

三七药材-三七二醇皂苷指纹图谱及其物质群量值传递分析

余佳丽^{1,2}, 唐晓章^{1,2}, 周菲¹, 林美斯¹, 林大胜^{1,2*}, 邓义红²

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 成都泰合健康科技集团股份有限公司, 成都 611731)

[摘要] 目的:建立同时适用于三七药材及其乙醇提取液、树脂洗脱液、三七二醇皂苷(PDS)的 HPLC 指纹图谱方法,分析 PDS 制备的主要工艺环节物质群量值传递情况。方法:采用 HPLC,以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,建立了三七药材及其中间产物,PDS 的指纹图谱检测方法;采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件对制备过程各关键工艺环节多批次样品进行相似度评价,同时进行物质群的量值传递分析。结果:建立的 HPLC 指纹图谱方法精密性、重复性和稳定性良好,能有效分离三七药材、中间产物及 PDS 各组分,标定了 12 批三七药材的 16 个共有峰,指认了其中 5 个主要色谱峰;各批次样品与其相应的对照指纹图谱的相似度均 ≥ 0.9 ;工艺过程较好地去除了药材中三七三醇皂苷类成分,而三七二醇皂苷类药效成分完整传递至 PDS。结论:建立的指纹图谱方法稳定可靠,能充分展示三七药材、中间产物及 PDS 物质群变化及其量值传递情况,为中药新药的开发与应用提供了精准工艺及质量控制研究新模式;现有 PDS 主要工艺流程科学合理。

[关键词] 三七;三七二醇皂苷;指纹图谱;物质群;量值传递;精准工艺;质量控制

[中图分类号] R22;R283.6;R942;R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0018-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180702

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180110.1636.011.html>

[网络出版时间] 2018-01-12 9:19

Analysis of Fingerprint of Notoginseng Radix et Rhizoma-panaxadiol Saponins and Their Quality Transmitting of Components Group

YU Jia-li^{1,2}, TANG Xiao-zhang^{1,2}, ZHOU Fei¹, LIN Mei-si¹, LIN Da-sheng^{1,2*}, DENG Yi-hong²

(1. College Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Chengdu Taihe Health Technology Group Co. Ltd., Chengdu 611731, China)

[Abstract] **Objective:** To provide an effective way for processing evaluation and quality control of panaxadiol saponins (PDS), Notoginseng Radix et Rhizoma and its ethanol extract, resin eluent by establishing the fingerprint of them. **Method:** HPLC was adopted to establish fingerprint of Notoginseng Radix et Rhizoma, PDS and their intermediates. The similarity evaluation was analyzed with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 version). The processing of quality transmitting of components group was analyzed. **Result:** The components of PDS, Notoginseng Radix et Rhizoma and its ethanol extract, resin eluent could be well separated by the established HPLC. The developed method was precise, reproducible and stable. The similarities of the samples with their corresponding control fingerprint were ≥ 0.9 . Sixteen common peaks were selected from 12 batches of Notoginseng Radix et Rhizoma, and 5 main peaks were identified. In the process, the panaxatriol saponins in the medicinal material was removed, while the PDS was transferred to PDS. **Conclusion:** The fingerprint method is stable and reliable, and it can fully demonstrate the changes of active materials of Notoginseng Radix et Rhizoma, panaxadiol saponins and their

[收稿日期] 20170914(020)

[基金项目] 四川省产业技术研究与开发项目(2014CD00058)

[第一作者] 余佳丽,在读硕士,从事中药新制剂和新剂型研究,E-mail:zoeyujiali@126.com

[通信作者] *林大胜,研究员,从事中药新制剂和新剂型研究,E-mail:hoistlds@vip.sina.com

intermediate in the key production processes.

[Key words] Notoginseng Radix et Rhizoma; panaxadiol saponins; fingerprint; components group; quality transmitting; precision process; quality control

三七二醇皂苷(PDS)是三七药材经乙醇提取、大孔吸附树脂分离纯化后得到的一类结构类似的原人参二醇型皂苷,具有较强的药理活性,其中人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 为其主要活性成分^[1],二者质量分数占 PDS 总组分的 50% 以上。PDS 在心脑血管系统、中枢神经系统、免疫系统等方面均体现出了良好的药用价值^[2-5],但目前临床上鲜有与 PDS 相关的制剂。因此,建立 PDS 制备过程中工艺评价及质量控制的方法,可为 PDS 制剂的开发奠定研究基础。

现有的中药相关产物制备工艺过程性评价多集中于对其收率、质量分数的考察^[6-7],忽略了中药研究的整体性。而指纹图谱作为评价多成分样品整体质量的有效手段^[8],可以全面把控质量线索,为制备工艺过程提供更系统有效的信息,且该方法已成为国际公认的控制中药或天然药物质量的有效手段。本实验以 PDS 为研究对象,对三七药材、各关键工艺环节中间产物(乙醇提取液、树脂洗脱液)与 PDS 的指纹图谱进行研究,建立基于中药指纹图谱的工艺过程性评价模式,初步评价 PDS 制备主要工艺流程设计的科学性,为以含量测定为主要评价指标的传统中药研究模式提供了新思路,为中药制备过程中关键工艺环节物质群的量值传递研究提供科学依据,丰富了中药研究过程的整体性概念。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), BT-125D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司), PCDX-JB-10 型实验室专用超纯水机(成都品成科技有限公司)。三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁, Rd 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110745-201619, 110703-201128, 110754-201525, 110704-201625, 111818-201603, 纯度分别为 95%, 93.6%, 97.4%, 93.7%, 92.1%);水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。12 批三七药材(产地云南文山)经成都中医药大学中药炮制与制剂教研室傅超美教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* 的根茎,符合 2015 年版《中国药典》(一部)有关的规定,各批次信息见表 1;乙醇提取液(三七药材经乙醇渗漉)^[9],树脂洗脱液(乙醇提取液经 D101 型大孔吸附树脂洗脱)^[10]与 PDS 原料药各 12

批,均由成都泰合健康科技集团股份有限公司华神制药厂生产。

表 1 三七药材的来源

Table 1 Sources of Notoginseng Radix et Rhizoma

样品编号	产地	采收时间	批号	购自单位
S1	文山州平坝	2016-11	20161101	文山州正贸三七有限公司
S2	文山州马关	2016-11	20161102	文山州正贸三七有限公司
S3	文山州苗乡	2016-11	20161103	文山州正贸三七有限公司
S4	文山州丘北	2016-12	20161201	文山州康鑫三七有限责任公司
S5	文山州蒙自	2016-12	20161202	文山州康鑫三七有限责任公司
S6	文山州平坝	2016-12	20161203	文山州康鑫三七有限责任公司
S7	文山州马塘	2016-12	20161204	文山州康鑫三七有限责任公司
S8	文山州东山坡	2017-01	20170101	文山金旺药业有限责任公司
S9	文山州小街	2017-04	20170401	文山州康鑫三七有限责任公司
S10	文山州东山坡	2017-05	20170501	文山航毅商贸有限责任公司
S11	文山州苗乡	2017-05	20170502	文山航毅商贸有限责任公司
S12	文山州砚山	2017-05	20170503	文山航毅商贸有限责任公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Symetry Shield C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 15% A; 10 ~ 25 min, 15% ~ 25% A; 25 ~ 40 min, 25% ~ 40% A; 40 ~ 55 min, 40% ~ 50% A),流速 1 mL · min⁻¹,检测波长选择 203 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁, Rd 对照品适量,精密称定,分别加乙腈-水(15:85)溶解并稀释成质量浓度约 0.5 g · L⁻¹ 的对照品溶液。另取上述对照品适量,精密称定,置于同一量瓶中,加乙腈-水(15:85)配成质量浓度分别为 0.243, 1.024, 0.115, 0.856, 0.249 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材粉末(过四号筛,下

同)1.0 g,精密称定,精密加入 75% 乙醇 20 mL,称定质量,浸泡 1 h,回流 1 h,放冷,称定质量,用 75% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,临用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得三七药材供试品溶液。取三七二醇皂苷(PDS)原料粉末 0.25 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加入乙腈-水(15:85)适量,超声(功率 150 W,频率 40 kHz)处理 10 min,放冷,加乙腈-水(15:85)稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,临用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得 PDS 供试品溶液。取乙醇提取液 10 mL,滤过,取续滤液,临用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得乙醇提取液的供试品溶液。取树脂洗脱液 10 mL,滤过,取续滤液,临用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得树脂洗脱液的供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取 2.2.2 项下的 4 种供试品溶液各 1 份,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,以人参皂苷 Rb_1 色谱峰为参照峰(S 峰),结果 4 种供试品溶液各共用峰相对保留时间的 RSD 均 $\leq 0.5\%$,相对峰面积的 RSD 均 $\leq 1.2\%$,表明仪器精密密度良好。

2.3.2 重复性试验 取 2.2.2 项下的 4 种供试品溶液各 6 份,按 2.1 项下色谱条件测定,以人参皂苷 Rb_1 色谱峰为 S 峰,结果 4 种供试品溶液各共用峰相对保留时间的 RSD 均 $\leq 1.1\%$,相对峰面积的 RSD 均 $\leq 1.6\%$,表明本方法重复性良好。

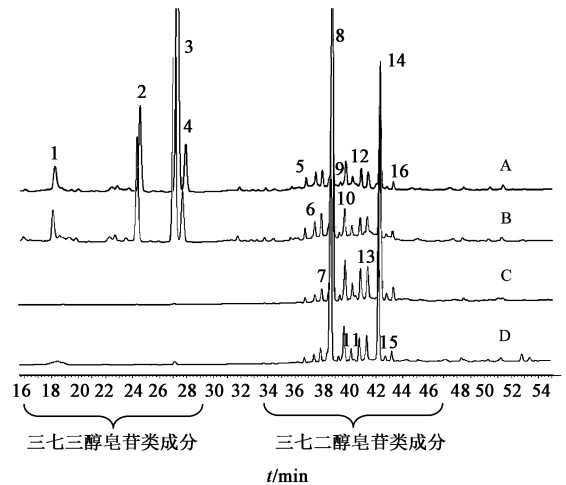
2.3.3 稳定性试验 按 2.2.2 项下的 4 种供试品溶液适量,室温保存,分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定,以人参皂苷 Rb_1 色谱峰为 S 峰,结果 4 种供试品溶液各共用峰相对保留时间的 RSD 均 $\leq 1.2\%$,相对峰面积的 RSD 均 $\leq 1.8\%$,表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.4 样品测定 分别精密量取上述 4 种供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件测定,记录 55 min 内的色谱图。

2.5 HPLC 指纹图谱建立及物质群量值传递分析

2.5.1 指纹图谱建立及共有峰指认 将文山不同产地的 12 批三七药材及其对应的乙醇提取液、树脂洗脱液与 PDS 色谱图数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件建立指纹图谱,并进行相似度评价,以样品 S1 的特征图谱为参照,采用平均数法生成对照图谱,时间宽度设定 0.2 s,得三七药材、中间产物与 PDS 的特征图谱,见图 1。分

析各样品图谱,以人参皂苷 Rb_1 为 S 峰,对共有峰个数进行标定,以 S 峰的保留时间和峰面积为基准,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,见表 2。根据单个对照品和混合对照品图谱,与所得样品图谱相比较,确定三七药材、中间产物与 PDS 主要物质群特征峰与其所属物质成分,见表 3。结果分别确定了各关键工艺环节产物共有峰个数(三七药材 16 个、乙醇提取液 16 个、树脂洗脱液 12 个和 PDS 12 个),并指认了 5 个共有峰,其中包括三七三醇皂苷类成分(三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1, Re)和三七二醇皂苷类成分(人参皂苷 Rb_1, Rd)。



2. 三七皂苷 R_1 ; 3. 人参皂苷 Rg_1 ; 4. 人参皂苷 Re ; 8. 人参皂苷 Rb_1 ; 14. 人参皂苷 Rd

图 1 三七药材(A),乙醇提取液(B),树脂洗脱液(C)与 PDS(D)的 HPLC 特征峰及物质群量值传递

Fig. 1 Common peaks and quality transmitting of components group of Notoginseng Radix et Rhizoma (A), ethanol extract (B), resin eluent (C) and panaxadiol saponins (D)

2.5.2 物质群量值传递分析 由图 1 和表 3 可知,三七药材与乙醇提取液的皂苷类物质群基本一致,三七药材中三七三醇皂苷类成分(4 个)和三七二醇皂苷类成分(12 个)均完整传递至乙醇提取液中,说明提取工艺科学可行;经大孔吸附树脂分离与纯化后,提取液中的三七三醇皂苷类物质群基本去除,三七二醇皂苷类药效物质群(12 个)完整保留,树脂洗脱液中人参皂苷 Rb_1 峰面积比例增加了 1 倍,人参皂苷 Rd 峰面积比例增加了 2 倍,树脂纯化工艺不仅保证了 PDS 主要药效物质群的完整传递,同时起到了对主要药效成分的富集作用;树脂洗脱液与 PDS 主要药效物质群基本一致,说明浓缩干燥工艺对主要药效物质群的量值传递影响较小。

2.5.3 相似度分析 各样品色谱图与其相应的

表 2 三七药材、中间产物与 PDS HPLC 特征峰的相对保留时间和相对峰面积

Table 2 Relative retention time and relative peak area of common peaks of *Notoginseng Radix et Rhizoma*, panaxadiol saponins and their intermediates

色谱峰	三七药材		乙醇提取液		树脂洗脱液		三七二醇皂苷	
	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT
1	0.158	0.469	0.116	0.466	-	-	-	-
2	0.373	0.632	0.370	0.626	-	-	-	-
3	1.717	0.703	1.472	0.698	-	-	-	-
4	0.214	0.719	0.186	0.713	-	-	-	-
5	0.028	0.949	0.023	0.947	0.009	0.947	0.011	0.949
6	0.052	0.968	0.045	0.965	0.015	0.966	0.019	0.967
7	0.044	0.981	0.059	0.978	0.024	0.979	0.030	0.980
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	0.016	1.016	0.011	1.013	0.010	1.014	0.011	1.015
10	0.084	1.025	0.075	1.023	0.094	1.023	0.092	1.025
11	0.044	1.039	0.022	1.036	0.039	1.037	0.027	1.038
12	0.056	1.055	0.041	1.052	0.086	1.053	0.058	1.054
13	0.051	1.068	0.064	1.066	0.080	1.067	0.074	1.068
14	0.355	1.091	0.297	1.090	0.443	1.092	0.441	1.091
15	0.016	1.104	0.013	1.102	0.014	1.103	0.012	1.104
16	0.020	1.116	0.022	1.114	0.030	1.116	0.024	1.116

注:RPA. 相对峰面积;RRT. 相对保留时间。

表 3 三七药材、中间产物与 PDS HPLC 指纹图谱主要物质群特征峰的峰面积比例

Table 3 Peak area ratio of main substances in common peaks of *Notoginseng Radix et Rhizoma*, panaxadiol saponins and their intermediates fingerprint %

成分	三七药材	乙醇提取液	树脂洗脱液	PDS
三七皂苷 R ₁	8.83	9.70	-	-
人参皂苷 Rg ₁	40.60	38.57	-	-
人参皂苷 Re	5.07	4.88	-	-
人参皂苷 Rb ₁	23.65	26.21	54.18	55.59
人参皂苷 Rd	8.39	7.80	24.00	24.51

对照指纹图谱进行相似度比较,见表 4 和见图 2。结果发现各批次样品与对照指纹图谱的相似度均 ≥ 0.98,12 批文山不同产地的三七药材及其对应的乙醇提取液、树脂洗脱液、PDS 物质群差异均较小。

3 讨论

2015 年版《中国药典》分别收录了适用于三七总皂苷与三七三醇皂苷物质群分析的指纹图谱检测方法^[9],而目前尚未检索到以三七二醇皂苷为主要

表 4 三七药材、中间产物与 PDS 样品的 HPLC 指纹图谱相似度分析
Table 4 Similarity analysis of fingerprint of *Notoginseng Radix et Rhizoma*, panaxadiol saponins and their intermediates

三七药材		乙醇提取液		树脂洗脱液		三七二醇皂苷	
编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.997	S1	0.996	S1	0.998	S1	0.997
S2	0.997	S2	0.997	S2	0.997	S2	0.998
S3	0.993	S3	1.000	S3	0.996	S3	0.999
S4	0.993	S4	0.999	S4	0.999	S4	0.999
S5	0.998	S5	0.998	S5	0.997	S5	0.993
S6	0.991	S6	0.995	S6	1.000	S6	0.999
S7	0.997	S7	0.997	S7	0.995	S7	0.998
S8	0.988	S8	0.998	S8	0.994	S8	0.996
S9	0.997	S9	1.000	S9	0.997	S9	0.999
S10	0.996	S10	0.996	S10	0.996	S10	0.999
S11	0.998	S11	0.998	S11	0.999	S11	0.996
S12	0.996	S12	0.996	S12	0.996	S12	0.999

研究对象的指纹图谱相关文献。本实验针对三七药材、乙醇提取液、树脂洗脱液及 PDS 的物质群特征,通过对乙腈-水流动相梯度洗脱条件的深入研究,建立了更适合三七二醇类皂苷物质群的指纹图谱检测方法,不仅实现了难分离成分对(人参皂苷 Rg₁, Re)的较好分离,更使物质群密集区人参皂苷 Rb₁ 前后的色谱峰得到了良好分离,同时也适用于 PDS 制备过程各关键环节产物的指纹图谱检测。通过对指纹图谱的相似度评价后发现,云南文山不同产地三七药材物质群差异较小;提取工艺、大孔吸附树脂分离纯化工艺及浓缩干燥工艺均稳定可靠,物质群批间差异小,说明 PDS 制备的主要工艺流程设计基本科学可行。该方法为 PDS 新药的系统工艺与质量控制研究奠定了良好基础,本课题组下一步将采用该指纹图谱检测方法对 PDS 新药进行全面系统的工艺与质量控制研究,并结合工艺过程主要药效成分的转移率和收率,深入研究三七药材-中间产物-PDS 主要药效物质群的量值传递关系。

药材-中间产物-成品主要药效物质群量值传递研究是中药新药(包含复方、有效部位和有效成分)工艺、质量控制研究的新思路和新方法,其与以指纹图谱为主的中药整体质量控制研究模式相结合,充分体现了新药开发过程中质量源于设计(quality by design, QbD)的理念^[11]。基于中药指纹图谱的整体性研究与物质群量值传递的过程性研究,不仅有利于建立反映产品整体质量状况的药品标准,实现中

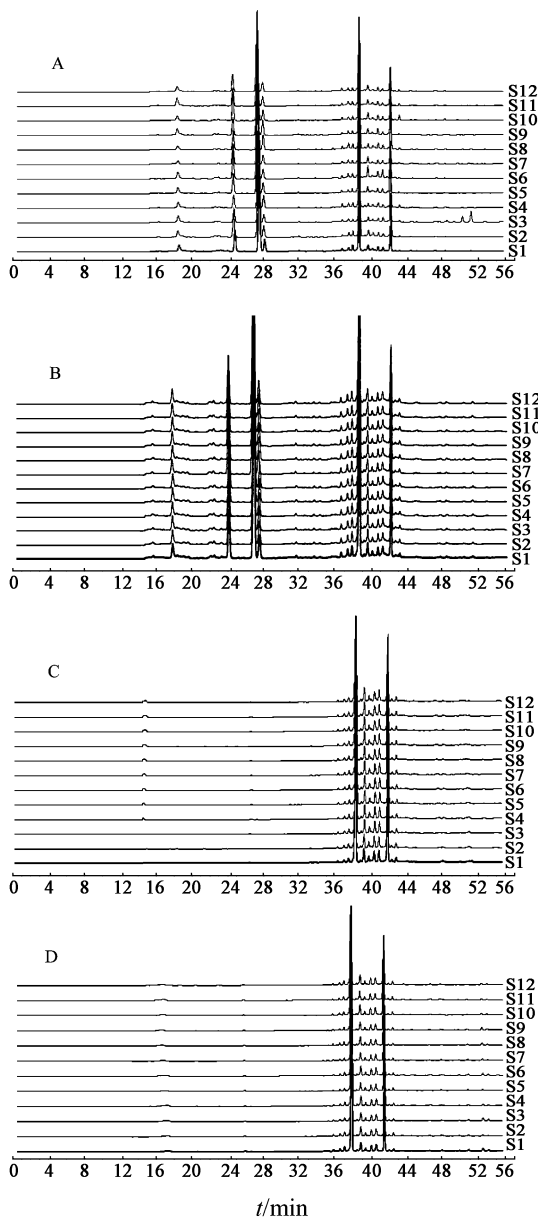


图 2 三七药材(A),乙醇提取液(B),树脂洗脱液(C)与 PDS(D)样品的 HPLC 指纹谱

Fig.2 Fingerprints of Notoginseng Radix et Rhizoma (A), ethanol extract (B), resin eluent(C) and panaxadiol saponins(D)

药的全局设计与全息分析;同时有利于建立药品生产全过程工艺控制标准和关键质量控制要点,实现

中药的全面控制和全程优化,从而真正实现中药生产全过程的精准工艺及质量控制,使中药新药整体工艺质量研究更加科学合理。本文通过 PDS 主要药效物质群的整体质量控制与量值传递相结合的集成研究,形成了中药新药精准工艺及质量控制研究新模式,期望可以为中药新药整体工艺及质量控制研究水平的提高起到示范和推动作用。

[参考文献]

[1] 王莹,褚扬,李伟,等.三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展[J].中草药,2015,46(9):1381-1392.

[2] 姚宇涵.三七二醇皂苷对 MCAO 模型大鼠脂联素、sCD40L 和 GOX-2 的影响[D].成都:成都中医药大学,2015.

[3] 惠永正,王玉芹,葛强.三七二醇组皂苷及其在制备治疗记忆力减退、预防和治疗老年痴呆药物中的应用:中国,CN101007035[P].2007-01-25.

[4] ZHANG Y X, WANG L, XIAO E L, et al. Ginsenoside-Rd exhibits anti-inflammatory activities through elevation of antioxidant enzyme activities and inhibition of JNK and ERK activation *in vivo* [J]. Int Immunopharmacol, 2013,17(4):1094-1100.

[5] 刘晓慧.三七二醇组皂苷抑制 Hela 细胞生长的研究[D].昆明:昆明理工大学,2009.

[6] 闫珂巍.三七粉末饮片的质量控制及三七总皂苷提取纯化工艺研究[D].成都:成都中医药大学,2016.

[7] 孙亦群,黄可儿.大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的工艺优化研究[J].中成药,2011,33(11):1911-1915.

[8] 孙国祥,张静娴.系统指纹定量法鉴别龙胆泻肝丸质量[J].分析化学,2009,39(8):1183-1187.

[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:392-394.

[10] 崔翰明,张秋燕,林海,等.三七总皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺和质量分析研究[J].中草药,2012,43(11):2177-2182.

[11] 崔雅华,王茜,徐冰,等.质量源于设计:基于知识组织的中药生产潜在关键工艺参数的辨识[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(15):1-8.

[责任编辑 刘德文]