

文章编号: 1006-2858(2006)04-0229-04

三七药材的指纹图谱

黎琼红, 张国刚

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立三七药材的高效液相指纹图谱分析方法。方法 采用 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水梯度洗脱 (体积比为 2:8~8:2), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 ℃, 检测波长 203 nm; 以人参皂苷 Rg1 为参照物。结果 通过对 11 批云南省三个地区不同规格的三七样品的测定, 标定了 15 个共有峰, 并通过“中药指纹图谱计算机辅助相似度软件”, 计算出其相似度均在 0.99 以上。结论 该方法可为更好地控制三七药材的内在质量提供科学依据。

关键词: 三七; 指纹图谱; 高效液相色谱法
中图分类号: R 282.71 文献标识码: A

三七为五加科植物三七 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 的干燥根, 其性甘, 微苦, 温, 具有散瘀止血, 消肿定痛等功效, 主要用于治疗冠心病、心绞痛等心脑血管系统疾病, 主产于云南、广西等地。三七中含有多种皂苷成分, 如人参皂苷 Rg1、Rb1、Re、Rd、三七皂苷 R1 等^[1]。为控制和保证产品质量的稳定性, 作者依据国家药品监督管理局颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》和国家药典委员会印发的《中药注射剂指纹图谱实验研究技术指南(试行)》, 对云南省三个地区 11 批不同规格的三七药材进行了指纹图谱测定和相似度计算。实验结果可为更好地

控制三七药材质量提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配有二极管阵列检测器, 美国 Agilent 公司)。人参皂苷 Rg1 对照品购自中国药品生物制品检定所。乙腈和甲醇均为色谱纯, 水为纯净水。11 批样品分别为云南文山、马关、砚山等三县的不同规格的药材, 这些药材经沈阳药科大学路金才副教授鉴定, 为五加科植物三七 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 的干燥根。药材来源及规格见表 1。

Table 1 Resources and gauges of 11 batches of Radix notoginseng samples

No.	Resource	Specification	No.	Resource	Specification	No.	Resource	Specification
1	Wenshan	120 head	5	Wenshan	Big mass	9	Wenshan	Small and middle mass
2	Yanshan	80 head	6	Wenshan	80 head	10	Wenshan	Small and middle mass
3	Maguan	80 head	7	Maguan	Big mass	11	Wenshan	Middle mass
4	Maguan	40 head	8	Yanshan	Small and middle mass			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 水-乙腈为流动相, 线性梯度洗脱程序为: 0 min, 体积比为 8:2; 25 min, 体积比为 45:55; 40 min, 体积比为 2:8; 60 min, 体积比为 2:8。流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 ℃, 检测波长 203 nm。

2.2 参照物溶液的制备

精密称取人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1) 对照品适量, 加入甲醇溶液制备成 0.2 g·L⁻¹ 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

称取三七药材粗粉 1.0 g, 加甲醇 50 mL, 回流提取 1 h, 滤过, 回收甲醇蒸干, 以 50 mL 水溶解, 通过 D101 大孔树脂柱 (湿重约 10 g 树脂), 以

收稿日期: 2005-04-20

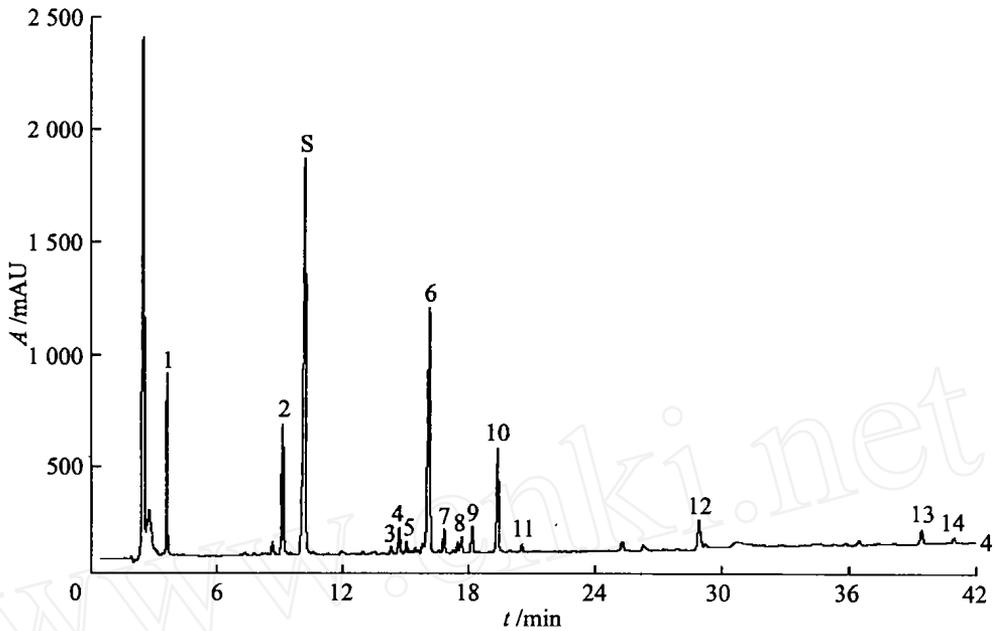
作者简介: 黎琼红 (1979-), 女 (汉族), 福建沙县人, 硕士研究生, 从事天然产物化学研究, E-mail kj6868kj@163.com; 张国刚 (1965-), 男 (汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 博士, 主要从事天然产物化学研究和抗病毒中药研究, Tel. 024-23986511, E-mail zgth@163.com。

水洗至无色澄清(约 100 mL),再以质量分数为 70%乙醇洗脱至无色澄清(约 150 mL),收集洗脱液蒸干,以甲醇溶解并定量转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试品溶液。

2.4 测定方法

分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液

10 μL ,注入液相色谱仪,按“2.1”条色谱条件,记录 60 min 的色谱图,即得。供试品色谱图中,以人参皂苷 Rg1 色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1,计算各峰的相对保留时间和峰面积比值。图 1 为市售样品(No. 4)的指纹图谱,图 2 为 11 批三七药材的指纹图谱。



S—Ginsenoside Rg1

Fig. 1 Fingerprint of Radix notoginseng (sample No. 4)

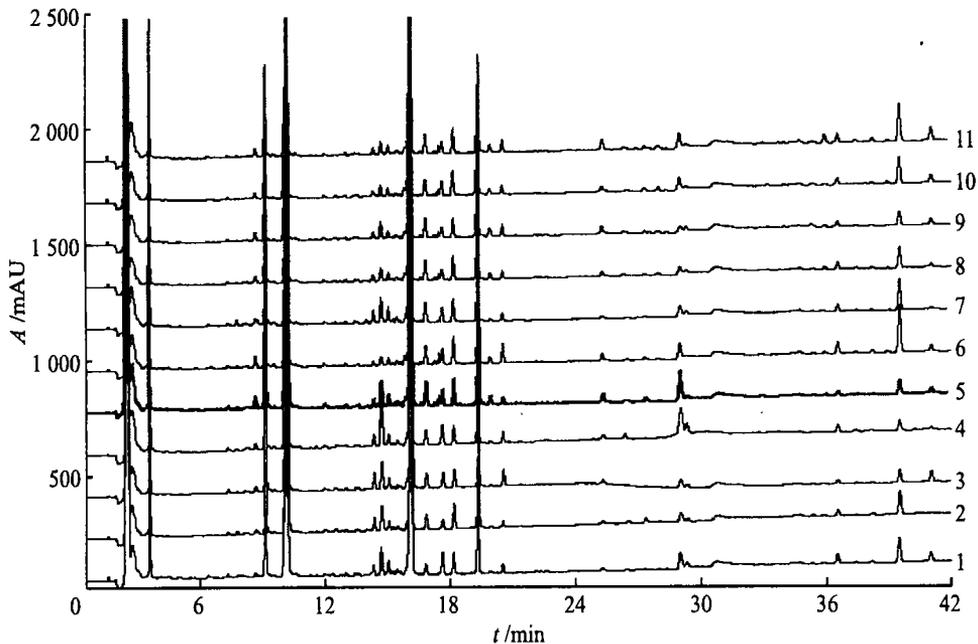


Fig. 2 Fingerprints of 11 batches of herbs of Radix notoginseng (sample No. 1-11)

2.5 方法学研究

为考察分析方法的可靠性,以一批市售药材为供试品,对仪器精密度,方法重复性和稳定性的相应考察。

2.5.1 空白试验

吸取甲醇空白溶液 10 μL ,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,发现 43 min 以后均为溶剂峰,因此分析时间定为 43 min。

2.5.2 对照试验

吸取参照物溶液 10 μL ,注入高效液相色谱仪,记录色谱图及保留时间,即得。

2.5.3 精密度试验

取同一批次供试品溶液,按“2.1”条色谱条件连续进样 5 次,分别对共有峰的相对保留时间和峰面积比值进行考察,结果表明,各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 0.06%;峰面积比值 RSD 小于 0.8%,符合指纹图谱分析要求。

2.5.4 重复性试验

取同一批次供试品药材粉末 5 份,按“2.3”条方法制备供试品溶液,照“2.1”条色谱条件进行分析,分别对共有峰的相对保留时间和峰面积比值进行考察。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.1%,峰面积比值 RSD 小于 3.0%,符合指纹图谱分析要求。

2.5.5 稳定性试验

取供试品溶液按“2.1”条色谱条件,分别于 0、2、4、8、12 h 进样分析,考察共有峰的相对保留时间和峰面积比值,结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.11%,峰面积比值 RSD 小于 4%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.6 指纹图谱相似性评价

2.6.1 共有峰的标定

按“2.1”条色谱条件分别将 11 批供试品进样分析,记录色谱图,确定共有峰 15 个,其中 S 峰为参照物人参皂苷 Rg1 的峰,其他分别编号为 1~14,结果见表 2。

Table 2 Statistical result of common peaks in fingerprints of 11 batches of samples

No.	RT	RA	No.	RT	RA
1	0.325	0.143 ~ 0.226	8	1.772	0.024 ~ 0.049
2	0.894	0.115 ~ 0.255	9	1.828	0.043 ~ 0.069
S	1.000	1.000	10	1.950	0.129 ~ 0.299
3	1.428	0.009 ~ 0.040	11	2.072	0.016 ~ 0.040
4	1.466	0.018 ~ 0.145	12	2.942	0.016 ~ 0.091
5	1.502	0.012 ~ 0.034	13	3.719	0.012 ~ 0.032
6	1.613	0.512 ~ 0.839	14	4.022	0.036 ~ 0.134
7	1.686	0.022 ~ 0.051			

No.—Number of common peak; RT—Relative retention time; RA—Relative area

由于相对保留时间的波动范围非常小,所以只标定峰面积比值的范围。

2.6.2 相似性评价

利用“中药指纹图谱计算机辅助相似度计算软件”,经过数据导入,峰点校正和数据匹配,以中位数法建立对照指纹图谱。根据峰匹配结果,以峰面积为参数,计算出待测指纹图谱与对照图谱的整体相似度,结果越接近 1 即相似度越高。结果表明,11 批药材的相似度均在 0.99 以上,具体计算结果如下:No. 1:0.994;No. 2:0.998;No. 3:0.993;No. 4:0.992;No. 5:0.998;No. 6:0.992;No. 7:0.992;No. 8:0.999;No. 9:0.996;No. 10:0.996;No. 11:0.998。

3 结论

作者用梯度洗脱的方法使三七药材得到了较

好的分离。通过对 11 批药材的测定分析,发现其峰面积差异较大,但整体特征相似,由此标定了 15 个共有峰,非共有峰占总峰面积的 10% 以下。同时计算了这些药材的相似度均在 0.99 以上,说明了各产地及不同规格之间虽然存在差异但同时具有较好的相关性。通过实验证实该测定方法稳定可靠,可用于三七药材的指纹检测。

4 讨论

4.1 药材的选取

三七的加工品除了主根外,还有剪口(根茎),筋条(侧根),绒根(根须)。主根按个头大小可分为 13 等,常见有 40 头、80 头、120 头等。而剪口的总皂苷含量最高,皂苷组分与主根相似,且各单体皂苷含量也比主根含量高,是很值得利用的资源^[2]。相比之下,筋条、绒根与主根的成分差异

较大,所以本实验选用了云南文山县,砚山县和马关县的不同规格的主根和剪口作为实验材料。

4.2 色谱条件优化

对甲醇-水、质量分数为0.5%磷酸水-乙腈、乙腈-水等体系进行了考察,结果表明乙腈-水系统分离良好,峰形佳,故选择乙腈-水系统进行梯度洗脱。比较了203、210、230、254、280 nm 5个波长下的色谱图,发现230 nm以后峰信号强度明显减小,且有很多峰消失没有吸收,而203 nm与210 nm相比,203 nm处的信号强度大且峰数多。在40℃柱温以及1.0 mL·min⁻¹的流速下,色谱图出峰时间适当,分离效果良好。

4.3 供试品溶液制备方法优选

a. 提取方式:考察了水回流,甲醇超声,甲醇回流三种提取方式,结果表明,甲醇回流时信号强,且峰数多,故选取甲醇热回流提取。

b. 提取时间的确定:分别考察了以甲醇回流

1 h、2 h、3 h。结果表明,提取2、3 h时的色谱图峰强和峰数与提取1 h的色谱图的相近,故确定提取时间为1 h。

c. 上大孔树脂的乙醇洗脱液的浓度:将样品上大孔树脂后,以水洗脱至无色澄清,先后以质量分数为20%、70%、95%的乙醇洗脱并分别收集提取液,制成供试品溶液。发现质量分数为20%乙醇洗脱下的色谱峰与质量分数为70%乙醇洗脱下的相近,但是峰的强度小,而质量分数为95%乙醇洗脱下的已无明显的色谱峰,故选择水洗后,再直接以质量分数为70%乙醇洗脱。

参考文献:

- [1] 魏均娴,杜元冲.三七现代科学研究与应用[M].昆明:云南科技出版社,1996.48-50.
- [2] 肖培根.新编中药志:第一卷[M].北京:北京化学工业出版社,2002.17-22.

Fingerprint of *Radix notoginseng*

LI Qiong-hong, ZHANG Guo-gang

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To establish the method of fingerprint analysis of *Radix notoginseng* by HPLC. **Methods** Kromasil C₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase was composed of acetonitrile and water with a linear gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ with DAD detected at 203 nm. The column temperature was maintained at 40℃. **Results** By the determination of the 11 *notoginseng* of different specifications gathered from different places, we have pinpointed 15 common peaks. The similarities were calculated and proved all above 0.99 with the help of the similarity calculation soft of fingerprint chromatography of traditional Chinese medicine. **Conclusions** This method is accurate and reliable. It provides a scientific basis for controlling the quality of *Radix notoginseng*.

Key words : *Radix notoginseng*; fingerprint; HPLC