

七叶神安滴丸 UPLC 指纹图谱和一测多评含量测定方法研究*

王京辉¹, 于密密¹, 陈晶¹, 王安琪¹, 房爽²,
陈有根¹, 张云生³, 傅欣彤^{1**}, 郭洪祝^{1**}

(1. 北京市药品检验研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206; 2. 沃特世科技(北京)有限公司, 北京 101111; 3. 金七药业股份有限公司, 云南 663100)

摘要 目的: 建立七叶神安滴丸的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱鉴别方法, 同色谱条件下完成一测多评法同时测定 8 个指标成分的含量。方法: 采用 Waters CORTECS® T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.40 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 203 nm。结果: 建立七叶神安滴丸 UPLC 指纹图谱, 确立了 15 个共有峰, 15 批样品相似度均大于 0.99。并对其含量较高的 8 个成分人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、三七皂苷 Fc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、三七皂苷 Fe 和三七皂苷 Fd 采用一测多评的方法进行含量测定, 15 批次样品每丸 8 个成分含量之和在 7.6 ~ 10.0 mg。8 个成分在相应浓度范围内与峰面积的线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.8%、99.7%、99.1%、99.4%、101.8%、102.0%、99.2% 和 100.2%, RSD 分别为 2.3%、2.2%、2.0%、1.5%、1.7%、1.2%、2.4% 和 2.6%。结论: 本研究建立的七叶神安滴丸的 UPLC 指纹图谱及一测多评的含量测定方法, 操作简单, 重复性好, 稳定可靠, 可为七叶神安滴丸的质量控制提供更加全面的依据。
关键词: 七叶神安滴丸; 三七叶总皂苷; 人参皂苷; 三七皂苷; 超高效液相色谱法; 指纹图谱; 一测多评; 含量测定

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)03-0386-09
doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.03.03

Study on UPLC fingerprint and quantitative analysis of multi-components by single marker of Qiye Shen' an dropping pills*

WANG Jing-hui¹, YU Mi-mi¹, Chen Jing¹, WANG An-qi¹, FANG Shuang²,
CHEN You-gen¹, ZHANG Yun-sheng³, FU Xin-tong^{1**}, GUO Hong-zhu^{1**}

(1. Beijing Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine (Traditional Chinese Patent Medicine), Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China; 2. Waters Technologies Beijing Limited, Beijing 101111, China; 3. Jinqi Pharmaceutical Co., Ltd., Yunnan 663100, China)

Abstract Objective: To establish the ultra high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Qiye Shen' an dropping pills, and to determine the contents of 8 index components by quantitative analysis of

* 国家药典委员会标准制修订研究课题(2020Z006)

** 通信作者 郭洪祝 Tel:18010281003; E-mail: guohz@bidc.org.cn

傅欣彤 Tel:18010281078; E-mail: fuxintong68@163.com

第一作者 王京辉 Tel:18010281092; E-mail: wangjinghui@bidc.org.cn

于密密 Tel:18010281099; E-mail: 123171052@qq.com

multi-components by single marker at the same time. **Methods:** Waters CORTECS® T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) chromatography column was used for gradient elution with acetonitrile - 0.1% phosphoric acid as mobile phase, flow rate was 0.40 mL · min⁻¹, column temperature was 35 °C, detection wavelength was 203 nm.

Results: The UPLC fingerprint of Qiye Shen'an dropping pills was established, 8 common peaks were established, and the similarity of 15 batches of samples was greater than 0.99. Ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rc, panax notoginseng saponin Fc, ginsenoside Rb₂, ginsenoside Rb₃, ginsenoside Rd, panax notoginseng saponin Fe and panax notoginseng saponin Fd were determined by quantitative analysis of multi-components by single marker method. The contents of 8 components in 15 batches were between 7.6 - 10.0 mg per pill. The average recoveries were 99.8%, 100.6%, 99.8%, 101.2%, 102.1%, 101.9%, 99.7% and 100.2% respectively, and the RSDs were 2.3%, 2.2%, 2.0%, 1.5%, 1.7%, 1.2%, 2.4% and 2.6% respectively. **Conclusion:** The UPLC fingerprint of Qiye Shen'an dropping pills and the content determination method of quantitative analysis of multi-components by single marker method established in this study are simple to operation, and have good repeatability, stability and reliability, and can provide a more comprehensive basis for the quality control of Qiye Shen'an dropping pills.

Keywords: Qiye Shen'an dropping pills; total saponins from panaxnotpginseng stem and leaf; ginsenoside; panax notoginseng saponin; UPLC; fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single marker; quality control

三七为五加科人参属植物,是常用的活血化瘀中药,随着市场需求的增加,综合利用三七各部位,充分开发利用三七具有重要意义。三七茎叶是三七的活性部位之一,有研究表明其主要活性成分三七茎叶总皂苷,具有益气安神、活血止痛、止血、安神之功。七叶神安滴丸为独家生产的品种,其主要成分为三七叶总皂苷,用于心气不足、失眠、心悸、胸痹、心痛或肿瘤、痈肿疮毒及出血症,临床上还用于神经衰弱、偏头痛、失眠等症的治疗,尤其对失眠有显著疗效^[1-5]。

中药成分复杂,单一指标成分难以全面评价中药质量优劣。指纹图谱具有整体性特点,可在整体上表征中药化学成分,是目前中药制剂质量的有效手段之一。一测多评法实现了采用1个对照品同时测定多个成分含量的目的,解决了中药对照品昂贵、稀缺等问题,同时也简化操作,可多维度控制中药的质量^[6-11]。指纹图谱和一测多评含量测定方法相结合,可以很好地解决中药多成分定性定量问题,以及保证产品质量和批间的一致性。

七叶神安滴丸现行质量标准收载于国家药品标准,该标准规定了皂苷类成分的理化鉴别和人参皂苷 Rb₁、Rb₃液相色谱鉴别,以及 HPLC 法测定人参皂苷 Rb₃的含量,质控指标单一,不能全面反映产品质量。

研究发现,三七茎叶中含有较为丰富的达玛烷型皂苷类成分,在抗抑郁、抗焦虑、调节血脂、保护心脑血管等方面有较好的活性,主要包括人参皂苷 Rb₁、Rb₃、Rc 及三七皂苷 Fa、Fc、Fe 等^[12],因此仅采用单一成分评价其质量,缺少科学性。文献已对三七地上地下部分多种成分采用 HPLC、UPLC(MS)等检测手段进行了研究^[13-20]。本研究对七叶神安滴丸的质量标准进行了全面提高完善,增加了指纹图谱测定项,采用一测多评方法,以人参皂苷 Rb₃为对照,测定了三七叶中人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、三七皂苷 Fc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd、三七皂苷 Fe、三七皂苷 Fd 8 个皂苷类成分的含量,其中人参皂苷 Rc、三七皂苷 Fc、三七皂苷 Fe、三七皂苷 Fd、三七皂苷 Fe 为三七地上部位特有成分,因此建立的方法可用于控制七叶神安滴丸制剂的一致性和质量评价,为三七茎叶类制剂质控指标的建立提供了参考。

1 仪器及试剂

超高效液相色谱仪 Waters ACQUITY H-CLASS 2 台, UltraPerformance LC 1 台, Empower3 工作站; Waters CORTECS® T3 色谱柱,规格均为 150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm, 柱号分别为 01123905015414、01183034215310、01183034215334; 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多公司)。

对照品人参皂苷 Rb₁ (批号 110704 - 202028, 纯度 93.1%), 人参皂苷 Rb₂ (批号 111715 - 201203, 纯度 93.8%), 人参皂苷 Rb₃ (批号 111686 - 202005, 纯度 96.5%), 人参皂苷 Rd (批号 111818 - 201603, 纯度 92.1%), 购自中国食品药品检定研究院。人参皂苷 Rc (批号 DSTDR001301, 纯度 99.48%), 三七皂苷 Fc (批号 DSTDR019501, 纯度 99.58%), 三七皂苷 Fe (批号 DST2010025 - 037, 纯度 98.82%), 三七皂苷 Fd (批号 DSTDS013601, 纯度 99.42%), 购自成都德思特生物技术有限公司。

样品共由企业提供, 共 15 批次, 为 S1 ~ S15。

乙腈为色谱纯, 甲醇、磷酸为优级纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters CORTECS[®] T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 7.0 min, 30%A; 7.0 ~ 11.5 min, 30%A → 33%A; 11.5 ~ 16.0 min, 33%A → 43%A; 16 ~ 20.0 min, 43%A → 55%A; 20.0 ~ 23.0 min, 55%A → 95%A; 23.0 ~ 26.0 min, 95%A), 检测波长 203 nm, 柱温 35 °C, 流速 0.40 mL · min⁻¹, 进样量 1 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液的配制 取对照品人参皂苷 Rb₃ 适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.6 mg 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的配制 取重量差异项下的本品 6 丸, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 密塞, 称量, 超声 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 处理 10 min, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 指纹图谱研究

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S12), 按照“2.1”项色谱条件进样, 仪器精密度 6 针之间的相似度为 1.000, 不同序列号色谱柱相似度在 0.998 ~ 1.000, 不同品牌仪器相似度在 0.996 ~ 0.999, 表明方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验 按照“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 (S12) 6 份, 按照“2.1”项色谱条件进样分析, 每 2 个供试品之间比较相似度为 1.000, 表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S12), 分别于 0、1、2、4、8、16、24 h 进样, 记录色谱图。每 2 针

之间相互比较相似度为 1.000, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 耐用性考察 采用 3 批次样品 (S10、S11、S12), 分别用 3 根同品牌不同柱号色谱柱, 3 台超高效液相色谱仪 (①H - CLASS; ②H - CLASS; ③Ultra-Performance LC), 测定指纹图谱, 相似度测定结果 RSD 均小于 1.4%。

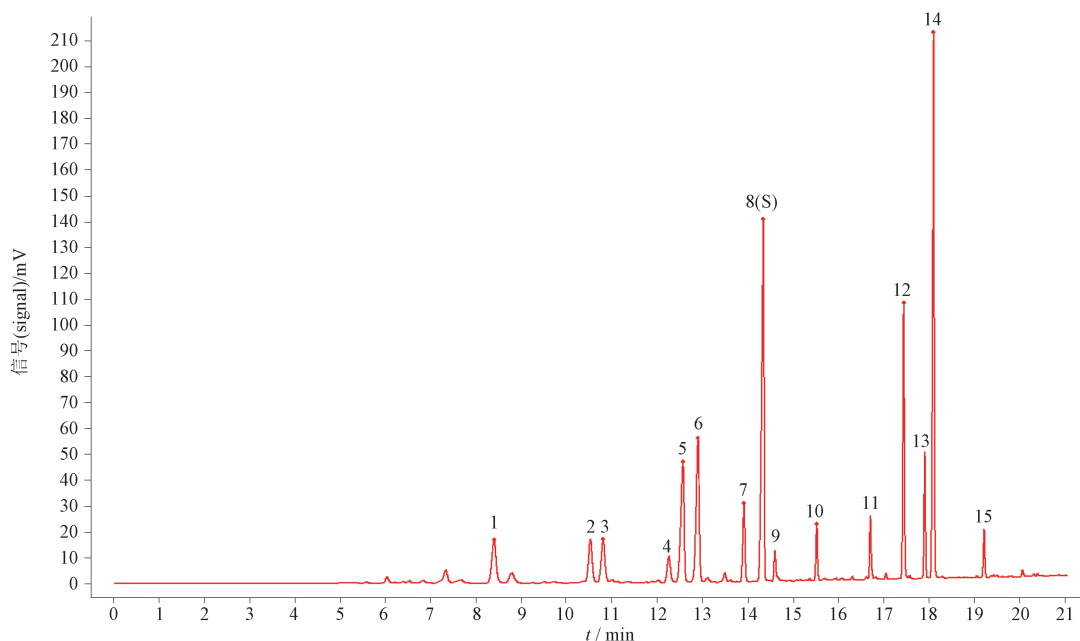
2.3.5 指纹图谱建立及特征峰的确定 使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版)”进行数据处理, 共确定了 15 个共有峰, 其中共有峰峰面积占总峰面积的 95% 以上。人参皂苷 Rb₃ 色谱峰分离度较好, 峰面积较稳定, 作为 S 峰, 经过与对照品比对, 指认出 8 个成分。对照指纹图谱见图 1。

2.3.6 指纹图谱相似度分析 以 21 批次三七叶总皂苷生成的对照图谱为对照图谱进行匹配, 计算 15 批七叶神安滴丸的相似度, 相似度均 > 0.99; 样品之间的相互比较, 均大于 0.98, 表明样品不同批次间质量稳定, 测定方法准确可靠。见图 2。

2.4 含量测定

2.4.1 相对校正因子的测定 采用校准曲线相对斜率法及浓度法 2 种方法, 以人参皂苷 Rb₃ 为对照, 测定其他 7 个指标成分相对于人参皂苷 Rb₃ 的校正因子。将 8 个皂苷类成分混合对照品溶液注入超高效液相色谱仪, 提取各成分校准曲线的斜率, 以人参皂苷 Rb₃ 斜率/待测成分斜率得出校正因子; 再分别制成不同浓度的对照品溶液, 采用同一台仪器, 不同色谱柱和同一色谱柱不同仪器进行测定, 考察测定成分在不同色谱柱和不同仪器上的重现性, 结果 RSD 均小于 5%, 并得出校正因子; 经比较, 校正因子斜率法和浓度法校正因子测定结果 RSD 均在 2.0% 以下。最终确定了 7 个皂苷类成分相对于人参皂苷 Rb₃ 校正因子和相对保留时间, 可用于一测多评方法测定七叶神安滴丸中 8 个皂苷类成分。见图 3。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 (含人参皂苷 Rb₁ 0.152 6 mg · mL⁻¹, 人参皂苷 Rc 0.384 6 mg · mL⁻¹, 三七皂苷 Fc 0.410 1 mg · mL⁻¹, 人参皂苷 Rb₂ 0.132 7 mg · mL⁻¹, 人参皂苷 Rb₃ 0.783 6 mg · mL⁻¹, 人参皂苷 Rd 0.070 8 mg · mL⁻¹, 三七皂苷 Fd 0.224 2 mg · mL⁻¹, 三七皂苷 Fe 0.505 7 mg · mL⁻¹) 0.2、0.4、0.8、1.2、1.5、2.0、2.5 μL, 注入 UPLC 仪; 记录色谱图, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积



3. 人参皂苷 Rb₁ (ginsenoside Rb₁) 5. 人参皂苷 Rc (ginsenoside Rc) 6. 三七皂苷 Fc (panax notoginseng saponin Fc) 7. 人参皂苷 Rb₂ (ginsenoside Rb₂) 8(S). 人参皂苷 Rb₃ (ginsenoside Rb₃) 10. 人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd) 12. 三七皂苷 Fe (panax notoginseng saponin Fe) 14. 三七皂苷 Fd (panax notoginseng saponin Fd)

图 1 对照指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of reference substances

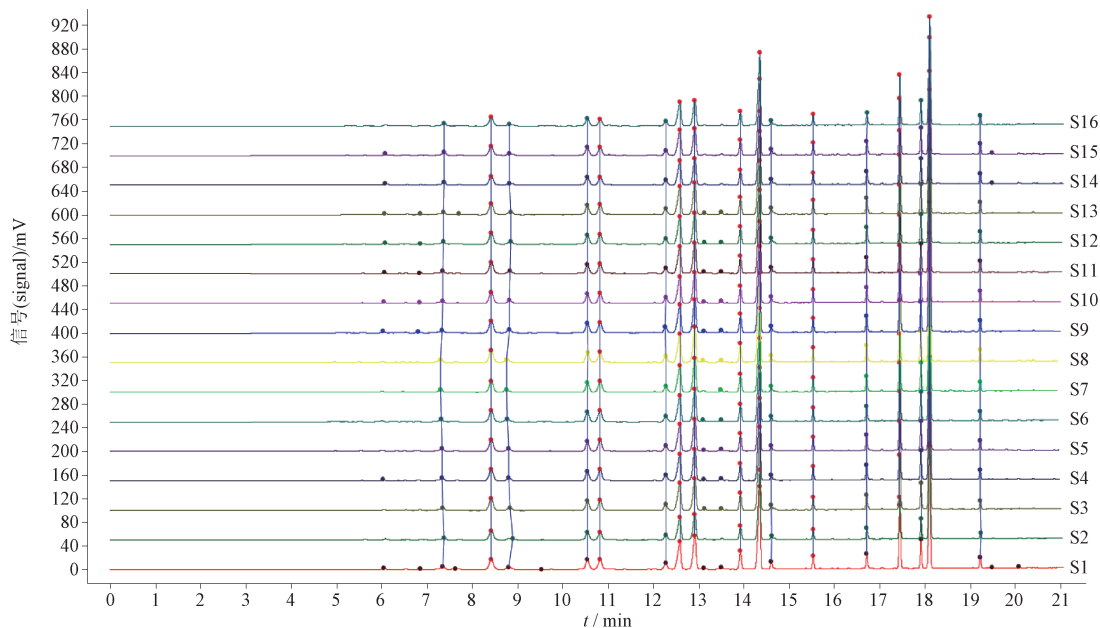


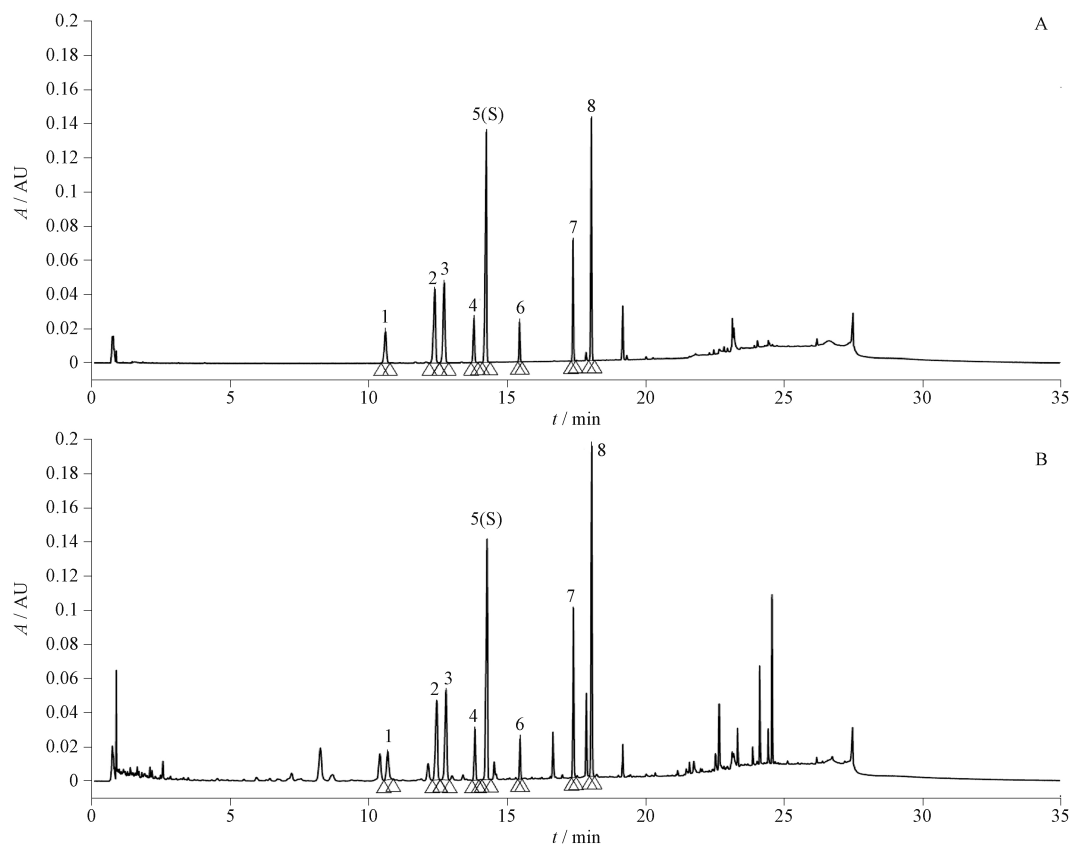
图 2 15 批次样品测定结果

Fig. 2 Fingerprints of 15 batches of samples

为纵坐标 (Y), 计算回归方程。结果见表 1。

2.4.3 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (S12) 1 μL, 连续重复进样 6 次, 8 个成分峰面积的 RSD < 2%, 表明方法精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (S12) 1 μL, 分别于配制后 0、1、2、4、8、16、24 h, 依法测定, 结果表明, 供试品溶液在 24 h 内基本稳定, 峰面积的 RSD < 2%。



1. 人参皂苷 Rb₁ (ginsenoside Rb₁) 2. 人参皂苷 Rc (ginsenoside Rc) 3. 三七皂苷 Fc (Panax notoginseng saponin Fc) 4. 人参皂苷 Rb₂ (ginsenoside Rb₂) 5(S). 人参皂苷 Rb₃ (ginsenoside Rb₃) 6. 人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd) 7. 三七皂苷 Fe (Panax notoginseng saponin Fe) 8. 三七皂苷 Fd (Panax notoginseng saponin Fd)

图 3 混合对照品溶液(A)及样品溶液(B)的 UPLC 色谱图

Fig. 3 UPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

表 1 8 个皂苷类成分线性关系考察

Tab. 1 Linear relationship and range of eight reference substances

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/μg
人参皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	$Y = 7.007 \times 10^5 X - 4.071 \times 10^3$	0.999 5	0.030 5 ~ 0.381 5
人参皂苷 Rc (ginsenoside Rc)	$Y = 6.209 \times 10^5 X - 1.589 \times 10^4$	0.999 9	0.076 9 ~ 0.961 6
三七皂苷 Fc (panax notoginseng saponin Fc)	$Y = 5.894 \times 10^5 X - 8.725 \times 10^3$	0.999 9	0.082 0 ~ 1.025 3
人参皂苷 Rb ₂ (ginsenoside Rb ₂)	$Y = 7.228 \times 10^5 X - 3.846 \times 10^3$	0.999 9	0.026 5 ~ 0.331 7
人参皂苷 Rb ₃ (ginsenoside Rb ₃)	$Y = 7.099 \times 10^5 X - 2.570 \times 10^4$	0.999 9	0.175 8 ~ 2.197 8
人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	$Y = 8.470 \times 10^5 X - 2.122 \times 10^3$	0.999 9	0.014 2 ~ 0.177 0
三七皂苷 Fe (panax notoginseng saponin Fe)	$Y = 7.445 \times 10^5 X - 6.547 \times 10^3$	0.999 9	0.044 8 ~ 0.560 5
三七皂苷 Fd (panax notoginseng saponin Fd)	$Y = 6.664 \times 10^5 X - 1.371 \times 10^4$	0.999 9	0.101 1 ~ 1.264 3

2.4.5 重复性试验 按“2.2.2”方法,对同一批号样品(S12),平行制备供试品溶液 6 份,进行测定,结果 8 个成分含量分别为 9.045 3、25.284 0、27.943 5、9.277 4、48.391 9、4.504 4、20.072 2、50.564 6 mg·

g⁻¹, RSD 分别为 2.8%、2.6%、2.6%、2.6%、2.5%、2.6%、2.5%、2.5%,表明方法重复性良好。

2.4.6 准确度及范围试验 采用加样回收法,精密称取已知含量的同一批样品(S12,含人参皂苷 Rb₁

9.045 3 mg · g⁻¹、人参皂苷 Rc 25.284 0 mg · g⁻¹、三七皂苷 Fc 27.943 5 mg · g⁻¹、人参皂苷 Rb₂ 9.277 4 mg · g⁻¹、人参皂苷 Rb₃ 48.391 9 mg · g⁻¹、人参皂苷 Rd 4.504 4 mg · g⁻¹、三七皂苷 Fe 20.072 2 mg · g⁻¹、三七皂苷 Fd 50.564 6 mg · g⁻¹) 0.1、0.15、0.30 g, 加入 7 个混合对照品溶液(含人参皂苷 Rb₁ 0.305 2 mg · mL⁻¹、人参皂苷 Rc 0.769 2 mg · mL⁻¹、三七皂苷 Fc 0.820 2 mg · mL⁻¹、人参皂苷 Rb₂ 0.265 4 mg · mL⁻¹、人参皂苷 Rd 0.141 6 mg · mL⁻¹、三七皂苷 Fe 0.448 4

mg · mL⁻¹、三七皂苷 Fd 1.011 4 mg · mL⁻¹) 2.5、4.0、8.0 mL, 人参皂苷 Rb₃ 对照品溶液(浓度为 1.475 5 mg · mL⁻¹) 2、4、8.0 mL, 2 种混合对照品溶液(含三七皂苷 Fe 0.561 3 mg · mL⁻¹、三七皂苷 Fd 1.371 4 mg · mL⁻¹) 1.0、2.0、4.0 mL, 加甲醇至 20 mL, 称量, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz) 10 min, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 平行制备 3 份, 依法测定, 结果表明本方法具有良好的准确度, 数据见表 2。

表 2 8 个成分的加样回收率测定结果(n=3)

Tab. 2 The recovery rate of 8 components

成分 (component)	加入量 (added)/ mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean recovery)/%	RSD/%
人参皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	0.763 0	102.4	99.8	2.3
	1.220 7	98.0		
	2.441 5	99.0		
人参皂苷 Rc (ginsenoside Rc)	1.923 2	101.8	99.7	2.2
	3.077 1	97.4		
	6.154 1	99.9		
三七皂苷 Fc(pana notoginseng saponin Fc)	2.050 5	100.7	99.1	2.0
	3.280 8	97.2		
	6.561 6	99.3		
人参皂苷 Rb ₂ (ginsenoside Rb ₂)	0.663 4	99.3	99.4	1.5
	1.061 4	98.8		
	2.122 9	100.0		
人参皂苷 Rb ₃ (ginsenoside Rb ₃)	2.951 0	103.8	101.8	1.7
	5.901 9	100.4		
	11.803 9	101.0		
人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	0.353 9	101.8	102.0	1.2
	0.566 2	102.6		
	1.363 4	102.6		
三七皂苷 Fe (panax notoginseng saponin Fe)	1.682 3	102.1	99.2	2.4
	2.916 2	97.1		
	5.832 4	98.3		
三七皂苷 Fd(panax notoginseng saponin Fd)	3.899 9	103.4	100.2	2.6
	6.788 4	98.1		
	13.576 8	99.0		

2.4.7 耐用性考察 取 3 批(S10、S11、S12)样品, 分别用 3 根同品牌不同柱号色谱柱, 3 台超高效液相色谱仪, 对 8 个成分及总量进行测定, 结果 RSD < 6.0%。

2.5 样品含量测定

取 15 批样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下条件进样测定, 计算得 8 个成分含量, 结果见表 3。

表3 七叶神安滴丸中8个成分含量测定结果

Tab.3 The content result determination of 8 components in Qiye Shen'an dropping pills

成分 (component)	每丸含量(content per pill)/mg	SD
人参皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	0.44	±0.066
人参皂苷 Rc (ginsenoside Rc)	1.27	±0.083
三七皂苷 Fc (pana notoginseng saponin Fc)	1.41	±0.12
人参皂苷 Rb ₂ (ginsenoside Rb ₂)	0.46	±0.031
人参皂苷 Rb ₃ (ginsenoside Rb ₃)	2.50	±0.16
人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	0.22	±0.018
三七皂苷 Fe (panax notoginseng saponin Fe)	1.01	±0.070
三七皂苷 Fd (panax notoginseng saponin Fd)	2.54	±0.20
总含量(totle content)	9.84	±0.70

表4 七叶神安滴丸中8个成分近似值矩阵表

Tab.4 Approximation matrix table of 8 components in Qiye Shen'an dropping pills

组分 (component)	人参 皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	人参 皂苷 Rc (ginsenoside Rc)	三七 皂苷 Fc (pana notoginseng saponin Fc)	人参 皂苷 Rb ₂ (ginsenoside Rb ₂)	人参 皂苷 Rb ₃ (ginsenoside Rb ₃)	人参 皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	三七 皂苷 Fe (panax notoginseng saponin Fe)	三七 皂苷 Fd (panax notoginseng saponin Fd)
人参皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	1.000	0.820 **	0.903 **	0.799 **	0.799 **	0.791 **	0.699 **	0.721 **
人参皂苷 Rc (ginsenoside Rc)	-	1.000	0.980 **	0.987 **	0.978 **	0.808 **	0.754 **	0.771 **
三七皂苷 Fc (pana notoginseng saponin Fc)	-	-	1.000	0.971 **	0.966 **	0.853 **	0.792 **	0.816 **
人参皂苷 Rb ₂ (ginsenoside Rb ₂)	-	-	-	1.000	0.953 **	0.857 **	0.796 **	0.813 **
人参皂苷 Rb ₃ (ginsenoside Rb ₃)	-	-	-	-	1.000	0.781 **	0.782 **	0.798 **
人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	-	-	-	-	-	1.000	0.954 **	0.961 **
三七皂苷 Fe (panax notoginseng saponin Fe)	-	-	-	-	-	-	1.000	0.996 **
三七皂苷 Fd (panax notoginseng saponin Fd)	-	-	-	-	-	-	-	1.000

注(note): ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

方向)中,与其他7个成分呈正相关,载荷图中各变量的位置影响各样本在得分图中的分布,离Y轴越偏右方向,说明成分含量越高。得分图中相近的样本具有相似的属性。七叶神安滴丸样本S2中人参皂苷 Rc、Rb₁、Rb₂、Rb₃和三七皂苷 Fc 含量较高,样品S13~S15 较低;样本S1 中人参皂苷 Rd 和三七皂苷 Fd、Fe 含量最低。样本S1、S13~S15 含量较为接近,样本S3、S5、S6、S10~S12 含量较为接近,样本S2、S4、S7~S9 含量较为接近。

3 讨论与总结

3.1 色谱条件的考察

研究考察了多个品牌和型号的色谱柱10余种,最终选用了Waters CORTECS®T3 型号色谱柱(150 mm ×

2.6 数据分析

2.6.1 相关性分析 将15批次样品8个成分的含量测定结果进行皮尔逊相关性分析,得到相关性矩阵,见表4。显著性检验结果 $P < 0.05$,各变量之间有显著统计学意义, $P < 0.01$,各变量之间有极其显著统计学意义;当变量为0.8~1.0,0.6~0.8时,相关性为极强相关和强相关。从相关系数矩阵表中可以看出七叶神安滴丸中各成分的相关系数均 > 0.7 ,且显著性均 $P < 0.002$,说明各成分呈高度相关。

2.6.2 主成分分析 对15批次样品8个成分的含量测定结果进行主成分分析,见图4。提出第一个主成分,可解释87.3%的变量。在得分图(Scores)和载荷图(Loadings)中可以看出,在第一个成分(水平

2.1 mm,1.6 μm)。对流动相比比例也进行了考察,考察流动相A:乙腈;流动相B:①水、②0.1%磷酸水溶液、③0.2%磷酸水溶液,经比较色谱图没有明显差异,最终流动相B选择了0.1%磷酸水溶液。根据使用色谱柱填料的极性,试用不同的洗脱程序,以得到最好的分离效果,比较各色谱柱的分离效果,最终选用正文中的梯度洗脱。比较了柱温30、35、40℃时色谱图的分离情况,35℃效果最佳。

3.2 供试品溶液制备方法的考察

取滴丸6粒,精密称定,分别精密加入甲醇、90%甲醇水、80%甲醇水、70%甲醇水、60%甲醇水、50%甲醇水,经过比较,无明显差异,最终选用甲醇作为提取溶剂。

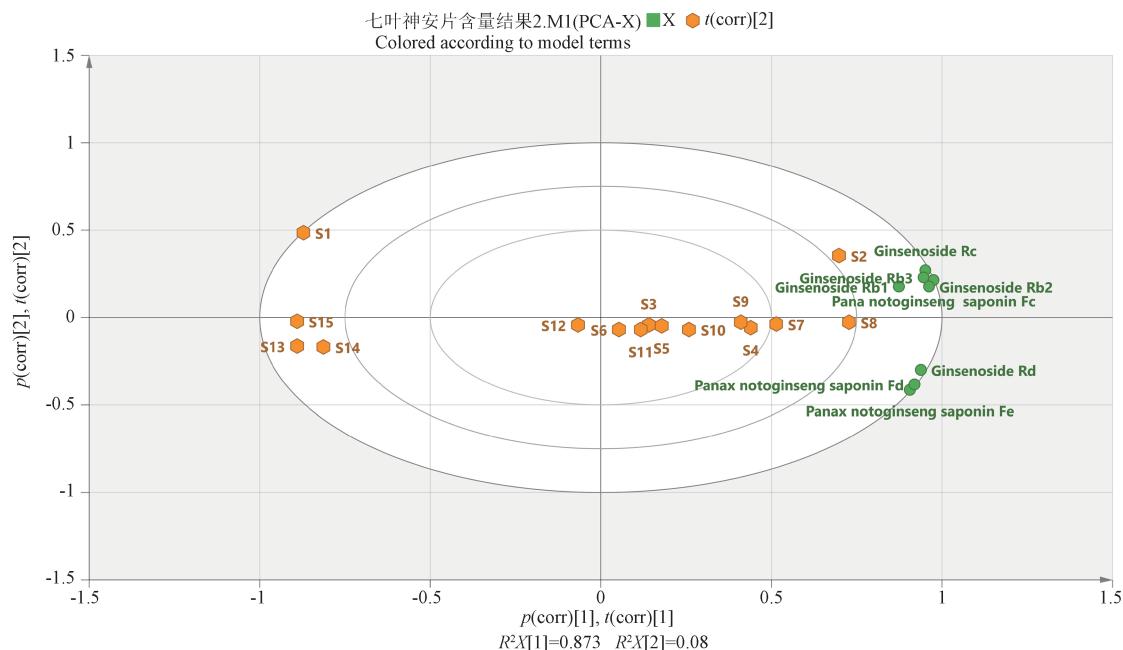


图4 七叶神安滴丸主成分分析结果图

Fig.4 PCA of 8 components in Qiye Shen'an dropping pills

3.3 色谱峰的识别

经过文献查询^[12],皂苷类和三七皂苷类成分,本研究共购得 18 个人参皂苷和三七皂苷,通过定位发现三七叶中成分与三七花相近,与三七根及茎所含皂苷类成分相差较远,即三七地上和地下部分成分差异比较大,三七根及根茎含三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b₁} 含量较高,人参皂苷 R_{b₃} 含量较低,而三七叶皂苷中几乎不含有三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b₁} 含量较低,人参皂苷 R_{b₃} 含量较高。本研究适当调整流动相极性比例,经过定位确定 9 个皂苷类成分可以用于定量研究,分别为人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 R_c、三七皂苷 F_c、人参皂苷 R_{b₂}、人参皂苷 R_{b₃}、人参皂苷 R_d、三七皂苷 F_e、三七皂苷 F_d、20 - ((S) - 人参皂苷 F₂)。后经不同仪器和不同色谱柱比较,发现 20 - ((S) - 人参皂苷 F₂) 被分离成 2 个色谱峰,最终确定人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 R_c、三七皂苷 F_c、人参皂苷 R_{b₂}、人参皂苷 R_{b₃}、人参皂苷 R_d、三七皂苷 F_e 8 个成分做为指控指标。

3.4 一测多评方法与对照品测定结果比较

采用 3 批次(S10、S11、S12)样品,分别采用一测多评方法和对照品方法计算 8 个成分的含量及总量,结果 RSD 均小于 5.0%。

3.5 总结

七叶神安滴丸的配伍组成较为简单,作为中药处方,在具有镇痛、镇静、改善睡眠等方面具有良好的效果,目前七叶神安滴丸市场需求量扩大,应用前景较好。但七叶神安滴丸的质量控制还较为落后,因此提高质量控制水平对提高产品质量,保证用药安全意义重大。本研究采用 UPLC 法建立了七叶神安滴丸指纹图谱,并用一测多评的方法同时测定其中 8 个成分的含量,该方法简便易操作,重复性好,能更全面、准确地控制七叶神安滴丸的质量,整体反映了其化学成分特征,且选用的测定成分和活性相关,为其质量综合评价提供了科学依据。

参考文献

- [1] 杨晓艳. 小剂量多塞平片联合七叶神安滴丸治疗失眠伴焦虑疗效观察[J]. 中医临床研究, 2015, 7(7): 12
YANG XY. Effective observation on treating insomnia with anxiety with doxepin tablets plus the Qiye Shenan pill[J]. Clin J Chin Med, 2015, 7(7): 12
- [2] 马妮, 赵爱, 曾鸿超, 等. 七叶神安滴丸长期毒性试验研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(6): 46
MAN, ZHAO A, ZENG HC, et al. Study on long-term toxicity of Qiyeshenan Diwan[J]. Res Pract Chin Med, 2011, 25(6): 46
- [3] 高维明, 周原, 任小宇. 三七茎叶皂苷对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 现代药物与临床, 2019,

- 34(6): 1615
GAO WM, ZHOU Y, REN XY. Protection of *Panax notoginseng* leaves on acute myocardial ischemia induced by isoprenaline in rats[J]. *Drugs Clin*, 2019, 34(6): 1615
- [4] 王钢, 陈琼芳, 李钊飞, 等. 三七总皂苷及其主要成分对脑细胞保护作用的机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(7): 1743
WANG G, CHEN QF, LI ZF, *et al.* Study progress on mechanism of protective effect of PNS and its major components on brain cell [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2017, 35(7): 1743
- [5] 余佳丽, 唐晓章, 周菲, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(7): 18
YU JL, TANG XZ, ZHOU F, *et al.* Analysis of fingerprint of *Panax notoginseng* Radix et Rhizoma - panaxadiol saponins and their quality transmitting of components group [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(7): 18
- [6] 黎江华, 刘玉杰, 黄永亮, 等. 一测多评法测定熟三七中7种皂苷类成分的含量[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10): 2363
LI JH, LIU YJ, HUANG YL, *et al.* Simultaneous determination of seven saponins in steamed *Panax notoginseng* by quantitative analysis of multi - components by single marker [J]. *Lishzhen Med Mater Med Res*, 2017, 28(10): 2363
- [7] 孟祥松, 蒋磊, 于现花, 等. 三七花及其易混淆品 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(6): 8
MENG XS, JIANG L, YU XH, *et al.* Identification of notoginseng flower and its adulterants by HPLC fingerprint chromatogram [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2018, 20(6): 8
- [8] 张迅杰, 赫军, 柳芳, 等. 人参和三七 HPLC 特征图谱研究[J]. *山东中医药大学学报*, 2017, 41(4): 372
ZHANG XJ, HAO J, LIU F, *et al.* Study on HPLC characteristic fingerprint of *Panax Ginseng* Radix C. A. Mey. and *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med*, 2017, 41(4): 372
- [9] 毕晓伟, 张璐璐, 张艳. 一测多评法同时测定三七伤药片中6种活性成分[J]. *中国药师*, 2018, 21(8): 1490
BI XW, ZHANG LL, ZHANG Y. Determination of six active constituents in Sanqi Shangyao tablets by quantitative analysis of multi - components by single marker [J]. *Chin Pharm*, 2018, 21(8): 1490
- [10] 刘阳, 段志敏, 熊宏苑, 等. 云南文山鲜三七花、茎、叶、根中人参皂甙成分测定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3864
LIU Y, DUAN ZM, XIONG HY, *et al.* Determination of ginsenosides in flower, stem, leaf and root of fresh *Panax notoginseng* from Wenshan, Yunnan province [J]. *J Food Safet Qual*, 2017, 8(10): 3864
- [11] 吴芸. 一测多评法测定血塞通注射液中5种成分含量[J]. *中医导报*, 2018, 24(11): 66
WU Y. Quantitative analysis of 5 components in Xuesaitong injection by QAMS [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharmacol*, 2018, 24(11): 66
- [12] 黄朝蓉, 杨兆祥. 三七茎叶中皂苷成分及药理作用研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2022, 31(23): 51
HYANG CR, YANG ZX. Advances in studies on constituents and pharmacological effects of saponins in stem leaves of *Panax notoginseng* [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2022, 31(23): 51
- [13] 李瑞明, 杨梦雅, 罗学军, 等. 三七叶中人参皂苷 Rb₃ 及总皂苷质量差异研究[J]. *天津药学*, 2021, 33(4): 1
LI RM, YANG MY, LUO XJ, *et al.* Study on the difference of ginsenoside Rb₃ and total saponins in the leaves of *Panax notoginseng* [J]. *Tianjin Pharm*, 2021, 33(4): 1
- [14] 林灵超, 林雪志, 周小靖. 高效液相色谱法快速测定七叶神安片中的人参皂苷 Rb₃ [J]. *化学分析计量*, 2019, 28(6): 66
LIN LC, LIN XZ, ZHOU XJ. Rapid determination of ginsenoside Rb₃ in Qiyeshen 'an tablets by HPLC [J]. *Chem Anal Meter*, 2019, 28(6): 66
- [15] 雷蓉, 赵振霞, 刘永利, 等. 超高效液相色谱法同时测定三七的叶和花中3个皂苷类成分含量[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(7): 1146
LEI R, ZHAO ZX, LIU YL, *et al.* Simultaneous determination of three saponins in leaves and flower buds of *Panax notoginseng* by UPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(7): 1146
- [16] 沙孟晨, 周永峰, 张海珠, 等. 三七不同部位化学成分的差异性研究[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(7): 832
SHA MC, ZHOU YF, ZHANG HZ, *et al.* Study on differences of chemical components in different parts of *Panax notoginseng* [J]. *Mod Chin Med*, 2018, 20(7): 832
- [17] 鞠康, 胡云飞, 徐倩, 等. 三七花质量控制方法研究进展[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2018, 39(12): 1425
JIU K, HU YF, XU Q, *et al.* The research progress of *Panax notoginseng* flower quality control methods [J]. *J Qiqihar Univ Med*, 2018, 39(12): 1425
- [18] 赵振霞, 王敏, 段吉平, 等. 三七叶、三七花质量标准研究[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(8): 979
ZHAO ZX, WANG M, DUAN JP, *et al.* Quality specification study of leaves and flower buds of *Panax notoginseng* [J]. *Mod Chin Med*, 2018, 20(8): 979
- [19] 赵振霞, 王敏, 王晓蕾, 等. 心可舒胶囊中非法添加三七茎叶的 UPLC/MS/MS 法检测[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(3): 619
ZHAO ZX, WANG M, WANG XL, *et al.* Determination of *Panax notoginseng* leaves illegally added in Xinkeshu capsules by UPLC/MS/MS [J]. *Lishenzhen Med Mater Med Res*, 2019, 30(3): 619
- [20] 陈玉勇, 秦枫, 朱善元, 等. 液相色谱 - 串联质谱检测田七花总皂苷中三七皂苷 R₁ 的含量[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(12): 319
CHEN YY, QIN F, ZHU SY, *et al.* Determination notoginsenoside R₁ in the total saponins of Tianqi flowers by UPLC - MS/MS [J]. *Jiangsu Agr Sci*, 2019, 42(12): 319

(本文于2024年2月26日修改回)