一测多评法与外标法测定养血止疼丸中 3 种丹参酮类成分

武爱玲[1,2]

（1 河南省洛阳正骨医院，洛阳，471002；2 河南省洛正药业有限责任公司，洛阳，471013）

摘要　目的：采用一测多评法测定养血止疼丸中丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮ⅡA 的含量，验证一测多评法（QAMS）的适用性。方法：以丹参酮ⅡA 为内参物，建立其与丹参酮Ⅰ、隐丹参酮的相对校正因子，考察不同仪器、不同色谱柱对相对校正因子的影响。分别用外标法测定丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮ⅡA 的含量，后者与计算值进行比较。结果：10 批养血止疼丸中丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮ⅡA 的含量可以用一测多评法进行测定，隐丹参酮、丹参酮Ⅰ含量的计算值与实测值间无显著差异。结论：一测多评法可用于养血止疼丸中丹参酮类成分的含量测定。

关键词　一测多评；高效液相色谱法；养血止疼丸；丹参酮

Simultaneous Determination of 3 Tanshinones in Yangxue Zhiteng Pill by QAMS

Wu Ailing[1,2]

（1 *Henan Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital*, *Luoyang* 471002, *China*; 2 *Henan Luozheng Pharmaceutical Limited Liability Company*, *Luoyang* 471013, *China*）

Abstract　**Objective**: To determine the contents of three tanshinones in Yangxue Zhiteng Pill by QAMS and to validate its feasibility. **Methods**: The tanshinone IIA as the internal reference substance, the relative correction factor of tanshinone I and cryptotanshinone were determined by HPLC on different instruments and chromatographic columns. The content of tanshinone IIA in Yangxue Zhiteng Pill was authentically determined by the external standard method, and the content of tanshinone I and cryptotanshinone was calculated by external standard method and relative correction factor respectively. **Results**: The QAMS could determine the content of tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA. No significant differences between the quantitative results of QAMS and external standard method were observed. **Conclusion**: The QAMS can determine the quality of content of tanshinone in Yangxue Zhiteng Pill.

Key Words　Quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); HPLC; Yangxue Zhiteng Pill; Tanshinone

中图分类号：R284.1　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2017.11.055

一测多评法是通过测定中药中一种代表性成分的含量，依据相对校正因子推算该中药中多种待测成分含量[1-3]，并使计算值与实测值满足定量方法学要求的一种多指标成分同步含量测定方法。“一测多评”法作为一种适合中药特点的多指标质量评价新模式，到目前为止，已在木瓜[4]、虎杖[5]、黄柏[6]、甘草[7]等单味中药材，以及金银花复方制剂[8]、复方丹参片[9]、穿心莲及其制剂[10]、湿疹软膏[11]等制剂的多指标含量测定中得到应用。

养血止疼丸是河南省洛阳正骨医院内部制剂，处方组成：丹参、鸡血藤、香附等，具有活血行气，温经通络。用于血瘀寒凝、膝关节骨质增生引起的膝关节疼痛、肿胀、活动受限等症。丹参是其主要药味，隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA 均是丹参中脂溶性成分，具有扩张血管，改善微循环，抑制血小板凝集等作用。为建立养血止疼丸的多成分含量测定方法，本文建立了养血止疼丸中丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA、隐丹参酮的一测多评测定方法，并对一测多评法用于养血止疼丸中丹参酮类成分含量测定的可行性进行了分析。

1　仪器与试药

1.1　仪器　Waters 2695 高效液相色谱仪，2998 PDA Detector（美国 Waters 公司），Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；METTLER AE200 电子分析天平，AB135-S 型梅特勒拖利多电子天平。色谱柱：Waters Symmetry C_{18}，Inertsil® ODS-3，Agilent Pursuit5 C_{18}，Wondasil® C_{18}（5 μm，4.6 mm × 250 mm）。

1.2　试剂　对照品：中国食品药品检定研究院隐丹参酮（批号：110852-200806）、丹参酮Ⅰ（批号：

基金项目：河南省洛正药业有限责任公司科技攻关资助项目（LZZKJ-BZ-032）——养血止疼丸质量控制标准提高研究

作者简介：武爱玲（1978.05—），女，硕士，主管药师，研究方向：中药制剂开发与研究，E-mail：wal2317@163.com

110867-200406)、丹参酮ⅡA(批号:110766-200619)。水为蒸馏水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 分析样品 10 批养血止疼丸,均由河南省洛阳正骨医院制剂科提供。

2 方法与结果[12-18]

2.1 色谱条件 Waters Symmetry C_{18}柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);以甲醇-水(75∶25)为流动相;检测波长为 268 nm,柱温为 20 ℃;进样量:10 μL。以丹参酮ⅡA 峰计理论塔板数不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA 对照品,置容量瓶中,加甲醇溶解,并定容至刻度,摇匀,得浓度分别为 20.5、20.3、19.8 μg/mL 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取养血止疼丸细粉约 0.4 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 30 mL,并称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,得续滤液。

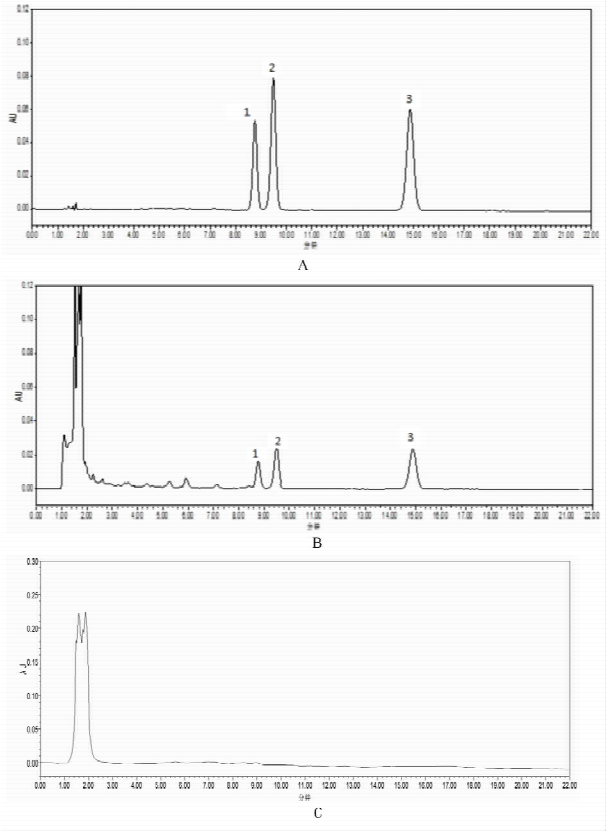

图 1 混合对照品(A)、养血止疼丸样品(B)和阴性样品(C)的色谱图

注:1 一丹参酮Ⅰ;2 一隐丹参酮;3 一丹参酮ⅡA

2.4 专属性试验 取缺丹参的阴性样品,按供试品溶液的方法制备,即得阴性对照液。在选定条件下,混合对照品和样品中隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA 分离良好,而阴性对照显示无干扰。见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 20、15、10、5、2、1 μL 进样,以进样量(X)对峰面积(Y)进行线性回归,丹参酮Ⅰ的线性方程是 Y = 223.05X + 10.27(r = 0.999 7),线性范围 0.0203 ~ 0.406 μg;隐丹参酮的线性方程是 Y = 192.71X + 7.56(r = 0.999 8),线性范围 0.0205 ~ 0.410 μg;丹参酮ⅡA 的线性方程是 Y = 269.33X + 1.83(r = 0.999 9),线性范围 0.0198 ~ 0.396 μg;表明 3 种丹参酮类成分在各浓度范围内与色谱峰面积的线性关系良好。

2.6 相对校正因子计算 内参物定为丹参酮ⅡA,参照相对校正因子的公式计算丹参酮Ⅰ、隐丹参酮相对丹参酮ⅡA 的相对校正因子。见表 1。

表 1 丹参酮类成分相对校正因子

进样量(μL)	$RCF_{丹参酮ⅡA/丹参酮Ⅰ}$	$RCF_{丹参酮ⅡA/隐丹参酮}$
20	1.061	1.593
15	1.103	1.621
10	1.092	1.582
5	1.12	1.581
2	1.087	1.617
1	1.089	1.601
平均值	1.092	1.599
RSD/%	1.79	1.07

相对校正因子 RCFs/k = fs/k = Ws. Ak/As. Wk;s 为内参物,k 为待测组分。

2.7 中间精密度试验 取“2.2”项下的对照品溶液,进样 5 次,每次 10 μL,分析得丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮ⅡA 的峰面积积分值。其相对标准偏差(*RSD*)分别为 0.39%、0.82%、0.67%。表明仪器较为稳定。

2.8 供试品溶液稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0、4、6、8、12、16、20 h 进样 10 μL,进行分析。丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮ⅡA 的 *RSD* 分别为 1.30%、1.96%、0.89%,表明在 20 h 内供试品溶液稳定。

2.9 重复性试验 取同一批号养血止疼丸 6 份,按“2.3”项下方法制成供试品溶液,每份进样 10 μL,测定隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA 峰面积积分值。结果 *RSD* 为 1.11%、0.78%、085%,显示该方法具有良好的重复性。

2.10 回收率试验 取 0.2 g 已知含量的养血止疼丸 6 份,分别加入适量的混合对照液,分别用“2.3”项下的方法制得供试品溶液,按照“2.1”条件测定。结果丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮ⅡA 的平均回收率

分别为 100.2%、99.87%、101.9%，*RSD* 分别为 1.65%、1.37%、0.96%。

2.11　校正因子的重复性考察　1）色谱柱及高效液相色谱仪考察：精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液 20、15、10、5、2、1 μL，进行测定，以丹参酮ⅡA 为内参物，按“2.6”项下计算丹参酮Ⅰ、隐丹参酮的相对校正因子。见表 2。结果表明，相对校正因子在不同色谱系统和不同品牌色谱柱下具有良好的适应性。2）待测组分色谱峰的定位：试验中利用 3 个成分色谱行为的不同，以丹参酮ⅡA 为基准峰计算各个化合物的相对保留时间，即确定其在色谱图中的位置。相对保留值 rk/s = tR(k)/(tR(s)，tR(k)：某指标成分的保留时间，tR(s)：内标的保留时间。见表 3。

表 2　不同仪器和色谱柱测得相对校正因子

仪器	色谱柱	RCF	
		RCF 丹参酮ⅡA/丹参酮Ⅰ	RCF 丹参酮ⅡA/隐丹参酮
Agilent 1100	Waters Symmetry C_{18}	1.161	1.556
	Inertsil® ODS-3	1.159	1.602
	Agilent Pursuit5 C_{18}	1.071	1.571
	Wondasil® C_{18}	1.102	1.543
shimadzu LC-20A	Waters Symmetry C_{18}	1.115	1.638
	Inertsil® ODS-3	1.096	1.583
	Agilent Pursuit5 C_{18}	1.123	1.592
	Wondasil® C_{18}	1.069	1.689
平均值		1.112	1.597
RSD%		3.157	2.963

表 3　不同仪器和色谱柱测得相对保留值

仪器	色谱柱	相对保留值	
		$r_{丹参酮ⅡA/丹参酮Ⅰ}$	$r_{丹参酮ⅡA/隐丹参酮}$
Agilent 1100	Waters Symmetry C_{18}	0.58	0.66
	Inertsil® ODS-3	0.57	0.68
	Waters WAT054275	0.56	0.66
	Heshin® C_{18}-DK	0.55	0.65
shimadzu LC-20A	Waters Symmetry C_{18}	0.55	0.69
	Inertsil® ODS-3	0.58	0.67
	Waters WAT054275	0.56	0.71
	Heshin® C_{18}-DK	0.53	0.7
平均值		0.56	0.68
RSD%		3.01	3.13

2.12　样品测定结果　按“2.3”项下方法制备了 10 批养血止疼丸供试品溶液，分别精密吸取 10 μL 进样分析。采用外标法和“一测多评”法分别计算丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮ⅡA 的含量。见表 4。对所得结果用 *t* 检验进行比较，表明外标法和 QAMS 法测定结果无显著性差异，将“一测多评”法用于养血止疼丸中丹参酮类成分的含量测定是可行的。

3　讨论

由于丹参酮类成分受热不稳定，故未考察热提取方式。试验采用对样品用甲醇超声处理 30 min。并考察了提取溶剂的用量，结果表明，甲醇在 30、40、50 mL 时测得的丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA 和隐丹参酮的含量差异无统计学意义（$P > 0.05$），说明甲醇用量对丹参酮类各成分的提取效率无显著影响。最后确定甲醇用量为 30 mL。

流动相的选择，试验对 5 种展开系统进行了考察。曾采用甲醇-水（70∶30）、乙腈-0.02% 磷酸溶液（80∶20）、乙腈-水（75∶25）等不同流动相，结果测定流动相为甲醇-水（75∶25）时丹参酮类成分峰形良好，可达到基线分离，与相邻峰分离度较好。

本试验的重点是色谱峰的专属性和校正因子问题。实验中 3 个丹参酮类成分在不同柱子和仪器上出峰时间有所变化，保留时间差之间有差异。但以丹参酮ⅡA 为基准峰计算的各个化合物的相对保留时间值变化不大，所以利用相对保留值能较好的解决各化合物的定位问题。

本实验只考察了丹参酮类 3 个成分的相对校正因子，且 3 个成分都属于同一类化合物。在后续实验中将采用一测多评法对不同类化合物之间的校正因子和专属性进行研究。

表 4　外标法和 QAMS 法测定养血止疼丸中 3 种丹参酮类成分含量（mg/g）

批号	丹参酮ⅡA	丹参酮Ⅰ		隐丹参酮	
		外标法	QAMS	外标法	QAMS
140601	0.34	0.15	0.17	0.21	0.20
140602	0.35	0.18	0.19	0.23	0.22
140603	0.34	0.15	0.16	0.22	0.22
140604	0.36	0.18	0.19	0.27	0.25
140605	0.37	0.19	0.21	0.25	0.23
140606	0.43	0.25	0.23	0.31	0.28
140607	0.39	0.22	0.21	0.29	0.27
140608	0.36	0.21	0.22	0.27	0.25
140609	0.35	0.20	0.21	0.25	0.23
140610	0.39	0.22	0.23	0.28	0.27

参考文献

[1]沈小钟，刘瑶，杨燕，等. 一测多评法研究进展[J]. 中国药业，2013，22(13)：1-5.

[2]王欣，覃瑶，王德江，等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药，2016，38(2)：395-402.

[3]范成杰. “一测多评”法在中药质量评价和控制中的应用概况[J]. 中药与临床，2013，4(2)：18-20.

[4]张勇，张玲，谢晓梅. 一测多评法同时测定木瓜中 2 种常见三萜酸[J]. 中成药，2013，35(4)：770-773.

[5]范玲，严冬，李爽，等. 一测多评法测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素及大黄素甲醚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(7)：103-107.

（下接第 2790 页）

产生的“辨药之难”问题,实现了煮散饮片的精准化鉴定和检测。基于多种现代技术体系为支撑的现代新型饮片,精准煮散饮片体系将成为现阶段常规饮片向“精准化”转型升级的适宜模式。

参考文献

[1]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,2015:191-192.

[2]刘文集,王玫馨,黄爱东,等. 广陈皮挥发油成分[J]. 中山医科大学学报,1991,12(2):136-138.

[3]Tao N,Jia L,Zhou H. Anti-fungal activity of Citrus reticulata Blanco essential oil against Penicillium italicum and Penicillium digitatum [J]. Food Chem,2014,153:265-271.

[4]俞静静,苏洁,吕圭源. 陈皮抗心脑血管疾病相关药理研究进展[J]. 中草药,2016,47(17):3127-3132.

[5]张海丽. 陈皮提取物的抗氧化活性研究[J]. 黑龙江医药,2014,24(2):306-309.

[6]Aasim KM, Ali M, Alam P. Phytochemical investigation of the fruit peels of Citrus reticulata Blanco[J]. Nat Prod Res,2010,24(7):610-620.

[7]吴愫青,叶莹,张俊. HPLC 测定不同产地陈皮橙皮苷的含量[J]. 中国现代中药,2008,10(8):20-22.

[8]徐海波. 中药煮散源流考[J]. 河北中医药学报,1999,41(4):11-13.

[9]刘起华,文谨,章军,等. 根及根茎类中药煮散与传统饮片有效成分煎出量对比研究[J]. 中国新药杂志,2014,23(5):591-595,605.

[10]Wang M,Zhao HX,Wang L,et al. Potential use of DNA barcoding for the identification of Salvia, based on cpDNA and nrDNA sequences[J]. Gene,2013,528(2):206-215.

[11]Chen S,Pang X,Song J,et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv,2014,32(7),1237-1244.

[12]陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京:科学出版社,2015:5-7.

[13]陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):54-61.

[14]陈士林,刘安,李琦,等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.

[15]于杰. 柑橘及其近缘属植物 DNA 条形码研制及其物种的鉴定研究[D]. 重庆:西南大学,2011.

[16]罗焜,陈士林,陈科力,等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J]. 中国科学:生命科学,2010,40(4):342-358.

[17]于杰,闫化学,鲁振华,等. 基于柑橘及其近缘属植物 DNA 条形码的叶绿体编码序列筛选[J]. 中国农业科学,2011,44(2):341-348.

[18]于杰,闫化学,鲁振华,等. 基于 matK 和 rbcLDNA 序列条形码鉴定柑橘及其近缘属植物[J]. 园艺学报,2011,38(9):1733-1740.

[19]闫化学. 柑橘及其近缘属植物 DNA 条形码研究[D]. 重庆:西南大学,2010.

(2017-01-05 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 2785 页)

[6]吴珊珊,胡昌江,吕非非,等. 一测多评法测定黄柏中 5 种生物碱[J]. 中成药,2014,36(1):130-134.

[7]刘香南,李明珠,尚晓娜,等. 一测多评法测定甘草中 6 种有效成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24):56-59.

[8]朱粉霞,张亚丽,汪晶,等. 一测多评法测定金银花复方制剂中新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸[J]. 中成药,2013,35(12):2666-2671.

[9]吴笛,臧忠良,王德勤,等. 一测多评法测定复方丹参片中 4 种丹参酮类成分的含量[J]. 中国药学杂志,2012,47(18):1509-1513.

[10]林青,匡艳辉,黄琳等. 一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分[J]. 中草药,2012,43(12):2406-2411.

[11]魏凤环,吴桂欣,朱清利,等. 一测多评法测定湿疹软膏中欧前胡素、异欧前胡素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):125-128.

[12]李晓翠,苗爱东. 一测多评法测定复方土荆皮酊中 3 种二萜类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):77-80.

[13]池絮影,崔曰新,张蜀,等. 一测多评法测定板蓝根颗粒中 4 种成分的含量[J]. 中国生化药物杂志,2015,10(35):137-140.

[14]符映均,胡浩彬. 一测多评法测定倍力舒合剂中 4 种三萜酸的含量[J]. 南京中医药大学学报,2015,3(31):277-279.

[15]黄渭,王奕. 一测多评法测定菊花中 3 个指标成分含量[J]. 医药导报,2016,35(6):645-649.

[16]郭燕娜,胡华杰. 一测多评法测定垂盆草颗粒中槲皮素、山奈素与异鼠李素含量[J]. 中国生化药物杂志,2016,4(36):199-202.

[17]朱卫敏,李玲,孙莲,等. 一测多评法测定新疆药桑叶中 4 种活性成分的含量[J]. 西北药学杂志,2016,31(1):15-18.

[18]黄丽,万佐玺. 一测多评法同时测定酸枣仁中 4 种皂苷类成分的含量[J]. 中国药师,2016,19(6):1073-1076.

(2016-08-15 收稿 责任编辑:张文婷)