

三七不同药用部位的质量研究

阮佳¹, 胡建华², 詹雁¹, 谭镭¹, 徐超群^{1*}

(1. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 研究并测定三七主根和根茎中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b_1 的含量及指纹图谱。方法 采用 RP-HPLC 法, 色谱柱为 Phenomenex C_{18} (150 mm \times 4.60 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (梯度洗脱); 流速 1.0 ml·min⁻¹; 检测波长 203 nm。结果 含量测定中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b_1 的线性范围分别为 0.184 ~ 1.840、0.994 ~ 9.940、0.896 ~ 8.960 μ g ($r=0.9999$), 平均回收率分别为 99.7% ($RSD=1.21\%$)、101.3% ($RSD=1.32\%$)、100.7% ($RSD=0.93\%$) ($n=9$)。三七主根和根茎的 HPLC 指纹图谱分离效果好。结论 所建含量测定和指纹图谱的方法简便、准确, 重复性好。测定结果显示, 无论是三七各成分的含量, 还是色谱峰的数目, 根茎均明显高于三七主根。

关键词: 三七主根; 三七根茎; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_g ; 人参皂苷 R_b_1 ; 含量测定; 指纹图谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-0103(2008)03-0332-03

Study on the quality of taproot and Rhizome in Radix Notoginseng

RUAN Jia¹, HU Jian-hua², ZHAN Yan¹, TAN Lei¹, XU Chao-qun^{1*}

(1. Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China; 2. West China School of Pharmacy Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: OBJECTIVE To develop a method for the determination of sanchinoside R_1 , ginsenoside R_g and ginsenoside R_b_1 in Radix Notoginseng and its extractions and to study the fingerprint in Radix Notoginseng and its extractions. **METHODS** An RP-HPLC method was adopted. The analysis was carried out on an analytical column C_{18} (150 mm \times 4.60 mm, 5 μ m). The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and the detective wavelength was set at 203 nm. The mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution). **RESULTS**

The linear range was 0.1840 - 1.8400 μ g ($r=0.9999$) and the average recovery was 99.7% with RSD of 1.21% ($n=9$) for sanchinoside R_1 . The linear range was 0.9940 - 9.9400 μ g ($r=0.9999$) and the average recovery was 101.3% with RSD of 1.32% ($n=9$) for ginsenoside R_g . The linear range was 0.8960 - 8.9600 μ g ($r=0.9999$) and the average recovery was 100.7% with RSD of 0.93% ($n=9$) for ginsenoside R_b_1 . The HPLC fingerprints of Radix Notoginseng and its extractions were obtained with good isolation.

CONCLUSION The method is simple, reproducible and suitable for determination of sanchinoside R_1 , ginsenoside R_g and ginsenoside R_b_1 in Radix Notoginseng and its extractions. The fingerprints could also be used for the quality control of Radix Notoginseng and its extractions.

Key words: Radix Notoginseng taproot; Radix Notoginseng Rhizome; Sanchinoside R_1 ; Ginsenoside R_g ; Ginsenoside R_b_1 ; Content determination; Fingerprints

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2008)03-0332-03

三七为五加科植物 Radix Notoginseng (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎, 是中国治疗心脑血管疾病的名贵中药, 有散瘀止血、消肿定痛的功效^[1]。人们习惯使用三七主根入药, 而不用其根茎; 依据三七主根的大小, 可将其分为 20、40、60 头等。现参照文献方法^[2,3], 系统研究了三七主根及根茎有效成分的含量和指纹图谱, 为三七资源的综合利用提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪包括四元泵、在线

脱气机、DAD 检测器和化学工作站 (美国安捷伦)。人参皂苷 R_g 、 R_b_1 、三七皂苷 R_1 对照品 (中国药品生物制品检定所); 3 批三七主根 (分别为 20、40、60 头) 和 1 批根茎均购自云南文山; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂为分析纯。

1.2 含量的测定

1.2.1 溶液的制备 取三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b_1 对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成 0.092 mg·ml⁻¹ 三七皂苷 R_1 、0.497 mg·ml⁻¹ 人参皂苷 R_g 和 0.448 mg·ml⁻¹ 人参皂苷 R_b_1 的对照品溶

作者简介: 阮佳 (1980 -), 男, 从事药理学的研究工作。

* 通讯作者 (Correspondent author), E-mail: chaoqun_xu@sina.com

液。取约 0.6 g 三七主根和根茎(过四号筛),精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入 50 ml 甲醇,密塞,称重,放置过夜,置 80 °C 水浴上保持微沸 2 h,放冷,再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,续滤液即为药材供试液。

1.2.2 色谱条件 色谱柱采用 Phenomenex C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为乙腈,流动相 B 为水,按表 1 进行梯度洗脱;检测波长为 203 nm;柱温为 30 °C;流速为 1.0 ml·min⁻¹。

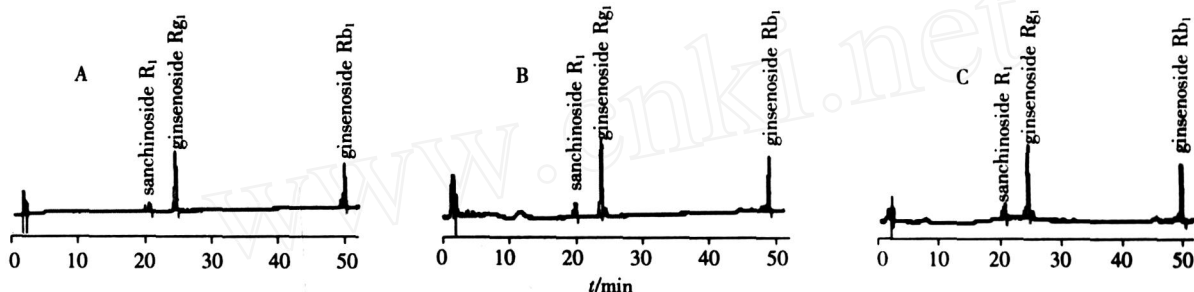


图 1 对照品(A)、三七主根(B)和三七根茎(C)的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of control solution(A), Radix Notoginseng taproot solution(B) and Radix Notoginseng Rhizome solution(C)

1.2.3 线性关系考察 分别精密吸取 2、5、10、15、20 μl “1.2.1 项下的对照品溶液,依次进样,记录三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_g、R_{b1} 的峰面积。以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,分别得方程为: $Y_{三七皂苷 R_1} = 173.93X + 0.3805$ ($r = 0.9999$); $Y_{人参皂苷 R_{g_1}} = 194.68X - 0.6098$ ($r = 0.9999$); $Y_{人参皂苷 R_{b_1}} = 143.34X - 0.4854$ ($r = 0.9999$)。三七皂苷 R₁ 0.184 ~ 1.840 μg,人参皂苷 R_g 0.994 ~ 9.940 μg,人参皂苷 R_{b1} 0.896 ~ 8.960 μg 与其峰面积的线性关系良好。

1.2.4 精密度试验 按“1.2.2 项下条件,分别精密吸取 5 μl “1.2.1 项下对照品溶液,重复进样 5 次,三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_g、R_{b1} 峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.72%、0.75%。表明进样精密度良好。

1.2.5 稳定性试验 取药材供试液,按“1.2.2 项下的色谱条件,于 8 h 内每间隔 2 h 进样 1 次(每次 5 μl)。三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_g、R_{b1} 峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.59%、0.66%,表明供试液稳定性良好。

1.2.6 重复性试验 精密称取 5 份三七根茎,按“1.2.1 项下方法,制备药材供试液。用“1.2.2 项下条件,进样 5 μl。三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_g、R_{b1} 峰面积的 RSD 分别为 1.01%、0.88%、0.91%。

1.2.7 加样回收试验 精密称取 9 份已知含量的三七根茎,分别加入一定量的对照品溶液,按“1.2.1 项方法,制备药材供试液,按“1.2.2 项的色谱条件,进

表 1 流动相的梯度洗脱

Table 1 Gradient elution of the mobile phase

Time/min	Acetonitrile(A) / %	Water(B) / %
0 - 12	19	81
12 - 60	19 - 36	81 - 64

分别精密吸取 5 μl 对照品溶液和药材供试液,进样。三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_g、R_{b1} 的保留时间分别为 20.5、24.4、49.7 min,与其他组分峰分离较好 ($R > 1.5$),理论板数按人参皂苷 R_g 峰计在 2×10^3 以上(图 1)。

样 5 μl。三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_g、R_{b1} 的平均回收率分别为 99.7% ($RSD = 1.21\%$), 101.3% ($RSD = 1.32\%$), 100.7% ($RSD = 0.93\%$)。

1.2.8 含量的测定 按“1.2.2 项的色谱条件,分别取 5 μl 对照品溶液和药材供试液进样,以峰面积按外标法计算含量。3 批三七主根(样品 1、2、3)和根茎(剪口,样品 4)的含量测定结果见表 2。

表 2 三七主根和根茎的含量测定结果 (%)

Table 2 Content determination results of Radix Notoginseng taproot and Radix Notoginseng Rhizome (%)

Sample	Sanchinoside R ₁	Ginsenoside R _{g1}	Ginsenoside R _{b1}	Total content
1	0.85	3.91	4.26	9.02
2	0.66	2.54	2.61	5.81
3	0.89	3.09	2.87	6.85
4	1.43	5.68	4.89	12.0

1.3 指纹图谱的研究

1.3.1 溶液的制备 分别取约 2.0 g 三七主根和根茎(过四号筛),精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入 50 ml 甲醇,密塞,称重,超声处理 30 min,放冷,再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,精密量取 10 ml 续滤液,蒸干,残渣用 20 ml 水分次溶解,上样于 HPD100 大孔树脂柱(10 g, 1.5 cm × 20 cm),用水洗脱至 Molisch 反应呈阴性,再用 70% 乙醇洗脱,保持洗脱流速为 1.0 ml·min⁻¹,收集 100 ml 洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至 10 ml 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,过滤,续滤液即为药材供试液。精密吸取 10 μl 各药材供试液,进样(图 2)。

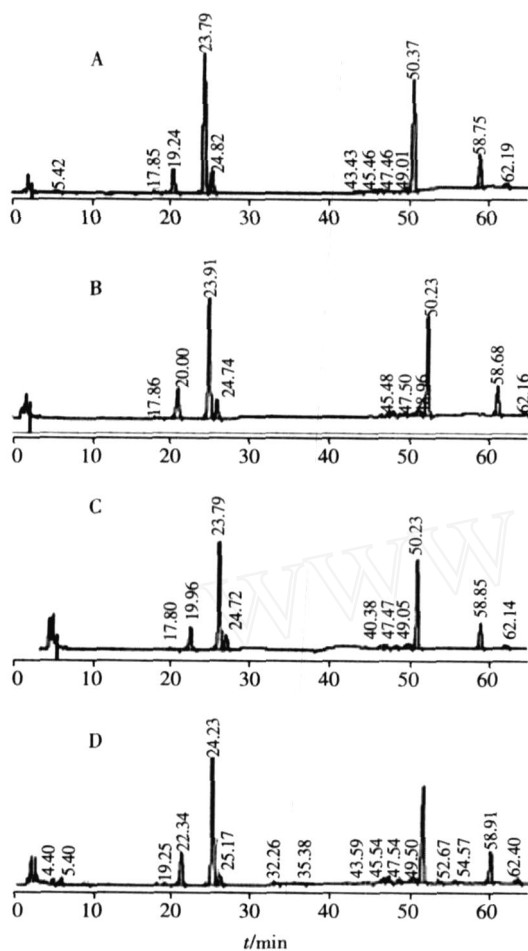


图 2 三七主根 20 头 (A)、40 头 (B)、60 头 (C) 和三七剪口 (D) 的指纹图谱

Fig 2 Fingerprint chromatograms of Radix Notoginseng taproot 20 (A), 40 (B), 60 (C) and Radix Notoginseng Rhizome (D)

1.3.2 色谱条件 色谱柱采用 Phenomenex C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为水, 按表 3 进行梯度洗脱; 检测波长为 203 nm; 柱温为 20 $^{\circ}$ C; 流速为 1.0 ml \cdot min $^{-1}$ 。

表 3 流动相梯度洗脱

Table 3 Gradient elution of the mobile phase

Time/min	Acetonitrile (A) / %	Water (B) / %
0 - 12	19	81
12 - 60	19 35	81 65

1.3.3 参照物的选择和制备 人参皂苷 R_g 为指纹图谱中出峰时间较早、峰面积较大, 且较稳定的峰, 故选其为参照物。取人参皂苷 R_g 对照品, 用甲醇制成 0.4220 mg \cdot ml $^{-1}$ 的对照品溶液, 按“1.3.2”项的条件, 进样 10 μ l, 即得参照 (S) 峰。

1.3.4 指纹图谱的测定 精密吸取 10 μ l 药材供试液, 按“1.3.2”项下条件进样, 记录 65 min 的色谱图, 以 S 峰的保留时间和峰面积为 1, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积值。

1.3.5 精密度试验 取三七根茎, 按“1.3.1”项下

方法制备药材供试液, 用“1.3.2”项下的色谱条件, 重复进样 5 次 (每次 10 μ l), 各共有峰的相对峰面积的 $RSD < 3\%$, 说明方法的精密度良好。

1.3.6 稳定性试验 取三七根茎, 按“1.3.5”项下方法制备药材供试液。于 8 h 内每间隔 2 h 进样 1 次 (每次 10 μ l), 各共有峰相对峰面积的 $RSD < 3\%$ 。说明药材供试液稳定性良好。

1.3.7 重复性试验 取三七主根和根茎, 按“1.3.1”项下方法, 平行制备 5 份药材供试液, 用“1.3.2”项的色谱条件, 分别进样 10 μ l, 各共有峰相对峰面积的 $RSD < 3\%$, 相对保留时间差别在 0.84 ~ 2.46 min 之间。说明方法的重复性良好。

2 讨论

文中建立的含量测定方法简便、准确, 精密度和重复性均好, 可用于三七药材中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_g 和人参皂苷 R_b1 的含量测定。所建立的 HPLC 指纹图谱方法, 对三七药材中各组分峰的分离度均较好, 可作为三七药材的质量控制依据。3 批三七主根中检出的色谱峰数分别为 14、11、11 个, 三七根茎 (剪口) 检出 19 个色谱峰, 其中相对 k_r 0.84、1、1.04、2.11 分别为三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_g 、人参皂苷 R_e 和人参皂苷 R_b1 的色谱峰。根据 3 批三七主根和 1 批剪口的指纹图谱研究, 确定了三七的指纹峰个数为 8 个。选择人参皂苷 R_g 为参照物 (S), 与 S 峰比较, 有 3 个峰的峰面积比值 $> 20\%$; 有 1 个峰的 $> 10\%$; 有 2 个峰的 $> 5\%$; 有 2 个峰的 $< 5\%$ 。3 批三七主根的非共有峰比例分别为 2.62%、0.74%、0; 根茎 (剪口) 的非共有峰比例为 5.85%。

含量测定结果表明, 根茎 (剪口) 各成分含量和总含量均明显高于三七主根, 三七主根中含量最高的为 20 头, 其次是 40 头和 60 头; 据指纹图谱, 根茎 (剪口) 检出 19 个色谱峰, 20 头、40 头和 60 头三七中检出峰分别为 14、11、11 个。研究结果提示, 无论是含量还是色谱峰的数目, 根茎 (剪口) 均明显高于三七主根, 而三七主根的质量又以 20 头 (个大者) 为优。

参考文献:

- [1] 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 - 11.
- [2] 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.
- [3] 詹雁, 阮佳, 谭镭, 等. RP - HPLC 同时测定复方三七制剂中的人参皂苷 R_g 、 R_b1 [J]. 华西药学期刊, 2007, 22(6): 703 - 705.

收稿日期: 2007 - 09