

HPLC 法在三七及其制剂现代药学研究中的应用

时圣明^{1,2}, 袁永兵¹, 陈常青¹, 赵余庆^{2*}

1 天津药物研究院 医药信息中心, 天津 300193

2 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要 三七为传统中药, 具有散瘀止血、消肿定痛等功效。三七皂苷是三七的主要活性部位, 具有增强机体功能、增加冠脉血流量、扩张血管、降低心肌耗氧量、抑制血小板聚集、降低血粘度等药理活性。高效液相色谱 (HPLC) 法具有快速、高效、分离效能高、重现性好、结果准确可靠等优势, 被广泛应用于三七药材及其制剂的现代药学研究中。综述 HPLC 法在三七及其制剂现代药学研究中的应用, 为三七 (提取物) 及其制剂的质量控制和评价及临床药学研究提供参考和依据。

关键词 三七; 皂苷; HPLC; 质量控制; 临床药学

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2010)06-0472-04

Application of HPLC in modern pharmaceutical study on root of *Panax notoginseng* and its preparation

SHI Sheng-ming^{1,2}, YUAN Yong-bin¹, CHEN Chang-qing¹, ZHAO Yu-qing²

1. Center of Medicinal Information, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. College of Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Key words: the root of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; saponin; quality control; clinical pharmacy

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根, 又名“田七”、“金不换”。主产于我国云南、广西, 多为栽培品。具有散瘀止血、消肿定痛等功效^[1]。现代研究证明, 三七中含有皂苷类、黄酮类、多糖类等多种成分。其中三七皂苷是三七的活性部位, 具有增强机体功能、增加冠脉血流量、扩张血管、降低心肌耗氧量、抑制血小板聚集、降低血黏度, 改善学习记忆功能等药理活性^[2-6]。目前, 三七药材和各种制剂已广泛的应用于临床, 三七总皂苷的水溶液制剂治疗脑血管疾病后遗症、视网膜中央静脉阻塞、眼前房出血。三七片剂用于咳血、吐血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺痛、跌扑肿痛、原发性血小板减小性紫癜, 临床效果较好。有关三七药材、提取物的质量分析、结构测定、制备分离及其制剂的临床药学研究报道日渐增多^[7]。特别是高效液相色谱 (HPLC) 法以其快速、高效、分离效能高、重现性好、结果准确可靠等优势被广泛应用于三七药材及其制剂的现代药

学研究中^[8]。本文就 HPLC 法在三七及其制剂现代药学研究中的应用进行综述, 为三七 (提取物) 及其制剂的质量检测和评价及临床药学研究提供参考和依据。

1 HPLC 法在三七原药材、提取物及其制剂的质量分析中的应用

1.1 原药材方面

研究证明, 三七原药材中含有人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁、Rg₂、Rh₁, 三七皂苷 R₁、R₂、R₃、R₄、R₆ 等 20 多种皂苷类成分。其中以人参皂苷 Rb₁ (35%)、Rg₁ (40%), 三七皂苷 R₁ (15%) 的量较高^[9]。

有关三七原药材中皂苷类成分的 HPLC 法检测分析, 多以这 3 种含量较高的皂苷作为指标性成分进行定量测定。Hu 等^[10]人采用 HPLC 法通过考察流动相 pH 值, 色谱柱温度, 流动相配比, 分析检测出三七中的 7 种皂苷, 它们分别为人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Rb₂、R₀ 和 Rd。结果证明,

收稿日期: 2010-08-12

* 通讯作者: 赵余庆, 教授。Tel: 024-23986521; E-mail: zyq4885@126.com..

HPLC 法对检验三七中皂苷类成分效果较好。刘华钢^[11]采用 HPLC 法测定三七中有效成分。色谱条件为 Shim pack VP ODS (610 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相梯度洗脱; 检测波长 203 nm; 体积流量 110 mL/min; HP1100 系列高效液相色谱仪; 选用的对照品为人参皂苷 Rg₁、Re、三七皂苷 Rb₁ 和三七皂苷 R₁。结果证明此法灵敏度高、快速准确、专属性强、重现性好。Guan 等^[12]应用 UPLC (超高效液相) 与光敏二极管联用, 即 HPLC-PDA 的方法快速测定出三七中 11 种三七皂苷类成分。它们分别为三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rg₂、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 和 Rg₃。这些皂苷的浓度与它们的峰面积的相关系数 (r) > 0.996 8。朱洁等^[13]应用高效液相色谱—蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 检测技术, 以人参皂苷 Rb₁、Rb₃ 和 Rc 作为质量指标, 建立了测定三七不同部位中皂苷的量的新方法。与 HPLC-UV 法进行比较。结果表明, 应用 HPLC-ELSD 法测定明显比 HPLC-UV 法准确、可靠、结果稳定、重现性好。Wang 等^[14]应用 HPCPC-ELSD 法从三七中分离到 3 个化合物, 分别为人参皂苷 Rc、Rb₁、Re, 质量分数达 96.5%、97.6%、98.5%。表明应用 HPCPC-ELSD 法可以测定并有效分离那些没有紫外发色团的化合物。韩金玉等^[15]以三七叶苷粗提物为原料, 采用 D-101B 大孔吸附树脂法和正相 HPLC 制备色谱法建立了分离纯化三七叶苷中人参皂苷单体 Rb₃ 的制备工艺。通过考察流动相组成、体积流量和上样量等因素对分离效果的影响, 确定了适宜的工艺操作条件: 流动相为正丁醇-醋酸乙酯-水溶液 (2:1:1 上层), 体积流量为 35~40 mL/min。在该工艺条件下得到了质量分数达 95% 的人参皂苷单体 Rb₃。本方法简便、分离效率高、重复性好, 为人参单体皂苷类新药的研制开发奠定了基础。

指纹图谱作为中药材及中成药的一种新的质量控制技术, 正得到普遍关注。中药的质量控制是中药现代化的重要组成部分, 中药指纹图谱作为中药质量稳定性的有效检定方法, 在中药材的质量评价和中药生产的质量控制中有着广泛的应用。利用中药色谱指纹图谱技术的中药质量控制模式可全面、客观、真实地控制三七质量。杨雪梅等^[16]采用 HPLC 法建立三七的指纹图谱。应用的色谱柱为 C₁₈ 反相柱 (250.0 mm × 4.0 mm), 检测波长在 203 nm, 流动相为乙腈-水, 采用梯度洗脱的方法对三七进行指

纹图谱分析, 从三七原药材中检测出多种三七皂苷。这种方法可简捷、快速的对三七进行分析鉴定。谢国祥等^[17]采用反相 C₁₈ 柱, 乙腈-水梯度洗脱; 检测波长 203 nm; 体积流量 1.0 mL/min 进行检测。根据相对保留值 (α) 和相对面积 (Sr) 对 HPLC 指纹图谱进行分析对比研究, 建立了一个快速、简易鉴别三七样品 HPLC 指纹图谱分析方法。用指标成分三七皂苷 R₁、Rg₁、Rb₁、Re 进行了确认, 并测定了它们的量。

1.2 提取物方面

黄永焯等^[18]在建立三七药材中人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 的定量测定方法过程中, 运用 HPLC-ELSD 法, 结合固相萃取技术对样品进行预处理。色谱柱为 Hypersil 氨基柱 (200 mm × 4.0 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-异丙醇-10 mmol/L 醋酸铵水溶液 (冰醋酸调 pH 5.0) (75:20:5)。体积流量 0.6 mL/min; 柱温为室温; ELSD 雾化器温度 55℃; 氮气流量 2.3 L/min。测得的人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 的线性范围为 1.0~10.0 μg, 加样回收率为 95.5%~102.5%, 日内精密密度 ≤ 2%, 日间精密密度 ≤ 4%。

1.3 制剂方面

王梅等^[19]用 HPLC 法同时检测三七总皂苷原料及注射液三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 3 种皂苷的量。条件: Spherisorb C₈ 分析柱; 乙腈-水性梯度洗脱: 0~3 min (24:76), 3~15 min (45:55); 体积流量 1.5 mL/min; 检测波长 203 nm。该方法回收率三七皂苷 R₁ 为 99.8%, 人参皂苷 Rb₁ 为 100.6%, 人参皂苷 Rg₁ 为 98.9%, RSD < 1.1%。高效液相色谱梯度洗脱能将多种皂苷很好地分离检测, 提高了时效, 减少了误差, 重现性好, 稳定性高。Lu 等^[20]应用 HPLC-ELSD 法同时测定了复方丹参片中 9 种活性成分的量, 其中包含三七中的活性成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁。该方法回收率三七皂苷 R₁ 为 102.7%, RSD < 3.69%, 人参皂苷 Rb₁ 为 97.8%, RSD < 2.62%, 人参皂苷 Rg₁ 为 102.7%, RSD < 4.18%。程娟等^[21]采用 HPLC 法测定了三七总皂苷中 4 种皂苷的量。色谱柱 Hypersil NH₂ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-1% 磷酸二氢钾溶液 (梯度洗脱), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温为 35℃。测得的三七总皂苷口含片中人参皂苷 Rg₁、Re、

Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 线性范围分别为 0.093 75~6 µg, 0.011 72~0.75 g, 1.406~9 µg 和 0.023 44~1.5 µg。朱关艳等^[22]应用反相 HPLC 法测定了三七散中三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 三种皂苷的量。Hypersil-C₁₈ 为色谱柱, 0.02% 磷酸-乙腈梯度洗脱, 检测波长为 203 nm。回收率分别为 88.68%、91.66%、82.21%。线性范围分别 0.245~6.118、0.823~20.511、0.393~9.892。王梅等^[23]采用 HPLC 法建立了适合三七胶囊制剂的定量测定方法。采用 ODS C₁₈ 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 µm), 流动相为乙腈-水 (20:80) 为流动相, 检测波长 203 nm; 体积流量为 1.0 mL/min。结果表明, 三七皂苷 R₁ 在 1.05~7.0 g 之间线性关系良好 ($r=0.999\ 0$), 方法的回收率为 98.14%, RSD 为 0.70% ($n=5$)。Yun 等^[24]应用 HPLC-UV-ELSD 法同时测定了“QI-SHEN-YI -QI”滴丸中 7 种活性成分的量, 其中包括三七中的三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁。7 种活性成分回收率在 93.3%~100.2%, RSD<5%。结果表明, 这种方法比较稳定, 可以作为三七滴丸制剂的质量控制方法。

2 HPLC 法在药理学研究中的应用

Wang 等^[25]用 HPLC 法测定三七根中的抗癌物质。结果发现, 具有抗癌作用的物质主要是人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁。并通过测定 DNA 中的胞胸腺嘧啶的量, 证明三七皂苷对 DNA 的合成有影响。Wu 等^[26]建立小鼠的心肌梗死模型, 然后给三七皂苷 Rg₁。通过 HPLC 法测定其代谢成分, 证明三七皂苷 Rg₁ 对心脑血管疾病有较好的作用。其中, 人参皂苷 Rg₁ 的生物利用度高达 103.56%。Li 等^[27]应用 HPLC 法在大鼠粪便中分离 4 种活性三七皂苷。HPLC 检测条件: 通过 ig 和 iv 将三七总皂苷注入大鼠体内, 再收集大鼠粪便, 经过 HPLC 分析检测到人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Rd 和三七皂苷 R₁。Jiang 等^[28]在研究三七皂苷对大脑半球的保护机制时应用 HPLC 技术测定了小鼠大脑中 ATP 的量, 进而研究三七皂苷对大脑半球的影响。结果表明, 三七皂苷有抗大脑缺氧的作用。Xu 等^[29]对三七中人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 的药动学进行了研究。应用 HPLC 方法测定了给药后的小鼠血液, 测得人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 的 α 相半衰期分别为 23.40 min 和 24.23 min; β 相半衰期分别 17.96 h 和 14.13 h。另外, 人参皂苷 Rb₁ 的生物利用度为 4.35%, 相对人参皂苷 Rg₁ 低。

3 小结

有效成分的发现和现代检测方法的建立为中药材及其制剂的现代药学研究提供了有利的条件和依据, 特别 HPLC 色谱仪的升级换代、检测灵敏度的提高及各种仪器的联用 (HPLC/MS) 等, 使得各种药材和制剂中有效物质的发现和检测变得更加简捷、快速。也为它们的质量控制和评价提供了可行的方法。从而保证了药材 (品) 应用的有效性和安全性。

参考文献

- [1] 孙小玲. 三七的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2005, 26 (6): 44-45.
- [2] 王楠, 万建波, 李铭源, 等. 三七治疗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39 (5): 787-790.
- [3] 吴兰鸥, 詹合琴, 闫俊岭, 等. 三七皂苷 Rg₁ 对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中草药, 2006, 37 (2): 229-233.
- [4] 袁志兵, 李晓辉, 李淑惠, 等. 三七治疗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中草药, 2006, 37 (5): 741-743.
- [5] 潘欣萍, 王玉芹. 精制原人参二醇皂苷对小鼠学习记忆的影响[J]. 现代药物与临床, 2010, 25 (4): 290-292.
- [6] Dong H J, Jiang B H, Han Y, et al. Transformation of compound K from saponins in leaves *Panax notoginseng* by immobilized β -glucanase [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2 (1): 41-47.
- [7] 杜江容. 三七有效成分含量测定的研究进展[J]. 云南中医中药杂志 2007, 28 (6): 41-42.
- [8] 付春梅, 朱静, 刘三康, 等. HPLC 法测定三七及其制剂中三七素[J]. 中草药, 2006, 37 (1): 68-69.
- [9] 潘俊杰, 郑琴, 杨明. 三七中三七总皂苷的提取、分离纯化及分析方法的研究进展[J]. 中医药现代化杂志, 2007, 9 (6): 77-87.
- [10] Hu P, Luo G A, Wang Q. The retention behavior of cinsenosides in HPLC and its application to quality assessment of *Radix Ginseng* [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31 (10): 1265-1273.
- [11] 刘华钢. 三七含量测定方法的研究[J]. 中国实验方剂学杂志 2004, 10 (5): 14-16.
- [12] Guan J, Lai C M, Li S P. A rapid method for the simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using ultra performance liquid chromatography [J]. *Pharm Biomed Anal*. 2007, 44 (4): 996-1000.
- [13] 朱洁, 张洪彬. HPLC-ELSD 检测技术测定三七不同部位中皂苷的含量[J]. 昆明医学院学报, 2004, 25 (专辑): 31-34.
- [14] Wang J, Bai H L, Liu C M, et al. Isolation and purifica-

- tion of ginsenosides from plant extract of *Panax quinquefolium* L by HPCPCC-ELSD [J]. *Chromatographia*, 2009, 11: 12.
- [15] 韩金玉, 刘 翀, 王 华, 等. 正相液相制备色谱分离纯化三七叶中人参皂苷单体 Rb₃ [J]. 高校化学工程学报, 2005, 19 (2): 192-196.
- [16] 杨雪梅, 刘 旭, 严铁琛, 等. 三七药材指纹图谱的研究[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24 (12): 1410-1412.
- [17] 谢国祥, 邱明丰, 贾 伟. 高效液相色谱法研究三七指纹图谱[J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (8): 1906-1908.
- [18] 黄永焯, 王宁生. HPLC/ELSD 法结合固相萃取测定三七中人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14 (3): 180-182.
- [19] 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通注射液中 3 种皂苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20 (6): 410-413.
- [20] Lu Y, Yu K, Qu H B, *et al.* Development of an HPLC-UV-ELSD method for quantification of multiple components of a Chinese medicine made from *Radix salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* [J]. *Chromatographia*, 2007, 65: 19-24.
- [21] 程 娟, 吴正红, 平其能, 等. 三七总皂苷口含片的含量测定[J]. 中成药, 2006, 28 (7): 959-961.
- [22] 朱关艳, 吴福星, 李郑林. 反相高效液相色谱法测定三七散中三种皂苷的含量[J]. 河南中医学院学报, 2007, 22 (3): 32-33.
- [23] 王 梅, 刘小红, 刘 航. HPLC 测定三参胶囊中三七皂苷 R₁ 的含量[J]. 陕西中医学院学报, 2007, 30 (5): 82-83.
- [24] Yun F, Wang Y, Qu H B, *et al.* Simultaneous determination of seven bioactive compounds in Chinese medicine "QI-SHEN-YI-QI" Dropping Pill by LC-UV and LC-ELSD [J]. *Chromatographia*, 2008, 67: 293-297.
- [25] Wang C Z, Xie J T, Zhang B. Chemopreventive effects of *Panax notoginseng* and its major constituents on SW480 human colorectal cancer cells [J]. *Int Oncol*, 2007, 31 (5): 1149-1156.
- [26] Wei Y J, Li S L, Li P. Simultaneous determination of seven active components of Fufang Danshen Tablet by high performance liquid chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21 (1): 1-9.
- [27] Li L, Sheng Y, Zhang J, *et al.* Determination of four active saponins of *Panax notoginseng* in rat feces by high-performance liquid chromatography [J] *Chromatogr Sci*, 2005, 43 (8): 421-425.
- [28] 姜开余, 钱曾年. 三七总皂苷对神经细胞在体外缺氧性损伤的作用[J]. 中国药理学报, 1995, 16 (5): 399-402.
- [29] Xu Q F, Fang X L, Chen D F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb₁ and Rg₁ from *Panax notoginseng* in rats [J]. *Ethnopharmacology*, 2003, 84 (2-3): 187.