

HPLC 法同时测定 8 种三七样品中 5 种皂苷成分的含量

李瑞婷^{1,2}, 娄灯吉³, 姚星宇⁴, 向巧^{1,2}, 邹玉林^{1,2}, 崔秀明^{1,2,5}, 杨晓艳^{1,2,5}*
 (1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500; 2. 云南省三七资源可持续发展利用重点实验室, 云南昆明 650500; 3. 玉溪师范学院化学生物与环境学院, 云南玉溪 653100; 4. 石药集团恩必普药业有限公司, 河北石家庄 052160; 5. 云南省中药新资源开发研究协同创新中心, 云南昆明 650500)

摘要 [目的] 建立同时测定 8 种不同三七样品中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 这 5 种单体皂苷的 HPLC 方法。[方法] 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm。[结果] 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 线性关系良好($R^2 > 0.999$), 方法重复性及回收率均符合要求。[结论] 不同三七样品的皂苷含量具有差异显著性, 此法可为三七药材质量优劣的判断提供一定的理论依据。

关键词 三七; 皂苷成分; HPLC; 含量测定

中图分类号 R 284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)16-0184-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.16.052



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Simultaneous Determination of Five Saponins in Eight *Panax notoginseng* Samples by HPLC

LI Rui-ting^{1,2}, LOU Deng-ji³, YAO Xing-yu⁴ et al (1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500; 2. Yunnan Provincial Key Laboratory of *Panax notoginseng*, Kunming, Yunnan 650500; 3. School of Chemical, Biological and Environmental Sciences, Yuxi Normal University, Yuxi, Yunnan 653100; 4. CSPC-NBP Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang, Hebei 052160)

Abstract [Objective] To establish a HPLC method for simultaneous determination of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g1} , R_c , R_{b1} and R_d in eight *Panax notoginseng*. [Method] Welchrom C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for gradient elution of acetonitrile with water at a flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C and detection wavelength of 203 nm. [Result] The linear relationships of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g1} , R_c , R_{b1} and R_d were good ($R^2 > 0.999$). The repeatability and recovery of the method met the requirements. [Conclusion] The 8 *Panax notoginseng* samples have significant differences in the content of saponins, and this method can provide a theoretical basis for judging the quality of *Panax notoginseng*.

Key words *Panax notoginseng*; Ginsenoside; HPLC; Content determination

三七, 原产于云南和广西交接地区的亚热带山地长绿阔叶林中, 为林下阴生植物, 适宜于冬暖夏凉的气候, 喜半阴潮湿的环境^[1], 是我国名贵的传统中药材, 其根和根茎可入药, 味甘、微苦, 性温, 归肝、胃经, 具有化瘀止血、消肿定痛的功效^[2], 用于治疗咯血、吐血、衄血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺痛、跌扑肿痛等, 是复方丹参滴丸、云南白药、片仔癀、复方三七口服液等常见中药制剂的主要成分之一, 目前以三七为配方进入《国家基本药物目录》和《国家中药保护品种目录》的制剂达 20 余种^[3]。三七通常于秋季花开前采挖, 洗净, 干燥, 备用。三七根部主要分为主根、根茎、支根及须根。三七主根呈类圆锥形或圆柱形, 长 1~6 cm, 直径 1~4 cm, 顶端有茎痕, 周围有瘤状突起; 三七根茎习称“剪口”, 位于三七主根及地上茎之间, 呈不规则的皱缩块状或条状, 表面有数个明显的茎痕及环纹; 三七支根又称大根, 习称“筋条”, 呈圆柱形或圆锥形, 长 2~6 cm, 上端直径约 0.8 cm, 下端直径约 0.3 cm; 三七须根是生长在三七支根上的须状根, 中部直径小于 0.4 cm。

近代研究表明, 三七中的皂苷类成分是其主要的药效成分之一, 也是衡量三七内在质量优劣的重要标准, 其中三七

皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 5 种皂苷是三七的主要成分, 约占总皂苷含量的 80%^[4]。中国药典规定三七主根及根茎为人药部位, 皂苷含量较高, 而三七大根及须根皂苷含量较少, 价格较为便宜, 为非药用部位。此外, 三七不同部位随着生长年限的增长皂苷含量有一定量的增加, 多以三年生主根或根茎入药, 而一年生、两年生、大根、筋条等由于活性成分含量较低, 被称为是不合适的三七样品^[5]。目前市场上三七粉末饮片品牌众多, 规格繁杂, 质量良莠不齐, 市售三七粉末饮片中符合 2015 版《中国药典》规定的合格产品, 仅约占市场份额的 75%^[6]。市场上存在的三七不合格药品多是以假乱真、以次充好或者用非药用部位充当药用部位。该试验抽取的 8 种三七样本包含了不同年份、不同药用部位、不同产地、不同工艺以及病变三七, 采用高效液相色谱法, 测定样本中 5 种皂苷的含量, 为鉴定样品质量的优劣提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 三七样品。 供试的 8 种三七样品均于 2018 年 11 月在云南省文山壮族苗族自治州采样或购买所得, 经昆明理工大学生命科学与技术学院崔秀明研究员鉴定为五加科人参属植物三七 (*Panax notoginseng* (Burkill) F.H.Chen ex C.H.), 8 种样品全部为干三七, 包括大根(三七的筋条又被称为“三七大根”, 采收加工后称筋条, 是由块根上生长出的较粗的支根, 随着三七年限增加而长粗、伸长、增多)、筋条(采收加工前的大根)、高温烘烤过的主根(三年生)、文山一年生主根、两年生主根、三年生主根、霉三七主根(三年生)、根腐病三七

基金项目 国家重点研发计划(2017YFC1701900); 国家自然科学基金项目(21562029, 31960371); 云南省重大科技专项(2017ZF001, 2018ZF014)。

作者简介 李瑞婷(1994—), 女, 辽宁大连人, 硕士研究生, 研究方向: 生物转化。*通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事中药化学成分分离及分析工作。

收稿日期 2019-12-24; 修回日期 2020-02-20

主根(三年生)。

1.1.2 药物与试剂。三七皂苷 R_1 (批号:wkq18061104)、人参皂苷 R_{g1} (批号:wkq18050401)、人参皂苷 R_c (批号:wkq18121407)、人参皂苷 R_{b1} (批号:wkq19012107)、人参皂苷 R_d (批号:wkq18030803),以上 5 种单体人参皂苷对照品,全部购自四川省维克奇生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,其他有机试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.1.3 仪器设备。高效液相色谱仪(美国 Agilent 1260 Infinity),包括四元泵(G1311B)、自动进样器(G1329B)、柱温箱(G1316A)、紫外检测器(G1314F);BL10-250A 型超声波清洗机(上海比朗仪器有限公司);FW-135 型摇摆式中药粉碎机(上海隆拓仪器设备有限公司);CP114 型电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司);UPT-I-20T 优普系列超纯水器(成都超纯科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备。分别精密称取三七皂苷 R_1 以及人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 标准品 6.03、6.99、2.10、5.98、3.01 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解定容,配成质量浓度分别为 0.603、0.699、0.210、0.598、0.301 mg/mL 的混合对照品贮备液。

1.2.2 供试品溶液的制备。参照曾宪彩等^[7]和武双等^[8-9]的方法,称量样品粉末 0.3 g,精密称定,置于具塞三角瓶中,精密加 75%甲醇 25 mL,密塞后称定质量,超声提取 30 min,放置过夜。次日于超声波清洗机上常温下超声提取 30 min,放冷,称定重量,用 75%甲醇补足减少的重量,摇匀。转移至离心管内用离心机进行离心(转速 3 500 r/min,时间 20 min),将上清液与样品固体分离,取上清液过 0.45 μ m 有机膜过滤于 2.0 mL 进样瓶内,即得三七皂苷供试品溶液。

1.2.3 色谱条件。色谱柱为 Welchrom C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为水(A)-乙腈(B);梯度洗脱(表 1);流速 1.0 mL/min;检测波长 203 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 20 μ L。利用 DAD 检测器在 190~400 nm 波长范围内对对照品进行波长扫描,确定样品测定的最大吸收波长。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution programs

时间 Time//min	A(超纯水 Ultrapure water//%)	B(乙腈 Acetonitrile//%)
0~20	90~80	10~20
20~45	80~54	20~46
45~60	54~45	46~55

1.2.4 方法学考察。

1.2.4.1 系统适应性试验。分别吸取对照品溶液及供试品溶液,在“1.2.3”色谱条件下,注入液相色谱仪进行测定,记录色谱图,考察系统适应性。

1.2.4.2 线性关系考察。每次精密吸取“1.2.1”对照品储备液 1 mL,依次稀释 2、3、6、12、30、60、100 倍制备系列混合对照品溶液,分别进样 20 μ L 注入色谱仪,按“1.2.3”色谱条件进行测定,记录各对照品的峰面积,以对照品浓度(X ,

mg/mL)为横坐标、色谱峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归。

1.2.4.3 精密度试验。吸取“1.2.1”混合对照品溶液 20 μ L,重复进样 3 次,测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 这 5 种皂苷成分的峰面积,并计算其 RSD。

1.2.4.4 稳定性试验。取同一样品(文山三年生主根),按照“1.2.2”方法平行制备供试品溶液 3 份,室温放置,按“1.2.3”色谱条件分别于 0、4、8、12、16、24 h 进样分析,分别依法测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 这 5 种皂苷成分的峰面积,并计算其 RSD。

1.2.4.5 重复性试验。取同一样品(文山三年生主根),按照“1.2.2”方法平行制备供试品溶液 3 份,在“1.2.3”色谱条件下进行分析,测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 的峰面积,并计算其 RSD。

1.2.4.6 加样回收率考察。取同一种含量已知的三七样品 3 份,分别等体积加入与样品中 5 种皂苷成分含量相当的对照品溶液,按“1.2.2”方法制备供试品溶液,测出三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 的含量,并计算其加样回收率及 RSD。

1.2.5 样品的含量测定。取 8 种不同的三七样品,按照“1.2.2”方法制备供试品溶液,按照“1.2.3”色谱条件,测得 8 种三七样品中 5 种单体皂苷的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 系统适用性试验。在“1.2.3”色谱检测波长及相应色谱条件下,混合对照品和样品中的三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 的分度度均较好,经计算样品与其他组分峰的分度度 >1.5 ,理论塔板数按三七皂苷 R_1 计算不低于 4 000,符合药典测定要求。对照品及样品的高效液相色谱图见图 1。

2.1.2 线性关系考察。分别以对照品浓度(X , mg/mL)为横坐标、色谱峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程,结果表明三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 这 5 种皂苷成分的线性关系均良好(表 2)。

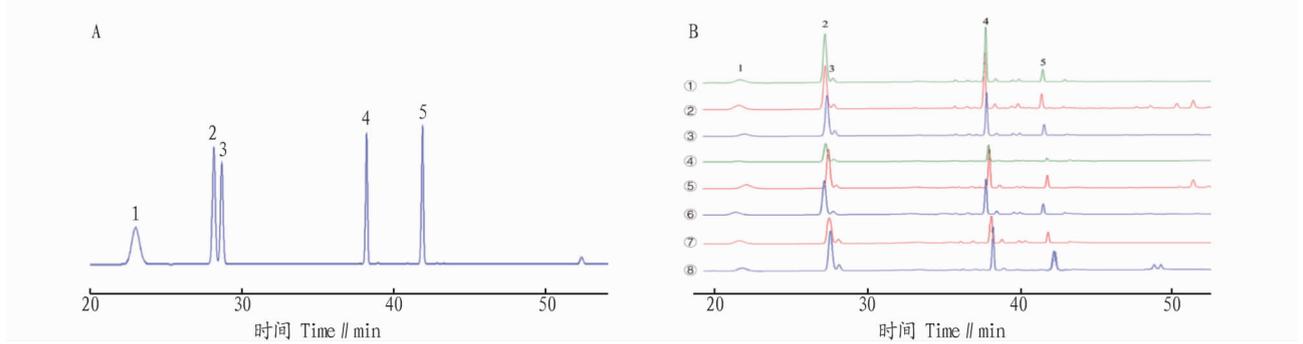
表 2 5 种皂苷的线性考察结果($n=7$)

Table 2 Results of linear regression of five ginsenosides ($n=7$)

成分 Ingredient	线性方程 Linear regression	R^2	线性范围 Linear range mg/mL
三七皂苷 R_1 Notoginsenoside R_1	$Y=6\ 438.7X+35.742$	0.999 7	0.01~0.60
人参皂苷 R_{g1} Ginsenoside R_{g1}	$Y=7\ 206.2X+109.82$	0.999 1	0.05~0.70
人参皂苷 R_c Ginsenoside R_c	$Y=6\ 084.1X+25.97$	0.999 8	0.01~0.20
人参皂苷 R_{b1} Ginsenoside R_{b1}	$Y=5\ 285.7X+61.437$	0.999 8	0.05~0.60
人参皂苷 R_d Ginsenoside R_d	$Y=6\ 208.3X+19.17$	0.999 8	0.01~0.30

2.1.3 精密度试验。按照“1.2.4.3”操作,重复进样 3 次,得出三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_d 峰面积的 RSD 值分

别为 1.24%、2.42%、1.62%、1.75%、2.08%，表明仪器精密程度良好。



注：1.三七皂苷 R₁；2.人参皂苷 R_{g1}；3.人参皂苷 R_e；4.人参皂苷 R_{b1}；5.人参皂苷 R_d。①两年生主根；②三年生主根；③筋条；④一年生主根；⑤高温烘烤主根；⑥霉三七主根；⑦根腐病主根；⑧大根

Note: 1. Notoginsenoside R₁; 2. Ginsenoside R_{g1}; 3. Ginsenoside R_e; 4. Ginsenoside R_{b1}; 5. Ginsenoside R_d. ①Two-year-old taproot; ②Three-year-old taproot; ③Sinews; ④One-year-old taproot; ⑤Roasted taproot after high temperature; ⑥Mildewed taproot; ⑦Root rot of taproot; ⑧Lateral roots

图 1 混合对照品 (A) 和 8 个不同三七样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC of reference substances (A) and eight different *Panax notoginseng* samples (B)

2.1.4 稳定性试验。按照“1.2.4.4”操作，得出三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、R_e、R_{b1}、R_d 这 5 种皂苷成分峰面积的 RSD 值分别为 0.81%、0.28%、1.12%、2.37%、3.23%，表明这 5 种皂苷成分在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验。按照“1.2.4.5”操作，得出三七皂苷 R₁、

人参皂苷 R_{g1}、R_e、R_{b1}、R_d 峰面积的 RSD 值分别 0.60%、1.73%、0.59%、1.26%、0.95%，表明该方法重复性良好。

2.1.6 加样回收试验。按照“1.2.4.6”操作，结果发现(表 3)，三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、R_e、R_{b1}、R_d 的平均回收率均在 95%~105%，RSD 分别为 0.71%、1.09%、2.70%、0.78%、0.07%。

表 3 5 种单体皂苷的加样回收率试验

Table 3 Recovery rate of five monomer saponins

成分 Ingredient		初始含量 Initial content mg	加标量 Spiked amount mg	测定值 Measured value mg	回收率 Recovery %	平均回收率 Average recovery %	RSD %
三七皂苷 R ₁	1	0.060 3	0.525 0	0.524 8	99.96	99.51	0.71
Notoginsenoside R ₁	2	0.060 3	0.312 5	0.312 1	99.87		
	3	0.060 3	0.107 3	0.105 9	98.70		
人参皂苷 R _d	1	0.030 1	0.403 0	0.402 7	99.93	99.88	0.07
Ginsenoside R _d	2	0.030 1	0.212 3	0.212 1	99.91		
	3	0.030 1	0.100 9	0.100 7	99.80		
人参皂苷 R _{g1}	1	0.069 9	0.780 5	0.800 4	102.55	103.77	1.09
Ginsenoside R _{g1}	2	0.069 9	0.353 4	0.370 3	104.78		
	3	0.069 9	0.170 5	0.177 3	103.99		
人参皂苷 R _e	1	0.021 0	0.333 5	0.304 1	91.18	92.94	2.70
Ginsenoside R _e	2	0.021 0	0.210 1	0.201 3	95.81		
	3	0.021 0	0.111 3	0.102 2	91.82		
人参皂苷 R _{b1}	1	0.059 8	0.636 5	0.656 3	103.11	104.04	0.78
Ginsenoside R _{b1}	2	0.059 8	0.420 0	0.439 5	104.64		
	3	0.059 8	0.220 5	0.230 1	104.35		

2.2 含量测定 从不同三七样品的皂苷含量(表 4)可以看出，生长年限不同的三七所含的皂苷含量是不同的，随着生长年限的增加所含的皂苷含量是依次增加的，其中，三年生三七>二年生三七>一年生三七；此外，即便同样都是三年生

三七，不同部位皂苷含量也是不同的，其皂苷含量从高到低依次为：主根、大根、筋条；最后，得病的根腐病三七、发霉的三七和高温烘烤的三七与正常样品(三年生三七主根)相比其皂苷含量均会有不同程度的降低。

表 4 5 种单体皂苷及其总含量测定结果 ($n=3$)

Table 4 Determination of five monomer saponins and their total contents

%

序号 No.	三七样品 <i>Panax notoginseng</i> sample	R_1	R_{g1}	R_e	R_{b1}	R_d	合计 Total
1	一年生三七主根	0.21±0.01	1.66±0.03	0.23±0.01	1.03±0.04	1.03±0.04	3.27±0.06
2	二年生三七主根	0.55±0.01	3.33±0.06	0.48±0.01	2.63±0.04	2.63±0.04	7.62±0.10
3	三年生三七主根	1.10±0.03	3.39±0.13	0.35±0.01	2.84±0.09	2.84±0.09	8.47±0.18
4	三年生三七大根	0.77±0.02	2.96±0.05	0.33±0.01	2.31±0.05	2.38±0.14	6.97±0.19
5	三年生三七筋条	0.70±0.02	2.81±0.06	0.32±0.01	2.33±0.05	2.38±0.12	6.69±0.17
6	根腐病三年生三七主根	0.45±0.02	2.53±0.09	0.33±0.01	2.22±0.09	2.12±0.17	5.96±0.15
7	发霉三年生三七主根	0.71±0.02	3.30±0.03	0.29±0.01	2.82±0.05	2.82±0.05	7.67±0.14
8	高温烘烤三年生三七主根	0.89±0.01	2.92±0.09	0.31±0.01	2.88±0.09	2.88±0.09	7.61±0.17

3 结论与讨论

高效液相色谱法对三七药材及其提取物的含量测定、质量分析,具有快速、分离效能高、结果准确可靠、重现性好等优势,广泛应用于三七药材、提取物及其制剂的研究中,三七中的单体皂苷三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 含量较高,约占三七总皂苷的 80%,这 5 种单体皂苷含量的高低可以在一定程度上反映三七药材质量的优劣^[10]。但三七中皂苷类成分的 HPLC 检测分析,中国药典以三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b1} 、 R_{g1} 这 3 种皂苷作为指标性成分进行定量分析^[11],该研究比较了三七皂苷 R_1 以及人参皂苷 R_{b1} 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_d 这 5 种单体皂苷的含量,更为全面一些。

由于市场上三七饮片或药品多以粉末的形式出现,品牌众多,规格繁杂,质量良莠不齐,且无法从表面形态判断其质量优劣。为了能更客观地判断不同三七的质量,该试验收集了 8 种不同的三七样品(三年生的合格样品和其他 7 种不合格的样品),对其中的三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 的含量进行了测定。该试验的 8 种样品中,一年生的三七主根皂苷含量远低于《中国药典》规定的 5.0%,且低于其他情况致不合格的三七样本,可见一年生三七药用价值不高,此外,三年生正常三七主根的皂苷含量最高,病变及过度加工

的三年生三七主根样品中 5 种皂苷含量相较于正常三年生三七主根样品中的皂苷含量有所降低,该试验对不同情形下的三七样本进行了 5 种皂苷含量的测定,并进行了比较,为三七质量的优劣判断提供一定的理论指导。

参考文献

- [1] 杨崇仁.三七的历史与起源[J].现代中药研究与实践,2015,29(6):83-86.
- [2] 蒲清荣,税不先.三七药理作用研究概述[J].现代医药卫生,2007,23(24):3704-3705.
- [3] 夏鹏国,张顺仓,梁宗锁,等.三七化学成分的研究历程和概况[J].中草药,2014,45(17):2564-2570.
- [4] 张喜平,齐丽丽,刘达人.三七及其有效成分的药理作用研究现状[J].医学研究杂志,2007,36(4):96-98.
- [5] 王振峰,高云涛,张文斌,等.不同生长年限三七中总皂苷含量的变化特征[J].安徽农业科学,2012,40(15):8458-8459,8463.
- [6] 郭换.三七粉末饮片质量评价与稳定性研究[D].成都:成都中医药大学,2018.
- [7] 曾宪彩,朱美霖,蒋艳雪,等.不同清洗处理方式对三七药口中重金属及药效成分的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(8):9-12.
- [8] 武双,崔秀明,郭从亮,等.不同蒸制法对三七主根中皂苷的影响[J].中草药,2015,46(22):3352-3356.
- [9] 武双,郭从亮,崔秀明,等.炮制前处理对三七中三七皂苷含量的影响[J].中国医院药学杂志,2015,35(24):2208-2212.
- [10] 时圣明,袁永兵,陈常青,等.HPLC 法在三七及其制剂现代药学研究中的应用[J].药物评价研究,2010,33(6):472-475.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:11-12.
- [12] 型[J].西部林业科学,2006,35(2):36-41.
- [9] 环境影响评价报告公示:支那河二级水电站工程环评报告[EB/OL].[2019-10-15].http://www.docin.com/p-1928277684.html.
- [10] 唐红燕,许丽萍,李帅锋,等.模拟氮沉降对南亚热带旱冬瓜幼苗生长性状及枝叶构建影响[J].西北林学院学报,2018,33(1):162-166,173.
- [11] 王秋华.森林火灾燃烧过程中的火行为研究[D].北京:中国林业科学研究院,2010.
- [12] 北极与北京蓼科杨柳科植物的叶表皮微形态特征[EB/OL].[2019-10-15].http://www.doc88.com/p-7394822921117.html.

(上接第 125 页)

- [4] 《云南植被》编写组.云南植被[M].北京:科学出版社,1987.
- [5] 吴怀理,胡杰,宿爱芝.钟灵山国家森林公园天然森林植被的主要类型[J].绿色科技,2018(19):190-191,202.
- [6] 车勇,张晓旭,谭志卫,等.盘龙河流域空间信息分析[J].环境科学导刊,2010,29(3):15-19.
- [7] 梁国军.云南怒江流域植被覆盖度及 MODIS 光谱特征季节变化研究[D].昆明:云南大学,2010.
- [8] 司马永康,裴艳辉,唐合文,等.云南黄家河流域天然森林植被的主要类