

- Rheum undulatum* L. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 84: 5-9.
- [6] Krumbiegel G, Schulz H. Rhein and aloe-emodin kinetics from senna laxatives in man [J]. *Pharmacology*, 1993, 47 (Suppl): 120-124.

- [7] Tan L, Yuan S, Yang J W, et al. Determination of rhein in human plasma by HPLC and the study of its pharmacokinetics [J]. *Bull Jinling Hospital* (金陵医院学报), 1998, 11 (2): 112-115.

HPLC 法测定三七及其制剂中三七素

付春梅, 朱 静, 刘三康, 李章万*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen 的干燥根, 其中所含三七素 (dencichine, β -草酰基-L- α , β -二氨基丙酸) 具有止血作用^[1,2], 因此三七在祖国传统医药中广泛用于跌打损伤的治疗。研究进一步证明三七素具有止血、增加血小板数的药理活性^[3]。目前, 三七素的测定主要采用的是氨基酸自动分析仪^[4,5], 该法具有分析结果准确的优点, 但仪器价格昂贵, 且不能应用于其他成分的分析。也有将三七素进行荧光衍生化后, 采用薄层扫描的方法测定^[6], 但衍生化产物不稳定, 扫描定量中引起误差的因素较多, 准确度不高。本实验采用离子对反相液相色谱法对三七素进行分离测定, 灵敏、快速、准确, 可用于三七药材及其复方制剂中三七素的测定。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10AVP 紫外检测器, CTO-6A 柱温箱, SEPU 3000 色谱工作站 (杭州普惠科学仪器有限公司)。三七素对照品 (四川大学华西药学院药化教研室提供, 质量分数大于 99%), 三七药材 (产地: 云南文山) 经四川大学华西药学院生药教研室张浩教授鉴定为五加科植物三七的干燥根, 三七制剂为市售; 实验用水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 迪马 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 自填国产 CYW C₁₈ 保护柱 (10 mm × 4.5 mm, 5 μ m), 流动相为含 3.5 mmol/L 磷酸二氢钠的甲醇-0.03% 四丁基氢氧化铵 (20:80, 磷酸调 pH 为 3.8), 体积流量为 1 mL/min, 柱温 40℃, 检测波长为 220 nm, 进样量为 20 μ L。

2.2 对照品溶液的制备: 取三七素对照品约 5 mg, 精密称定, 用流动相溶解制成 0.1 mg/mL 溶液作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取粉碎的三七根粉 1 g, 精密称定, 置 50 mL 烧瓶中, 加硼砂缓冲液 (pH 9.18) 25 mL, 水浴回流 1 h, 提取液转移至 50 mL 量瓶中, 残渣加硼砂缓冲液 15 mL 回流提取 0.5 h, 提取液转移至 50 mL 量瓶中, 残渣用硼砂缓冲液洗涤, 合并提取液与洗涤液, 用硼砂缓冲液定容至 50.00 mL, 混匀, 滤过, 即得。

2.4 线性及范围: 配制不同质量浓度对照品溶液, 注入液相色谱仪测定。以三七素峰面积对进样量进行线性回归, 回归方程为 $Y = -2.12 \times 10^4 + 6.98 \times 10^5 X$, $r = 0.9997$, 线性范围为 0.202~4.04 μ g。

2.5 精密度试验: 同一供试品溶液重复进样 5 次, 三七素峰面积积分值的 RSD 为 0.85%。

2.6 重现性试验: 同一批样品平行测定 5 份, 测得其平均质量分数为 5.61 mg/g, RSD 为 1.1%。

2.7 稳定性试验: 在 4 个不同日期测定同一批供试品, RSD 为 1.5%。

2.8 加样回收率试验: 精密称取三七粉末 (含三七素 5.61 mg/g) 适量 (0.4~0.6 g), 分别加入三七素对照品 (2.2~3.4 mg), 按供试品溶液制备方法制成高、中、低 3 种质量浓度溶液各 3 份, 测定。结果平均加样回收率为 98.8%, RSD 为 1.7%。

按制剂处方配制空白样品 (不含三七), 按供试品溶液的制备方法制备空白溶液并测定, 结果 3 种制剂空白均不干扰三七素测定。冠心丹参片、复方三七胶囊、复方丹参片的高、中、低 3 种质量浓度空白加样平均回收率分别为 98.2% (RSD 为 2.1%, $n=$

* 收稿日期: 2005-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271535)

作者简介: 付春梅 (1971—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事药物分析教学及科研工作。Tel: (028) 85503272 Fax: (028) 85501634

E-mail: lizhangwanlab@163.com

* 通讯作者 李章万 E-mail: lizhangwanlab@163.com

9)、97.6% (RSD 为 1.5%, $n=9$)、99.1% (RSD 为 2.4%, $n=9$)。

2.9 样品测定: 对不同规格和部位的三七(产地: 云南)及市售含三七的复方制剂进行测定, 结果见图 1 和表 1。

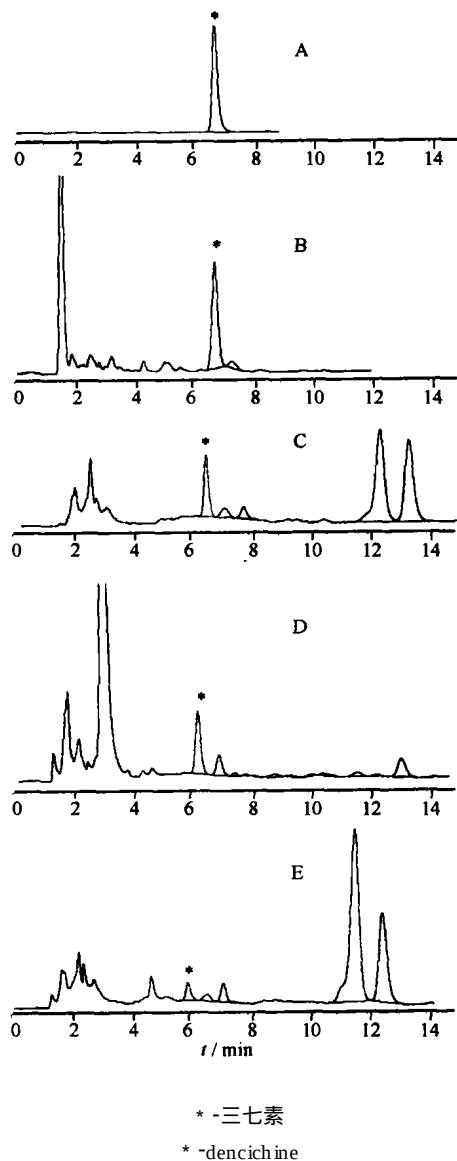


图 1 三七素对照品(A)、三七(B)、冠心丹参片(C)、复方三七胶囊(D)和复方丹参片(E)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of dencichine (A), *P. notoginseng* (B), Guanxin Danshen Tablets (C), Compound Sanchi Capsule (D), and Compound Danshen Tablet (E)

3 讨论

3.1 色谱条件的选择: 曾采用 ODS 及 CN 基填料, 用多种缓冲溶液作为流动相, 以及采用十二烷基硫酸钠作为离子对试剂, 结果均不理想。采用四丁基氢氧化氨作为离子对试剂, 结果本实验选定的流动相

表 1 不同制剂中三七素的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of dencichine in different preparations ($n=3$)

样 品	三七素/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
20 头三七	5.82
30 头三七	5.77
40 头三七	5.70
60 头三七	5.65
80 头三七	5.61
三七剪口	6.09
冠心丹参片(批号: 030912)	2.05
复方三七胶囊(批号: 040207)	1.81
复方丹参片(批号: 031120)	0.60

使三七素在 ODS 柱上保留适中, 峰形对称。磷酸二氢钠浓度、流动相 pH 值均影响峰形和分离度。三七素在流动相中为末端吸收, 兼顾灵敏度及仪器噪声, 选择在 220 nm 波长处测定。

3.2 提取条件的选择: 根据三七素的溶解行为, 分别采用水、50% 乙醇、甲醇、0.5% 氨水、硼砂缓冲液 (pH 9.18) 为提取剂对三七根粉 (60 目) 进行提取。结果提取率依次为硼砂缓冲液 > 水 > 0.5% 氨水 > 50% 乙醇 > 甲醇, 因此选用硼砂缓冲液 (pH 9.18) 作为提取溶剂。以硼砂缓冲液为溶剂, 超声提取、冷浸提取和回流提取 3 种提取方式下, 回流提取的效率最高。回流提取时间的考察结果表明提取 1.5 h 的提取率最高, 继续延长回流时间, 三七素降低。可能是加热时间过长, 三七素发生脱羧反应而减少。实验中对样品分 2 次回流提取, 第 1 次提取 1 h, 第 2 次提取 0.5 h 的方式进行, 可获得较高的提取效率。

References

- [1] Yin J, Guo L G. *Modern Studies on and Clinical Use of Chinese Herbal Drugs* (中草药现代研究与临床应用) [M]. Vol 1. Beijing: Xueyuan Press, 1985.
- [2] Kosuge T, Yokota M, Ochiai A. Studies on antihemorrhagic principles in the crude drugs for hemostatics II. On antihemorrhagic principles in Sanchi Ginseng Radix [J]. *Yakugku Zasshi*, 1981, 107 (7): 629-632.
- [3] Liu H Z, Pang J, Wang Z L, et al. Studies on the effects of *Gynura segetum* and *Panax notoginseng* on the ultrastructure of platelets in guinea-pigs [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1982, 17 (11): 801-807.
- [4] Wu J Z, Li X G, Yang J X. Study on the amino acids in fresh ginseng and red ginseng [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1990, 13 (5): 27-29.
- [5] Jin D Z, Zhang C, Wang Z H. Determination of dencechine in Chinese red ginseng and Gao li ginseng [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1998, 20 (11): 48.
- [6] Zhang G D, Cui J F, Li H Y. HPLC Fluorometric determination of dencichine, a hemostatic component of Sanchi [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1990, 10 (4): 209-211.