

- determination of carbamazepine, lamotrigine, clonazepam, diazepam and oxazepam in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(11): 1215-1220.
- [2] LI X F, TANG L, LUO Y C, et al. Determination of benzodiazepines drugs in blood using isolate SLE-supported liquid extraction and GC-MS/MS [J]. For Sci Tech(刑事技术), 2014(2): 27-29.
- [3] WANG X Q, LIN D, LI Y X, et al. LC-APCI-MS/MS simultaneous determination of 7 benzodiazepine drugs in human plasma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(3): 403-407.
- [4] LIU L X, CUI Y M. RP-HPLC simultaneous determination of 7 benzodiazepines in human plasma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(2): 336-339.
- [5] GUO S C, LI H, GU N, et al. Simultaneous determination of eight kind of benzodiazepines in human plasma by RP-HPLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2010, 25(4): 453-455.
- [6] YUAN Y, GUO W W, LI J, et al. Simultaneous determination of 10 kinds of common hypnotics in human urine by GC-MS [J]. China Pharm(中国药房), 2013, 24(46): 4362-4364.
- [7] ZHANG J L, WANG Z L, ZHANG Y N. Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2014, 33(4): 479-482.
- 收稿日期: 2015-04-24

HPLC 测定三七提取液中三七皂苷 $R_2(S)$ 、七叶胆苷 XVII 和人参皂苷 F_2 的含量

陈华丽, 潘坚扬, 瞿海斌, 龚行楚^{*}(浙江大学药物信息学研究所, 浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要:目的 建立同时测定三七提取液中三七皂苷 $R_2(S)$ 、七叶胆苷 XVII 及人参皂苷 F_2 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters Acquity UPLC CSH- C_{18} (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 流动相为 0.01%甲酸-水(A)和 0.01%甲酸-乙腈(B), 梯度洗脱, 检测波长为 203 nm, 进样量为 5 μ L, 流速为 0.35 mL·min⁻¹, 柱温为 40 $^{\circ}$ C。结果 在 43 min 内可完成三七皂苷 $R_2(S)$ 、七叶胆苷 XVII 和人参皂苷 F_2 的分离测定。3 种皂苷峰面积和浓度线性关系良好($r^2>0.999$ 8); 日内和日间精密度 RSD<3.4%; 回收率为 98.4%~102.1%。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 可用于三七提取液中皂苷成分的测定。

关键词:三七提取液; 三七皂苷 $R_2(S)$; 七叶胆苷 XVII; 人参皂苷 F_2 ; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1114-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.021

Determination of Notoginsenoside $R_2(S)$, Gypenoside XVII and Ginsenoside F_2 in Notoginseng Radix et Rhizoma Extracts by HPLC

CHEN Huali, PAN Jianyang, QU Haibin, GONG Xingchu^{*}(Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for the simultaneous determination of notoginsenoside $R_2(S)$, gypenoside XVII and ginsenoside F_2 in Notoginseng Radix et Rhizoma extracts. **METHODS** The analysis was performed on an Agilent 1260 series HPLC system with Waters Acquity UPLC CSH- C_{18} (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) column. Gradient elution using 0.01%-formic acid-water and 0.01%-formic acid-acetonitrile as the mobile phases with detection wavelength of 203 nm, flow rate of 0.35 mL·min⁻¹, injection volume 5 μ L and column temperature 40 $^{\circ}$ C was applied. **RESULTS** The total analyzing time was 43 min. The high determination coefficient values ($r^2>0.999$ 8) indicated good correlations between saponin concentrations and their peak areas within the test ranges. The overall intra-day and inter-day variations (RSD) of 3 major saponins were <3.4%. The developed method was successfully used for the analysis of saponins in Notoginseng Radix et Rhizoma extracts with overall recovery of 98.4%–102.1% for all the analytes. **CONCLUSION** This analytical method is accurate and convenient for the determination of 3 saponins in *Panax notoginseng* extracts.

KEY WORDS: *Panax notoginseng* extracts; notoginsenoside $R_2(S)$; gypenoside XVII; ginsenoside F_2 ; HPLC

基金项目: 浙江省教育厅科研项目(Y201225492)

作者简介: 陈华丽, 女, 硕士生 Tel: (0571)88208426 E-mail: 21219025@zju.edu.cn *通信作者: 龚行楚, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (0571)88208426 E-mail: gongxingchu@zju.edu.cn

三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen]为五加科人参属植物,又名田七、山漆、金不换等,为我国名贵中药材,产于云南和广西^[1]。三七具有活血化瘀、消肿止痛和滋补强壮等功效^[2],含有皂苷、黄酮、多炔醇、多糖、氨基酸、肽以及脂肪酸等各类成分。皂苷类成分是三七制剂的主要有效成分和质控指标^[3]。虽然三七中不同皂苷成分有60余种^[4-5],但是大多数研究集中于三七药材中含量较高的三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rd 等5种^[6-7]。

周家明等^[8]发现三七皂苷 R₂ 对冠脉结扎所致大鼠心肌缺血性损伤具有保护作用,可明显降低大鼠心肌缺血模型心律失常的发生率,并且减少模型大鼠心肌梗死面积。三七皂苷 R₂ 也能够明显抑制咖啡因导致的自主活动增加。七叶胆苷具有降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗衰老、保护肝脏及增强肌体免疫功能等作用^[9]。Lee 等^[10]的研究表明,七叶胆苷在体内具有抗肿瘤活性,其可能机制为代谢生成了具有诱导肿瘤细胞凋亡作用的20-*O*-(β -吡喃葡萄糖基)-20(*S*)-原人参二醇。陈茜^[11]发现人参皂苷 F₂ 对胃癌 SGC-7901 细胞和肺癌 SPC-A-1 细胞均具有抑制作用。

三七皂苷 R₂、七叶胆苷 XVII 和人参皂苷 F₂ 等3种成分均具有显著药理活性,所以对这3种成分的检测有利于提高三七制剂的质量控制水平。本研究建立了三七提取液中该3种皂苷成分的定量测定方法,以期提高三七提取工艺控制水平。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器;XS105 型分析天平(梅特勒-托利多国际股份有限公司);Milli-Q 型超纯水机(美国 Millipore 公司);Minispin 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

三七(批号:20130216),来源于云南文山,经浙江大学药学院陈柳蓉副教授鉴定为 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根茎;三七皂苷 R₂(S)(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-13031102,纯度为93.53%);七叶胆苷 XVII (批号:110421,130809,纯度>98%)及人参皂苷 F₂(批号:130809,纯度>95%)均购自上海融禾医药科技发展有限公司;乙腈和甲醇均为色谱纯,

购于 MERCK 公司;甲酸(色谱纯,ROE 公司);无水乙醇(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 三七醇提液的制备

准确称取50 g三七,第1次用200 mL的70%乙醇溶液提取5 h。第2次和第3次用150 mL的70%乙醇溶液分别提取5 h,提取液用纱布过滤。合并3次提取所得过滤液,即得三七醇提液样品。

2.2 供试品溶液的制备

取适量上述三七醇提液于5.0 mL量瓶中,用70%甲醇溶液稀释并定容,制成每1 mL中约含0.46 g提取液的稀释溶液。10 000 r·min⁻¹离心10 min,0.22 μ m有机相膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取三七皂苷 R₂(S)对照品5.75 mg,七叶胆苷 XVII 对照品4.18 mg,人参皂苷 F₂对照品0.69 mg,置于5 mL量瓶中,70%甲醇溶液定容,摇匀,即得含三七皂苷 R₂(S)1 150 μ g·mL⁻¹,七叶胆苷 XVII 836 μ g·mL⁻¹,人参皂苷 F₂ 138 μ g·mL⁻¹的混合对照品储备液。

2.4 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC CSH-C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); Waters Acquity UPLC CSH-C₁₈ 预柱;流动相:0.01%甲酸-水(A),0.01%甲酸-乙腈(B),线性梯度洗脱:0 min 20% B,21.5 min 37% B,40 min 90% B,运行43 min;流速:0.35 mL·min⁻¹;检测波长:203 nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ L。在此色谱条件下,样品中三七皂苷 R₂(S)、七叶胆苷 XVII 和人参皂苷 F₂ 达到基线分离,结果见图1。

2.5 线性关系考察

精密吸取“2.3”项下混合对照品储备液逐级稀释,各取5 μ L进样,测定峰面积积分值,以质量浓度为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y)进行线性回归。三七皂苷 R₂(S)的回归方程为 $Y=4\,126.6X+8.269\,6$, $r^2=1.000\,0$,线性范围为14.4~1 150 μ g·mL⁻¹;七叶胆苷 XVII 的回归方程为 $Y=3\,413.1X+6.844$, $r^2=1.000\,0$,线性范围为10.5~836 μ g·mL⁻¹;人参皂苷 F₂ 的回归方程为 $Y=3\,855.1X-0.644\,6$, $r^2=0.999\,8$,线性范围为1.70~138 μ g·mL⁻¹。

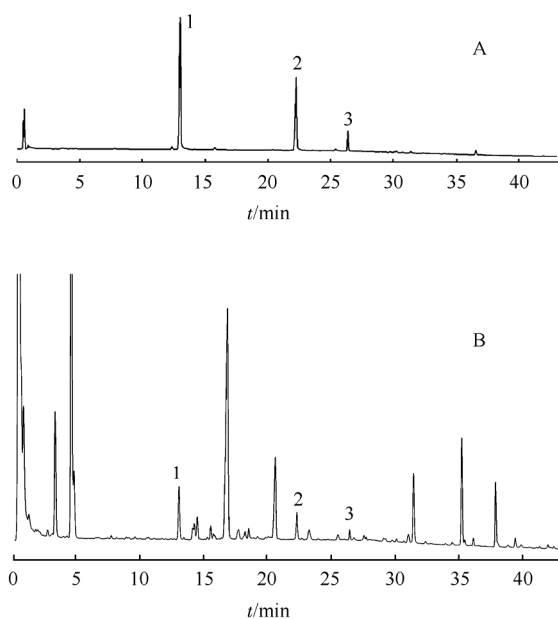


图1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-三七皂苷 $R_2(S)$; 2-七叶胆苷 XVII; 3-人参皂苷 F_2 。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-control solution; B-sample solution; 1-notoginsenoside $R_2(S)$; 2-gypenoside XVII; 3-ginsenoside F_2 。

2.6 仪器精密度试验

按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 取同一份供试品溶液平行进样 6 次, 测定各成分的峰面积, 结果三七皂苷 $R_2(S)$ 峰面积的 RSD 为 0.10%; 七叶胆苷 XVII 峰面积的 RSD 为 0.70%; 人参皂苷 F_2 峰面积的 RSD 为 0.66%。结果表明仪器精密度良好。

2.7 方法精密度试验

2.7.1 日内精密度试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行制样 6 份, 测定质量浓度, 结果三七皂苷 $R_2(S)$ 浓度平均值为 $0.354 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.51%; 七叶胆苷 XVII 浓度平均值为 $0.169 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.45%; 人参皂苷 F_2 浓度平均值为 $0.038 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.83%。结果表明, 方法日内精密度良好。

2.7.2 日间精密度试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 每日平行制样 3 份, 测定质量浓度, 连续测定 6 d, 结果三七皂苷 $R_2(S)$ 浓度平均值为 $0.350 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.33%; 七叶胆苷 XVII 浓度平均值为 $0.159 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 3.32%; 人参皂苷 F_2 浓度平均值为 $0.039 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.09%。结果表明方法日间精密度良好。

2.8 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 在室温下放置约 0, 8, 12, 16, 20, 24 h 后, 按“2.4”项下色谱条件进样分析, 测定峰面积, 结果三七皂苷 $R_2(S)$ 峰面积的 RSD 为 0.16%; 七叶胆苷 XVII 峰面积的 RSD 为 1.13%; 人参皂苷 F_2 峰面积的 RSD 为 0.58%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

精密吸取已知各组分含量的样品[“2.1”项下三七提取液, 含三七皂苷 $R_2(S)$ 、七叶胆苷 XVII、人参皂苷 F_2 分别为 $0.320, 0.150, 0.036 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$] 0.5 mL 共 9 份, 分别加入含一定浓度 3 种皂苷的混合对照品溶液 0.5 mL, 用 70% 甲醇溶液稀释定容至 2.0 mL, 离心过滤取续滤液, 按“2.4”项下色谱条件测定各组分的含量, 计算回收率, 结果见表 1。3 种皂苷的加样回收率为 98.4%~102.1%, 说明加样回收率良好。

表 1 加样回收率试验结果($n=3$)

Tab. 1 Result of recovery test($n=3$)

成分	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	RSD/ %	平均回收 率/%
三七皂苷 $R_2(S)$	0.073 0	0.074 5	102.09	2.14	101.02
	0.131 5	0.132 1	100.50	0.24	
	0.185 0	0.185 9	100.48	1.14	
七叶胆苷 XVII	0.050 0	0.050 9	101.91	1.97	101.13
	0.090 6	0.091 2	100.69	0.29	
	0.126 9	0.127 9	100.78	1.06	
人参皂苷 F_2	0.013 7	0.013 7	100.14	1.65	99.13
	0.024 7	0.024 4	98.82	0.31	
	0.034 8	0.034 2	98.42	0.84	

2.10 样品测定

分别准确称取三七 100 g, 加入 10 倍量 86% 乙醇溶液加热回流提取 8 h。分别在 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6.5, 8 h 采样, 对采集样品离心浓缩去除提取溶剂后, 用 70% 甲醇溶液充分溶解, 按“2.4”项下方法测定不同提取时间下 3 种皂苷的含量。结果见表 2。由结果可知, 3 种皂苷浓度随着提取时间增加而增加, 本定量分析方法可用于分析三七提取液中相应皂苷浓度。

表2 三七提取液中皂苷含量

Tab. 2 Saponin contents in the extract of Notoginseng Radix et Rhizoma

提取时间/ h	三七皂苷 R ₂ (S)/ mg·g ⁻¹	七叶胆苷 XVII/ mg·g ⁻¹	人参皂苷 F ₂ / mg·g ⁻¹
0.5	0.078	0.051	0.006
1	0.118	0.075	0.011
2	0.156	0.093	0.015
3	0.181	0.101	0.018
4	0.206	0.107	0.021
5	0.222	0.111	0.023
6.5	0.232	0.111	0.025
8	0.252	0.118	0.028

3 结论

本研究建立了三七提取液中三七皂苷 R₂(S)、七叶胆苷 XVII 以及人参皂苷 F₂ 的含量测定方法, 该方法简单易行, 准确可靠, 重现性好, 可用于监测三七提取液中上述 3 种皂苷成分的含量变化。

REFERENCES

[1] 时圣明, 李巍, 曹家庆, 等. 三七果化学成分的研究[J]. 中草药, 2010, 30(8): 1249-1251.

[2] WAN X Q, CHEN S H, PENG Y S, et al. Comparative of Notoginseng Radix et Rhizome and its processed products on enriching blood and supplementing Qi of rats with blood-deficiency [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 696-699.

[3] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 450-451.

[4] 黄凤. 三七叶皂苷成分及其单体提取分离研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(6): 999-1005.

[5] 李庆. 三七的化学成分及其对冠心病的药理作用分析[J]. 中国保健营养, 2013, 24(7): 2098-2099.

[6] CUI H M, ZHANG C G, LIN H, et al. Determination of effective components in different position of *Panax notoginseng* by HPLC [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2009, 32(12): 1810-1813.

[7] WAN X Q, XIA B H, LOU Z H, et al. Determination of saponnins in different processed products of *Panax notoginseng* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2011, 26(4): 841-843.

[8] 周家明, 叶祖光, 崔秀明, 等. 三七皂苷 R₁、R₂ 和人参皂苷 Rb₁ 药效学研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1494-1497.

[9] HONG X Y. Research of extraction, separation, purification and antioxidant effection of Gypenosides [D]. Guangdong: South China University of Technology, 2012.

[10] LEE S J, KO W G, KIM J H, et al. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease [J]. Biochem Pharmacol, 2000(60): 677-685.

[11] CHEN Q. Study on the preparative methods and the anti-tumor effect of ginsenoside F₂ [D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2008.

收稿日期: 2014-10-28

HPLC 同时测定野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量

沈亚芬¹, 杜伟锋^{2*}, 郑敏霞¹, 葛卫红² (1.浙江省中医院, 杭州 310006; 2.浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 杭州 311401)

摘要: 目的 建立同时测定野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量的方法。方法 采用高效液相色谱法, 应用 Agilent Eclipse C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 二极管阵列检测器(DAD), 以甲醇-乙腈-0.2%乙酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 334 nm。结果 绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的峰面积与浓度的线性关系良好 ($r>0.9993$), 平均加样回收率分别为 99.5%, 100.4%, 100.4%。结论 该方法简单、准确、重复性好, 可为全面评价和控制野菊花的质量提供依据。

关键词: 野菊花; 绿原酸; 咖啡酸; 蒙花苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1117-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.022

基金项目: 浙江省中医药学会医院中药科研专项基金——华东专项(2013109)

作者简介: 沈亚芬, 女, 主管中药师 Tel: (0571)87071657 E-mail: 2855224757@qq.com *通信作者: 杜伟锋, 男, 博士, 副教授 Tel: (0571)85369163 E-mail: 2855224757@qq.com