

一测多评法同时测定复方丹参片中人参皂苷 R_{g₁}, Re, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 含量

耿燕娜¹, 张文鑫²

(1. 河南大学 淮河医院, 河南 开封 475000; 2. 河南中医学院 第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:建立复方丹参片中人参皂苷 R_{g₁}, Re, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 的“一测多评”含量测定方法。方法:以人参皂苷 Rb₁ 为内标,采用 RP-HPLC 法建立其与人参皂苷 R_{g₁}, Re 和三七皂苷 R₁ 的相对校正因子,运用该校正因子计算出人参皂苷 R_{g₁}, Re 和三七皂苷 R₁ 的含量。运用外标法测定这 4 个成分的含量,并比较两种方法测定结果。结果:建立了“一测多评”测定复方丹参片中人参皂苷 R_{g₁}, Re, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 含量的方法。外标法和“一测多评”法测定含量的结果无显著性差异。结论:“一测多评”的方法快速和准确,且节约对照品资源,能运用于复方丹参片的质量控制。

[关键词] 一测多评法; 复方丹参片; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0069-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010069

Simultaneous Quantitative Determination of Ginsenosides Re, R_{g₁}, Rb₁ and Notoginsenoside R₁ in Fufang Danshen Tablets by QAMS GENG Yan-na¹, ZHANG Wen-xin² (1. Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative determination of ginsenosides R_{g₁}, Re, Rb₁ and notoginsenoside R₁ in Fufang Danshen tablets based on the quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS). **Method:** RP-HPLC method was used ginsenoside Rb₁ as internal reference standard, and 3 relative correction factors (RCF) to ginsenoside Rb₁ were calculated. The contents of ginsenosides R_{g₁}, Re, Rb₁ and notoginsenoside R₁ in Fufang Danshen tablets were determined by both external standard method and QAMS. The differences between the two methods were evaluated. **Result:** A QAMS method for simultaneous determination of ginsenosides R_{g₁}, Re, Rb₁ and notoginsenoside R₁ in Fufang Danshen tablets has been established. No significant differences were found in the quantitative results of ginsenosides R_{g₁}, Re, Rb₁ and notoginsenoside R₁ in Fufang Danshen tablets determined by the two methods. **Conclusion:** The QAMS method is rapid, accurate, and can save reference substances. QAMS is suitable for quality control of Fufang Danshen tablets.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single marker; Fufang Danshen tablets; RP-HPLC

复方丹参片是丹参、三七和冰片组成,能活血化瘀、理气止痛,临床适用于心绞痛和心血管内科疾病。现代药理研究证实^[1-3],复方丹参片具有扩张冠状动脉、增加冠状动脉血流量、减慢心率、改善心肌缺氧之功效;可改善心脑血管急性症状和心电图缺血性的改变;可抑制血小板凝集,抑制血小板的释放反应,降低血黏度,降低血脂。复方丹参片中的人

参皂苷 R_{g₁}, Re, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 是其主要的活性成分,近年来,有大量的研究报道^[4-8]建立了人参皂苷 R_{g₁}, Re, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 同时测定的方法,这些方法均采用多指标同时测定实现复方丹参片的质量控制。但由于对照品不易获得,纯化难度大,价格昂贵,影响用常规外标法来实现其多指标质量控制的设想,直接限制这些方法在实际质量控制工作中的应用。

[收稿日期] 20140418(005)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81001645)

[第一作者] 耿燕娜,主管药师,从事中药质量控制研究, Tel:15639928602, Email:gengyanna0416@126.com

本研究采用一测多评法同时测定复方丹参片中人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 含量, 用一个指标替代多指标, 同时又能实现多指标质量控制的效果, 为复方丹参片实际质量控制提供实验依据。

1 材料

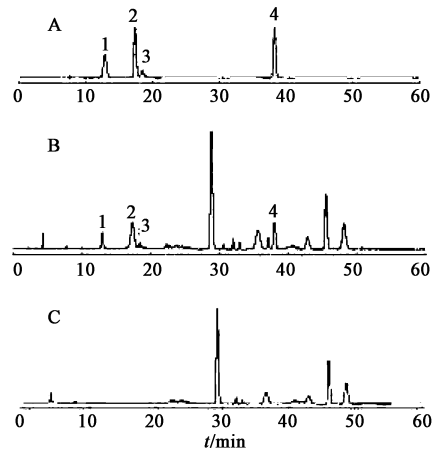
1200 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent), e2695 系列高效液相色谱仪 (美国 waters), BP211D 型分析天平 (德国赛多利斯), 人参皂苷 R_{g_1} (批号 110703-200316), 人参皂苷 R_e (批号 110754-200317), 人参皂苷 R_{b_1} (批号 110704-200314), 三七皂苷 R_1 (批号 110745-200516) 对照品, 均由中国食品药品检定研究院提供。乙腈为色谱纯 (Dikma), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。复方丹参片购于同仁堂科技发展股份有限公司 (批号 2120920, 2120913, 4120355, 4120368, 4120369)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 waters symmetry C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 12 ~ 20 ~ 60 min, 19% ~ 19% ~ 28% ~ 36% A), 检测波长 203 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别取三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} , 人参皂苷 R_e , 人参皂苷 R_{b_1} 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到含三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} , 人参皂苷 R_e , 人参皂苷 R_{b_1} 为 0.311, 0.782, 0.129, 0.967 g · L⁻¹ 混合对照品溶液。另取人参皂苷 R_{b_1} 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到 0.952 g · L⁻¹ 人参皂苷 R_{b_1} 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取复方丹参片 20 片, 除去包衣, 精密称重, 计算平均片重, 并研磨成粉末, 精



1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g_1} ; 3. 人参皂苷 R_e ; 4. 人参皂苷 R_{b_1}

图 1 混合对照品 (A)、复方丹参片供试品 (B)、阴性样品 (C) HPLC

Fig. 1 HPLC of hybrid reference substance solution (A), sample solution (B), negative sample solution (C)

密称取 0.5 g, 置锥形瓶中, 准确加入甲醇 5 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 用甲醇补足质量。过 0.45 μ m 滤膜, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 按 2010 年版《中国药典》中复方丹参片中的处方及制剂工艺, 制成缺三七的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法处理得缺三七阴性样品溶液。

2.5 线性关系试验 精密吸取上述对照品溶液 2, 5, 10, 20, 30 μ L, 注入色谱仪, 以进样量 (μ g) 为自变量, 色谱峰面积 (A) 为因变量绘制标准曲线, 建立回归方程。另取混合对照品溶液, 用甲醇依次稀释制成一系列由高到低的梯度浓度溶液, 测定峰面积为噪音 3 倍时进样量的检出限 (LOD), 峰面积为噪音 10 倍时进样量的定量限 (LOQ), 见表 1。

表 1 复方丹参片中各成分的标准曲线、线性范围、定量限及检测限

Table 1 standard curve, linear range, quantitative limit and detection limit of each component

成分	标准曲线	r	线性范围/ μ g	LOD/ μ g	LOQ/ μ g
三七皂苷 R_1	$Y = 143.95X - 7.368$	0.999 5	0.622 ~ 9.33	0.03	0.3
人参皂苷 R_{g_1}	$Y = 355.92X - 69.481$	0.999 3	1.564 ~ 23.46	0.02	0.4
人参皂苷 R_e	$Y = 227.02X + 13.7$	0.999 7	0.258 ~ 3.87	0.01	0.3
人参皂苷 R_{b_1}	$Y = 267.03X - 73.647$	0.999 6	1.934 ~ 29.01	0.02	0.3

2.6 校正因子的计算 依从线性关系试验按相对校正因子公式 $f_{k/s} = f_k/f_s = A_s C_k / (A_k C_s)$ 公式以人参皂苷 R_{b_1} 为内参物, 分别计算人参皂苷 R_{g_1} , 人参皂苷 R_e , 三七皂苷 R_1 对人参皂苷 R_{b_1} 的相对校正因子, 见表 2。

2.7 日内精密性及日间精密性 取混合对照品溶液, 连续进样 5 次, 测得峰面积, 结果见表 3。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD, 三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} , 人参皂苷 R_e , 人

表 2 人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 对人参皂苷 R_{b1} 的相对校正因子

Table 2 Relative correction factor of Ginseng saponin R_{g1}, Ginseng saponin Re and Panax notoginseng saponins R₁ relative to Ginseng saponin R_{b1}

进样体积/ μL	相对校正因子 f		
	三七皂苷 R ₁ / 人参皂苷 R _{b1}	人参皂苷 R _{g1} / 人参皂苷 R _{b1}	人参皂苷 Re/ 人参皂苷 R _{b1}
2	0.953	0.724	0.889
5	0.934	0.705	0.876
10	0.926	0.684	0.841
20	0.961	0.696	0.857
30	0.952	0.711	0.864

表 3 人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 对人参皂苷 R_{b1} 日内和日间精密度

Table 3 Days and daytime precision %

成分	日内 RSD		日间 RSD	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
三七皂苷 R ₁	0.5	1.1	0.6	1.6
人参皂苷 R _{g1}	1.1	0.4	1.1	2.1
人参皂苷 Re	0.2	0.7	0.3	2.0
人参皂苷 R _{b1}	0.1	1.6	0.2	2.7

人参皂苷 R_{b1} 的 RSD 分别为 1.5%, 2.0%, 1.8%, 1.0%。

2.9 重复性试验 取同一批样品,共 6 份,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,计算各成分的含量,三七皂苷 R₁,人参皂苷 R_{g1},人参皂苷 Re,人参皂苷 R_{b1} 的含量分别为 0.23, 0.89, 1.10, 4.65 mg/片。

2.10 加样回收率试验 取已知含量的样品 6 份, 0.25 g,精密称定,分别准确加入一定量的对照品,按供试品溶液处理方法制备,并按相应的色谱条件进样,计算回收率,三七皂苷 R₁,人参皂苷 R_{g1},人参皂苷 Re,人参皂苷 R_{b1} 的回收率分别为 99.6%, 100.7%, 100.1%, 99.8%, 见表 4。

表 4 复方丹参片中 4 种成分加样回收率试验

Table 4 Results of recovery test

成分	加入量/mg	平均回收率/%	RSD/%
三七皂苷 R ₁	0.124	99.6	3.4
人参皂苷 R _{g1}	0.391	100.7	2.7
人参皂苷 Re	0.650	100.1	4.1
人参皂苷 R _{b1}	1.934	99.8	2.5

2.11 样品测定 分别精密吸取混合对照品溶液、人参皂苷 R_{b1} 对照品溶液及供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪,测定,采用外标法和一测多评法计

算 4 种成分的量,见表 5。结果表明一测多评法与外标法测定结果无显著差异。

表 5 各组分外标与一测多评含量测定 mg/片

Table 5 Content determination results of each component by external standard method and multi-components quantitative by one marker mg/tablet

批号	人参皂苷 R _{b1}	三七皂苷 R ₁		人参皂苷 R _{g1}		人参皂苷 Re	
		外标	一测多评	外标	一测多评	外标	一测多评
2120920	4.67	0.22	0.23	0.84	0.88	1.07	1.12
2120913	5.07	0.24	0.24	0.92	1.03	1.21	1.28
4120355	4.72	0.23	0.26	0.87	0.91	1.17	1.31
4120368	4.93	0.28	0.28	1.21	1.22	1.33	1.33
4120369	5.14	0.27	0.27	1.15	1.25	1.18	1.22

3 讨论

3.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察 考察了两种高效液相色谱系统 Agilent 1200 系列液相色谱仪和 waters 2695 型高效液相色谱仪,分别在 waters symmetry C₁₈, Venusil XBP C₁₈, Agilent XDB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱进行测定相对校正因子,结果见表 6。

表 6 不同仪器和色谱柱测定的相对校正因子

Table 6 The relative correction factor of different instruments and chromatographic column to determine

仪器	色谱柱	$f_{R_1/R_{b1}}$	$f_{R_{g1}/R_{b1}}$	$f_{R_e/R_{b1}}$
Agilent 1200	waters symmetry C ₁₈	0.948	0.732	0.837
	Venusil XBP C ₁₈	0.934	0.729	0.848
	Agilent XDB-C ₁₈	0.911	0.694	0.877
waters 2695	waters symmetry C ₁₈	0.930	0.721	0.839
	Venusil XBP C ₁₈	0.962	0.705	0.841
	Agilent XDB-C ₁₈	0.925	0.721	0.880

3.2 待测组分色谱峰的定位和系统适用性评价 按照上述色谱条件,同时考察 6 种不同厂家的色谱柱: waters symmetry C₁₈, Venusil XBP C₁₈, Agilent XDB-C₁₈, Phenomenex Luna C₁₈、大连依利特柱 BDS C₁₈, Dikma C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 进行各成分色谱柱考察和待测成分色谱峰的定位,结果见表 7。

采用 RP-HPLC 法,在乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液系统中进行梯度洗脱,得到色谱图显示,峰形较好,各峰之间分离较好,并通过方法学考察,结果显示,线性范围良好,仪器精密性良好,待测成分峰面积在 24 h 稳定,样品含量测定重复性较好,且加样回收率均在 95% 与 105% 之间,表明该测定方法可靠、准备,可以同时测定复方丹参片中人参皂苷 Re,

表 7 各成分色谱柱考察和待测成分色谱峰的定位

Table 7 Test results of each component by chromatographic column and the positioning of the chromatographic peak of components

色谱柱	人参皂苷 Rb ₁	三七皂苷 R		人参皂苷 Rg ₁		人参皂苷 Re	
	t/min	t/min	t _{k/s}	t/min	t _{k/s}	t/min	t _{k/s}
waters symmetry C ₁₈	39.372	13.504	0.34	17.717	0.45	18.008	0.46
Venusil XBP C ₁₈	39.918	14.782	0.37	18.993	0.48	19.217	0.48
Agilent XDB-C ₁₈	38.125	13.125	0.34	17.523	0.46	17.761	0.47
大连依利特柱 BDS C ₁₈	39.012	12.924	0.33	18.124	0.46	18.295	0.47
Dikma C ₁₈	40.781	14.445	0.35	18.853	0.46	18.994	0.47
Phenomenex Luna C ₁₈	41.157	13.278	0.32	20.726	0.50	20.215	0.49

Rg₁, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 含量。通过以人参皂苷 Rb₁ 为指标,计算不同进样体积下人参皂苷 Re, Rg₁ 和三七皂苷 R₁ 对人参皂苷 Rb₁ 的相对校正因子, RSD 均在 5% 以内,相对校正因子稳定,可以作为一个较为“固定”的参数,可以作为复方丹参片中人参皂苷 Re, Rg₁ 和三七皂苷 R₁ 与人参皂苷 Rb₁ 之间含量测定转化的参数。比较外标法和一测多评方法测定的人参皂苷 Re, Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 含量,结果显示,复方丹参片一测多评含量测定方法与外标法的测定结果无显著性差异,所建立复方丹参片中人参皂苷 Re, Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 含量的一测多评法测定结果较为满意,这与朱晶晶等^[9]报道的结果一致。人参皂苷 Rb₁ 是人参和三七药材及相应的制剂中的主要成分,结构稳定,且容易获取,于其他的皂苷对比分析,将人参皂苷 Rb₁ 作为内参物的优势较为明显,准确性较好,可信度较高。

在方法的耐用性、系统适用性考察中,通过对不同仪器和色谱柱的考察,人参皂苷 Re, Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 出峰顺序一致,理论板数、分离度、对称因子均能较好的满足系统适用性要求,表明所采用的色谱条件耐用性良好,且相对校正因子无显著性差异。在对各成分色谱峰进行定位时,本实验采用相对保留时间(待测成分相对于内参物)进行成分定性,通过内参物和待测成分的相对保留时间就能对待测成分进行定性,这样就实现了复方丹参片中人参皂苷 Re, Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 定性及定量的要求。

综上所述,本实验以复方丹参片为例,通过方法学验证、一测多评准确性的评价和方法的耐用性、系统适用性考察,对一测多评法的技术适用性和可行性进行了探讨研究。结果表明,一测多评法计算的结果与外标法所得结果没有显著差异,提示本方法可实现以人参皂苷 Rb₁ 为对照品,通过确定的相对

校正因子计算人参皂苷 Re, Rg₁ 和三七皂苷 R₁ 的量,实现复方丹参片的多指标质量评价。一测多评法可以应用到复方丹参片中皂苷类成分的含量测定,该方法快速、准确,节约对照品资源,同时达到多指标质量控制要求。

[参考文献]

[1] Lv Y, Zhang X, Ling X, et al. Characterization of the constituents in rat biological fluids after oral administration of Fufang Danshen tablets by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(1):155-159.

[2] 周勇. 复方丹参滴丸治疗冠心病心绞痛的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(8):1874-1875.

[3] 丁力. 复方丹参片联合曲美他嗪治疗冠心病不稳定型心绞痛临床疗效观察[J]. 实用心脑血管病杂志, 2012, 20(5):773-774.

[4] 黎玉翠, 陈志维, 暴梅佳, 等. HPLC 法测定灵芝降糖胶囊中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 及三七皂苷 R₁ 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7):9-11.

[5] 张永昕, 俞发. HPLC 法测定活血止痛片中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 含量[J]. 中药材, 2008, 31(5):771-773.

[6] 许勇, 诸艳蓉, 王柯, 等. HPLC 测定复方丹参胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6):148-151.

[7] 陆继伟, 于建, 王柯, 等. 复方丹参片中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(12):1027-1030.

[8] 冯中, 李晓燕, 刘波, 等. HPLC 测定不同厂家复方丹参片中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Re, Rg₁、Rb₁ 含量[J]. 中成药, 2009, 31(1):71-74.

[9] 朱晶晶, 王智民, 匡艳辉, 等. 一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J]. 药学报, 2008, 43(12):1211-1216.

[责任编辑 顾雪竹]