

## 三七药材、三七总皂苷及三七缓释片的指纹图谱

周 绚<sup>1</sup>, 傅超美<sup>1\*</sup>, 易秋艳<sup>2</sup>, 刘红亚<sup>3</sup>, 郑为骞<sup>1</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2 四川省食品药品检验所, 四川 成都 610036; 3 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041)

**摘要:** 目的 采用 HPLC 研究三七药材、三七总皂苷提取物及三七缓释片的指纹图谱。方法 色谱柱为 Dikma Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 水, 梯度洗脱, 检测波长 203 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 ml·min<sup>-1</sup>; 同时采用 CASE 软件和 2004A 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统分析相似度。结果 建立了三七药材、三七总皂苷及三七缓释片的 HPLC 指纹图谱, 且相似度较好。结论 所建方法简单、重复性良好, 可用于三七药材、三七总皂苷及三七缓释片的质量控制和工艺评价。

**关键词:** 三七; 三七总皂苷; 三七缓释片; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103 (2009) 01 - 0074 - 04

### Quality control of Radix Notoginseng, Panax Notoginseng saponins and sustained - release preparation by fingerprint method

ZHOU Xuan<sup>1</sup>, FU Chao - mei<sup>1\*</sup>, YI Qiu - yan<sup>2</sup>, LIU Hong - ya<sup>3</sup>, ZHENG Wei - qian<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 611137 P. R. China; 2. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu, Sichuan, 610036 P. R. China; 3. Sichuan Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To establish the chromatographic fingerprints of Radix Notoginseng, Panax Notoginseng saponins and sustained - release tablets by HPLC. **METHODS** The fingerprints were investigated using Dikma Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile / water and eluted in gradient mode. The detection wavelength was 203 nm. The column temperature was 30 °C. The flow rate was 1.0 ml·min<sup>-1</sup>. The similarity was analyzed by Computer Aided Similarity Evaluation (CASE software) and Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (Version 2004 A). **RESULTS** The HPLC fingerprints of Radix Notoginseng, Panax Notoginseng saponins and sustained - release tablets were obtained. The similarity was good. **CONCLUSION** The method was simple, reproducible and can be used in quality control and process evaluation for Radix Notoginseng, Panax Notoginseng saponins and sustained - release tablets.

**Key words:** Radix notoginseng; Panax Notoginseng saponins; Sustained - release tablets; HPLC; Fingerprint; Similarity

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103 (2009) 01 - 0074 - 04

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎, 主产于云南、广西等地。具有散瘀止血、消肿定痛的功效<sup>[1]</sup>。三七的主要活性成分为达玛烷系四环三萜类皂苷成分, 具有增加冠脉血流量、扩张血管、降低心肌耗氧量等作用。三七提取物是从三七药材中提取的三七总皂苷有效部位, 近年来, 其制剂广泛应用于冠心病、心绞痛等疾病的临床治疗。现采用 HPLC 梯度洗脱对三七原药材、三七总皂苷提取物及以三七总皂苷为原料制成的三七缓释片进行了指纹图谱研究。结果证明, 方法操作性强、重复性好, 可作为三七相关药材、制剂的质量控制和评价依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent)。人参皂苷 RgI (批号 110703 - 200424)、人参皂苷 RbI (批号: 110704 - 200420)、人参皂苷 Re (批号: 110754 - 200421)、三七皂苷 R1 (批号: 110745 - 200415) (中国药品生物制品检定所); 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂为分析纯; 三七药材 (云南文山、马关、砚山) 经成都中医药大学药学院唐声武教授鉴定, 全部符合《中国药典》2005 年版有关各项的规定; 三七总皂苷提取物、三七缓释片 (自制)。

基金项目: 四川省教育厅重点项目 (2004D017)

作者简介: 周绚 (1983 - ), 女, 重庆南川, 正攻读药剂学专业的硕士学位。Email: zhouxuan\_yoyo@163.com

\* 通讯作者 (Correspondent author), Email: chaomeifu@126.com

## 1.2 方法与结果

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Dikma Diamonsil™ C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 水, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 乙腈 21%, 15 ~ 40 min, 乙腈 21% ~ 22%, 40 ~ 45 min, 22% ~ 35%, 45 ~ 60 min, 35% ~ 40%, 60 ~ 70 min, 40% ~ 70%, 70 ~ 80 min, 70% ~ 21%); 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 ml·min<sup>-1</sup>; 所有组分均在 80 min 内洗脱出柱<sup>[2]</sup>。

**1.2.2 溶液的制备** 精密称取人参皂苷或三七皂苷对照品适量, 加入 70% 甲醇溶液制备成 0.4 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。精密称取 1 g 三七药材粉末 (过 4 号筛), 置 10 ml 量瓶中, 加入 70% 甲醇, 放置过夜, 超声提取 30 min, 用 70% 甲醇定容, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得三七药材供试溶液。精密称取 0.2 g 三七总皂苷提取物, 置 10 ml 量瓶中, 加入 70% 甲醇, 超声提取 30 min, 用 70% 甲醇溶液定容, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得三七总皂苷提取物溶液。取三七缓释片 10 片, 研钵研细, 取粉末置 50 ml 量瓶中, 加 70% 甲醇, 超声提取 30 min, 用 70% 甲醇定容, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得三七缓释片供试品溶液<sup>[3]</sup>。

**1.2.3 系统适用性试验** 分别精密吸取 10 μl 三七皂苷 R<sub>1</sub> 和人参皂苷 R<sub>g</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub> 混合对照品溶液及供试品溶液, 分别进样检测, 记录色谱图。比较保留时间和在线紫外光谱, 确定供试品色谱图中的峰归属。人参皂苷 R<sub>b</sub> 峰信号强度适中且与相邻峰分离较好, 故选择为参照物峰 (S 峰)。在此系统条件下, 人参皂苷 R<sub>b</sub> 理论板数 2.5 × 10<sup>3</sup>。考察供试品溶液 2 h 图, 色谱图 80 min 后无样品峰出现, 故流动相系统确定洗脱时间为 80 min<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 稳定性与精密度试验** 按“1.2.2 项方法配制 3 种供试品溶液, 在室温下保存。分别于 0、1、2、3、4、6、12、24 h 测定, 以人参皂苷 R<sub>b</sub> 为参照物, 分别以共有峰的  $t_R$  和峰面积比进行统计。结果表明, 3 种供试品溶液的指纹图谱在 24 h 内稳定, 各峰  $t_R$  的 RSD 均 < 1.0%, 峰面积比的 RSD 均 < 3.0%。同法配制 3 种供试品溶液各 1 份, 每份分别连续进样 5 次, 计算共有峰的  $t_R$  和峰面积比。结果表明, 3 种供试品溶液各峰  $t_R$  的 RSD 均 < 0.7%, 峰面积比的 RSD 均 < 3.0%。

**1.2.5 重复性试验** 按“1.2.2 项方法配制 3 种供试品溶液各 5 份, 每份分别进样 1 次, 分别对各共有峰的  $t_R$  和峰面积比进行统计。结果表明, 3 种供试品溶液各峰  $t_R$  的 RSD 均 < 1.6%, 峰面积比的 RSD 均 < 3.0%。

**1.2.6 样品的测定** 采用 HPLC 法<sup>[5]</sup>, 分别精密量取 10 μl 3 种供试品溶液进样, 记录 80 min。

**1.2.7 共有峰的标定** 对测定的指纹图谱进行分析, 供试品指纹图谱中与参照物峰相应的峰 (R<sub>b</sub> 峰) 为 S 峰, 找出 10 批三七药材样品中共有峰为 17 个, 10 批三七总皂苷提取物样品中共有峰为 15 个, 10 批三七缓释片中共有峰为 14 个。将不能完全分离的色谱峰归并为一个指纹峰, 即将三七药材指纹图谱中 5 ~ 9 号峰, 三七总皂苷中 5 ~ 8 号峰, 三七缓释片中 5 ~ 7 号峰分别合并, 以 S 峰的  $t_R$  和峰面积为基准, 计算各共有峰的  $t_R$  和峰面积比值, 结果见表 1。三七药材、三七总皂苷提取物及三七缓释片的指纹图谱见图 1。

表 1 三七药材、总皂苷提取物及三七缓释片样品共有峰的相对保留时间和峰面积比

Table 1 Relative retention time ( $t_R$ ) and peak area ratio (RPA) of common peaks of Radix Notoginseng, Panax Notoginseng saponins and sustained-release tablets

Radix Notoginseng			Panax Notoginseng Saponins			Sustained-release tablets		
Peak No	$t_R$	RPA	Peak No	$t_R$	RPA	Peak No	$t_R$	RPA
1	0.073	0.103	1	0.073	0.099	1	0.073	0.093
2	0.437	0.179	2	0.436	0.322	2	0.437	0.320
3	0.612	0.984	3	0.614	1.074	3	0.613	1.085
4	0.643	0.135	4	0.645	0.201	4	0.645	0.217
5	0.935	0.138	5	0.936	0.177	5	0.955	0.160
6	0.955	(5-9 peaks)	6	0.955	(5-8 peaks)	6	0.974	(5-7 peaks)
7	0.956		7	0.973		7	0.979	
8	0.972		8	0.979		8 (S)	1.000	1.000
9	0.978		9 (S)	1.000	1.000	9	1.018	0.086
10 (S)	1.000	1.000	10	1.019	0.088	10	1.037	0.110
11	1.018	0.019	11	1.037	0.106	11	1.065	0.870
12	1.035	0.022	12	1.066	0.092	12	1.133	0.430
13	1.063	0.013	13	1.133	0.401	13	1.185	0.092
14	1.132	0.358	14	1.185	0.098	14	1.401	0.054
15	1.160	0.065	15	1.401	0.077			
16	1.184	0.043						
17	1.400	0.072						

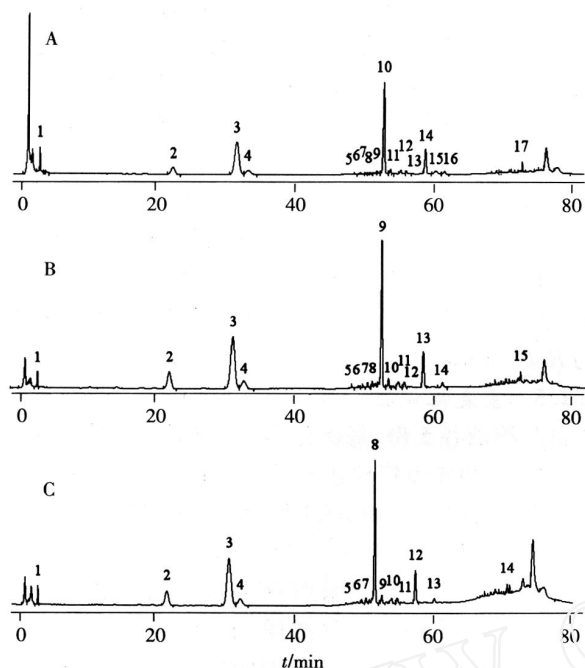


图 1 三七药材 (A)、三七总皂苷提取物 (B) 及三七缓释片 (C) 的指纹图谱

Fig 1 Chromatographic fingerprints of Radix Notoginseng (A), Panax Notoginseng saponins (B) and sustained-release tablets (C)

1.2.8 相似度分析 通过 CASE 软件 (中南大学, matlab 版) 和 2004A 版 (药典委员会) 中药色谱指纹图谱相似度评价系统得出三七药材、三七总皂苷提取物以及三七缓释片的共有模式, 各样品与该共有模式比较, 其相似度结果见表 2~4, 色谱图见图 2。

通过对 10 批药材的测定分析, 发现其峰面积差

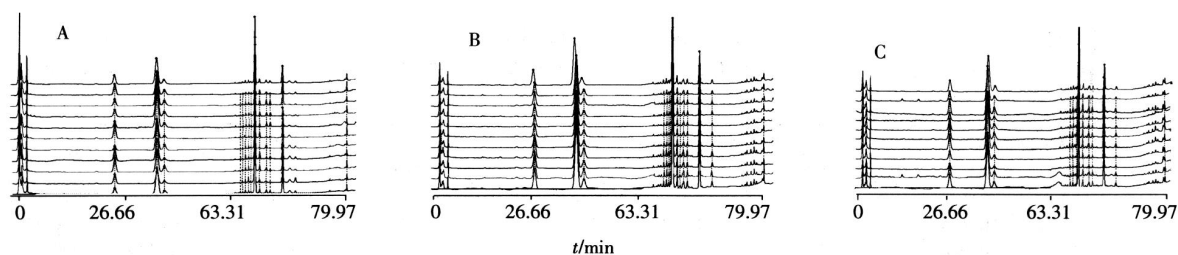


图 2 三七药材 (A)、三七总皂苷提取物 (B) 及三七缓释片 (C) 的相似度图谱

Fig 2 Similarity chromatograms of Radix Notoginseng (A), Panax Notoginseng saponins (B) and sustained-release tablets (C)

异较大, 但整体特征相似, 由此标定了 17 个共有峰, 非共有峰占总峰面积 10% 以下。同时采用两种不同的相似度评价软件计算了 10 批药材的相似度均在 0.82 以上, 说明各产地三七药材之间虽然存在差异, 但同时具有较好的相关性。进一步研究得到三七总皂苷提取物、三七缓释片各 10 批指纹图谱, 分别标定共有峰 15、14 个, 相似度评价软件计算结果均在 0.95 以上, 充分验证了制剂工艺的稳定性。通

表 2 三七药材各批样品的相似度分析结果

Table 2 Results of similarity of Radix Notoginseng

No.	Similarity of full spectrum		Similarity of peak area		Similarity
	correlation coefficient	included angle cosine	correlation coefficient	included angle cosine	
1	0.9891	0.9871	0.9810	0.9813	0.896
2	0.9128	0.8990	0.8238	0.8388	0.879
3	0.9848	0.9865	0.9640	0.9692	0.967
4	0.9855	0.9830	0.9479	0.9538	0.825
5	0.9896	0.9907	0.9568	0.9632	0.959
6	0.9786	0.9804	0.9549	0.9615	0.952
7	0.9198	0.9310	0.9133	0.9226	0.924
8	0.9479	0.9548	0.9441	0.9509	0.905
9	0.9851	0.9869	0.9737	0.9760	0.961
10	0.9857	0.9875	0.9732	0.9764	0.935

表 3 三七总皂苷提取物各批样品的相似度分析结果

Table 3 Results of similarity of Panax Notoginseng saponins

No.	Similarity of full spectrum		Similarity of peak area		Similarity
	correlation coefficient	included angle cosine	correlation coefficient	included angle cosine	
1	0.9931	0.9937	0.9876	0.9891	0.995
2	0.9687	0.9716	0.9575	0.9626	0.997
3	0.9949	0.9949	0.9941	0.9943	0.997
4	0.9922	0.9926	0.9950	0.9954	0.997
5	0.9939	0.9943	0.9859	0.9874	0.997
6	0.9928	0.9929	0.9770	0.9799	0.997
7	0.9941	0.9946	0.9876	0.9892	0.995
8	0.9938	0.9932	0.9887	0.9901	0.996
9	0.9738	0.9753	0.9515	0.9577	0.993
10	0.9943	0.9946	0.9848	0.9867	0.991

表 4 三七缓释片各批样品的相似度分析结果

Table 4 Results of similarity of sustained-release tablets

No.	Similarity of full spectrum		Similarity of peak area		Similarity
	correlation coefficient	included angle cosine	correlation coefficient	included angle cosine	
1	0.9807	0.9797	0.9773	0.9591	0.995
2	0.9673	0.9505	0.9552	0.9620	0.997
3	0.9633	0.9644	0.9441	0.9544	0.997
4	0.9871	0.9880	0.9759	0.9822	0.997
5	0.9856	0.9862	0.9855	0.9847	0.997
6	0.9914	0.9874	0.9775	0.9719	0.997
7	0.9913	0.9916	0.9826	0.9892	0.995
8	0.9739	0.9753	0.9787	0.9701	0.996
9	0.9849	0.8864	0.9599	0.8877	0.993
10	0.9933	0.9937	0.9818	0.9863	0.991

过实验证明文中测定方法稳定、可靠, 可用于三七药材、提取物和缓释制剂的指纹特征检测和质量控制研究。

## 2 讨论

通过考察三七药材、提取物及三七缓释片样品的 HPLC-DAD 三维图谱, 发现在 203 nm 信号强度大且色谱峰数目多, 同时参照 2005 年版《中国药

典》一部三七药材项下的含量测定方法,选择 203 nm 为检测波长。实验对进一步缩短图谱分析时间的研究发现,指纹峰分离效果较差,同时流动相梯度变化较大导致基线漂移严重,影响了分析效果,故确定分析时间为 80 min。同时发现柱温高于 35℃,色谱图中人参皂苷 R<sub>g</sub>、R<sub>e</sub> 的分离度显著下降,故检测柱温定为 30℃,其分离效果良好。

对三七药材、三七总皂苷提取物和三七缓释制剂样品的指纹图谱进行比较,除原料药材中 9、15 号小峰在提取物中不能被检出,5、9、15 号小峰在最终成品不能被检出以外,其余各共有峰的相对保留时间基本一致。3 种样品的峰面积比差异较大,可能由于原料药材经提取、纯化后某些皂苷类成分的含量显著增加,导致峰面积比发生变化,但提取物和三七缓释片的峰面积比基本一致。总之,三者指纹图谱整体特征具有良好的相关性,说明三七皂苷类成分分布及比例稳定,中间体、成品与原料药材的相关性良好、质量稳定,进一步验证了整个制备工艺的合

理性<sup>[6,7]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 杨志刚,陈阿琴,愈颂东. 三七药理研究新进展 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(4): 59 - 62.
- [2] 万建波,李绍平,王一涛. 中药三七高效液相色谱特征研究 [J]. 药学学报, 2006, 41(11): 1090 - 1093.
- [3] 仇燕峰,李楠,李晓菲,等. HPLC 测定三七粉及三七片中人参皂苷 R<sub>g1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量 [J]. 中成药, 2006, 29(12): 1851 - 1852.
- [4] 黄赵刚,张国华,李俊,等. RP - HPLC 法测定三七中 11 种皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1281 - 1283.
- [5] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 10, 附录 33 - 35.
- [6] 傅萍,晁若冰,刘仲义,等. 注射用三七通舒的指纹图谱研究 [J]. 华西药学期刊, 2007, 22(6): 681 - 682.
- [7] 傅萍,刘仲义. 指纹图谱测定注射用血塞通、血栓通注射液及注射用血脉通的化学成份 [J]. 华西药学期刊, 2007, 22(1): 76 - 78.

收稿日期: 2009 - 09

## 多孔石墨化碳柱亚临界水色谱法分析芳烃化合物

罗荣宁, 李章万, 钱广生, 付春梅\*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

**摘要:** 目的 采用亚临界水为流动相, 分析苯等芳烃化合物。方法 构建了 4.6 mm 内径柱的亚临界水色谱 - 紫外检测仪器装置, 考察了影响亚临界水色谱保留和柱效的因素。结果 苯、甲苯等在建立的条件中获得良好分离。结论 升高温度使亚临界水的反相洗脱能力增强, 并可得到柱效的最佳值; 高温下可采用高流速来提高分析速度。

**关键词:** 多孔石墨化碳柱; 亚临界水色谱; 芳烃化合物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103(2009)01 - 0077 - 03

### Analyzing aromatic hydrocarbon on graphitic carbon column by Subcritical water chromatography

LUO Rong - ning, LI Zhang - wan, QIAN Guang - sheng, FU Chun - mei\*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To develop a Subcritical water chromatography (SubWC) to analyze aromatic hydrocarbon **METHODS** SubWC instrument was developed and the effect of experimental parameters on the retention and performance was studied **RESULTS** Organic compounds such as benzene could be eluted from graphitic carbon column with subcritical water as mobile phase **CONCLUSION** The eluotropic strength of water increased with the column temperature, and the flow rate could be increased at high temperature because of the decrease of viscosity and affection on performance, which was very beneficial for the rapid analysis and environment protection

**Key words:** Graphitic carbon column; Subcritical water chromatography; Aromatic hydrocarbon

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2009)01 - 0077 - 03

作者简介: 罗荣宁, 女, 正攻读药物分析专业的硕士学位。Email: fairyln@163.com

\* 通讯作者 (Correspondent author), Email: fcm213@sina.com