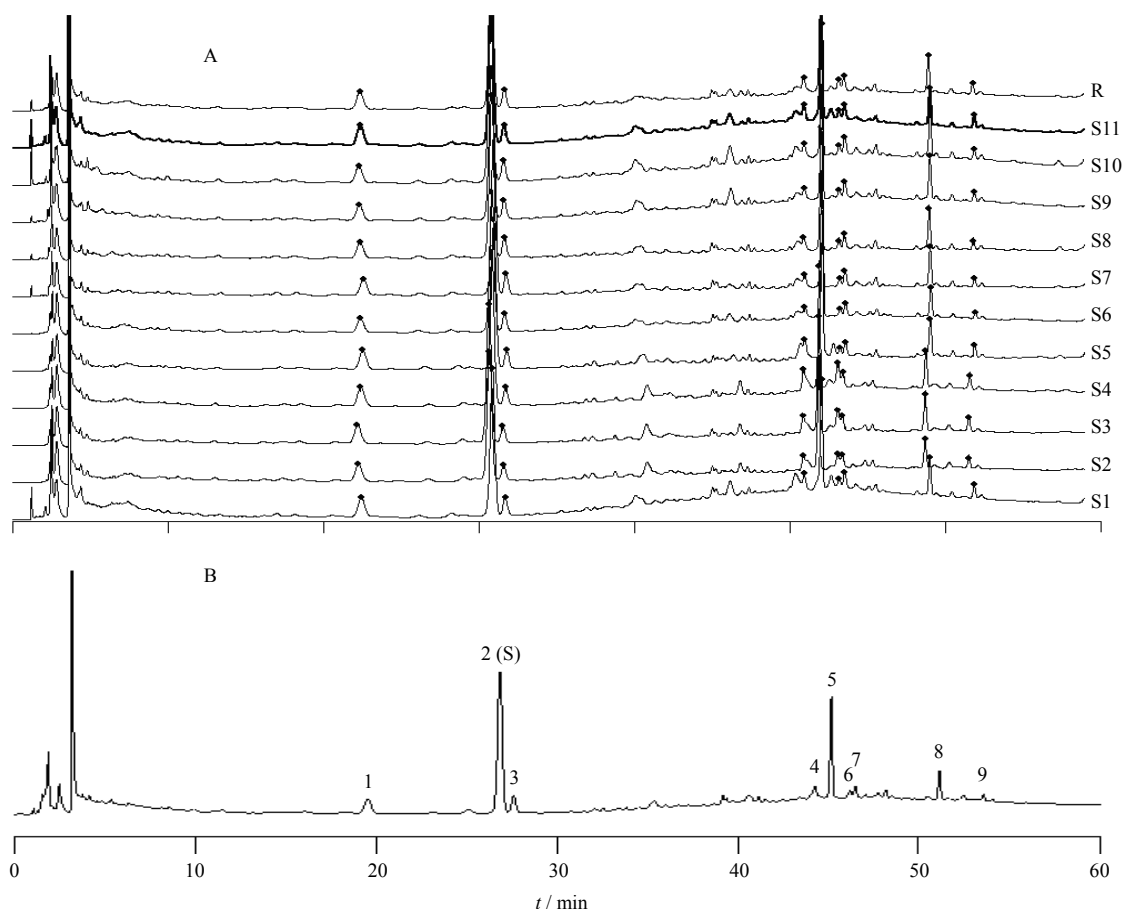


图1 11批散结镇痛胶囊中皂苷类成分的HPLC指纹图谱(A)及其共有指纹峰图(B)

Fig. 1 HPLC fingerprints of saponins for 11 batches of SZC (A) and their common fingerprint peaks (B)

表3 11批胶囊中皂苷类成分的指纹图谱相似度评价

Table 3 Similarity of common peaks for 11 batches of SZC

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	1.000	S5	0.999	S9	0.998
S2	1.000	S6	0.998	S10	0.999
S3	0.999	S7	0.998	S11	0.998
S4	0.999	S8	0.999		

分极性相对较小的干扰性成分。通过上述研究拟定的供试品处理方法可以达到除杂并满足检测需要。

3.2 流动相选择

考察了乙腈-水、乙腈-0.1%冰醋酸、甲醇-水梯度洗脱、甲醇-0.1%冰醋酸系统进行梯度洗脱,结果选择乙腈-水溶液进行梯度洗脱时,得到的色谱峰形较好,且较稳定。记录该色谱条件下120 min色谱图,60 min后无色谱峰出现,故色谱记录时间为60 min。

3.3 色谱柱的选择

本实验考察了Phenomenex Gemini C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry[®] C₁₈柱(250

mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种不同型号的色谱柱,结果选择Waters Symmetry[®] C₁₈柱,其出峰较其他两种色谱柱早,而且各色谱峰分离度佳,峰形较好。

3.4 测定波长的选择

采用DAD二级管阵列检测器进行全波长扫描,比较了200~400 nm所得的HPLC图谱,结果在203 nm波长检测时,其HPLC图谱中反映的色谱峰信息较全面,同时各色谱峰分离度较好,出峰数目适中,峰形较好,故确定203 nm为检测波长。

3.5 指纹图谱评价

本研究按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》^[6]采用HPLC法对散结镇痛胶囊中皂苷类成分指纹图谱及其技术参数进行了研究,取得了较满意的结果,标定了9个共有峰,方法学考察其精密度、稳定性、重现性均良好,表明所建立的HPLC指纹图谱方法可行。运用指纹图谱相似度软件对散结镇痛胶囊皂苷类成分HPLC指纹图谱进行了相似度计算,11批不同批次胶囊中皂苷类成分的指

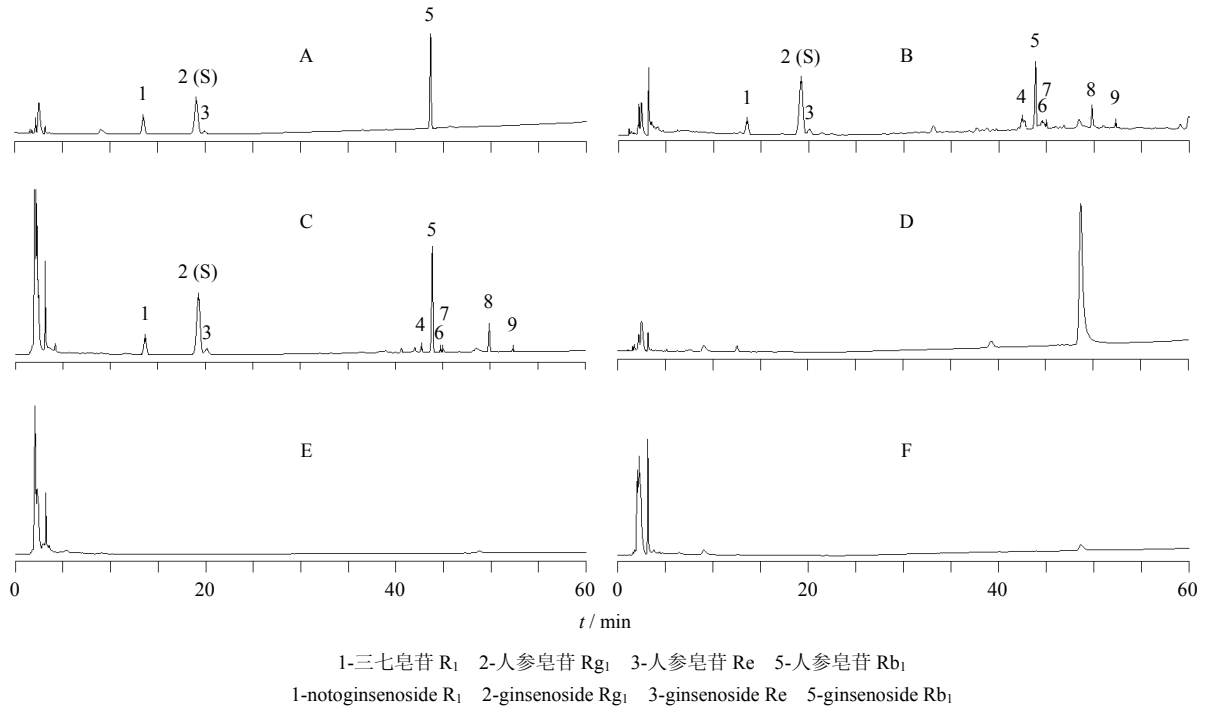


图 2 混合对照品 (A)、散结镇痛胶囊皂苷类成分 (B)、三七 (C)、龙血竭 (D)、浙贝母 (E) 和薏苡仁 (F) 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), saponins in SZC (B), *Notoginseng Radix et Rhizoma* (C), *D. cochinchinensis* (D), *Fritillariae Thunbergii Bulbus* (E), and *Coicis Semen* (F)

纹图谱具有较好的相似度、相对保留时间和相对峰面积的比值范围。表明散结镇痛胶囊各批次间其皂苷类成分无明显差异,为客观评价胶囊质量提供一定依据。

本实验拟定了散结镇痛胶囊指纹图谱检测方法,经初步验证能够用来控制本品的质量,确保产品批次间的稳定性、均一性。本研究中选取了人参皂苷 R_{g1} 等 9 个共有峰作为代表,通过对共有峰的监控,达到控制制剂整体质量均一的目的,但仍需要长期、多批次的样品数据的积累,才能逐步形成较为完善的指纹图谱控制技术。鉴于本研究现有的 11 批数据,初步建立了本指纹图谱。由于散结镇痛胶囊复方中的成分种类复杂,在后续的实验本课题组还将研究建立复方中黄酮类成分的指纹图谱。

参考文献

[1] 唐云,倪玮焯,束志凌. HPLC 法测定散结镇痛胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 及人参皂苷 R_{b1} 的含量 [J]. 药学进展, 2009, 33(7): 328-329.

[2] 潘媛,曹克,邓奕,等. 散结镇痛片对子宫内膜异位症模型大鼠妊娠功能和激素水平的影响 [J]. 现代药物与临床, 26(6): 477-480.

[3] 谢培山. 中药色谱指纹图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

[4] 屠鹏飞. 中药指纹图谱制定的方法学探讨 [A]. 现代化中药产业关键技术系列研讨会——国际色谱指纹评价中药质量研讨会 [C]. 广州: 广州药学会, 2001.

[5] 蔡宝昌. 中药制剂分析 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.

[6] 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行) [S]. 2000.