

[质 量]

HPLC 法同时测定熟三七散中 13 种皂苷

于泽萱¹，代向向²，杜双有²，茅仁刚²，吴献荣^{2*}

(1. 浙江中医药大学，浙江 杭州 310053；2. 山西仟源医药集团股份有限公司上海研发分公司，上海 201203)

摘要：目的 建立 HPLC 法同时测定熟三七散（三七）中人参皂苷 Rb₁、Rd、F₄、Rg₁、20 (R) -Rg₃、20 (S) -Rg₃、Rg₅、20 (R) -Rh₁、20 (S) -Rh₁、Rh₄、Rk₁、Rk₃ 和三七皂苷 R₁ 的含有量。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；流动相乙腈-水，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 °C；检测波长 203 nm。结果 13 种皂苷在各自范围内线性关系良好 ($r=0.9995$)，平均加样回收率 90.01% ~ 108.32%，RSD 0.62% ~ 3.54%。结论 该方法灵敏准确，可用于熟三七散的质量控制。

关键词：熟三七散；皂苷；HPLC

中图分类号：R927.2

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2017)06-1179-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.014

Simultaneous determination of thirteen saponins in Shusanqi Powder by HPLC

YU Ze-xuan¹，DAI Xiang-xiang²，DU Shuang-you²，MAO Ren-gang²，WU Xian-rong^{2*}

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Shanghai Research and Development Branch, Shanxi C&Y Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: AIM To develop an HPLC method for the simultaneous content determination of ginsenosides Rb₁, Rd, F₄, Rg₁, 20 (R) -Rg₃, 20 (S) -Rg₃, Rg₅, 20 (R) -Rh₁, 20 (S) -Rh₁, Rh₄, Rk₁, Rk₃ and notoginsenoside R₁ in Shusanqi Powder (processed *Notoginseng Radix et Rhizoma*). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 35 °C thermostatic Agilent Zorbax-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 203 nm. **RESULTS** Thirteen saponins showed good linear relationships within their own ranges ($r=0.9995$), whose average recoveries were 90.01% ~ 108.32% with the RSDs of 0.62% ~ 3.54%. **CONCLUSION** This sensitive and accurate method can be used for the quality control of Shusanqi Powder.

KEY WORDS: Shusanqi Powder; saponins; HPLC

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根，主要产于云南、广西一带，是我国著名的珍贵中药材^[1]，历来有“生消熟补”之说，生三七具有散淤止血，消肿定痛功效，主要用于咯血、吐血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺疼、跌扑肿痛^[2-4]；熟三七长于滋补，可以缓和生三七的止血特性，增强补血、补气的功效，主治补血和血，用于贫血、失血

虚弱、月经不调、产后恶血不尽^[5-6]。现代研究表明，生三七的主要活性成分为人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 和三七皂苷 R₁^[7]，其经高温蒸制后成为熟三七，这些成分的种类和含有量发生了显著变化，具有增强免疫、抑制肿瘤等多种生理活性^[8]。

熟三七散是具有国家食品药品监督管理局标准 [WS-11219 (ZD-1219) -2002] 的中成药，经测试分析发现，其中人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 和三七皂苷 R₁

收稿日期：2017-03-06

作者简介：于泽萱（1995—），女，研究方向为中医学。Tel: (0571) 86633177, E-mail: 578663806@qq.com

* 通信作者：吴献荣（1986—），女，硕士，从事药物分析研究。Tel: (021) 50767671, E-mail: xxwxr668@126.com

含有量显著降低，并产生了人参皂苷 F_4 、20 (R)- Rg_3 、20 (S)- Rg_3 、 Rg_5 、20 (R)- Rh_1 、20 (S)- Rh_1 、 Rh_4 、 Rk_1 、 Rk_3 等多种皂苷。2015 版《中国药典》规定，生三七含人参皂苷 Rb_1 、 Rg_1 和三七皂苷 R_1 的总量不得低于 5.0%^[3]，但生三七中人参皂苷 Rg_1 含有量高于 1.8%^[9-10]，而国家食品药品监督管理局标准规定，熟三七散每 1 g 含三七以人参皂苷 Rg_1 计，不得少于 18.0 mg，故该标准并不能对生、熟三七进行有效区分。

因此，本实验建立 HPLC 法同时测定熟三七散中固有人参皂苷 Rb_1 、 Rd 、 Rg_1 和三七皂苷 R_1 ，以及转化得到的新皂苷——人参皂苷 F_4 、20 (S)- Rh_1 、20 (R)- Rh_1 、 Rh_4 、20 (S)- Rg_3 、20 (R)- Rg_3 、 Rg_5 、 Rk_1 、 Rk_3 的含有量，对有效控制熟三七散质量、规范其炮制工艺有着重要意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪（配置四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱）；Agilent G4212B 1260 DAD 检测器；Agilent ChemStation 色谱工作站；Millipore 超纯水系统；Sartorius BT125D 电子天平（十万分之一）；SCQ-6201 超声波清洗机（上海声彦超声波仪器有限公司）。

1.2 试药 三七皂苷 R_1 （批号 110745-201318，含有量 94%）、人参皂苷 Rb_1 （批号 110704-201424，含有量 93.7%）、 Rd （批号 111818-201302，含有量 94.2%）、 Rg_1 （批号 110703-201529，含有量 95%）、20 (S)- Rg_3 （批号 110804-200603，含有量 100%）对照品均购自中国食品药品检定研究院；人参皂苷 F_4 （批号 MUST-15020418，含有量 99.67%）、20 (R)- Rg_3 （批号 MUST-14112711，含有量 99.41%）、 Rg_5 （批号 MUST-15051917，含有量 98.96%）、20 (S)- Rh_1 （批号 MUST-15020914，含有量 97.68%）、20 (R)- Rh_1 （批号 MUST-15020912，含有量 99.27%）， Rh_4 （批号 MUST-15050415，含有量 99%）、 Rk_1 （批号 MUST-14092812，含有量 99.23%）对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司；人参皂苷 Rk_3 （批号 15051524，含有量 96%）购自上海同田生物技术股份有限公司。甲醇为色谱纯（上海阿达玛斯试剂有限公司）；乙腈为色谱纯（美国 Fisher Scientific 公司）；水为超纯水。三七剪口和筋条购自云南省文山州三七批发市场，经上海中医药大学李俊松高级实验师鉴定分别为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.

H. Chen 的干燥根茎和支根。

1.3 熟三七散 按照国家食品药品监督管理局标准方法自制，制备方法为取三七剪口 7 份、筋条 3 份，混合破碎成小块，置于蒸锅中，饱和水蒸气蒸制 3 h，干燥，粉碎成细粉，即得。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取人参皂苷 Rb_1 164.00 mg、 Rd 38.16 mg、 F_4 17.48 mg、 Rg_1 88.00 mg、20 (S)- Rg_3 52.07 mg、20 (R)- Rg_3 7.40 mg、 Rg_5 65.48 mg、20 (S)- Rh_1 41.04 mg、20 (R)- Rh_1 24.56 mg、 Rh_4 40.24 mg、 Rk_1 17.76 mg、 Rk_3 20.28 mg、三七皂苷 R_1 15.96 mg，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇溶解稀释至刻度，摇匀，即得对照品贮备液。精密量取 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇定容至刻度，即得。

2.2 供试品溶液制备

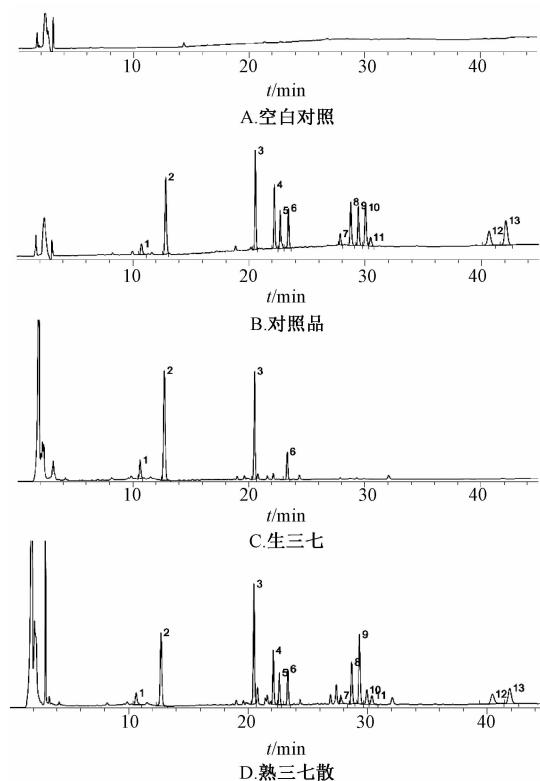
2.2.1 生三七溶液 取三七剪口 7 份、筋条 3 份，粉碎成细粉，混匀，精密称取约 100 mg，置于 25 mL 量瓶中，70% 甲醇定容至刻度，超声提取 40 min，冷却至室温，70% 甲醇定容，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2.2 熟三七散溶液 精密称取熟三七散约 100 mg，其他操作同“2.2.1”项。

2.3 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) - 水 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 20% ~ 25% A；10 ~ 20 min, 25% ~ 40% A；20 ~ 25 min, 40% ~ 50% A；25 ~ 35 min, 50% A；35 ~ 40 min, 50% ~ 55% A；40 ~ 45 min, 55% A)；柱温 35 °C；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 203 nm；进样量 20 μL 。

2.4 专属性试验 吸取空白对照 (70% 甲醇)、混合对照品、生三七、熟三七散溶液（批号 20150706）各 20 μL ，在“2.3”项色谱条件下进样，结果见图 1。由图可知，生三七溶液中 4 种皂苷和熟三七散溶液中 13 种皂苷的保留时间与混合对照品一致，空白对照溶液在相应位置无吸收峰，即对皂苷测定无干扰。对比生三七、熟三七散、对照品溶液色谱图发现，生三七主要含有人参皂苷 Rb_1 、 Rd 、 Rg_1 和三七皂苷 R_1 ，熟三七散含有 13 种皂苷，除了生三七固有的 4 种外，其他 9 种是在炮制过程中转化生成的低极性皂苷。

2.5 线性关系考察 取“2.1”项下对照品贮备液适量，70% 甲醇稀释定容，得到一系列质量浓度的对照品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样 20 μL ，



1. 三七皂苷 R_1 2. 人参皂苷 Rg_1 3. 人参皂苷 Rb_1 4. 人参皂苷 $20(S)-Rh_1$ 5. 参皂苷 $20(R)-Rh_1$ 6. 人参皂苷 Rd
 7. 人参皂苷 F_4 8. 人参皂苷 Rk_3 9. 人参皂苷 Rh_4 10. 人参皂苷 $20(S)-Rg_3$ 11. 人参皂苷 $20(R)-Rg_3$ 12. 人参皂苷 Rk_1
 13. 人参皂苷 Rg_5
 1. notoginsenoside R_1 2. ginsenoside Rg_1 3. ginsenoside Rb_1
 4. ginsenoside $20(S)-Rh_1$ 5. ginsenoside $20(R)-Rh_1$ 6. ginsenoside Rd
 7. ginsenoside F_4 8. ginsenoside Rk_3 9. ginsenoside Rh_4
 10. ginsenoside $20(S)-Rg_3$ 11. ginsenoside $20(R)-Rg_3$
 12. ginsenoside Rk_1 13. ginsenoside Rg_5

图1 各皂苷 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various saponins

记录色谱图。以峰面积为纵坐标 (Y)，质量浓度为横坐标 (X) 进行回归，再以峰高约为基线噪音 3 倍时的进样量为检测限，10 倍时的进样量为定量限，结果见表 1，可知各皂苷在各自范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 取“2.5”项下对照品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样 6 次，测得人参皂苷 Rb_1 、 Rd 、 F_4 、 Rg_1 、 $20(S)-Rg_3$ 、 $20(R)-Rg_3$ 、 Rg_5 、 $20(S)-Rh_1$ 、 $20(R)-Rh_1$ 、 Rh_4 、 Rk_1 、 Rk_3 、三七皂苷 R_1 峰面积 RSD 分别为 0.00%、0.93%、2.64%、0.16%、0.18%、0.67%、1.55%、0.04%、0.08%、0.47%、3.24%、1.55%、0.93%，表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密称取熟三七散（批号 20150706）约 100 mg，共 6 份，置于 25 mL 量瓶中，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项下色谱条件下进样 20 μ L，测得人参皂苷 Rb_1 、 Rd 、 F_4 、 Rg_1 、 $20(S)-Rg_3$ 、 $20(R)-Rg_3$ 、 Rg_5 、 $20(S)-Rh_1$ 、 $20(R)-Rh_1$ 、 Rh_4 、 Rk_1 、 Rk_3 、三七皂苷 R_1 含有量 RSD 分别为 0.84%、0.76%、1.34%、1.19%、0.58%、1.76%、1.07%、1.86%、1.19%、0.43%、4.86%、1.07%、0.19%，表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取“2.7”项下同一供试品溶液，每 2 h 测定 1 次，连续 16 h，测得人参皂苷 Rb_1 、 Rd 、 F_4 、 Rg_1 、 $20(S)-Rg_3$ 、 $20(R)-Rg_3$ 、 Rg_5 、 $20(S)-Rh_1$ 、 $20(R)-Rh_1$ 、 Rh_4 、 Rk_1 、 Rk_3 、三七皂苷 R_1 峰面积 RSD 分别为 0.78%、1.38%、2.00%、1.20%、1.46%、2.34%、1.95%、1.46%、1.71%、0.44%、3.44%、0.38%、2.63%，表明溶液在 16 h 内稳定性良好。

表1 各皂苷线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various saponins

皂苷	回归方程	线性范围/(μ g·mL $^{-1}$)	相关系数	检测限/ng	定量限/ng
人参皂苷 Rb_1	$Y = 4.178X + 2.348$	4.014 ~ 192.677	0.9995	0.00938	0.02719
人参皂苷 Rd	$Y = 6.247X - 0.600$	0.954 ~ 76.337	0.9995	0.01093	0.03224
人参皂苷 F_4	$Y = 4.262X + 1.080$	0.437 ~ 34.891	0.9995	0.00381	0.01066
人参皂苷 Rg_1	$Y = 7.019X + 0.993$	2.201 ~ 176.059	0.9995	0.01221	0.03933
人参皂苷 $20(S)-Rg_3$	$Y = 7.352X - 2.568$	5.207 ~ 104.135	0.9995	0.01092	0.03089
人参皂苷 $20(R)-Rg_3$	$Y = 11.640X + 3.046$	0.740 ~ 14.802	0.9995	0.01070	0.02920
人参皂苷 Rg_5	$Y = 4.908X - 2.577$	1.637 ~ 130.933	0.9995	0.02139	0.06101
人参皂苷 $20(S)-Rh_1$	$Y = 8.989X - 1.047$	1.026 ~ 82.051	0.9995	0.00330	0.01080
人参皂苷 $20(R)-Rh_1$	$Y = 9.833X - 0.169$	0.614 ~ 49.174	0.9995	0.00375	0.01013
人参皂苷 Rh_4	$Y = 7.270X + 0.483$	1.003 ~ 80.206	0.9995	0.00744	0.02195
人参皂苷 Rk_1	$Y = 14.815X + 3.252$	0.344 ~ 27.526	0.9995	0.00828	0.02523
人参皂苷 Rk_3	$Y = 13.951X + 0.344$	0.507 ~ 40.563	0.9995	0.01256	0.03671
三七皂苷 R_1	$Y = 5.918X - 1.322$	0.399 ~ 31.904	0.9995	0.03019	0.08684

2.9 加样回收率试验 精密称取样品(批号20150706)约100 mg,共6份,置于25 mL量瓶中,加入等同于样品含有量的各皂苷对照品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样20 μ L,测得人参皂苷Rb₁、Rd、F₄、Rg₁、20 (S)-Rg₃、20 (R)-Rg₃、Rg₅、20 (S)-Rh₁、20 (R)-Rh₁、Rh₄、Rk₁、Rk₃、三七皂苷R₁平均加样回收率分别为108.32%、99.80%、97.19%、92.79%、98.09%、90.01%、98.06%、98.92%、97.89%、98.24%、99.13%、99.02%、102.07%,RSD分别为1.10%、0.96%、1.95%、3.42%、0.62%、3.05%、1.06%、1.63%、2.40%、3.54%、1.74%、1.89%。

2.10 样品含有量测定 取样品3批(批号20151001、20151002、20151003),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样20 μ L,记录峰面积,测定含有量,结果见表2。

表2 各皂苷含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of various saponins (mg/g)

批号	20151001	20151002	20151003	平均值
人参皂苷Rb ₁	20.74	22.19	22.50	21.81
人参皂苷Rd	5.49	5.76	5.86	5.70
人参皂苷F ₄	2.88	3.01	3.00	2.96
人参皂苷Rg ₁	23.41	21.99	22.27	22.56
人参皂苷20(S)-Rg ₃	2.39	2.84	2.88	2.70
人参皂苷20(R)-Rg ₃	1.35	1.58	1.52	1.48
人参皂苷Rg ₅	5.90	7.00	6.96	6.62
人参皂苷20(S)-Rh ₁	4.32	4.54	4.59	4.48
人参皂苷20(R)-Rh ₁	2.07	2.23	2.26	2.19
人参皂苷Rh ₄	10.11	10.82	10.93	10.62
人参皂苷Rk ₁	1.64	1.89	1.89	1.81
人参皂苷Rk ₃	3.29	3.50	3.54	3.44
三七皂苷R ₁	6.82	5.60	5.71	6.04
总计	90.41	92.94	93.93	92.43

3 讨论

2015版《中国药典》采用HPLC法测定三七中人参皂苷Rb₁、Rg₁和三七皂苷R₁的含有量,该方法准确可靠,重复性好,但不适合检测熟三七散中新生成的低极性皂苷;文献[6]报道同时测定10种皂苷的方法流动相极性过大,对新生成皂苷成分有较好的分离度,但原有皂苷的分离度不理想,也不适合检测。本试验将两者融合在一起,经过流动相梯度优化,并考察了色谱柱型号、长度

(150、250 mm)、柱温(20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C)、体积流量对分离度的影响,最终优化得到“2.3”项下色谱条件。

本实验显示,在熟三七散13种皂苷中,人参皂苷Rb₁、Rd、F₄、Rg₁和三七皂苷R₁是生三七的原生皂苷,而人参皂苷20 (S)-Rg₃、20 (R)-Rg₃、Rg₅、20 (S)-Rh₁、20 (R)-Rh₁、Rh₄、Rk₁、Rk₃主要是在加工过程中转化形成的次生皂苷,其中又以人参皂苷Rh₄、Rk₃的增加值最为显著。因此,为了有效区分生三七和熟三七,并控制熟三七散质量,可考虑将人参皂苷Rb₁、Rg₁、Rh₄、Rk₃和三七皂苷R₁纳入其定量测定标准。

研究表明,制备工艺对熟三七散质量具有较大影响,生三七含水量、蒸煮温度、蒸煮时间是影响皂苷转化效率的关键工艺参数,故只有严格控制关键工艺参数才能确保其质量。本实验采用HPLC法同时测定熟三七散中13种皂苷的含有量,该方法灵敏准确,可用于该制剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 武孔云,陈宝儿,赵伯涛. 中药材种养关键技术丛书[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001.
- [2] 徐冬英. 三七补益功效考[J]. 中药材, 2002, 25(12): 906-908.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 11-12.
- [4] 陈斌,徐慧琳,贾晓斌. 三七炮制的研究进展和研究思路[J]. 中草药, 2013, 44(4): 482-487.
- [5] 刘旭,李明春,徐霞,等. 中药三七对大鼠心肌缺血保护作用的谱效学研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(8): 819-823.
- [6] 陈斌,蔡涛,贾晓斌. UPLC同时测定蒸制三七中的10种人参皂苷类活性成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1614-1619.
- [7] 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]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2007, 9(6): 77-87.
- [8] Wang D, Liao P Y, Zhu H T, et al. The processing of *Panax notoginseng* and the transformation of its saponin components [J]. *Food Chem*, 2012, 132(4): 1808-1813.
- [9] 龙扬. HPLC法测定不同采收期三七中有效成分含量[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(7): 24-25.
- [10] 周新惠,赵荣华,张荣平,等. 三七不同加热炮制品中5种皂苷类成分的含量测定[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(6): 11-14.