

散结镇痛胶囊中皂苷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², 李家春², 陈保来², 文红梅^{1**}, 萧伟^{2**}

(1. 南京中医药大学药学院 南京 210000;

2. 江苏康缘药业股份有限公司/中药制药过程新技术国家重点实验室 连云港 222001)

摘要:目的 建立散结镇痛胶囊中皂苷类成分的指纹图谱,为评价散结镇痛胶囊质量提供依据。方法 采用 Waters Symmetry Shield™ RP18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 203 nm。结果 各批次样品相似度在 0.95 以上, 标示出 9 个共有峰 通过对照品比对, 确定了 5 个成分, 分别为三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g1}、R_e、R_{b1}、R_d, 并对其进行定量分析。结论: 该方法快速、简便、准确, 可作为评价该制剂质量的有效方法之一。

关键词: 散结镇痛胶囊 HPLC 法 多成分 指纹图谱

doi: 10.11842/wst.2013.09.022 中图分类号 R286.0 文献标识码 A

散结镇痛胶囊是由三七、龙血竭、浙贝母、薏苡仁组成的成方制剂, 具有软坚散结、化瘀定痛之功效, 用于治疗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。散结镇痛胶囊的主要成分有皂苷类、酚酸类、生物碱类及油脂类成分。为了更好的控制产品质量, 保证临床疗效, 需建立全面评价该制剂质量的方法。有研究者对散结镇痛胶囊中的 3 个皂苷类成分进行了含量测定^[1]和指纹图谱研究^[2], 分别用两种方法进行质量控制, 实施过程较繁琐, 且皂苷类成分为末端吸收, 该含量测定方法目标成分易受杂质的干扰, 造成定量不准确, 指纹图谱检测方法中主要色谱峰分离度达不到定量要求。本文以制剂中皂苷类成分为主要分析对象, 参考 2010 年版《中国药典》^[3]及相关文献^[4-9], 采用 HPLC 法对散结镇痛胶囊中皂苷类成分同时进行了指纹图谱研究和 5 个指标成分的含量测定, 节约了分析时间, 可作为控制散结

镇痛胶囊质量的有效方法之一。

1 仪器和试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪 (Waters 2487 检测器), BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), Centrifuge 5415D 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), Milli-Q Academic 纯水机 (美国 Millipore), KQ-250DB 型超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

三七皂苷 R₁ 对照品 (批号: 110745-200617)、人参皂苷 R_{g1} 对照品 (纯度 96.3%, 批号: 110703-201027)、人参皂苷 R_e 对照品 (纯度 88.8%, 批号: 110754-200822)、人参皂苷 R_{b1} 对照品 (纯度 92.6%, 批号: 110704-201122)、人参皂苷 R_d 对照品 (纯度 94.4%, 批号: 111818-201001) 均购自中国药品生物制品检定所; 散结镇痛胶囊 (江苏康缘药业股份有限公司生产), 乙腈 (色谱纯, 天地公司), D101 大孔树脂 (国药集团化学试剂有限公司), 超纯水, 其余试剂均为分析纯。

收稿日期: 2013-01-14

修回日期: 2013-05-03

* 科学技术部国家重大新药创制项目 (2011ZX09201-201-20): 子宫内膜异位症首选用药-散结镇痛胶囊大品种技术改造, 负责人 荣根新。

** 通讯作者 文红梅, 教授, 主要研究方向 药物分析与代谢 萧伟, 本刊编委, 研究员级高级工程师, 博士, 主要研究方向 中药制剂的研究与开发。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry ShieldTM RP18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水溶液 (B) 梯度洗脱, 线性洗脱程序为 0~20 min 20% (A) 20~45 min 20%→46% (A); 流速: 1.2 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 测定波长: 203 nm; 进样量: 10 μL; 理论塔板数以人参皂苷 R_{g1} 峰计, 不得低于 6 000。

2.2 对照品溶液的制备

取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 1 mL 含三七皂苷 R₁ 55 μg、人参皂苷 R_{g1} 280 μg、人参皂苷 Re 30 μg、人参皂苷 Rb₁ 120 μg、人参皂苷 Rd 50 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物, 研细, 取约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入水饱和正丁醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 1 h, 放冷, 再称定重量, 用水饱和正丁醇补足减失的重量, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置分液漏斗中, 加入正丁醇饱和的 1% NaOH 溶液洗涤 3 次, 每次 10 mL, 弃去碱液, 正丁醇液用正丁醇饱和水洗涤至中性, 正丁醇层蒸干, 残渣加水 10 mL 溶解, 通过预处理好的 D101 大孔树脂 (25 mL), 依次用 125 mL 水, 150 mL 50% 乙醇洗脱, 收集 50% 乙醇洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 并定容至 10 mL, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

取除三七外的其他药材, 按处方及制备工艺制得缺三七的阴性样品, 再按“2.3”项下方法制备阴性供试品溶液, 即得。

2.5 线性关系的考察

分别精密称取三七皂苷 R₁ 15.05 mg、人参皂苷 R_{g1} 61.40 mg、人参皂苷 Re 6.46 mg、人参皂苷 Rb₁ 52.60 mg、人参皂苷 Rd 15.30 mg 对照品, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度分别为 1 505.00、5 912.82、573.65、4 870.76、1 444.32 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 精密量取 3 mL 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 再逐倍稀释得系列浓度。分别精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 以进样浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 回归方程分别为 $Y =$

$1\ 921.4X + 3\ 020.6, r = 0.999\ 9; Y = 2\ 453.3X + 1\ 914.7, r = 0.999\ 9; Y = 2\ 396.5X + 2\ 720.6, r = 0.999\ 9; Y = 1\ 876.3X + 1\ 634.7, r = 0.999\ 8; Y = 2\ 348.7X + 5\ 036.6, r = 0.999\ 9$ 。结果表明, 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 分别在 14.11~225.75 μg·mL⁻¹、55.43~886.92 μg·mL⁻¹、5.38~86.05 μg·mL⁻¹、45.66~730.62 μg·mL⁻¹ 和 13.54~216.65 μg·mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取同一供试品溶液连续进样 6 次, 以峰面积计算各指标成分 RSD, 三七皂苷 R₁ 1.74%、人参皂苷 R_{g1} 1.85%、人参皂苷 Re 2.01%、人参皂苷 Rb₁ 1.97% 和人参皂苷 Rd 2.04%。以指纹图谱的平均值生成精密度对照指纹图谱, 计算相似度, 结果相似度均不小于 0.993, RSD 为 0.21%。

2.7 稳定性试验

取同一样品内容物, 研细, 取约 2 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 分别于 0、2、6、10、15、20 h 注入液相色谱仪, 以峰面积计算各指标成分 RSD, 三七皂苷 R₁ 1.52%、人参皂苷 R_{g1} 0.32%、人参皂苷 Re 1.41%、人参皂苷 Rb₁ 0.84% 和人参皂苷 Rd 0.58%。以 0 h 进样所得指纹图谱为对照指纹图谱, 计算相似度, 结果相似度均不小于 0.989, RSD 为 0.65%, 表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.8 重复性试验

取同一批样品内容物, 研细, 取约 2 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 测定, 计算含量。结果三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd 的平均含量分别为 0.058%、0.305%、0.041%、0.105%、0.054%, RSD 分别为 2.92%、2.76%、2.66%、2.70%、1.19%。以指纹图谱的平均值生成重复性对照指纹图谱, 计算相似度, 结果相似度均不小于 0.987, RSD 为 0.49%, 表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取同一批已测定成分含量的样品内容物 6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 分别精密加入混合对照品溶液 1 mL (含三七皂苷 R₁ 0.530 0 mg·mL⁻¹、人参皂苷 R_{g1} 2.950 0 mg·mL⁻¹、人参皂苷 Re 0.308 8 mg·mL⁻¹、人参皂苷 Rb₁ 0.926 7 mg·mL⁻¹、人参皂苷 Rd 0.450 6 mg·mL⁻¹), 再精密加入水饱和的正丁醇 49

mL,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件进样分析,计算回收率。结果见表1。

3 结果

3.1 样品含量测定结果

取10批散结镇痛胶囊,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件进样分析,分别计算5种成分含量,结果见表2。

3.2 指纹图谱的建立与技术参数

将10批散结镇痛胶囊检测所得图谱,标定9个共有峰,采用国家药典颁布的《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。见图1。10批所测供试品色谱图与对照指纹图谱相似度分别为0.987、0.993、0.991、0.996、0.993、0.989、0.992、0.998、0.996和0.999。

3.3 指纹图谱中共有峰的归属

将处方中4味药材分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,“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9个共有峰均来自三七,为皂苷类成分。见图2。

4 讨论

在制备供试品溶液时,考虑到皂苷类成分为末端吸收,为去除处方中龙血竭成分对测定的干扰,采用了萃取和上大孔树脂纯化,且对各步进行了详细的考察,结果既较好的保留了皂苷类成分又达到了纯化效果。

实验过程中参考2010年版《中国药典》^[3]及相关文献^[10]对色谱条件进行了优化,对不同的流速与柱温进行了考察,结果表明流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 分离度达不到1.5,流速为 $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 及以上时人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 分离度为1.5以上,为了定量准确及尽量降低柱

表1 回收率测定结果 ($n=6$)

成分	平均回收率/%	RSD/%
三七皂苷 R_1	95.96	1.76
人参皂苷 Rg_1	96.72	2.54
人参皂苷 Re	94.67	2.74
人参皂苷 Rb_1	91.94	2.09
人参皂苷 Rd	94.37	2.38

表2 样品测定结果 ($n=2$)

编号	三七皂苷 R_1 含量/%	人参皂苷 Rg_1 含量/%	人参皂苷 Re 含量/%	人参皂苷 Rb_1 含量/%	人参皂苷 Rd 含量/%
1	0.060	0.321	0.045	0.120	0.054
2	0.072	0.343	0.053	0.132	0.061
3	0.075	0.340	0.057	0.129	0.065
4	0.071	0.337	0.051	0.126	0.060
5	0.087	0.428	0.062	0.153	0.072
6	0.085	0.407	0.065	0.156	0.069
7	0.074	0.385	0.059	0.138	0.060
8	0.071	0.382	0.063	0.135	0.058
9	0.083	0.325	0.052	0.127	0.074
10	0.078	0.327	0.061	0.130	0.059

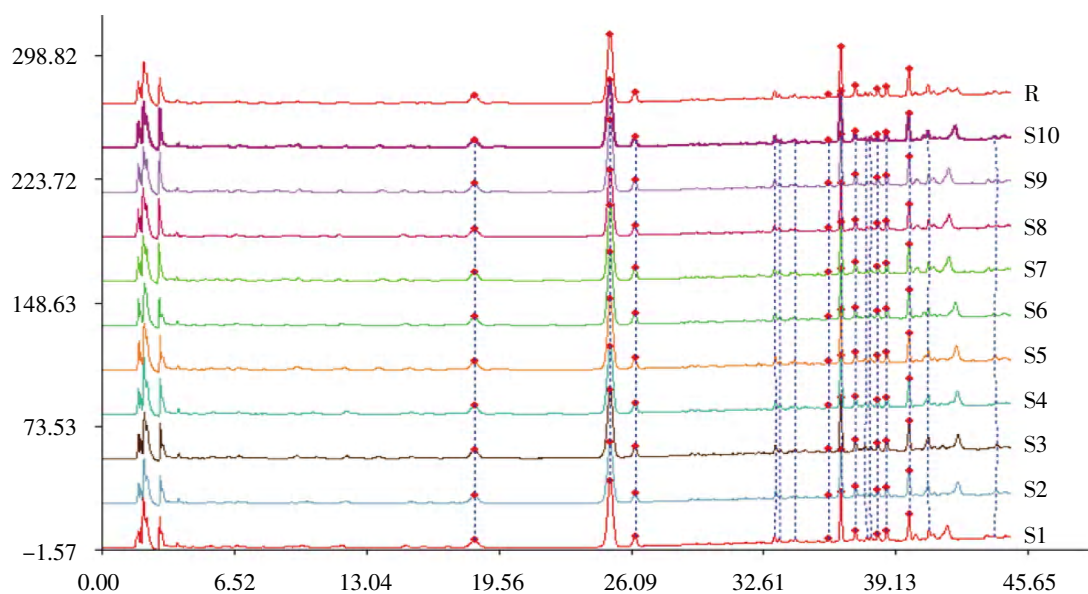


图1 10批散结镇痛胶囊指纹图谱

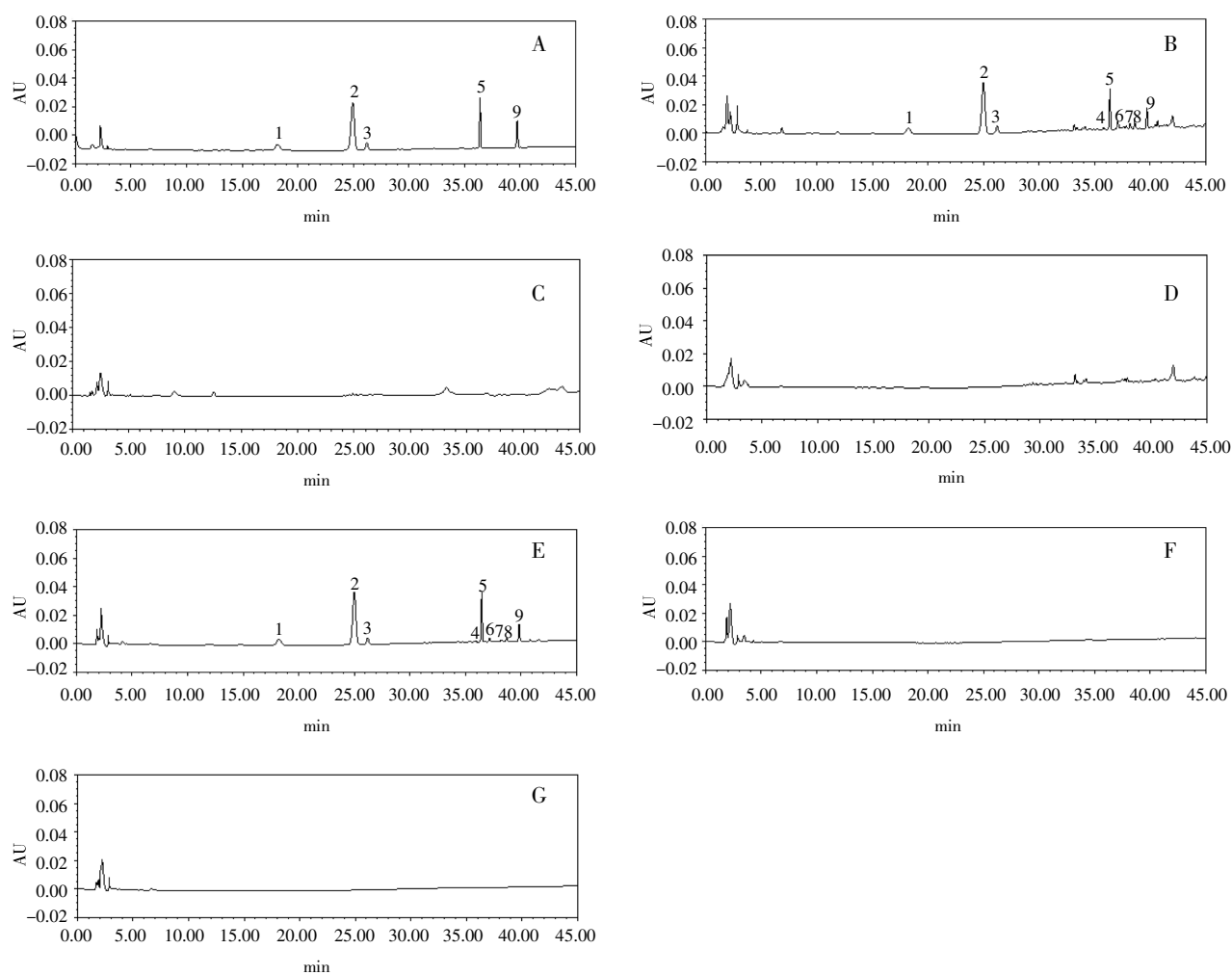


图2 混合对照品(A)、散结镇痛胶囊(B)、阴性样品(缺三七)(C)、龙血竭(D)、三七(E)、薏苡仁(F)和浙贝母(G) HPLC图
注:1.三七皂苷 R_1 , 2.人参皂苷 R_{g1} , 3.人参皂苷 R_e , 5.人参皂苷 R_{b1} , 9.人参皂苷 R_d 。

压,本文采用的流速为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 柱温在 $25^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ 时对各色谱峰的分离度及测定结果基本无影响。

根据散结镇痛胶囊处方中 4 味药材特性,本文建立了皂苷类成分的质量控制方法,在后续的研究中将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 唐云,倪玮烨,束志凌.HPLC 法测定散结镇痛胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的含量.药学进展,2009,33(7):328~329.
- 2 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.中草药,2012,43(3):496~500.
- 3 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:中国医药科技出版社,2010:11,367~369.
- 4 谢培山.中药色谱指纹图谱.北京:人民卫生出版社,2005.
- 5 张小红,孙冬梅.高效液相色谱法同时测定醒脑化瘀胶囊中人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 的含量.中国实验方剂学杂志,2010,16(5):81~83.
- 6 曹树萍,聂黎行,王钢力,等.HPLC 法同时测定参麦注射液中 9 个人参皂苷的含量.药物分析杂志,2011,31(3):476~478.
- 7 毕晓黎,胥爱丽,李养学.三七配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究.中国实验方剂学杂志,2011,17(9):54~57.
- 8 邵建东,罗旭彪,颜流水,等.HPLC 法同时测定三七中 7 种皂苷含量.中国药师,2008,11(12):1411~1413.
- 9 鲍建才,刘刚,丛登立,等.三七的化学成分研究进展.中成药,2006,28(2):246~253.
- 10 赖宇红,陈浩桢,区卓莹,等.三七总皂苷指纹图谱及含量测定 HPLC 条件的耐用性考察.中国天然药物,2006,4(2):107~110.

Fingerprint and Multi-components Determination of Saponins in *Sanjie-zhentong* Capsule

Qin Jianping^{1,2}, Wu Jianxiong², Li Jiachun², Chen Baolai², Wen Hongmei¹, Xiao Wei²

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co.Ltd. / State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

Abstract: This study was aimed to establish a HPLC fingerprint of saponins in *Sanjie-zhentong* Capsule in order to make a quantitative analysis of the quality of *Sanjie-zhentong* Capsule. The Waters Symmetry Shield™ RP18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used with a mobile phase of acetonitrile–water gradient elution. The flow rate was 1.2 mL/min. The column temperature was 30°C . The detection wavelength was 203 nm. The results showed that the fingerprint chromatography included 9 mutual peaks. The similarity among batches was more than 0.95. Compared with reference substance, five characteristic components were recognized. The five components are notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g1} , ginsenoside R_e , ginsenoside R_{b1} and ginsenoside R_d . It was concluded that this method was rapid, simple and accurate and can be used as one of the effective methods for the quality control of *Sanjie-zhentong* Capsule.

Keywords: *Sanjie-zhentong* Capsule, HPLC, multi-components, fingerprint

(责任编辑 李沙沙 张志华,责任译审 王 晶)