

HPLC 测定三七花蕾中的皂苷含量研究

张媛, 崔蓉, 杜洪建, 杨奕 (金华职业技术学院 医学院药理学系, 浙江 金华 321017)

摘要:目的 建立三七花蕾中 8 种四环三萜皂苷 (人参皂苷 R_{g_1} 、Re、 R_{b_1} 、Rc、 R_{b_2} 、 R_{b_3} 、Rd 和三七皂苷 R_1) 的高效液相色谱定性定量测定方法。方法 采用 Hypersil ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 分析柱, 以含 0.005% 甲酸的乙腈-水进行梯度洗脱, 在 65 min 内获得良好分离。结果 三七花蕾中 8 种皂苷在一定的浓度范围内, 与峰面积呈良好的线性关系, 回收率分别为: R_1 95.6% ~ 102.5% ($n=3$), R_{g_1} 98.8% ~ 103.1% ($n=3$), Re 95.3% ~ 101.7% ($n=3$), R_{b_1} 98.9% ~ 101.1% ($n=3$), Rc 95.6% ~ 102.3% ($n=3$), R_{b_2} 99.0% ~ 100.4% ($n=3$), R_{b_3} 99.2% ~ 100.3% ($n=3$), Rd 95.0% ~ 96.8% ($n=3$)。结论 该方法灵敏快速, 准确可靠, 可用于三七花蕾的质量控制。

关键词:三七; 花蕾; 皂苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R917.792; R927.2

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 01-0068-04

Determination of Saponins in the Flower Buds of Panax Notoginseng by HPLC

ZHANG Yuan, CUI Rong, DU Hongjian, YANG Yi (Department of Pharmacy, Medicine College, Jinhua College of Profession & Technology, Jinhua 321017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for qualitative and quantitative analysis of eight saponins including ginsenosides R_{g_1} , Re, R_{b_1} , Rc, R_{b_2} , R_{b_3} , Rd and notoginsenoside R_1 in the flower buds of Panax notoginseng by HPLC. **METHODS** The analysis was performed on a Hypersil ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) column with gradient elution of acetonitrile and water both contained 0.005% formic acid in 65 min. **RESULTS** Eight saponins were detected in samples of flower buds, in which protopanaxadiol saponins were the main active components, and the content of ginsenoside R_{b_3} was above 3%. **CONCLUSION** The method was sensitive, rapid and accurate with good reproducibility, and suitable for the quality control of the flower buds of Panax notoginseng.

KEY WORDS: Panax notoginseng; flower buds; saponin; HPLC

三七(*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen), 又名田七、金不换、山漆、人参三七等,是五加科人参属植物,主产于云南文山和毗邻的广西右江流域一带,为我国特有的珍贵药材。其传统药用活性部位为根,主要活性成分为达玛烷型四环三萜皂苷^[1]。三七花蕾为生长两年以上尚未开放的花蕾,民间常作茶饮用,有清凉、平肝、降压之功效^[2]。现代研究表明,花蕾是三七全株之精华,总皂苷含量高达13%以上(主要为原人参二醇型皂苷),是含量最高的部位。三七花蕾具有镇静安神、抗炎镇痛、降血压等药理作用,常用于治疗高血压、偏头痛、失眠等症^[3]。虽然已对三七花蕾中的皂苷成分进行过研究^[4,6],但是目前仍然未见对其单体皂苷进行定量分析的详细报道。笔者在研究中发现,花蕾中原人参二醇型皂苷成分远较药材(根)复杂,难于用目前三七药材皂苷成分检测的HPLC进行检测。为了控制三七花蕾的质量,提供准确可靠、灵敏快速的检测方法,笔者探讨并建立了适用于三七花蕾中皂苷成分分析的HPLC。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 Shimadzu LC-10ATvp 高效液相色谱仪, SCL-10Avp 紫外检测器, FCV-10ALvp 二元梯度泵, DGU-14A 脱气机, SIL-10AF 自动进样器和 CTO-10ASvp 柱温箱, CLASS-VP 工作站。

1.2 材料与试剂

样品为市售,购于文山州三七药材市场,经罗国海副教授鉴定为五加科人参属三七植物的干燥花蕾。人参皂苷 Rg₁ (批号: 0703200322)、Re (批号: 07549608)、Rb₁ (批号: 0704200114) 和三七皂苷 R₁ (批号: 0745-200007) 对照品均购自中国药品生物制品检定所,人参皂苷 Rb₂, Rb₃, Rc 和 Rd 为本实验室分离制得(纯度≥98%)。乙腈、甲醇均为 Merck 公司色谱级试剂,实验用水为超纯水(18.2 MΩ, Millipore Milli-Q SP 水纯化系统)。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

依利特(Elite) Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温 35 °C; 流动相为含 0.005% 甲酸的乙腈(A)和 0.005% 甲酸的水溶液(B); 梯度洗脱条件为: 0 ~ 35 min, 10% ~ 35% A, 35 ~ 65 min, 35% ~ 75% A; 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 203 nm; 进样量 20 μL。塔板理论数和分离度分别为 R₁: 127 461, 1. 81; Rg₁: 169 453, 1. 57; Re: 143 432, 1. 23;

Rb₁: 252 289, 1. 25; Rc: 168 428, 1. 08; Rb₂: 215 272, 1. 08, Rb₃: 12 055, 1. 70; Rd: 168 798, 1. 30。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各种皂苷对照品,分别置 10 mL 量瓶,加色谱级甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,置 4 °C 冰箱备用。精密称取 8 种皂苷对照品即三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, 分别为 2. 35, 2. 90, 2. 95, 3. 65, 3. 02, 3. 39, 4. 22, 3. 23 mg, 用色谱级甲醇溶解并定容至 10 mL, 配成 8 种皂苷混合对照品贮备液。

2.3 供试品溶液的制备

取干燥花蕾置研钵中研磨成粉末,精密称取约 100 mg 花蕾粉末置 25 mL 具塞锥形瓶中,加入 10 mL 70% 甲醇溶液静置 12 h, 50 °C 超声(功率 250 W)提取 80 min, 过滤, 残渣按上述方法重复提取一次, 合并滤液, 真空浓缩干燥得初提物。去离子水溶解初提物, 过 D101 大孔吸附树脂, 70% 乙醇洗脱, 洗脱液真空浓缩至干, 色谱级甲醇溶解残留物并定容至 10 mL 得供试品溶液, 经 0. 45 μm 滤膜过滤, 滤液用于 HPLC 分析。

2.4 标准曲线的制备

取“2.2”项下对照品溶液, 以对照品追加增加峰高法对 8 种单体皂苷进行定性测定。取对照品混合贮备液, 分别稀释 1, 2, 5, 10, 20 和 50 倍配成 6 个不同浓度梯度的皂苷混合对照品溶液。取上述 6 份混合对照品溶液各 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。以峰面积 Y 为纵坐标, 以进样量 X(μg) 为横坐标, 得回归方程如表 1。结果表明, 在试验浓度范围内线性关系良好。色谱图见图 1。

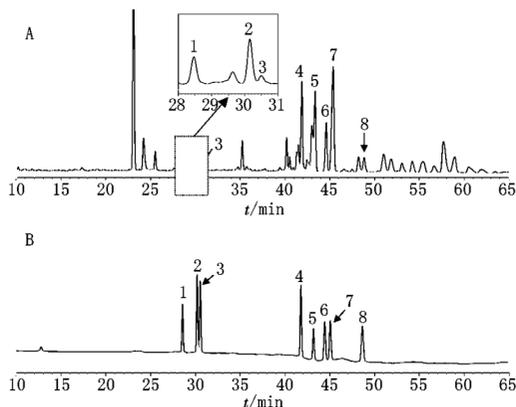


图 1 三七花蕾皂苷 HPLC 图

A - 样品; B - 对照品

1 - R₁; 2 - Rg₁; 3 - Re; 4 - Rb₁; 5 - Rc; 6 - Rb₂; 7 - Rb₃; 8 - Rd

Fig 1 HPLC chromatogram of saponins in flower buds of *Panax notoginseng*

A - sample; B - reference of saponins

1 - R₁; 2 - Rg₁; 3 - Re; 4 - Rb₁; 5 - Rc; 6 - Rb₂; 7 - Rb₃; 8 - Rd

2.5 仪器精密度试验

精密吸取供试品液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样5次,每次进样20 μ L,计算R₁,Rg₁,Re,Rb₁,Rc,Rb₂,Rb₃和Rd的峰面积的RSD分别为2.1%,2.8%,4.1%,3.7%,3.2%,0.5%,1.3%和2.4%。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液,在3d内每12h进样1次,按“2.1”项下的色谱条件进行测定并计算峰面积。结果3d内8种皂苷R₁,Rg₁,Re,Rb₁,Rc,Rb₂,Rb₃和Rd的色谱峰面积无明显变化,8种皂苷峰面积的RSD分别为2.4%,2.6%,2.8%,2.9%,4.2%,2.4%,2.5%和3.7%。因此,供试品溶液在3d内稳定。

表1 8种皂苷的线性回归方程(n=6)

皂苷	保留时间/min	回归方程	线性范围/ μ g	r ²
R ₁	28.56	Y = 290 061 X + 21.71	0.094 ~ 4.70	0.999 9
Rg ₁	30.19	Y = 356 681 X - 210.49	0.116 ~ 5.80	0.999 7
Re	30.54	Y = 323 323 X - 60.71	0.118 ~ 5.90	0.999 3
Rb ₁	41.81	Y = 278 727 X + 42.76	0.146 ~ 7.30	0.999 8
Rc	43.27	Y = 172 045 X + 246.67	0.121 ~ 6.04	0.999 1
Rb ₂	44.53	Y = 207 412 X - 49.25	0.136 ~ 6.78	0.999 7
Rb ₃	45.25	Y = 182 767 X - 93.81	0.169 ~ 8.44	0.999 4
Rd	48.71	Y = 224 830 X - 61.04	0.129 ~ 6.46	0.999 8

2.7 重复性试验

取同一样品,按“2.3”项下的方法,制备5份供试品溶液,精密吸取20 μ L,进样进行测定并计算峰面积。8种皂苷R₁,Rg₁,Re,Rb₁,Rc,Rb₂,Rb₃和Rd峰面积的RSD分别为1.9%,1.6%,2.5%,2.7%,3.6%,1.4%,1.5%和2.6%。

2.8 加样回收率试验

分别精密称取已测含量的样品粉末3份,每份100mg,分别加入适量对照品皂苷R₁,Rg₁,Re,Rb₁,Rc,Rb₂,Rb₃和Rd,按“2.3”项下供试品溶液的制备方法制得供试品溶液,进样20 μ L,记录峰面积并计算回收率,结果见表2。

2.9 样品含量测定

取5批样品,按“2.3”项下操作,在上述色谱条件下,以外标法分别计算各皂苷的含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 提取、分析条件的优化

三七花蕾的主要活性成分是种类十分丰富的原人参二醇型三萜皂苷和挥发油^[7-8]。与三七的根不

表2 8种皂苷回收率实验结果(n=3)

Tab 2 Results of recoveries of eight saponins (n=3)

皂苷 对照品	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
R ₁	0.125	0.127	0.246	97.6	3.6
	0.121	0.122	0.249	102.5	
	0.126	0.125	0.240	95.6	
Rg ₁	0.130	0.128	0.266	103.1	2.4
	0.124	0.128	0.250	99.2	
	0.129	0.128	0.254	98.8	
Re	0.063	0.065	0.122	95.3	3.5
	0.067	0.065	0.134	101.7	
	0.066	0.065	0.126	96.2	
Rb ₁	0.934	0.949	1.874	99.5	1.1
	0.941	0.949	1.911	101.1	
	0.933	0.949	1.861	98.9	
Rc	1.861	1.842	3.789	102.3	3.4
	1.859	1.842	3.689	99.7	
	1.866	1.842	3.543	95.6	
Rb ₂	0.689	0.678	1.373	100.4	0.7
	0.683	0.678	1.355	99.6	
	0.687	0.678	1.352	99.0	
Rb ₃	2.617	2.616	5.228	99.9	0.6
	2.621	2.616	5.197	99.2	
	2.622	2.616	5.255	100.3	
Rd	0.171	0.168	0.327	96.5	1.0
	0.174	0.168	0.331	96.8	
	0.169	0.168	0.320	95.0	

表3 三七花蕾中8种单体皂苷的含量测定结果(mg·g⁻¹)

Tab 3 Content of the saponins determined in the flower buds of Panax notoginseng(mg·g⁻¹)

样品	原人参三醇型皂苷				原人参二醇型皂苷					
	R ₁	Rg ₁	Re	Total	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd	Total
1	1.16	1.13	0.73	3.02	7.52	18.31	5.36	25.34	1.96	58.49
2	1.73	1.49	0.65	3.87	14.61	26.44	12.85	41.75	1.79	97.44
3	0.23	0.43	0.78	1.44	5.38	13.79	4.81	18.26	1.74	43.98
4	0.74	0.97	0.22	1.93	7.86	18.65	6.27	28.57	2.51	63.86
5	0.46	0.64	0.42	1.52	12.60	21.73	9.15	34.53	4.09	82.10

同,花蕾含有较多的绿色素,因此选择D101大孔吸附树脂除去色素,从而尽量减少对分析的干扰。三七花蕾含有丰富的原人参二醇型三萜皂苷,这些皂苷(如本实验测定的5种原人参二醇型皂苷)之间的差别仅仅在于苷元20位上一个糖基的差异,因此

对它们的分离具有一定的难度。Washida 等^[9]分别采用乙腈-0.5%磷酸盐(31:69)分离检测人参皂苷 Rb₁, Rb₂, Rc 和 Rd, 乙腈-0.5%磷酸盐(20:80)测定 Rg₁和 Re。而本实验仅采用乙腈-水的梯度洗脱系统,同样获得良好的分离效果。不仅使难于分离的人参皂苷 Rg₁和 Re 得到较好的分离,而且结构上仅有微小差别的人参皂苷 Rb₁, Rc, Rb₂和 Rb₃之间也获得了非常好的分离效果。研究发现,梯度洗脱中流动相之间比例的微小变化导致分离效率的极大改变,而在洗脱液中加入0.005%甲酸不仅可显著改善峰形,而且分离效率也得到了明显的提高。

3.2 样品的含量测定

原人参二醇型皂苷是三七花蕾中的主要皂苷,这与三七的地下部分即根具有显著的差别。Wan 等^[10]采用 HPLC-ELSD 方法也仅检测到 5 种原人参二醇型皂苷。本实验采用 HPLC-UV 方法不仅使花蕾中皂苷得到很好的分离,而且还定性定量分析了 8 种原人参二醇和原人参三醇型皂苷,其中人参皂苷 Rg₁, Re 和三七皂苷 R₁这 3 种皂苷首次得到定性定量分析。在 8 种原人参二醇和原人参三醇型皂苷中,人参皂苷 Rc 和 Rb₃含量均高于 1%,甚至高达 4%以上,表明花蕾是三七植物中这两种皂苷的高含量部位。原人参三醇型皂苷含量显著小于原人参二醇型皂苷,相差约 20~50 倍。而文献报道^[11]三七中原人参三醇型皂苷含量与二醇型皂苷的含量比约为 1:2,说明花蕾中还含有其它较高含量的三醇型皂苷。图 1A 中保留时间 23~26 min 之间出现的 3 个主要峰似乎正是这些原人参三醇型皂苷峰,值得进一步采用其它更精确的分析方法如 HPLC/MS/MS 进行研究。

REFERENCES

[1] ZHENG G Z, YANG C R. Application and biology of Panax

notoginseng(三七生物学及其应用)[M]. Beijing: Science Press, 1994:47-49.

- [2] ZHONG HUA BEN CAO. Zhong Hua Ben Cao(中华本草)5th ed [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 851-853.
- [3] YOSHIKAWA M, MORIKAWA T, KASHIMA Y, et al. Structures of new dammarane-type triterpene saponins from the flower buds of Panax notoginseng and hepatoprotective effects of principal ginseng saponins [J]. J Nat Prod, 2003, 66(7): 922-927.
- [4] TANIYASU S, TANAKA O, YANG T R, et al. Dammarane saponins of flower buds of *Panax notoginseng* (Sanchi-Ginseng) [J]. Planta Med, 1982, 44(2): 124-125.
- [5] WEI J X, LIU L, XU R X. Research of saponins of flower buds of Panax notoginseng [J]. Bull Chin Materia Medica (中药通报), 1984, 9(5): 223-225.
- [6] ZUO G Y, WEI J X, DU Y C. Studies on saponins from flower buds of sanchi [J]. Nat Prod Res Develop (天然产物研究与开发), 1991, 3(4): 24-26.
- [7] MA N, GAO J, KE J H. Process regulations of flower buds of Panax notoginseng [J]. Res Prac Chin Med (现代中药研究与实践), 2003, S1: 53-54.
- [8] LU Q, QIN J, ZHANG P. Simultaneous Distillation and Solvent Extraction and GC/MS Analysis of Volatile Oil from Flowers of Panax notoginseng (Burk.) F. H. Chen [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005, 25(3): 284-286.
- [9] WASHIDA D, KITANAKA S. Determination of polyacetylenes and ginsenosides in Panax species using high performance liquid chromatography [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(11): 1314-1315.
- [10] WAN J B, YANG F Q, LI S P, et al. Chemical characteristics for different parts of Panax notoginseng using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD [J]. J Pharm Biomed, 2006, 41(5): 1596-1597.
- [11] FENG H C. Chinese Ginseng(人参)[M]. Beijing: Popular Science Press, 1986: 123-124.

收稿日期:2007-07-06