

# 三七含量测定方法的研究

刘华钢<sup>1</sup>, 赖茂祥<sup>2</sup>, 梁秋云<sup>3</sup>, 严克俭<sup>2</sup>

(1 广西医科大学, 广西 南宁 530021; 2 广西中医药研究所, 广西 南宁 530023;

3 广西中医学院, 广西 南宁 530001)

**摘要:**目的: 建立高效液相色谱法测定三七中人参皂甙 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b<sub>1</sub></sub> 与三七皂苷 R<sub>1</sub> 的方法, 并与中国药典(2000 年版)的薄层色谱扫描测定方法进行比较, 以进一步探讨高效液相色谱法用于控制三七质量的可行性。方法: RP-HPLC 法, Shim pack VP-ODS 柱分离, 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 柱温: 室温, 流速 1mL/min, 检测波长 203nm; TLCs 法依照中国药典(2000 年版)检测方法。结果: 两检测方法测定结果差异不大(P > 0.05), 而高效液相色谱法具有更灵敏, 更快速, 专属性更强, 重复性更好等优点。结论: 高效液相色谱法代替薄层色谱扫描法是可行的。

**关键词:** RP-HPLC; 三七; 人参皂甙 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b<sub>1</sub></sub>; 三七皂苷 R<sub>1</sub>

**中图分类号:** R284.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)05-0014-03

三七为五加科植物 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根。有散瘀止血, 消肿定痛之功效。用于咯血, 吐血, 衄血, 便血, 崩漏, 外伤出血, 胸腹刺痛, 跌扑肿痛等<sup>[1]</sup>。中国药典(2000 年版)采用 TLCs 法控制其质量, 而目前对其含量的研究大部分已采用高效液相色谱法<sup>[2-8]</sup>。为了验证高效液相色谱法的可行性, 我们对两种测定方法进行了比较, 并对其提取方法进行了考察, 为进一步修订其质量检测方法提供了实验依据。

## 1 仪器与试剂

HP1100 系列高效液相色谱仪(包括 G1131 四元泵, G1313 自动进样器, G1131 脱气机, G1314A 紫外可见检测器, G1316 柱温箱, 配备 HP 工作站); 日本岛津 CS-9000 双波长薄层扫描仪; 双槽层析缸(10 × 24 × 24) cm; 硅胶 G(青岛海洋化工厂); CG16-W 高速微量离心机(北京医用离心机厂)。

人参皂甙 R<sub>g<sub>1</sub></sub> (0703-2000015)、R<sub>e</sub> (110754-200218)、R<sub>b<sub>1</sub></sub> (0704-200012) 和三七皂苷 R<sub>1</sub> (0745-200007) 对照品(中国药品生物制品检定所); 三七: 市售(购自广西)。乙腈为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司), 水为去离子重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

## 2 供试品溶液的制备

### 2.1 提取条件的选择

**2.1.1 提取方法的比较** 取三七细粉 15 份, 每份 1.0g, 精密称定, 用乙醇作为提取溶剂, 对冷浸提取、渗漉提取、索氏提取、超声提取和回流提取 5 种方法进行比较。HPLC 含量测定结果表明, 索氏提取 4h 和超声提取 1h 效果最好。因索氏提取所需时间较长, 故选择超声提取。

**2.1.2 提取溶剂的比较** 取三七细粉 33 份, 每份 1.0g, 精密称定, 分别选取水、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、95% 乙醇和甲醇作为溶剂, 超声提取 1h。结果表明, 70% 乙醇提取皂苷类成分的提取率最高。

**2.1.3 提取条件的优化** 取三七粉 27 份, 每份 1.0g, 精密称定, 以 70% 乙醇作溶剂, 对不同的超声提取时间和提取溶剂体积、提取次数和粉末粒度进行比较见表 1。结果表明, 以 70% 乙醇 50 倍超声提取粗粉 2 次, 每次 30min 效果最好, 故以此条件作为样品提取的优化条件。

表 1 试验因素水平表

因素水平	A	B	C	D
	乙醇倍量	时间(min)	次数	粒度
1	30	30	1	极细粉
2	50	60	2	细粉
3	70	90	3	粗粉

**2.1.4 供试液的制备** 取三七粗粉 3 份, 每份 0.5g, 精密称定, 加 70% 乙醇 50mL 作为溶剂, 超声提取 2 次, 每次 30min, 过滤, 将滤液浓缩至干, 加乙腈水(30:70)溶解, 转移至 50mL 的容量瓶中, 加乙腈水(30:70)至刻度, 摇匀, 离心, 即得; 另取三七粗粉 3

份, 每份 0.5g, 精密称定, 按中国药典(2000 年版)的提取方法制备供试液 3 份。

### 3 实验方法

#### 3.1 高效液相色谱法

**3.1.1 色谱条件** 色谱柱: Shim pack VP-ODS 色谱柱(15cm × 6.0mm, 5μm); 柱温: 室温; 流动相: 乙腈-水梯度洗脱; 流速: 1mL/min; 检测波长: 203nm。此条件下以人参皂苷 R<sub>g1</sub> 计算理论塔板数不低于 3000。对照品及样品色谱图见图 1。

**3.1.2 对照品溶液的制备** 分别取人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re R<sub>b1</sub> 与三七皂苷 R<sub>1</sub> 对照品约 10、10.8、10mg, 精密称定, 置 10mL 量瓶中, 用乙腈-水(30:70)溶解并稀释至刻度, 摇匀。

**3.1.3 线性关系** 分别精密吸取人参皂苷 R<sub>g1</sub> (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4mL)、Re (0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、0.9mL)、R<sub>b1</sub> (0.5、0.7、0.9、1.1、1.3、1.5mL) 与三七皂苷 R<sub>1</sub> (0.1、0.2、0.4、0.6、0.7、0.8mL), 用乙腈-水(30:70)定容至 5mL, 得到系列浓度的对照品混合溶液, 分别进样 3 针, 每次进样 20μL, 记录色谱图。以峰面积积分为纵坐标(Y), 对照品进样量(μg)为横坐标(X)进行线性回归, 得回归方程分别为:

$Y = 90.58X + 138.57, (r = 0.9999); Y = 130.13X + 89.59, (r = 0.9998); Y = 101.42X + 78.69, (r = 0.9998)$  和  $Y = 113.54X + 107.38, (r = 0.9999)$ 。人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re、R<sub>b1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 分别在 1.6~5.6μg、0.4~3.6μg、1.6~4.8μg 和 0.4~3.2μg 内呈良好线性关系。

**3.1.4 精密度试验** 取“3.1.2”项方法同一对照品溶液, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re、R<sub>b1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 含量的 RSD 分别为 0.53、0.82、1.3、0.69%。

**3.1.5 稳定性试验** 取同一批供试品溶液, 分别于 0.2、4、6、8、10、12、24h 对样品进行分析。结果表明, 三七中各皂苷峰面积积分值变化不大, 人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re、R<sub>b1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 的 RSD 分别为 0.98、0.92、0.57、0.75%, 日内稳定性较好。

**3.1.6 重复性试验** 取同一批样品共 5 份, 每份 1.0g, 精密称定, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 测定并计算各皂苷含量, 结果人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re、R<sub>b1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 含量的 RSD 分别为 0.78、0.91、0.99、1.1%。

**3.1.7 加样回收试验** 精密称取已知含量的样品, 分别精密加入人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re、R<sub>b1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub>

对照品适量, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液。测定并计算各皂苷的含量, 结果见表 2~5。

表 2 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 加样回收率试验测定结果(n=5)

样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
10.12	5.00	14.97	99.0		
10.01	5.00	14.98	99.8		
10.03	5.00	14.95	99.5	99.6	0.46
10.10	5.00	14.99	99.3		
10.05	5.00	15.08	100.2		

表 3 人参皂苷 Re 加样回收率试验测定结果(n=5)

样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
2.11	2.00	4.09	99.5		
2.08	2.00	4.02	98.5		
2.01	2.00	3.97	99.0	99.4	0.78
2.09	2.00	4.07	99.5		
2.01	2.00	4.03	100.5		

表 4 人参皂苷 R<sub>b1</sub> 加样回收率试验测定结果(n=5)

样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
10.80	4.00	14.62	98.8		
10.72	4.00	14.68	99.7		
10.70	4.00	14.61	99.4	99.8	0.72
10.79	4.00	14.83	100.3		
10.81	4.00	14.90	100.6		

表 5 三七皂苷 R<sub>1</sub> 加样回收率试验测定结果(n=5)

样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
5.51	5.00	10.48	99.7		
5.49	5.00	10.39	99.0		
5.52	5.00	10.34	98.3	98.9	0.52
5.46	5.00	10.36	99.0		
5.48	5.00	10.34	98.7		

**3.1.8 样品测定** 分别取两种提取方法制备的供试液各 10μL, 按上述色谱条件测定, 结果见表 6。

**薄层色谱扫描法** 按中国药典(2000 年版)检测方法分别测定两种提取方法制备的供试液中人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re、R<sub>b1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量, 结果见表 6。

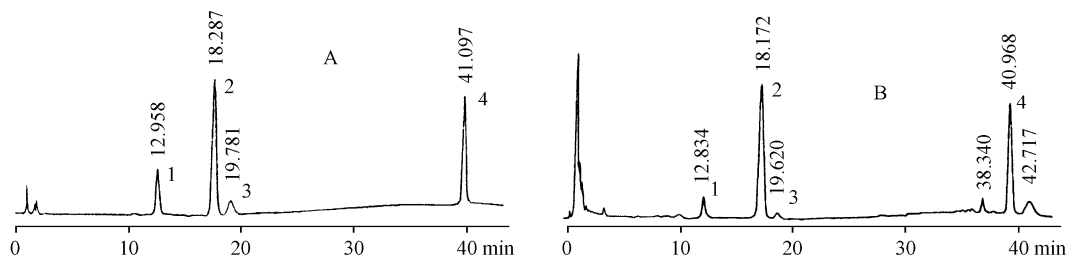


图 1 样品及对照品 HPLC 图

A 对照品 B 样品

1. 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 2. 人参皂苷 R<sub>g1</sub>; 3. 人参皂苷 Re; 4. 人参皂苷 R<sub>b1</sub>

表 6 样品测定结果 (n = 3)

样 品	HPLC 测得量 (%)				TLCS 测得量 (%)				P
	R <sub>g1</sub>	Re	R <sub>b1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>g1</sub>	Re	R <sub>b1</sub>	R <sub>1</sub>	
1	3.67	0.59	3.14	1.11	3.62	0.57	3.12	1.08	> 0.05
2	3.81	0.60	3.16	1.08	3.78	0.63	3.09	1.09	> 0.05
3	3.18	0.60	2.89	0.94	3.09	0.58	2.88	0.96	> 0.05
4	3.12	0.49	3.07	1.00	3.08	0.50	2.98	1.00	> 0.05
5	3.43	0.62	3.10	1.01	3.39	0.57	3.12	0.99	> 0.05
6	3.65	0.61	3.25	1.10	3.60	0.60	3.19	1.11	> 0.05

注: 样品 1~ 3 为优选方法提取, 样品 4~ 6 为中国药典方法提取。

## 4 讨论

**4.1** 由实验结果可得 HPLC 与 TLCS 两检测方法所得结果差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 两检测方法均可用于三七药材的质量监控。

**4.2** 本文对提取方法进行了优化选择, 并与中国药典(2000 年版)提取方法进行比较, 结果表明两种提取方法所得结果相近。中国药典(2000 年版)采用乙醚脱脂, 再用索氏提取, 操作较复杂且不安全, 而本实验采用 70% 乙醇超声提取, 安全、简便、省时, 更适合一般生产单位对三七药材质量的监控。

**4.3** HPLC 法与 TLCS 法比较 HPLC 法具有灵敏度高、快速、准确、专属性强、重现性好和受外界干扰小等特点, 而 TLC 法受外界干扰较大, 除了硅胶的粒度及均匀程度外, 展开剂饱和的温度、温度及层析板在

层析缸中角度都影响着各成分的 R<sub>f</sub> 值, 因此提高三七检测的法定标准势在必行。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 10.
- [2] 王晓强, 倪健, 郭亚健. 三七及其制剂正康脑明注射剂中人参皂苷 R<sub>g1</sub> 及 R<sub>b1</sub> 含量测定研究[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(2): 38-40.
- [3] 王梅, 范亚刚, 高文分. RP-HPLC 梯度洗脱法同时测定三七总皂苷及血塞注射液中 3 种皂苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 410-412.
- [4] 王强, 江英桥, 马世平, 等. 高效液相色谱法测定三七中三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 617-618.
- [5] 李性天, 周密妹, 耿立坚, 等. 高效液相色谱法梯度洗脱测定三七中三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(12): 728-730.
- [6] 何夏秋, 贺建华, 杨蕾, 等. 三七及前列腺康胶囊检验方法的研究[J]. 中成药, 2001, 23(2): 97-100.
- [7] 甄健存, 陈志刚, 常增荣, 等. 血栓通注射液质量评价研究. 中国药学杂志[J]. 2001, 36(12): 847-850.
- [8] 王梅, 范亚刚. RP-HPLC 梯度法测定血塞通滴丸中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub> 的含量[J]. 中成药, 2002, 24(9): 681-683