

散结镇痛胶囊中酚酸类成分的指纹图谱研究和多指标成分定量测定

秦建平^{1,2}, 吴建雄^{1,2}, 李家春^{1,2}, 毕宇安^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 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酚酸类成分的 UPLC 指纹图谱, 并进行多成分定量分析, 为评价散结镇痛胶囊提供依据。**方法** 采用 UPLC 法, 色谱柱为 Phenomenex Kinetex 2.6 μm C₁₈ 100 A 柱, 乙腈-水梯度洗脱, 体积流量为 1.7 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长为 280、325 nm。**结果** 得到分离度、重现性均较好的散结镇痛胶囊酚酸类成分 UPLC 指纹图谱, 标示出 15 个共有峰, 各批次样品相似度均在 0.96 以上; 通过对照品比对, 确定了 5 个成分, 分别为白藜芦醇、7, 4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪, 并对其进行定量分析。**结论** 同时对散结镇痛胶囊中酚酸类成分进行 UPLC 指纹图谱和 5 个指标成分分析, 方法快速、简便、准确, 可作为全面评价该制剂质量的有效方法之一。

关键词: 散结镇痛胶囊; 指纹图谱; 白藜芦醇; 7, 4'-二羟基黄酮; 龙血素 A; 龙血素 B; 紫檀芪; UPLC

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)01-0059-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.012

Fingerprint of phenolic constituents in Sanjie Zhentong Capsule and quantitative determination of multi-components

QIN Jian-ping^{1,2}, WU Jian-xiong^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, BI Yu-an^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprint for the phenolic constituents in Sanjie Zhentong Capsule (SZC) and to perform the quantitative determination of multi-components, so as to provide a scientific basis for the quality control of SZC. **Methods** The Phenomenex Kinetex 2.6 μm C₁₈ 100 A column was used in the gradient elution with a mobile phase of acetonitrile-water, the flow rate was 1.7 mL/min, the column temperature was 40 °C, and the detection wavelengths were at 280 and 325 nm. **Results** The reproducible fingerprint of SZC was established and 15 common peaks were found. The fingerprints showed the good similarity in 10 batches of SZC was above 0.96. Based on the retention time and UV absorption spectra of reference substances, five constituents including loureirin A, loureirin B, 7, 4'-dihydroxy flavone, resveratrol, and pterostilbene were identified and quantitatively analyzed. **Conclusion** The method is rapid, simple, and accurate, which could be used for the quality control of SZC.

Key words: Sanjie Zhentong Capsule; fingerprint; resveratrol; 7, 4'-dihydroxy flavone; loureirin A; loureirin B; pterostilbene; UPLC

散结镇痛胶囊 (Sanjie Zhentong Capsule, SZC) 是由三七、龙血竭、浙贝母和薏苡仁组成的成方制剂, 软坚散结、化瘀定痛, 用于痰瘀互结兼气滞所致的继发性痛经、月经不调、盆腔包块、不孕, 子宫内膜异位症等, 在临床使用中对于子宫内膜异位症有良好的疗效^[1-2]。散结镇痛胶囊中的主要成分有皂

苷类、酚酸类、生物碱类及油脂类成分。为了更好地控制产品质量, 保证临床疗效, 需建立全面评价该制剂质量的方法。文献中关于散结镇痛胶囊的质量控制方法主要有皂苷类成分的定量测定^[3]和指纹图谱研究^[4]、黄酮类成分的指纹图谱研究^[5], 文献报道的这些质量控制手段还不能全面的控制散结镇

收稿日期: 2013-08-19

基金项目: 国家科技部“重大新药创制”项目名称: 子宫内膜异位症首选用药——散结镇痛胶囊大品种技术改造 (2011ZX09201-201-20)

作者简介: 秦建平 (1979—), 女, 工程师, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: (0518)85521932 E-mail: jianpingqin@gmail.com

*通信作者 萧伟 (1959—), 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药制剂和创新中药的研究与开发。

Tel: (0518)81152367 Fax: (0518)81152327 E-mail: kanionlunwen@163.com

网络出版时间: 2013-12-24 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/散结镇痛胶囊中酚酸类成分的指纹图谱研究和多指标成分.html>

痛胶囊的质量。散结镇痛胶囊中酚酸类成分主要来自龙血竭药材，本实验以制剂中酚酸类成分为主要分析对象，参考相关文献报道^[5-12]，采用 UPLC 法同时对散结镇痛胶囊中酚酸类成分进行了指纹图谱研究和 5 个指标成分的定量测定，可作为全面控制散结镇痛胶囊质量的有效方法之一。

1 仪器与材料

Agilent 1290 超高压液相色谱仪，DAD 紫外检测器（美国安捷伦公司）；Mettler AE240 电子分析天平（德国梅特勒公司）；BP211D 型电子分析天平（德国赛多利斯公司）；Centrifuge 5415D 高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；Milli-Q Academic 纯水机（美国密理博公司）；KQ-250DB 型超声波清洗仪（昆山超声仪器有限公司）。

散结镇痛胶囊（江苏康缘药业股份有限公司生产，批号为 110504、110901、110902、110903、110904、110905、100607、100102、100103 和 100107）；对照品龙血素 A（批号 111660-200402，质量分数 99.7%）、龙血素 B（批号 111558-200303，质量分

数 99.0%）、7, 4'-二羟基黄酮（批号 111787-201002，质量分数 98.6%），均购自中国食品药品检定研究院；紫檀芪（批号 20110723，质量分数 >99%，购自杭州广林生物医药科技有限公司），白藜芦醇（质量分数 >99%，购自陕西永健制药有限公司）；乙腈（色谱纯，美国天地公司），水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Kinetex 2.6 μm C₁₈ 100A 柱（100 mm×4.6 mm，2.6 μm）；流动相为乙腈-水，梯度洗脱，线性洗脱程序为 0~12 min，13%~18% 乙腈，12~22 min，18%~28% 乙腈，22~35 min，28%~40% 乙腈，35~45 min，40% 乙腈；体积流量为 1.7 mL/min；检测波长为 280 nm（指纹图谱，龙血素 A 和龙血素 B 定量测定）和 325 nm（白藜芦醇、7, 4'-二羟基黄酮和紫檀芪定量测定）；柱温为 40 °C；进样量为 5 μL；理论板数按龙血素 B 峰计算不低于 100 000。色谱图见图 1。

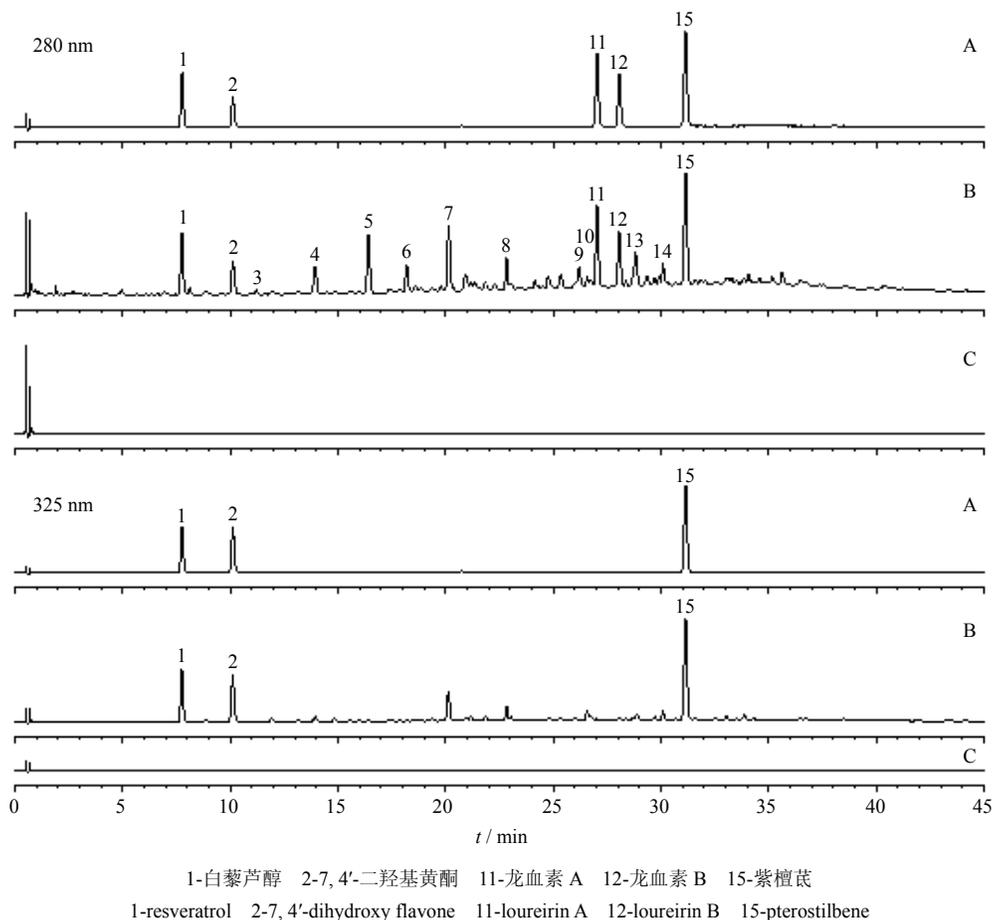


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 和不含龙血竭的阴性样品 (C) UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substance (A), sample (B), and negative sample without *Draconis Resina* (C)

2.2 对照品溶液的制备

取对照品白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素A、龙血素B和紫檀芪适量,精密称定,加甲醇制成含白藜芦醇 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7,4'-二羟基黄酮 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、龙血素A 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、龙血素B 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、紫檀芪 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物,混匀,研细,取约1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25mL,称定质量,超声(250W,40kHz)提取30min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过0.22 μm 滤膜,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按散结镇痛胶囊工艺制备不含龙血竭的阴性样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,即得。

2.5 线性关系的考察

精密称取白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素A、龙血素B和紫檀芪适量,加70%乙醇制成含白藜芦醇 496.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7,4'-二羟基黄酮 438 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、龙血素A 368 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、龙血素B 645.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、紫檀芪 1517.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液,将其作为母液用70%乙醇逐倍稀释,分别精密吸取5 μL ,注入液相色谱仪,测定,以进样质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程分别为 $Y=16.906X-3.701$, $r=0.9999$; $Y=15.722X+0.4522$, $r=1.0000$; $Y=10.217X-1.162$, $r=1.0000$; $Y=8.106X-2.452$, $r=1.0000$ 和 $Y=14.575X-2.681$, $r=0.9998$ 。白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素A、龙血素B和紫檀芪分别在7.76~248.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.84~219 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.75~184 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.08~322.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和23.71~758.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取同一供试品(批号110504)溶液连续进样6针,以峰面积计算各指标成分RSD,分别为白藜芦醇1.21%、7,4'-二羟基黄酮0.31%、龙血素A 0.26%、龙血素B 1.34%和紫檀芪1.08%。以龙血素B为参照峰,计算各个共有峰相对保留时间RSD均小于0.20%,占总峰面积5%以上的共有峰相对峰面积RSD均小于1.50%。

2.7 稳定性试验

取同一对照品溶液,精密吸取5 μL ,分别于0、3、6、10、16、20、24h注入高效液相色谱仪,以

峰面积计算各指标成分RSD,分别为白藜芦醇0.32%、7,4'-二羟基黄酮0.75%、龙血素A 0.26%、龙血素B 0.26%和紫檀芪1.19%。取同一供试品(批号110504)内容物,研细,取约1g,精密称定,按上述供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,精密吸取5 μL ,分别于0、2、6、9、14、18、24h注入液相色谱仪,以峰面积计算各指标成分RSD,分别为白藜芦醇2.44%、7,4'-二羟基黄酮1.40%、龙血素A 0.86%、龙血素B 0.82%和紫檀芪2.76%。以龙血素B为参照峰,计算各个共有峰相对保留时间RSD均小于1.10%,占总峰面积5%以上的共有峰相对峰面积RSD均小于1.97%。结果表明对照品溶液和供试品溶液放置24h稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一供试品(批号110504)内容物,研细,取约1g,精密称定,按上述供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,平行制备6份,测定,计算质量分数。结果白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素A、龙血素B和紫檀芪的平均质量分数分别为0.82、0.85、0.92、0.95、2.57 mg/g, RSD分别为1.11%、0.79%、0.72%、0.70%、0.67%。以龙血素B为参照峰,计算各个共有峰相对保留时间RSD均小于0.80%,占总峰面积5%以上的共有峰相对峰面积RSD均小于1.50%。结果表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取同一供试品(批号110504)内容物,研细,取约0.5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入混合对照品溶液(含白藜芦醇425.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7,4'-二羟基黄酮460.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、龙血素A 458 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、龙血素B 490 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、紫檀芪1267.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1mL,再精密加入甲醇24mL,超声提取(250W,40kHz)30min,放冷,滤过,取续滤液过0.22 μm 滤膜,注入高效液相色谱仪,计算回收率。结果白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素A、龙血素B和紫檀芪的平均回收率分别为99.51%、101.21%、98.50%、100.45%、101.54%, RSD分别为1.80%、0.95%、1.82%、1.76%、1.94%。

2.10 样品测定结果

取10批次散结镇痛胶囊,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,分别计算5种成分的质量分数,结果见表1。结果表明,不同批次散结镇痛胶囊中5种成分的质量分数差异较小。

表 1 样品测定 (n=2)

Table 1 Determination of samples (n=2)

批号	质量分数 / (mg·g ⁻¹)				
	白藜芦醇	7, 4'-二羟 基黄酮	龙血素 A	龙血素 B	紫檀芪
110504	0.82	0.85	0.92	0.95	2.57
110902	0.88	0.75	0.70	1.10	3.10
110904	0.80	0.70	0.63	1.10	3.35
110903	0.90	0.75	0.78	1.13	3.45
110901	0.95	0.73	0.60	1.15	2.38
110905	0.93	0.75	0.63	1.18	2.38
100607	0.87	0.75	0.83	1.05	2.48
100102	0.73	0.80	0.65	1.00	2.38
100103	0.68	0.75	0.69	1.10	2.30
100107	0.73	0.78	0.68	1.05	2.33

2.11 指纹图谱的建立

根据 10 批散结镇痛胶囊检测所得到的图谱, 标定出 15 个共有峰, 采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》进行分析, 经数据匹配, 以中位数法建立对照指纹图谱, 结果见图 2。10 批所测供试品色谱图与对照指纹图谱相似度分别为 0.969、0.989、0.990、0.991、0.992、0.991、0.989、0.980、0.987 和 0.988, 均大于 0.96。

2.12 指纹图谱中共有峰的归属

将龙血竭药材、不含龙血竭药材的胶囊分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 通过保留时间和 DAD 扫描分析, 指纹图谱中标定的 15 个共有峰均来自龙血竭, 色谱图见图 3。

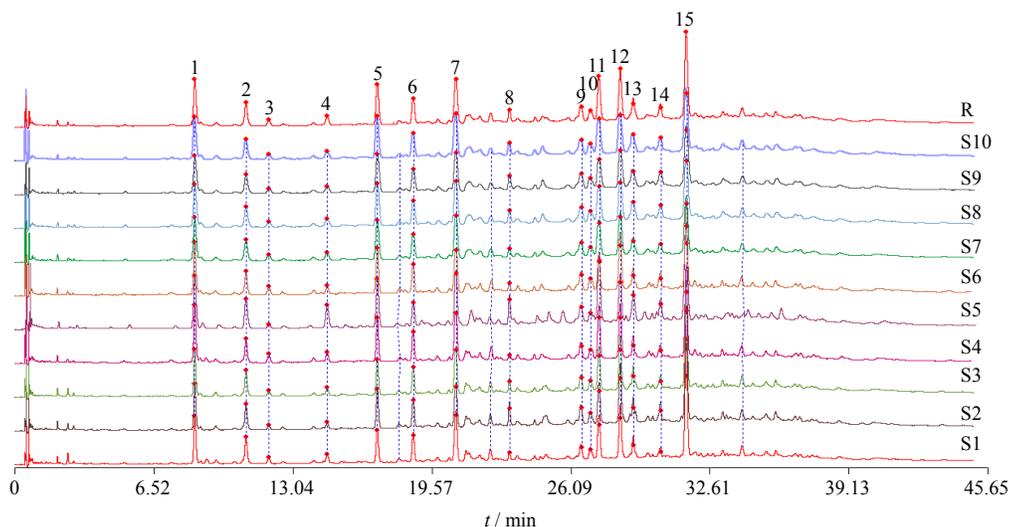


图 2 10 批散结镇痛胶囊酚酸类成分 UPLC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprints for phenolic constituents in 10 batches of SZC

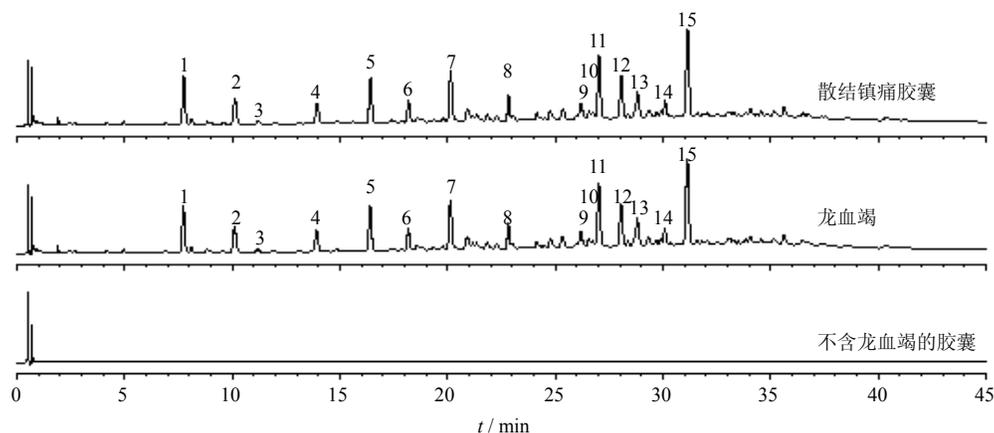


图 3 散结镇痛胶囊酚酸类成分 UPLC 指纹图谱中各共有峰归属色谱图

Fig. 3 UPLC fingerprints of each common peak attribution of phenolic constituents in SZC

3 讨论

通过 DAD 检测器在 190~400 nm 全扫描, 结果 280 nm 下反映的信息较全面, 色谱峰较多且各色谱峰分离较好, 因此选择 280 nm 作为指纹图谱的检测波长; 根据白藜芦醇、7, 4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪的最大吸收波长及吸收曲线, 选择 280 nm 测定龙血素 A 和龙血素 B 的量, 325 nm 测定白藜芦醇、7, 4'-二羟基黄酮和紫檀芪的量, 并且对 5 个指标成分进行了峰纯度验证, 结果表明在本实验所确定的检测条件下样品中所测定的 5 个成分不含其他干扰成分。

通过考察不同品牌色谱柱, 结果表明色谱柱 Phenomenex Kinetex 2.6 μm C₁₈ 100 A 能使各色谱峰分离较好, 且缩短了分析时间。对供试品溶液的制备方法、不同流动相系统、柱温、体积流量及不同仪器均进行了考察, 结果表明本实验所采用的检测方法耐用性良好。

10 批散结镇痛胶囊定量测定结果和指纹图谱显示, 该制剂中酚酸类成分质量较稳定, 不同批次间整体质量差异较小。本实验根据散结镇痛胶囊处方中四味药材特性, 建立了酚酸类成分的质量控制方法, 在后续的研究中将继续对其他类成分进行考察, 并建立质量控制方法, 为全面控制散结镇痛胶囊质量提供依据。

参考文献

[1] 周娟, 惠宁. 散结镇痛胶囊治疗子宫内膜异位症

的 Meta 分析 [J]. 临床合理用药, 2011, 4(2): 69-73.

- [2] 尚慧玲, 李光仪. 散结镇痛胶囊治疗子宫内膜异位症疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(1): 24-25.
- [3] 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 Rg₁ 及人参皂苷 Rb₁ 的含量 [J]. 药学进展, 2009, 33(7): 328-329.
- [4] 颜月园, 萧伟, 吴云, 等. 散结镇痛胶囊中皂苷类成分的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 496-500.
- [5] 颜月园, 萧伟, 吴云, 等. 散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 58-61.
- [6] 谢培山. 中药色谱指纹图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [7] 刘芳, 戴荣继, 邓玉林, 等. 龙血竭化学成分研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1437-1439.
- [8] 高秀丽, 蒋倩, 王鹏娇, 等. 龙血竭高效液相色谱特征研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 2025-2027.
- [9] 周艳林, 蒋受军, 文建文, 等. 龙血竭特征成分对照指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12): 3080-3082.
- [10] 胡迎庆, 韩慧文, 宋月英, 等. 不同工艺提取龙血竭中紫檀芪的含量测定 [J]. 中成药, 2002, 24(8): 616-618.
- [11] 张晓燕, 杨晓明, 闫广利, 等. 龙血竭缓释滴丸的质量标准研究 [J]. 中医药信息, 2011, 28(2): 37-39.
- [12] 李云, 萧伟, 秦建平, 等. HPLC 测定龙血竭提取物中龙血素 A、B 和 7, 4'-二羟基黄酮的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 45-47.