



中药三七“一测多评”质量控制方法的系统研究

王超群¹, 贾秀虹¹, 陈季¹, 肖新月², 王璇^{1*}, 蔡少青^{3*}

(1. 北京大学药学院 化学生物学系, 北京 100191;

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050;

3. 北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

[摘要] 目的:建立可用于中药三七质量控制的人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d , R_e 及三七皂苷 R_1 的“一测多评”定量检测方法。方法:采用 HPLC-DAD 测定 5 种活性皂苷成分之间的相对校正因子,并分别以这 5 种成分中的任 1 种作为参照成分,建立可对另外 4 种成分定量检测的“一测多评”方法。分别采用 5 台不同的 HPLC 仪器,5 种不同 C_{18} 色谱柱及 4 个检测波长验证所建立方法的耐用性。进而采用建立的“一测多评”方法测定并计算 43 批三七药材样品中 5 种皂苷类成分含量,并与外标法比较,以评价“一测多评”法的准确性。结果:5 种皂苷成分分别为参照成分时,43 批药材中 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d , R_e , R_1 的“一测多评”法含量计算结果 (W_i) 均与外标法的含量测定结果 (W_s) 无显著性差异,2 种方法的含量测定结果的比值 (W_s/W_i) 为 $(94.02 \pm 2.11)\% \sim (99.75 \pm 0.79)\%$,说明方法准确度高、重复性好。相对校正因子耐用性良好,在不同色谱柱、不同仪器及不同检测波长下 RSD 分别为 $0.42\% \sim 3.7\%$, $0.52\% \sim 3.5\%$, $0.79\% \sim 4.9\%$ 。采用相对保留值方法可以对 5 种成分色谱峰准确定位,其数值的 RSD 为 $0.18\% \sim 13\%$ 。结论:本研究建立了准确、快速且耐用性良好的 5 种活性皂苷类成分同时定位定量的三七“一测多评”方法,为“一测多评”法应用于中药质量控制提供了可靠依据。

[关键词] 一测多评;HPLC;三七;人参皂苷;三七皂苷;相对校正因子;中药质量控制;耐用性

常用中药三七来源于五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎,具有散瘀止血、消肿定痛的功效^[1]。三七不仅以单味药的形式在临床上广泛使用,而且是著名中成药“云南白药”、“复方丹参滴丸”等制剂的主要原料。现代研究证明,三七还具有抗肿瘤^[2-3]及心血管系统保护^[4-5]等作用,皂苷类成分是其主要的活性成分。目前,三七的质量控制采用三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 及 R_{b_1} 的总量作为标准^[1]。但是,三七皂苷类成分对照品大都较昂贵,且难获得,不利于三七质控的发展。“一测多评”法作为采用单一对照品对多指标同时定量的方法,解决了这一难题。目前,这种方法已成功应用于黄连中 4 种成分的质量控制^[1],近年来其他中药的相关报道也逐渐增多^[6-9],但仍未见

应用于三七的专属性强、准确度高且耐用性好的“一测多评”质量控制方法。

本课题组前期已成功建立三七的指纹图谱^[10]及三七中 11 种成分同时 HPLC 定量的方法^[11]。为克服对照品不易得到对三七多成分含量检测带来的困难,本研究建立了三七中 5 种皂苷成分的“一测多评”方法,并探讨以该方法进行质量控制的可行性及适用性。

1 材料

Agilent 1200 及 1100 高效液相色谱仪,Agilent chemstation 工作站(美国安捷伦公司);Shimadzu LC-10A 及 LC-20A 高效液相色谱仪,LC solution 工作站(日本岛津公司);Waters Alliance e2695 高效液相色谱仪,Empower 3 工作站(美国沃特世公司)。1/1 万天平(美国 Mettler 公司),1/10 万天平(美国 Sartorius 公司),YYF300 超声波清洗器(北京医科大学仪器厂),RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),F2100 高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),SHZ-3(III)型循环水泵(河南予华仪器有限公司)。

对照品人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d , R_e (以分别下用 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d , R_e 表示)及三七皂苷 R_1 (以下用 R_1 表

[稿件编号] 20120605008

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-023);中医药行业科研专项(200707009);国家药典委员会标准研究项目(Y2-305)

[通信作者] *王璇,教授,Tel/Fax:(010)82806818,E-mail:xuanwang6818@bjmu.edu.cn;*蔡少青,教授,Tel/Fax:(010)82801693,E-mail:sqcai@bjmu.edu.cn

[作者简介] 王超群,硕士研究生,E-mail:wangchaoqun8676@live.cn

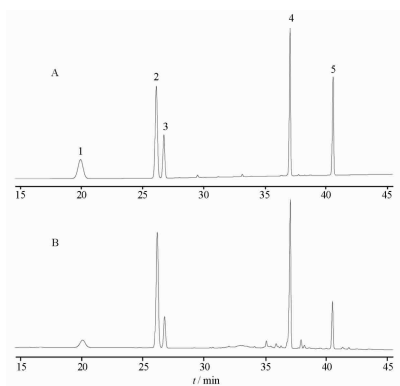
示)均购自中国食品药品检定研究院(批号分别为 110703-201027, 110703-200921, 111818-201001, 110754-200822, 110745-200617), 纯度分别为 96.3%, 92.9%, 94.4%, 88.8%, 100%。分析纯甲醇(北京化工厂), 色谱纯乙腈及甲醇(美国 Fisher 公司), 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

实验中所用 43 批三七药材及饮片收集于云南、广西、北京、杭州、四川、安徽等地, 其产地均为云南或广西, 由北京大学天然药物与仿生物药国家重点实验室蔡少青教授鉴定为五加科植物三七 *P. notoginseng* 的干燥根。药材标本保存在北京大学药学院生药标本室。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 色谱条件 Agilent 1200 高效液相色谱仪, Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱 0~20 min, 20% B, 20~45 min, 20%~46% B, 45~55 min, 46%~55% B, 55~60 min, 55%~90% B。流速 1.5 mL · min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。上述色谱条件下, 各待测组分峰分离效果良好(分离度 > 1.5), 见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 三七皂苷 R₁; 2. 人参皂苷 R_{g₁}; 3. 人参皂苷 Re; 4. 人参皂苷 R_{b₁}; 5. 人参皂苷 R_d。

图 1 对照品和三七样品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances and notoginseng sample

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 R_{g₁}, R_{b₁}, R_d, R_e, R₁ 适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 2.84, 2.88, 0.99, 1.26, 1.56 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液, 再采用甲醇稀释得到 7 个浓度级别的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取三七样品粉末(过 40 目筛)0.5 g, 精密加入甲醇 15 mL, 超声波提取 30 min, 滤过, 重复提取 1 次, 合并滤液, 减压蒸干溶剂, 用甲醇(色谱纯)溶解残渣并定容至 10 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 即得供试品溶液。

2.1.4 相对校正因子的计算 根据公式 $(A_n \times W_s) / A_s = f_r \times W_n$, 其中 A, W, f_r 分别为色谱峰面积、成分的质量浓度(g · L⁻¹)及相对校正因子, 下标 n, s 分别代表待测成分及参照成分。以 W_n 对 $(A_n \times W_s) / A_s$ 作回归处理, 所得回归曲线的斜率即为相对校正因子。以该方法分别求算当 R_{g₁}, R_{b₁}, R_d, R_e 及 R₁ 单独作为参照成分时, 其他 4 种成分的相对校正因子(f_r)。

2.2 方法学验证

2.2.1 标准曲线的建立 分别吸取 7 个浓度的混合对照品溶液进样分析 2 次, 取色谱峰面积的平均值。以对照品溶液浓度对峰面积积分值进行回归处理, 得 R_{g₁}, R_{b₁}, R_d, R_e 及 R₁ 的标准曲线, 结果表明 5 种成分在相应的线性范围内线性关系良好, 结果见表 1。

2.2.2 日间、日内精密度验证 精密吸取某一级别混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, R_{g₁}, R_{b₁}, R_d, R_e 及 R₁ 色谱峰面积的日内精密度的 RSD 分别为 1.4%, 1.8%, 1.0%, 2.0%, 1.0%。精密吸取某一级别混合对照品溶液 10 μL, 每天进样 2 次连续 3 d, R_{g₁}, R_{b₁}, R_d, R_e 及 R₁ 色谱峰面积的日间精密度 RSD 分别为 0.72%, 0.70%, 0.94%, 1.2%, 1.6%。精密吸取药材(6605 号)的供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 各色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.91%, 1.0%, 1.3%, 1.3%, 2.1%。以上结果均表明仪器的精密度良好。

2.2.3 样品稳定性验证 取新制备的三七供试品溶液(编号 6692), 在室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h 后各精密吸取 10 μL 进样, R_{g₁}, R_{b₁}, R_d, R_e 及 R₁ 色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.84%, 2.8%, 2.3%, 1.8%, 1.3%, 结果表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.2.4 方法重复性验证 取同一批三七药材粉末(编号 6606), 共 7 份, 精密称定, 按 2.1.3 方法制备样品, 测得 R_{g₁}, R_{b₁}, R_d, R_e 及 R₁ 的平均质量分数分别为 2.03%, 1.74%, 0.49%, 0.29%, 0.56%, RSD 分别为 2.9%, 2.9%, 3.0%, 3.0%, 2.5%, 结果表明该方法重复性

良好。

表 1 三七中 5 种皂苷成分的标准曲线、线性范围、定量限及检测限

Table 1 The standards' calibration curves, linear ranges, LOD and LOQ of five saponins in *Panax notoginseng*

皂苷成分	标准曲线	R^2	线性范围/ $g \cdot L^{-1}$	LOD/ μg	LOQ/ μg
R ₁	$Y = 1\ 763.9X + 3.3$	0.999 9	0.02 ~ 1.56	0.03	0.2
Rg ₁	$Y = 2\ 237.8X + 55.8$	0.999 9	0.04 ~ 2.84	0.01	0.4
Re	$Y = 2\ 218.8X + 10.3$	0.999 9	0.02 ~ 1.26	0.01	0.2
Rb ₁	$Y = 1\ 662.2X + 35.9$	0.999 9	0.04 ~ 2.88	0.01	0.4
Rd	$Y = 2\ 061.8X + 8.9$	0.999 7	0.02 ~ 0.99	0.01	0.2

2.3 相对校正因子的计算及其耐用性验证

2.3.1 用不同高效液相色谱仪测定的耐用性验证

取 2.1.2 项下的系列混合对照品溶液,分别精密吸取 10 μL ,采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱,分别在 Agilent 1100, Agilent 1200, Shimadzu LC-10A, Shimadzu LC-20A, Waters Alliancee 2695 等 5 种高效液相色谱仪上进样检测,按 2.1.4 项中的方法,求算以 Rg₁, Rb₁, Rd, Re 及 R₁ 分别作为参照成分时其他 4 种成分的相对校正因子,采用不同仪器测定得到的各待测成分的 5 个相对校正因子的 RSD 评价相对校正因子的耐用性,结果显示 RSD 在 0.52% ~ 3.5%,说明相对校正因子在使用不同仪器时的耐用性良好,结果见表 2。

2.3.2 用不同 C₁₈ 色谱柱测定的耐用性验证

取 2.1.2 项下的系列混合对照品溶液,分别精密吸取 10 μL ,在 Agilent 1200 高效液相色谱仪上,分别采用 Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm ; 下同), Agilent Zorbax SB-C₁₈, Dikma Diamonsil C₁₈, Waters Symmetry C₁₈ 及 Merck Hibar Purospher STAR RP-C₁₈ 等 5 种色谱柱进行检测,按 2.1.4 项中的方法,求算以 Rg₁, Rb₁, Rd, Re 及 R₁ 分别作为参照成分时其他 4 种成分的相对校正因子,使用不同色谱柱测定时各相对校正因子 RSD 在 0.42% ~ 3.7%,说明相对校正因子在使用不同色谱柱时耐用性良好,结果见表 3。

表 2 使用不同高效液相色谱仪测定并计算得到的各待测成分的相对校正因子

Table 2 Relative correction factors determined on different HPLC instruments

HPLC 仪器	R ₁ ¹⁾				Rg ₁				Re				Rb ₁				Rd			
	Rg ₁ ²⁾	Re	Rb ₁	Rd	R ₁	Re	Rb ₁	Rd	R ₁	Rg ₁	Rb ₁	Rd	R ₁	Rg ₁	Re	Rd	R ₁	Rg ₁	Re	Rb ₁
仪器-1	1.27	1.26	0.94	1.17	0.79	0.99	0.74	0.92	0.81	1.01	0.76	0.94	1.06	1.35	1.34	1.24	0.86	1.07	1.08	0.81
仪器-2	1.26	1.23	0.94	1.14	0.79	0.99	0.74	0.92	0.81	1.01	0.77	0.93	1.06	1.34	1.30	1.22	0.87	1.10	1.07	0.82
仪器-3	1.25	1.30	0.92	1.13	0.80	1.04	0.73	0.90	0.77	0.96	0.74	0.87	1.09	1.36	1.42	1.23	0.89	1.11	1.15	0.81
仪器-4	1.25	1.23	0.93	1.14	0.80	0.99	0.74	0.92	0.81	1.01	0.75	0.93	1.08	1.35	1.33	1.23	0.87	1.09	1.08	0.81
仪器-5	1.27	1.23	0.94	1.15	0.79	0.97	0.74	0.91	0.81	1.03	0.76	0.93	1.07	1.35	1.32	1.23	0.86	1.10	1.07	0.81
RSD/%	0.79	2.5	0.96	1.3	0.69	2.6	0.61	0.98	2.2	2.6	1.5	3.1	1.2	0.52	3.4	0.57	1.4	1.4	3.1	0.55

注: 1) 此行为参照成分; 2) 此行为待测成分(表 3, 4 同)。

表 3 使用不同色谱柱测定并计算得到的各待测成分的相对校正因子

Table 3 Relative correction factors determined on different columns

C ₁₈ 色谱柱	R ₁ ¹⁾				Rg ₁				Re				Rb ₁				Rd			
	Rg ₁ ²⁾	Re	Rb ₁	Rd	R ₁	Re	Rb ₁	Rd	R ₁	Rg ₁	Rb ₁	Rd	R ₁	Rg ₁	Re	Rd	R ₁	Rg ₁	Re	Rb ₁
色谱柱-1	1.27	1.24	0.94	1.17	0.79	0.98	0.74	0.92	0.81	1.01	0.76	0.94	1.06	1.35	1.34	1.24	0.86	1.07	1.08	0.81
色谱柱-2	1.25	1.21	0.94	1.16	0.80	0.97	0.75	0.93	0.83	1.02	0.78	0.96	1.06	1.32	1.28	1.22	0.86	1.06	1.05	0.81
色谱柱-3	1.27	1.24	0.95	1.16	0.79	0.98	0.75	0.91	0.80	1.01	0.77	0.94	1.05	1.33	1.30	1.22	0.87	1.11	1.08	0.82
色谱柱-4	1.27	1.23	0.94	1.14	0.79	0.97	0.74	0.90	0.81	1.01	0.76	0.93	1.06	1.34	1.31	1.22	0.86	1.08	1.07	0.82
色谱柱-5	1.27	1.31	0.94	1.14	0.80	1.03	0.75	0.90	0.76	0.95	0.72	0.87	1.06	1.34	1.39	1.21	0.87	1.11	1.15	0.83
RSD/%	0.71	3.0	0.47	1.2	0.69	2.6	0.73	1.4	3.2	2.8	3.0	3.7	0.42	0.85	3.2	0.90	0.63	2.1	3.5	1.0



2.3.3 采用不同检测波长测定的耐用性验证
取 2.1.2 项下的系列混合对照品溶液,分别精密吸取 10 μ L,采用 Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪及 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱进样检测,按 2.1.4 项中的方法,分别计算采用 200,

203,207,210 nm 作为检测波长时 5 种成分之间的相对校正因子,不同检测波长下相对校正因子的 RSD 在 0.79% ~ 4.9%,说明相对校正因子在检测波长有微小变动下耐用性良好,结果见表 4。

表 4 使用不同检测波长测定并计算得到的各待测成分的相对校正因子

Table 4 Relative correction factors determined on different detective wavelengths

检测 波长	R ₁ ¹⁾				Rg ₁				Re				Rb ₁				Rd			
	Rg ₁ ²⁾	Re	Rb ₁	Rd	R ₁	Re	Rb ₁	Rd	R ₁	Rg ₁	Rb ₁	Rd	R ₁	Rg ₁	Re	Rd	R ₁	Rg ₁	Re	Rb ₁
200 nm	1.24	1.35	0.91	1.21	0.80	1.09	0.73	0.93	0.73	0.91	0.66	0.85	1.10	1.36	1.48	1.28	0.86	1.08	1.17	0.79
203 nm	1.25	1.30	0.92	1.18	0.80	1.04	0.73	0.90	0.77	0.96	0.71	0.87	1.09	1.36	1.41	1.23	0.89	1.11	1.15	0.81
207 nm	1.22	1.24	0.91	1.16	0.82	1.01	0.74	0.91	0.80	0.98	0.73	0.89	1.10	1.34	1.36	1.22	0.90	1.10	1.12	0.82
210 nm	1.22	1.23	0.90	1.17	0.82	1.00	0.74	0.90	0.81	1.00	0.73	0.89	1.11	1.36	1.36	1.22	0.91	1.12	1.12	0.82
RSD/%	1.3	4.4	0.79	1.9	1.3	3.7	0.79	1.5	4.9	3.8	4.5	2.6	0.80	0.66	3.9	1.8	2.3	1.5	2.4	1.8

2.4 待测成分色谱峰的定位

本研究比较了在使用不同仪器及色谱柱进行测定时,保留时间、保留时间差值(保留时间差值的绝对值)及相对保留值(待测成分与参照成分保留时间的比值)对 5 种待测成分色谱峰在色谱图上的定位准确度(以 RSD 评价)。各待测成分的保留时间、

保留时间差值及相对保留值的 RSD 分别为 2.3% ~ 14%,2.6% ~ 42%,0.18% ~ 13%,且采用 Rg₁作为参照成分时,相对保留值的 RSD 仅为 1.6% ~ 7.4%。由结果可知,保留时间差值的变化范围很大,不宜采用。相对保留值数值稳定,可以用于待测成分色谱峰的定位,结果见表 5。

表 5 使用不同仪器及色谱柱测定三七的保留时间、保留时间差值及相对保留值($\bar{x} \pm s$)

Table 5 The retention time, differences in retention time and relative retention value determined on different instruments and different columns($\bar{x} \pm s$)

待测 成分	保留时间 /min	保留时间差值的绝对值(RT _n - RT _s) ¹⁾ /min					相对保留时间(RT _n /RT _s) ¹⁾				
		R ₁ ²⁾	Rg ₁	Re	Rb ₁	Rd	R ₁	Rg ₁	Re	Rb ₁	Rd
R ₁	19.4 ± 2.7 (13.97%) ³⁾		6.2 ± 1.0 (16.55%)	7.0 ± 1.3 (18.47%)	17.6 ± 2.0 (11.29%)	21.1 ± 1.9 (9.17%)		0.8 ± 0.1 (7.43%)	0.7 ± 0.1 (8.71%)	0.5 ± 0.1 (12.03%)	0.5 ± 0.1 (12.10%)
Rg ₁	25.5 ± 1.8 (7.08%)	6.2 ± 1.0 (16.55%)		0.8 ± 0.3 (41.86%)	11.4 ± 1.1 (9.25%)	14.9 ± 1.0 (6.70%)	1.3 ± 0.1 (7.47%)		1.0 ± 0.0 (1.52%)	0.7 ± 0.0 (5.03%)	0.6 ± 0.0 (5.09%)
Re	26.3 ± 1.5 (5.37%)	7.0 ± 1.3 (18.47%)	0.8 ± 0.3 (41.86%)		10.6 ± 0.7 (6.94%)	14.1 ± 0.7 (4.87%)	1.4 ± 0.1 (8.93%)	1.0 ± 0.0 (1.55%)		0.7 ± 0.0 (3.61%)	0.7 ± 0.0 (3.64%)
Rb ₁	36.9 ± 0.9 (2.33%)	17.6 ± 2.0 (11.29%)	11.4 ± 1.1 (9.25%)	10.6 ± 0.7 (6.94%)		3.5 ± 0.1 (2.63%)	1.9 ± 0.2 (12.70%)	1.5 ± 0.1 (5.27%)	1.4 ± 0.1 (3.70%)		0.9 ± 0.0 (0.18%)
Rd	40.4 ± 0.9 (2.28%)	21.1 ± 1.9 (9.17%)	14.9 ± 1.0 (6.70%)	14.1 ± 0.7 (4.87%)	3.5 ± 0.1 (2.63%)		2.1 ± 0.3 (12.72%)	1.6 ± 0.1 (5.27%)	1.5 ± 0.1 (3.73%)	1.1 ± 0.0 (0.18%)	

注:1)下标 n,s 分别代表待测成分和参照成分;2)此行为参照成分;3)相对标准偏差(RSD)。

2.5 “一测多评”法与外标法测定结果的比较

分别以 Rg₁,Rb₁,Rd,Re,R₁作为“一测多评”法的参照成分,计算 43 批三七药材样品中 5 种成分的质量分数(“一测多评”法测定结果以 W_f表示),并与外标法的测定结果(W_s)进行比较,结果见表 6,7,方差分析结果显示同一成分分别用 2 种方法求得的

含量值之间无显著性差异。此外,采用外标法与“一测多评”法所得含量的比值(W_s/W_f)评价“一测多评”法的准确度,以 Rg₁,Rb₁,Rd,Re 及 R₁分别作为参照成分时,另 4 种成分 W_s/W_f的比值分别为(96.16 ± 2.12)% ~ (99.46 ± 0.77)%,(96.15 ± 2.17)% ~ (99.12 ± 0.79)%,(96.00 ± 1.65)% ~

(99.75 ± 0.79)% , (96.02 ± 1.61)% ~ (99.21 ± 0.77)% , (94.20 ± 2.11)% ~ (98.73 ± 0.93)% 。

结果表明建立的“一测多评”法的准确度与外标法相当。

表 6 “一测多评”法与外标法测定 5 种皂苷成分含量准确度的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 The comparison of QAMS method and Standards' calibration method($\bar{x} \pm s$)

参照成分	待测成分					指标成分 总和	RSD ₁ (n = 6)
	R ₁	Rg ₁	Re	Rb ₁	Rd		
R ₁		96.83 ± 1.05	94.20 ± 2.11	97.74 ± 2.19	97.06 ± 4.88	98.73 ± 0.93	1.7
Rg ₁	99.46 ± 0.77		96.16 ± 2.12	97.11 ± 2.49	96.30 ± 4.15	98.45 ± 1.11	1.5
Re	99.21 ± 0.77	96.02 ± 1.61		97.50 ± 2.50	97.52 ± 4.20	97.41 ± 1.79	1.2
Rb ₁	99.12 ± 0.79	97.65 ± 1.68	96.15 ± 2.17		97.43 ± 4.30	98.61 ± 1.25	1.2
Rd	99.75 ± 0.79	96.00 ± 1.65	96.19 ± 2.17	97.91 ± 2.57		97.52 ± 1.82	1.6
RSD ₂ (n = 5)	0.28	0.81	1.03	0.35	0.54	0.61	

注:准确度 = $(W_s / W_f) \times 100\%$; RSD₁. 由同一参照成分分别求算其他 4 种成分的含量及 4 成分总量与外标法相比的相对标准偏差(%); RSD₂. 分别采用 5 种成分为参照成分,求算某一成分含量或 5 种成分总量与外标法相比的百分比的相对标准偏差(%).

3 结论与讨论

3.1 建立了三七 5 个皂苷成分“一测多评”方法

本项研究利用三七中皂苷类成分化学结构的相似性,建立了以 1 种成分为参照计算三七中 5 种皂苷成分含量的“一测多评”法,实现了用 1 种对照品测定计算三七中 5 种同类成分含量的构想。方差分析结果表明所建立的三七“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;以工作曲线法(外标法)的测定结果为标准,以外标法(W_s)与“一测多评”法(W_f)分别测得的含量的比值(W_s / W_f)评价“一测多评”法计算结果的准确性,结果令人满意。以 5 种不同皂苷分别单独为参照,分别测定另外 4 个皂苷类成分的含量, W_s / W_f 均在(94.02 ± 2.11)% ~ (99.75 ± 0.79)%。通过对 43 份三七药材样品中 5 种皂苷成分的含量分析和统计学处理,当采用 1 种参照成分计算另 4 种成分含量及 5 成分总量的 W_s / W_f 的 RSD₁(n = 5) 为 1.2% ~ 1.7%,不同参照成分计算同一种成分含量的 W_s / W_f 的 RSD₂(n = 4) 为 0.28% ~ 1.0%,说明 5 种成分中参照成分的选取对准确度的影响较小,且不同的参照成分对待测成分不存在选择性。这表明 5 种皂苷成分中的任何一个成分作为参照成分计算出来的三七中 5 种成分的含量数据几乎一致,即选用 5 种皂苷中的任何一种作参照成分时的含量测定结果一致。

3.2 本研究建立的方法对三七质量评价与鉴定有重要意义

该方法较 2010 年版《中国药典》中三七质量标

准多检测了 2 个主要成分(Re, Rd),而这 2 种成分均为三七的活性成分,例如 Rd 具有抗动脉粥样硬化^[12]、抗肿瘤^[13]、神经保护^[14]作用,而 Re 具有免疫调节^[15]及降血糖^[16]等活性,因此增加的 2 个成分益于三七的品质评价与质量控制,另一方面增加的 2 个成分对三七的鉴别也具有重要意义。本课题组前期研究也发现,5 种皂苷成分总量(Rg₁, Rb₁, Rd, Re, R₁)可以增大不同生长年限三七之间的差异。本研究中 43 批样品的 3 个成分(R₁, Rg₁, Rb₁)总质量分数为 0.67% ~ 9.81%,而 5 个成分的总质量分数为 0.82% ~ 11.62%,曾有文献报道采用检测人参的“一测多评”方法,以人参皂苷 Rb₁为参照检测了三七中的人参皂苷 Rg₁, Rd, Rb₁^[17],但未检测三七特有成分三七皂苷 R₁及三七中的主要成分之一人参皂苷 Re。而本研究检测的 5 个指标成分既是三七中的主要成分,也是主要的活性成分,对提高中药三七的质量评价具有重要意义。此外,本研究建立的“一测多评”方法在多种类型的三七样品中进行了验证,包括不同头数三七、不同规格(三七个子、粉末、切片),不同生长年限及不同产地(广西、云南)的三七样品,为三七及三七片的质量标准的制定提供了更广泛的科学依据。

3.3 在检测波长的小幅变化、使用不同仪器和不同色谱柱测定含量时方法的适用性良好

研究中发现,以 5 种皂苷成分分别作为参照成分计算其他成分的相对校正因子,在 200 ~ 210 nm 的 4 个检测波长下 RSD 均在 5% 以内,说明本方法

表7 采用人参皂苷 R_{g_1} 作为参照时“一测多评”法 (W_f) 与外标法 (W_s) 求得43批三七样品中5种皂苷类成分含量的比较
Table 7 The comparison of contents of 5 saponins in 43 notoginseng samples assayed by both QAMS method and standards' calibration curves method when R_{g_1} was used as internal referring substance

No.	样品 编号	产地	规格	R_{g_1}		R_1		Re		R_{b_1}		Rd		总量	
				W_s	W_f	W_s	W_f	W_s	W_f	W_s	W_f	W_s	W_f	W_s	W_f
1	5966	云南	20头	1.59	0.37	0.38	0.29	0.30	2.76	2.81	0.54	0.56	5.56	5.64	
2	5967	云南	30头	0.87	1.57	1.57	0.35	0.35	3.02	3.08	0.66	0.68	6.47	6.55	
3	5968	云南	40头	1.54	1.06	1.06	0.19	0.20	1.29	1.34	0.26	0.28	4.35	4.42	
4	6498	云南	20头	2.08	0.53	0.53	0.75	0.75	1.77	1.82	0.36	0.38	5.50	5.57	
5	6499	云南	30头	1.82	0.59	0.59	0.78	0.78	1.53	1.58	0.38	0.40	5.10	5.16	
6	6500	云南	40头	2.86	0.80	0.80	0.23	0.24	3.02	3.08	0.67	0.69	7.58	7.66	
7	5908	云南	特号	2.33	0.63	0.64	0.19	0.20	3.26	3.31	0.60	0.62	7.01	7.09	
8	5909	云南	一号	1.60	0.47	0.47	0.15	0.16	1.15	1.19	0.30	0.32	3.67	3.74	
9	6501	广西靖西	40头	4.40	0.33	0.34	0.41	0.41	1.80	1.85	0.38	0.39	7.31	7.39	
10	6502	广西德保	20头	3.00	0.51	0.51	0.36	0.36	2.76	2.81	0.62	0.64	7.25	7.32	
11	6503	广西隆林	130~140头	2.56	0.25	0.26	0.22	0.23	1.93	1.98	0.54	0.56	5.50	5.58	
12	6536a	云南	40头切片	2.55	1.03	1.03	0.20	0.21	2.72	2.77	0.50	0.52	7.01	7.08	
13	6537a	云南	80头切片	1.77	0.77	0.78	0.23	0.23	3.24	3.30	0.62	0.63	6.63	6.71	
14	6538	云南	切片	1.78	0.59	0.60	0.21	0.21	1.52	1.57	0.32	0.33	4.42	4.50	
15	6539	不详	切片	2.15	0.63	0.63	0.33	0.34	2.43	2.48	0.50	0.51	6.04	6.11	
16	6521	云南	切片	2.37	0.56	0.56	0.29	0.29	2.06	2.11	0.44	0.45	5.72	5.79	
17	6522	云南	切片	2.13	0.50	0.50	0.27	0.27	1.99	2.04	0.44	0.45	5.33	5.40	
18	6540	云南	切片	2.62	0.79	0.79	0.32	0.33	2.38	2.43	0.53	0.55	6.65	6.72	
19	6543	云南	三七块	2.48	0.75	0.75	0.32	0.32	2.72	2.77	0.65	0.66	6.91	6.99	
20	6523	云南	切片	2.57	0.54	0.54	0.31	0.32	2.35	2.40	0.53	0.55	6.30	6.38	
21	6496	云南	薄片	1.62	0.38	0.38	0.19	0.20	1.68	1.73	0.31	0.32	4.19	4.26	
22	6536b	云南	40头切片	2.74	1.12	1.12	0.27	0.28	3.13	3.18	0.68	0.69	7.94	8.02	
23	6547	云南	切片	1.91	0.66	0.66	0.22	0.22	1.57	1.62	0.35	0.36	4.71	4.78	
24	6692	云南	120头	2.81	1.10	1.10	0.32	0.32	2.17	2.22	0.61	0.63	7.01	7.09	
25	6605	云南	切片	0.88	0.26	0.26	0.09	0.10	0.84	0.89	0.22	0.23	2.30	2.37	
26	6606	云南	切片	1.78	0.49	0.49	0.24	0.24	1.78	1.83	0.44	0.45	4.72	4.79	
27	6537b	云南	80头切片	2.26	0.97	0.97	0.32	0.32	2.70	2.75	0.69	0.70	6.93	7.01	
29	6545	云南	切片	2.41	0.61	0.62	0.27	0.27	2.33	2.38	0.60	0.61	6.22	6.29	
37	6686	云南	60头	2.77	0.79	0.79	0.25	0.26	1.98	2.03	0.64	0.66	6.43	6.50	
28	6685	云南	40头	2.00	0.99	1.00	0.24	0.25	3.16	3.21	0.94	0.96	7.32	7.41	
30	6691	云南	80头	2.19	0.68	0.68	0.24	0.24	1.70	1.75	0.50	0.52	5.31	5.38	
31	6505	广西	300头	1.80	0.51	0.51	0.38	0.39	1.82	1.87	0.51	0.53	5.02	5.09	
32	6600	云南	粉末	0.84	0.18	0.18	0.12	0.13	0.77	0.82	0.15	0.16	2.06	2.13	
33	6748	云南	粉末	2.60	0.70	0.71	0.32	0.33	2.52	2.57	0.60	0.62	6.75	6.83	
34	6548	云南	粉末	2.10	0.47	0.47	0.22	0.23	1.95	2.00	0.40	0.42	5.14	5.22	
35	2654 ¹⁾	云南文山县	三年生主根	3.17	0.57	0.57	0.29	0.30	2.67	2.72	0.70	0.71	7.39	7.47	
36	Y01033 ¹⁾	云南文山县	三年生须根	2.35	0.73	0.73	0.32	0.32	2.43	2.48	0.47	0.49	6.30	6.38	
38	20101216-3 ¹⁾	云南文山县	一年生全根	0.40	0.07	0.07	0.06	0.07	0.20	0.25	0.02	0.03	0.76	0.82	
39	20101214 ¹⁾	云南玉溪县	二年生主根	2.84	0.94	0.94	0.35	0.35	1.81	1.86	0.55	0.56	6.49	6.57	
40	20101217-1 ¹⁾	云南建水县	二年生主根	2.00	0.53	0.54	0.20	0.21	1.45	1.49	0.32	0.33	4.51	4.58	
41	20101216-2 ¹⁾	云南文山县	二年生主根	2.34	0.60	0.60	0.25	0.26	1.34	1.39	0.57	0.58	5.10	5.17	
42	20101216-1 ¹⁾	云南文山县	三年生主根	4.32	1.39	1.39	0.84	0.84	4.10	4.16	0.89	0.91	11.54	11.62	
43	20101217-2 ¹⁾	云南建水县	三年生主根	3.49	0.99	0.99	0.53	0.53	3.16	3.22	0.74	0.75	8.90	8.98	

注:¹⁾自采药材。

得到的相对校正因子受检测波长的微小变化影响较小,在检测波长变化范围在 ± 10 nm 时,相对校正因

子随检测波长的规律性变化幅度不超过 5%,说明相对校正因子在检测波长存在微小变化时



(± 5 nm)比较稳定。

3.4 不同高效液相色谱仪相对校正因子的比较

5个成分中的任一成分作为参照成分计算其他成分的校正因子的RSD均在4%以下,说明本研究建立的方法在不同厂牌高效液相色谱仪上有良好的适用性。在进行不同 C_{18} 色谱柱相对校正因子的比较中发现,5个成分中的任一成分作为参照成分计算其他成分的校正因子的RSD均在4%以下,且采用不同色谱柱测得的相对校正因子与5种色谱柱的平均值的偏差均在5%以下,其中3种色谱柱测得相对校正因子与平均值的偏差仅为 $(0.71 \pm 0.49)\%$ ~ $(0.81 \pm 0.43)\%$,说明本研究建立的方法在不同 C_{18} 色谱柱上有良好的适用性。

3.5 采用相对保留值可对待测成分色谱峰准确定位

待测组分峰的定位研究发现,若采用相对保留值进行定位,当所选参照成分的出峰位置比较居中,则对其他4个组分峰的定位准确度较高,例如采用 R_{g_1} 及 R_e 作为对照对另几种组分定位时用不同仪器及色谱柱测定所得相对保留RSD分别为 $(4.88 \pm 2.44)\%$, $(4.42 \pm 3.04)\%$,而采用 R_1 , R_{b_1} , R_d 为参照时RSD较大,分别为 $(10.46 \pm 2.67)\%$, $(5.21 \pm 4.98)\%$, $(5.50 \pm 5.47)\%$ 。因人参皂苷 R_{g_1} 是三七中的主要成分,较易得到高纯度对照品,且计算其他成分含量的准确度又较高,与外标法相比的比值在 $(96.16 \pm 2.12)\%$ ~ $(99.46 \pm 0.77)\%$,故可首选人参皂苷 R_{g_1} 作为三七中5种皂苷“一测多评”法定量检测的参照成分。在缺乏 R_{g_1} 对照品时,采用本文提供的相对校正因子及定位方法,选用另外4种成分中任一作为参照时也可得到较好的定位、定量效果。本研究结果解决了“一测多评”对待测组分色谱法准确定位的难题。

本研究建立了一个准确、重复性好、快速经济的三七多种皂苷成分的“一测多评”定量方法,提高了三七质量控制标准的水平,并为“一测多评”法在中药质控中的推广应用提供了更充分的依据。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:11.
[2] Yoo H S, Yoon J, Lee G H, et al. Best case series program sup-

portive cases of *Cordyceps militaris*- and *Panax notoginseng*-based anticancer herbal formula[J]. Integr Cancer Ther, 2011, 10(4): NPI.

[3] Sun S, Qi L W, Du G J, et al. Red notoginseng: higher ginsenoside content and stronger anticancer potential than Asian and American ginseng[J]. Food Chem, 2011, 125(4): 1299.
[4] Yue Q X, Xie F B, Song X Y, et al. Proteomic studies on protective effects of salvianolic acids, notoginsenosides and combination of salvianolic acids and notoginsenosides against cardiac ischemic-reperfusion injury[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 141(2): 659.
[5] Chen S, Liu J, Liu X, et al. *Panax notoginseng* saponins inhibit ischemia-induced apoptosis by activating PI3K/Akt pathway in cardiomyocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 263.
[6] 王钰莹, 冯伟红, 杨菲, 等. “一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 212.
[7] 杨芳, 万丽, 胡一晨, 等. 一测多评法测定川白芷药材中3种香豆素成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 956.
[8] 黄山君, 杨琪伟, 石燕红, 等. 一测多评法测定白芍中芍药苷与芍药内酯苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 780.
[9] 冯伟红, 王智民, 张启伟, 等. 一测多评法测定秦皮药材与饮片中香豆素类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1782.
[10] 李静, 王璇, 马付勇, 等. 影响中药三七 HPLC 指纹谱的若干因素[J]. 中国天然药物, 2004(1): 34.
[11] Jia X H, Wang C Q, Liu J H, et al. Comparative studies of saponins in 1—3-year-old main roots, fibrous roots, and rhizomes of *Panax notoginseng*, and identification of different parts and growth year samples[J]. J Nat Med, 10. 1007/S11418-012-0691-6.
[12] Li J, Xie Z Z, Tang Y B, et al. Ginsenoside-Rd, a purified component from *Panax notoginseng* saponins, prevents atherosclerosis in apoE knockout mice[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 652(1/3): 104.
[13] Yang Z G, Sun H X, Ye Y P. Ginsenoside Rd from *Panax notoginseng* is cytotoxic towards HeLa cancer cells and induces apoptosis[J]. Chem Biodivers, 2006, 3(2): 187.
[14] Zhang C, Du F, Shi M, et al. Ginsenoside Rd protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity by inhibiting Ca^{2+} influx[J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(1): 121.
[15] Sun H X, Chen Y, Ye Y. Ginsenoside Re and notoginsenoside R_1 : immunologic adjuvants with low haemolytic effect[J]. Chem Biodivers, 2006, 3(7): 718.
[16] Yang C, Wang J, Zhao Y, et al. Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(2): 231.
[17] 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(12): 1211.

Systematic study on QAMS method for quality control of *Panax notoginseng*

WANG Chao-qun¹, JIA Xiu-hong¹, CHEN Ji¹, XIAO Xin-yue², WANG Xuan^{1*}, CAI Shao-qing^{3*}

(1. Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

3. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

[**Abstract**] **Objective:** To establish a quantitative method of multi-components by single marker(QAMS) for determining ginsenoside R_{g_1} , R_{b_1} , R_d , R_e and notoginsenoside R_1 for the purpose of the quality control of *Panax notoginseng*. **Method:** The relative correction factors(RCFs)between the five active saponins were determined by HPLC-DAD. With any of the five constituents as reference, a QAMS method was established for detect the quantitation of the other four constituents. The durability of the method was evaluated with five different HPLC instruments, five different C_{18} chromatographic columns and four detective wavelengths. Subsequently, the new QAMS method was used to determine the contents of five saponins contained in 43 batches of notoginseng samples, and compare with external standard methods, in order to evaluate the accuracy of the QAMS method. **Result:** When the five saponins were taken for reference, there was no significant difference between the contents of R_{g_1} , R_{b_1} , R_d , R_e and R_1 contained in the 43 batches of medicines calculated by the QAMS method(W_f) and the content determination result of the external standard method(W_s). The ratio of their results was (W_s/W_f)(94.02 ± 2.11)% - (99.75 ± 0.79)%, suggesting that the method was highly accurate. Their relative correction factors showed good durability, ranging between 0.42%-3.7%, 0.52%-3.5% and 0.79%-4.9%, respectively, with different chromatographic columns, different instruments and different detective wavelengths. The relative retention value method could be adopted for accurately position the chromatographic peak of the five constituents, with their values ranging between 0.18%-13%. **Conclusion:** An accurate, rapid and highly durable QAMS method is established for simultaneous determination and location of five saponins, so as to provide reliable basis for the application of the QAMS method in quality control of traditional Chinese medicines.

[**Key words**] QAMS method; HPLC; *Panax notoginseng*; ginsenoside; notoginsenoside; relative correction factor; quality control of traditional Chinese medicine; robustness

doi:10.4268/cjcmm20122220

[责任编辑 孔晶晶]