

复方血栓通胶囊中4个有效成分的一测多评定量方法研究*

梁洁萍¹, 陈思¹, 谢称石², 彭维¹, 苏薇薇¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广东众生药业股份有限公司, 广东 东莞 523325)

摘要: 为建立复方血栓通胶囊中4个有效成分的一测多评定量方法, 采用高效液相色谱法, 以人参皂苷 Rg₁ 为参照对照品, 计算其与三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 的相对校正因子, 并进行含量计算, 实现一测多评; 同时采用外标法验证一测多评法的准确性。实验结果显示校正因子重现性好, 采用校正因子计算的含量值和外标法实测值之间没有显著性差异。故采用一测多评法同时测定复方血栓通胶囊中4个有效成分的含量, 具有准确、简便、经济实用等优点, 值得推广。

关键词: 复方血栓通胶囊; 一测多评; 校正因子; 高效液相色谱法

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2013) 05-0123-05

A Quantitative Method Using One Marker for Simultaneous Assay of Four Effective Components in Compound Xueshuantong Capsule

LIANG Jieping¹, CHEN Si¹, XIE Chengshi², PENG Wei¹, SU Weiwei¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Zhongsheng Pharmaceutical Company Limited, Dongguan 523325, China)

Abstract: The paper reported the establishment of a quantitative method for simultaneously determining four effective components in Compound Xueshuantong capsule by using one chemical reference, the new quality evaluation method, quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS), using Ginsenoside Rg₁ as the internal reference substance, was developed by HPLC to simultaneously determine Notoginsenoside R₁, Ginsenoside Rg₁, Ginsenoside Re, Ginsenoside Rb₁ in Compound Xueshuantong capsule with the relative correction factor (RCF). In addition, the results of QAMS method were validated by comparing with that of external standard method. The results show that the RCFs have good reproducibility and no significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method were observed. So, it is a accurate, convenient and practical method to simultaneously determine four effective components in Compound Xueshuantong capsule for its quality control.

Key words: Compound Xueshuantong capsule; QAMS; relative correction factor; HPLC

中药复方血栓通胶囊具有活血化瘀、益气养阴的功效, 用于治疗血瘀兼气阴两虚证的视网膜静脉阻塞。现代药理研究^[1-3]以及本实验室^[4]前期研究表明: 三七皂苷类化合物 (主要为三七皂苷 R₁、

人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁) 是复方血栓通胶囊发挥活血化瘀药效的主要物质基础。这种多成分、多功效的特点意味着控制单一成分难以全面控制其质量, 需建立简便易行的多成分同步

* 收稿日期: 2013-01-27

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2011ZX09201-201-22); 国家科技支撑计划课题 (2012BAI29B09); 东莞医疗卫生科技计划资助项目 (2012105102004)

作者简介: 梁洁萍 (1988年生), 女; 研究方向: 天然药物分析; 通讯作者: 苏薇薇; E-mail: lssww@126.com

质量控制模式。为此,王智民等^[5]提出了“一测多评”法,即利用中药有效成分间的相关关系,只测定一个成分,来实现多个成分的同时测定,近年来已有不少关于这方面的研究^[6-8]。复方血栓通胶囊的质量标准收载于《中国药典》2010 版一部^[9]，“含量测定”项以高效液相色谱外标法测定了三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量,外标法虽具有准确度高的优点,但必须有足够量、高纯度的化学对照品,应用中成本较高、方法较复杂。本研究建立的一测多评法,只需人参皂苷 R_{g_1} 对照品即可同时测定复方血栓通胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 4 个有效成分的含量,具有准确、简便、经济实用等优点,现报道如下。

1 仪器与试剂

10 万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius 公司, BP211D 型);超纯水器 (美国密理博 Millipore 公司, Simplicity);旋转蒸发器 (德国 Laborota 公司, 4001 型);数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司, KQ-250DE 型);Ultimate 3000 DGLC 高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司, DGP-3600SD 双三元泵、SRD-3600 脱气机、WPS-3000SL 自动进样器、TCC3000-RS 柱温箱、DAD 检测器、Chromeleon6.8 数据处理软件);P680 高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司, ASI-100 自动进样器、ATH-585 柱温箱、P680 四元梯度泵、Ultimate 3000 DAD 检测器)。

三七皂苷 R_1 (批号: 110745-200617)、人参皂苷 R_{g_1} (批号: 110703-201027)、人参皂苷 R_{b_1} (批号: 110704-200921)、人参皂苷 R_e (批号: 110754-200822) 均购自中国药品生物制品检定所;10 批复方血栓通胶囊由广东众生药业股份有限公司提供。

乙腈 (美国 Burdick & Jackson) 为色谱纯;甲醇 (广东光华化学厂有限公司) 为分析纯、磷酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司)、甲酸 (瑞士 Fluka Analytical) 为色谱纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Dionex Acclaim[®] 120 C_{18} (3 μm , 150 mm \times 4.6 mm) 为色谱柱;以乙腈为流动相 A, 以 $w = 0.05\%$ 磷酸溶液为流动相 B, 线性梯度洗脱程序

0~60 min: A (15% \rightarrow 38%); 检测波长为 203 nm;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;流速为 1.0 mL/min;进样量为 10 μL 。理论板数按三七皂苷 R_1 计不低于 10 000。混合对照品及样品色谱图见图 1。

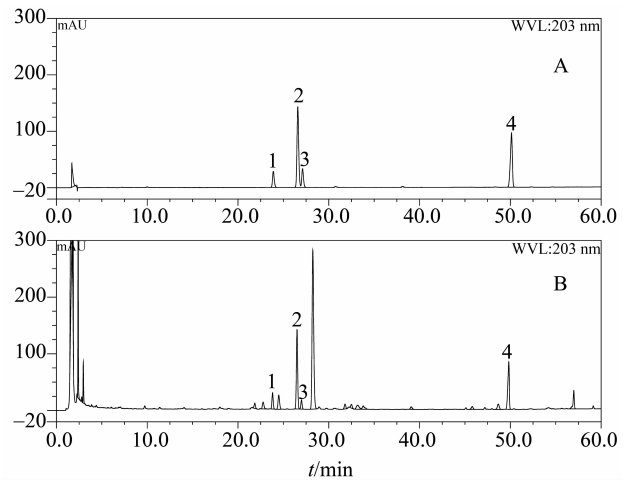


图 1 复方血栓通的对照品 (A) 及样品 (B) HPLC 图
1: 三七皂苷 R_1 ; 2: 人参皂苷 R_{g_1} ;
3: 人参皂苷 R_e ; 4: 人参皂苷 R_{b_1}

Fig. 1 HPLC of the samples of four mixed reference substances (A) and Compound Xueshuantong capsule (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 R_{g_1} 对照品、人参皂苷 R_{b_1} 对照品适量,置同一容量瓶中,加 $\varphi = 50\%$ 甲醇制成每 1 mL 含人参皂苷 R_{g_1} 0.982 mg、人参皂苷 R_{b_1} 0.918 mg 的混合对照品溶液;精密称取三七皂苷 R_1 对照品、人参皂苷 R_e 对照品适量,加 $\varphi = 50\%$ 甲醇分别制成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 0.984 mg、人参皂苷 R_e 0.904 mg 的对照品溶液;精密量取上述人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 混合对照品溶液 5 mL,分别精密量取上述三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_e 对照品溶液各 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 $\varphi = 50\%$ 甲醇至刻度,混匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物适量,混匀,研细,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中加入 $\varphi = 70\%$ 甲醇 20 mL,密塞,超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min,滤过,将滤纸及滤渣置同一锥形瓶中,再加入甲醇 20 mL,超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min,滤过,合并两次滤液,减压旋蒸至近干, $\varphi = 50\%$ 甲醇溶解,定量转移至 10 mL 量瓶,加 $\varphi = 50\%$ 甲醇至刻度,摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取上述混合对照品溶液1、5、10、15、20、25 μL , 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积。以峰面积(y)为纵坐标, 含量(x)为横坐标, 进行回归处理, 得三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 的标准曲线方程, 见表1, 各标准曲线在线性范围内线性良好。

表1 复方血栓通胶囊中4个成分的标准曲线

Table 1 Standard curves of four reference substances

成分	回归方程	r	线性范围/($10^{-2} \mu\text{g}$)
三七皂苷 R_1	$y=3\ 088.8x-0.001\ 6$	0.999 9	9.84~246.00
人参皂苷 R_{g_1}	$y=3\ 108.3x-0.208\ 5$	0.999 6	47.28~1 182.08
人参皂苷 R_e	$y=3\ 730.9x-0.047\ 8$	1.000 0	8.03~200.70
人参皂苷 R_{b_1}	$y=2\ 753x-0.027\ 8$	0.999 7	42.50~1 062.58

2.5 校正因子计算

以人参皂苷 R_{g_1} 为内标, 按一测多评法建立的技术指南^[10]中公式(1), 分别计算三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 的相对校正因子, 结果见表2。

表2 复方血栓通胶囊中3种成分的相对校正因子

Table 2 RCFs of three components in Compound Xueshuantong capsule

进样 体积/ μL	$f_{\text{人参皂苷}R_{g_1}/\text{三七皂苷}R_1}$	$f_{\text{人参皂苷}R_{g_1}/\text{人参皂苷}R_e}$	$f_{\text{人参皂苷}R_{g_1}/\text{人参皂苷}R_{b_1}}$
1	1.007	0.840	1.119
5	0.997	0.834	1.110
10	0.986	0.829	1.107
15	0.959	0.834	1.089
20	1.015	0.846	1.145
25	1.005	0.827	1.121
Mean	0.995	0.835	1.115
RSD/%	2.02	0.84	1.66

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液10 μL , 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样6次, 记录峰面积, 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} 峰面积的RSD%分别为0.60%、0.4%、1.00%、1.77%。

2.6.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液10 μL , 分别于配置后0、2、4、6、8、10、12、24、48 h进样分析, 记录峰面积, 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} 峰面积的RSD%分别为1.05%、0.95%、0.90%、0.30%, 表明样品在48 h内稳定。

2.6.3 重复性试验 取复方血栓通胶囊内容物(批次: 1110401)约0.5 g共6份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 4个成分的含量并计算质量分数的RSD%分别为0.75%、0.64%、0.74%、0.60%。

2.6.4 加样回收率 取复方血栓通胶囊内容物(批号: 110401)约0.25 g共6份, 精密称定, 分别按各成分在复方中的含量, 精密加入与胶囊中含量相当的各对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 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} 的加样回收率分别为95.84%、100.71%、97.73%、95.75%, RSD%分别为0.52%、1.44%、3.02%、1.85%。

2.6.5 不同仪器及不同色谱柱考察 精密吸取2.2项下混合对照品溶液5、10、15 μL , 按“2.1”项下色谱条件测定, 依据一测多评法建立的技术指南^[10]中公式(1)分别计算三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 的校正因子。试验分别考察了2种高效液相色谱仪和3种色谱柱, 所得的相对校正因子及其相对标准差见表3, 结果表明不同的仪器及不同的色谱柱所得的相对校正因子无显著性差异。

2.7 待测组分数谱峰的定位

采用一测多评法建立的技术指南^[10]中保留时间差(Δt_R)的定位方法: 测定内标物以及其余待测成分的相对保留时间, 计算出内标物与其余待测物的保留时间差, 再根据峰形、紫外吸收光谱等信息, 就能够正确判断出目标峰的准确峰位置。实验结果见表4, 各成分相对保留时间的RSD% $\leq 5\%$, 因此认为利用 Δt_R 进行峰定位是合理、可行的。

2.8 一测多评法与外标法结果比较研究

分别精密吸取制备好的供试品溶液10 μL , 按“2.1”项下色谱条件测定。分别采用外标法和一测多评法计算复方血栓通胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量, 结果见表5, 采用统计学 t 检验, 对外标法和一测多评法计算得到的含量进行比较, $p > 0.05$, 表明两种方法所测得各成分含量不存在显著性差异, 由此说明一测多评法可用于复方血栓通胶囊的多成分质量评价。

表 3 不同仪器和色谱柱测得相对校正因子
Table 3 RCFs determined by different instruments and columns

仪器	色谱柱	相对校正因子		
		$f_{\text{人参皂苷Rg}_1/\text{三七皂苷R}_1}$	$f_{\text{人参皂苷Rg}_1/\text{人参皂苷Re}}$	$f_{\text{人参皂苷Rg}_1/\text{人参皂苷Rb}_1}$
Ultimate	Dionex Acclaim [®] 120 C ₁₈	0.995	0.835	1.115
3000	Agilent Proshell 120 EC-C ₁₈	0.974	0.811	1.121
DGLC	Ultimate XB-C ₁₈	0.988	0.848	1.131
Dionex P680	Dionex Acclaimed [®] 120 C ₁₈	0.959	0.807	1.111
	Mean	0.979	0.825	1.120
	RSD/%	1.63	2.37	0.78

表 4 不同仪器和色谱柱测得相对保留时间
Table 4 Relative retention time determined by different instruments and columns

仪器	色谱柱	相对保留时间		
		$\Delta t_{\text{R三七皂苷R}_1 - \text{人参皂苷Rg}_1}$	$\Delta t_{\text{R人参皂苷Re} - \text{人参皂苷Rg}_1}$	$\Delta t_{\text{R人参皂苷Rb}_1 - \text{人参皂苷Rg}_1}$
Ultimate	Dionex Acclaim [®] 120 C ₁₈	0.897	1.018	1.884
3000	Agilent Proshell 120 EC-C ₁₈	0.900	1.018	1.874
DGLC	Ultimate XB-C ₁₈	0.900	1.019	1.886
Dionex P680	Dionex Acclaim [®] 120 C ₁₈	0.886	1.022	2.010
	Mean	0.896	1.019	1.914
	RSD/%	0.74	0.19	3.37

表 5 外标法和一测多评法测定复方血栓通中 4 个成分含量的比较
Table 5 Comparison of contents of three components in Compound Xueshuantong capsule by two methods

批次	$w(\text{人参皂苷 Rg}_1)$		$w(\text{三七皂苷 R}_1)$		$w(\text{人参皂苷 Re})$		$w(\text{人参皂苷 Rb}_1)$	
	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
110401	15.32	2.98	3.01	1.46	1.43	11.69	11.73	
110817	13.74	2.69	2.72	1.50	1.46	10.91	10.94	
110614	13.98	3.08	3.12	1.28	1.25	10.58	10.61	
110610	13.22	2.67	2.70	1.49	1.45	10.16	10.19	
110111	15.54	3.18	3.22	1.84	1.79	12.54	12.57	
110535	13.04	2.45	2.48	1.62	1.58	10.02	10.05	
110737	12.28	2.60	2.63	1.26	1.23	9.33	9.36	
101207	10.50	1.99	2.01	1.35	1.32	8.51	8.53	
110512	12.72	2.32	2.34	1.32	1.28	9.97	10.00	
100606	11.45	2.14	2.16	1.20	1.17	9.19	9.21	

3 讨论

本研究构建了复方血栓通中 4 种有效成分一测多评的方法,经统计学检验,一测多评法与外标法所得结果之间无显著性差异,说明本研究建立的以人参皂苷 Rg₁ 为参照对照品的一测多评法具有可行性,只需人参皂苷 Rg₁ 对照品,就可进行 4 个成分同步测定,可替代外标测定法用于复方血栓通胶囊的质量分析。本研究建立的方法,重复性、加样回收率好,与外标法相比具有简便、快速、检测成本低等优点,是适合中药特点多指标质量评价的新方

法,为更全面评价复方血栓通的质量提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 钟毅敏,于强,胡兆科.复方血栓通胶囊在眼科临床中的应用[J].广东医学,2004,25(5):487-488.
- [2] 李冠烈.三七的现代研究与进展(二)[J].世界中西医结合杂志,2008,3(10):687-691.
- [3] 杨志刚,陈阿琴,俞颂东,等.三七皂苷药理作用研究进展[J].中国兽药杂志,2005,39(1):33-37.

(下转第 129 页)

之间,同一地区的上一代与下一代之间主要依赖吡蚜酮防治,吡蚜酮相对用药较多且频繁,迁入地和迁出地繁殖世代也较多。最近几年湖北省荆门市防治白背飞虱的骨干品种是吡蚜酮,因性价比高 [$\varphi = 25\%$ 吡蚜酮悬浮剂(8 g),零售价3.00元],而且中南半岛水稻种植业发达,我国的虫源地(越南和泰国等)和发生地(湖北荆门)广泛连续地使用吡蚜酮防治白背飞虱,用药水平高,所以抗性因子聚集快,迁飞推迟白背飞虱产生抗药性的作用不明显,在2012年的各繁殖世代发生过程中,不断受到吡蚜酮选择压力作用,抗药性发展明显加快,湖北荆门的迁出种群即以较快的速度演化到对吡蚜酮的高抗性水平(抗药性激增)。所以,制定吡蚜酮抗药性治理措施刻不容缓。

参考文献:

- [1] NAUEN R, VONTAS J, KAUSSMANN M, et al. Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci* [J]. *Pest Management Science*, 2013, 69: 457-461.
- [2] 张小磊,周锋,李建洪,等. 25%吡蚜酮可湿性粉剂和25%噻嗪酮可湿性粉剂及其混用对水稻褐飞虱的田间防效研究[J]. *现代农业科技*, 2012, 23: 132-135.
- [3] 凌炎,黄凤宽,龙丽萍,等. 中国和越南褐飞虱抗药性研究[J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(5): 1374-1380.
- [4] BAN Lanfeng, ZHANG Shuai, HUANG Ziyang, et al. Resistance monitoring and assessment of resistance risk to pymetrozine in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2012, 105(6): 2129-2135.
- [5] 浙江省植物保护检疫局. 通报2011年水稻主要害虫抗药性监测结果[J]. *农药市场信息* 2012, 1: 51.
- [6] LING Shanfeng, ZHANG Hong, ZHANG Runjie. Effect of fenvalerate on the reproduction and fitness costs of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* and its resistance mechanism [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2011, 101: 148-153.
- [7] 王彦华,王强,沈晋良,等. 褐飞虱抗药性研究现状[J]. 2009, 46(4): 518-524.
- [8] HE Yueping, CHEN Li, CHEN Jianming, et al. Electrical penetration graph evidence that pymetrozine toxicity to the rice brown planthopper is by inhibition of phloem feeding [J]. *Pest Management Science*, 2011, 67: 483-491.
- [9] GE L Q, ZHAO K F, HUANG L J, et al. The effects of triazophos on the trehalose content, trehalase activity and their gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2011, 100(2): 172-181.
- [10] 解晓军,高媛媛,戚舒,等. 水稻胰蛋白酶抑制剂对褐飞虱产卵刺激的响应[J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2011, 50(5): 104-109.
- [4] 刘忠政,梁洁萍,聂怡初,等. 复方血栓通胶囊基于血液循环和凝血过程相关靶点的网络药理学研究[J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2013, 52(2): 97-100.
- [5] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [6] 匡艳辉,朱晶晶,王智民,等. 一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(5): 390-394.
- [7] 彭维,王永刚,苏薇薇. HPLC法同时测定田基黄4个黄酮类成分含量[J]. *中药材*, 2011, 34(8): 1229-1231.
- [8] 张德培,罗源生,贺凡珍. 酒大黄中5种蒽醌类成分一测多评方法的建立[J]. *中药材*, 2012, 35(4): 588-590.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 909-910.
- [10] 王智民,钱忠直,张启伟,等. 一测多评法建立的技术指南[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(6): 657-658.

(上接第126页)