

散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱研究

颜月园^{1,2}, 萧伟^{2,3*}, 吴云^{2,3}, 王伟^{2,3}, 姜华^{2,3}, 张怡^{2,3}, 朱克近^{2,3}

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

[摘要] 目的:采用高效液相色谱法测定散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱。方法:采用 50% 甲醇超声提取黄酮类成分进行分析检测。色谱条件为 Waters Symmetry@ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为乙腈-水,梯度洗脱;检测波长 275 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;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 10 批不同批次的散结镇痛胶囊中黄酮类成分指纹图谱进行相似度计算。结果:指纹图谱中标记了 15 个共有峰,共有峰面积之和大于总峰面积的 95%,利用指纹图谱相似度测试软件,测定 10 批散结镇痛胶囊中黄酮类成分指纹图谱相似度均在 0.99 以上。结论:方法具有良好的精密性、重复性、稳定性,各共有峰间分离度高,可用于散结镇痛胶囊质量的综合评价。

[关键词] 散结镇痛胶囊; 黄酮类成分; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)05-0058-04

Fingerprint Analysis of Flavonoids in Sanjie Zhentong Capsules by HPLC

YAN Yue-yuan^{1,2}, XIAO Wei^{2,3*}, WU Yun^{2,3}, WANG Wei^{2,3}, JIANG Hua^{2,3}, ZHANG Yi^{2,3}, ZHU Ke-jin^{2,3}

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;
2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China;
3. Jangsu Kanion pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] Objective: To establish the chromatographic fingerprint analysis for the quality control of the content of flavonoids in Sanjie Zhentong capsules. Method: Under the operation of ultrasonic extraction, the flavonoids from Sanjie Zhentong capsules were extracted in the 50% methanol. With Waters Symmetry@ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, and gradient elution was performed by mobile phase containing acetonitrile and water. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wave length was at 203 nm. The temperature of column was maintained at 30 ℃. And data were analyzed by ‘Similarity evaluation software for chromatographic Fingerprint of traditional Chinese medicine’ software to compare the quanlity of 11 batches of capsules samples. Result: Fifty common peaks were selected in chromatography, and all the common peaks were separated effectively. Conclusion: The accuracy, repeatability, and stability of this method were satisfied. The method developed can be used to evaluate the quality of Sanjie Zhentong capsules synthetically.

[Key words] Sanjie Zhentong capsules; flavonoids; fingerprint; HPLC

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,能活血化瘀、软坚散结,具有改善微循环、抑制组织异常增生及免疫调节的功能,在临床使用中发现其对子宫内膜异位症有良好的疗效^[1]。为保证制剂的质量和临床疗效,在前期的研究中建立了散结镇痛胶囊中皂苷类成分的指纹图谱,但是对于中药成方制剂而言,其中的成分多,类别也多。在前期的研究基础上笔者继续对制剂中的黄酮类成分进行研究,并且以黄酮类成分为主要分析对象,采用 HPLC 对散结镇痛胶囊中黄酮类成分进行了指纹图谱研究,为散结镇痛胶囊的质量控制提供更加完

[收稿日期] 20111021(011)

[基金项目] 国家科技部重大新药创制项目(2011ZX09201-201-20)

[第一作者] 颜月园,硕士研究生,从事生物药剂学研究,Tel: 15961379521, E-mail: yanyueyuanyezi@163.com

[通讯作者] * 萧伟,研究员级高级工程师,博士,从事中药新剂型的研究与开发, E-mail: wzhzh-nj@tom.com

整的科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 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),水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 试药 散结镇痛胶囊(江苏康缘药业股份有限公司提供,批号 Z100607),7,4'-二羟基黄酮(自制,纯度 ≥ 98.00%),龙血素 A(批号 111660-200301)、龙血素 B(批号 111558-200303),均购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Symmetry @ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相见表 1,检测波长 275 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。

2.2 对照品溶液的制备 取 7,4'-二羟基黄酮、龙

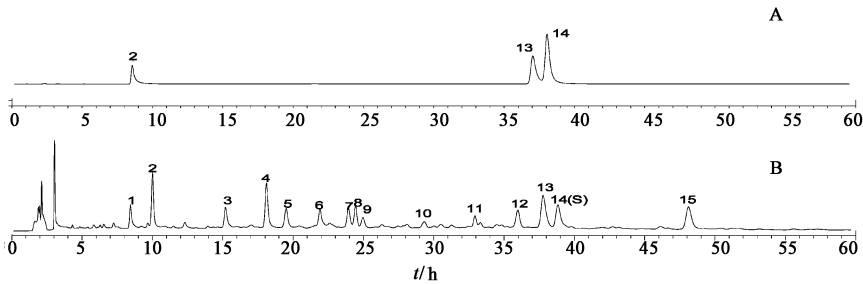
表 1 流动相梯度变化

t/min	乙腈/%	水/%
0	25	75
30	40	60
55	45	55
60	45	55

血素 A、龙血素 B 适量,加适量的甲醇制成质量浓度分别为 0.050 4,0.052 2,0.093 4 g·L⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取成品 2 g,加入 50 mL 50% 甲醇,超声 30 min (60 ℃,100 W,40 kHz),滤过,取续滤液,0.45 μm 滤膜滤过。

2.4 测定方法 分别精密量取对照品和供试品溶液各 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 60min 色谱图。结果见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;2. 7,4'-二羟基黄酮;13. 龙血素 A;14. 龙血素 B

图 1 散结镇痛胶囊皂苷类成分 HPLC

2.5 方法学考察^[2]

2.5.1 精密度试验 取散结镇痛胶囊(批号 Z100607)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,以龙血素 B 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 < 2.97%;相对峰面积 RSD 均 < 4.95%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

2.5.2 重复性试验 取散结镇痛胶囊(批号 Z100607)适量,按 2.3 项下分别制备供试品 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样分析,以龙血素 B 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 < 1.79%;相对峰面积 RSD 均 < 4.77%,表明该方法重复性良好,符合指纹图谱要求。

2.5.3 稳定性试验 取散结镇痛胶囊(批号 Z100607)适量,按 2.3 项下制备供试品溶液,分别在 0,1.5,3,4.5,6,7.5,9,10.5,12 h 测定,以龙血素 B 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 < 2.41%;相对峰面积 RSD 均 < 4.67%,表明供试品溶液在 12 h 内保持稳定。

2.6 指纹图谱的建立^[3-4]

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,以图谱中龙血素 B 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 10 批药材指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间,见表 2。其中 15 个色谱峰为各样品所共有,故标定它们为共有指纹峰。见图 2。

表 2 10 批散结镇痛胶囊中黄酮类成分各峰相对保留时间

峰号	各批样品相对保留时间										平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.189	0.189	0.189	0.203	0.187	0.185	0.184	0.184	0.185	0.183	0.188	3.192
2	0.259	0.260	0.260	0.260	0.259	0.259	0.259	0.259	0.259	0.257	0.259	0.316
3	0.373	0.373	0.373	0.379	0.371	0.369	0.368	0.368	0.368	0.365	0.371	1.094
4	0.465	0.465	0.456	0.466	0.464	0.464	0.464	0.464	0.463	0.462	0.464	0.242
5	0.502	0.502	0.502	0.502	0.501	0.501	0.501	0.500	0.500	0.499	0.501	0.196
6	0.568	0.568	0.568	0.567	0.567	0.568	0.568	0.568	0.567	0.565	0.567	0.162
7	0.619	0.619	0.619	0.618	0.619	0.619	0.619	0.619	0.619	0.617	0.619	0.114
8	0.633	0.633	0.633	0.632	0.632	0.633	0.633	0.633	0.632	0.631	0.632	0.087
9	0.645	0.646	0.645	0.646	0.645	0.646	0.646	0.645	0.645	0.646	0.646	0.042
10	0.759	0.759	0.759	0.758	0.759	0.759	0.759	0.759	0.759	0.760	0.759	0.051
11	0.849	0.849	0.849	0.848	0.849	0.849	0.849	0.849	0.849	0.850	0.849	0.038
12	0.931	0.930	0.931	0.929	0.931	0.931	0.931	0.932	0.931	0.932	0.931	0.073
13	0.972	0.972	0.972	0.972	0.972	0.972	0.972	0.972	0.972	0.971	0.972	0.027
14(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
15	1.244	1.244	1.244	1.243	1.245	1.276	1.245	1.245	1.279	1.244	1.244	0.072

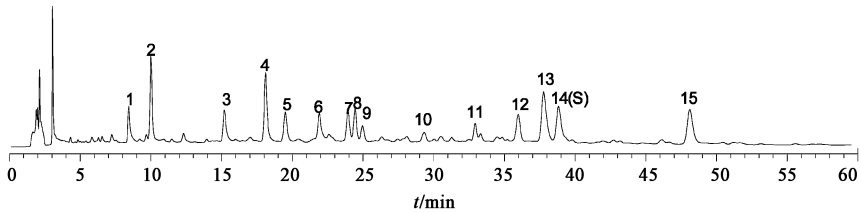


图 2 散结镇痛胶囊中黄酮类成分指纹图谱

2.6.2 共有峰的相对峰面积 以图谱中龙血素 B 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 <4.99%。见表 3。

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 <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,见图 3。结果 10 批胶囊的相似度均在 0.99 以上,表明建立的指纹图谱的技术稳定、重现性好。见表 4。

样品: S1 (Z110501), S2 (Z110504), S3 (Z110602), S4 (Z110603), S5 (Z110506), S6 (Z110606), S7 (Z100607), S8 (Z100606), S9 (Z100806), S10(Z110806), S11(Z111006)。

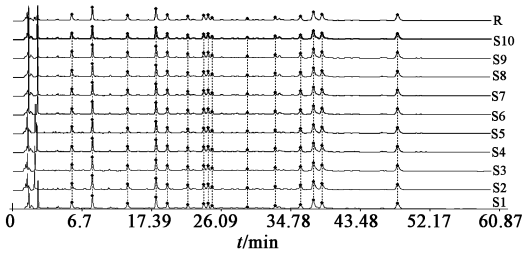


图 3 10 批胶囊中黄酮类成分的指纹图谱

3 小结

3.1 供试品溶液的处理 对多种提取方法进行了考察和优化,并分别对提取溶剂(甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇)、提取方式(超声、加热回流)及提取时间进行了考察,最终选择用 50% 甲醇超声 30 min,方法简便,得到的色谱峰信息丰富。

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。

表 3 10 批散结镇痛胶囊中黄酮类成分各峰相对峰面积

峰号	各批样品相对峰面积										平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.881	0.879	0.880	0.831	0.863	0.793	0.784	0.784	0.798	0.820	0.831	4.961
2	1.256	1.259	1.256	1.187	1.274	1.262	1.274	1.253	1.248	1.180	1.242	2.574
3	0.703	0.707	0.689	0.705	0.732	0.707	0.748	0.759	0.761	0.760	0.727	3.881
4	1.379	1.379	1.379	1.325	1.396	1.381	1.222	1.368	1.365	1.358	1.355	3.730
5	0.604	0.606	0.549	0.549	0.595	0.542	0.543	0.541	0.544	0.566	0.564	4.794
6	0.425	0.427	0.425	0.388	0.434	0.416	0.422	0.418	0.420	0.369	0.415	4.858
7	0.565	0.564	0.565	0.557	0.574	0.577	0.577	0.577	0.577	0.573	0.570	1.289
8	0.555	0.555	0.555	0.542	0.562	0.564	0.561	0.563	0.565	0.590	0.561	2.167
9	0.287	0.284	0.287	0.280	0.287	0.287	0.285	0.287	0.290	0.321	0.289	3.965
10	0.247	0.250	0.247	0.268	0.249	0.252	0.248	0.248	0.247	0.225	0.248	4.121
11	0.358	0.356	0.358	0.346	0.361	0.350	0.348	0.346	0.338	0.314	0.347	3.898
12	0.710	0.708	0.710	0.687	0.717	0.722	0.725	0.719	0.706	0.607	0.701	4.956
13	1.657	1.658	1.657	1.640	1.678	1.678	1.679	1.677	1.676	1.627	1.662	1.089
14(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
15	1.259	1.256	1.259	1.251	1.278	1.276	1.287	1.278	1.279	1.212	1.263	1.764

表 4 10 批胶囊中黄酮类成分的指纹图谱相似度评价

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.998	0.997	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999

3.3 色谱柱的选择 考察了 Phenomenex Gemini C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),Waters Symmetry@ C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×250 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,而且各色谱峰分较度佳,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 203,275,280 nm 波长检测时,其 HPLC 图谱中呈现较多的色谱峰,但是为了排除皂苷类成分干扰,同时使各色谱峰分离度较好、出峰数目适中、峰形较好,故确定 275 nm 处波长为检测波长。

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》^[5]采用 HPLC 对散结镇痛胶囊中黄酮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 15 个共有峰,方法学考察其精密度、稳定性、重复性均良好,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黄酮类成分 HPLC 指纹图谱进行了相似度计算,10 批不同批次胶囊中黄酮类成分的指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黄酮类成分无明显差异,为客观评价胶囊质量

提供一定依据。

4 讨论

本研究中选择了以龙血素 B 等几个共有峰为代表,建立了散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱,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。在该制剂的质量控制中,能够结合较为完善的散结镇痛胶囊中皂苷类和黄酮类成分指纹图谱控制技术,对制剂的多成分进行严格控制,进一步保证制剂的质量和临床疗效。同时,该指纹图谱技术的建立为散结镇痛胶囊品种的市场推广及产品的二次开发提供具有说服力的依据。

[参考文献]

[1] 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.
[2] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.
[3] 屠鹏飞. 中药指纹图谱指定的方法学探讨[C]. 广州: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,2001.
[4] 蔡宝昌. 中药制剂分析[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
[5] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药,2000,22(10):671.

[责任编辑 蔡仲德]