

[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 ℃; 检测波长 203 nm。**结果** 13 种皂苷在各自范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 5$), 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 ℃ 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 ($r=0.999\ 5$), 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, 生三七具有散瘀止血, 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, 研究方向为中药学。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 μ m 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×250 mm, 5 μ m);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 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 203 nm;进样量 20 μ L。

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 μ L,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,除了生三七中固有的 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 μ L,

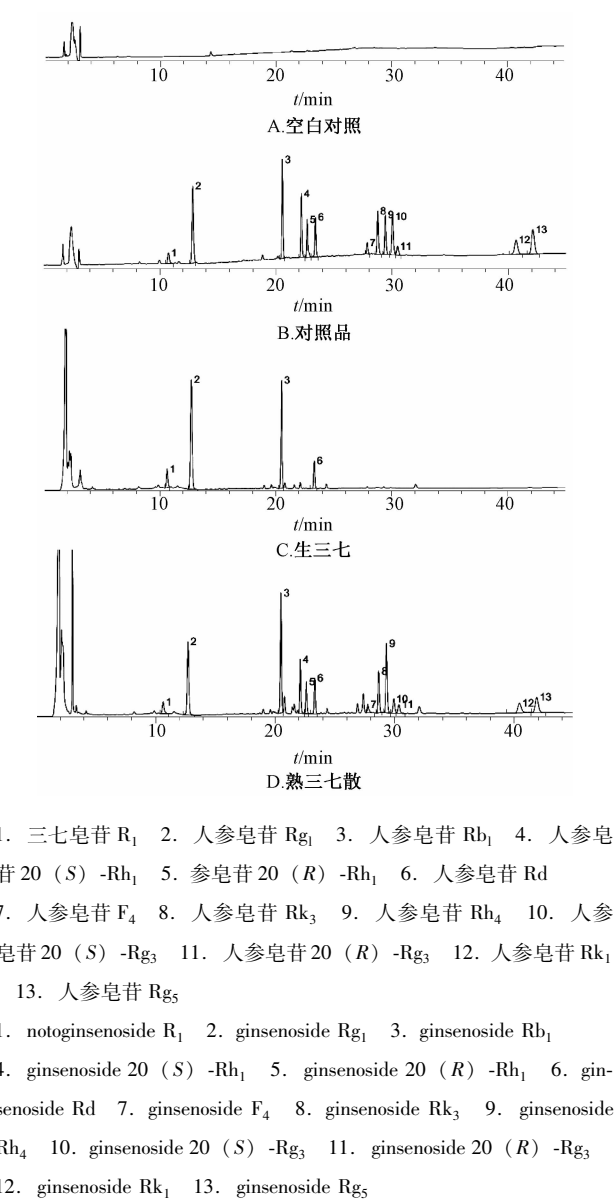


图1 各皂苷HPLC色谱图

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 μL，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/(μg·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 | 0.999 5 | 0.009 38 | 0.027 19 |
| 人参皂苷 Rd | $Y=6\ 247X-0.600$ | 0.954~76.337 | 0.999 5 | 0.010 93 | 0.032 24 |
| 人参皂苷 F ₄ | $Y=4\ 262X+1.080$ | 0.437~34.891 | 0.999 5 | 0.003 81 | 0.010 66 |
| 人参皂苷 Rg ₁ | $Y=7\ 019X+0.993$ | 2.201~176.059 | 0.999 5 | 0.012 21 | 0.039 33 |
| 人参皂苷 20(S)-Rg ₃ | $Y=7\ 352X-2.568$ | 5.207~104.135 | 0.999 5 | 0.010 92 | 0.030 89 |
| 人参皂苷 20(R)-Rg ₃ | $Y=11\ 640X+3.046$ | 0.740~14.802 | 0.999 5 | 0.010 70 | 0.029 20 |
| 人参皂苷 Rg ₅ | $Y=4\ 908X-2.577$ | 1.637~130.933 | 0.999 5 | 0.021 39 | 0.061 01 |
| 人参皂苷 20(S)-Rh ₁ | $Y=8\ 989X-1.047$ | 1.026~82.051 | 0.999 5 | 0.003 30 | 0.010 80 |
| 人参皂苷 20(R)-Rh ₁ | $Y=9\ 833X-0.169$ | 0.614~49.174 | 0.999 5 | 0.003 75 | 0.010 13 |
| 人参皂苷 Rh ₄ | $Y=7\ 270X+0.483$ | 1.003~80.206 | 0.999 5 | 0.007 44 | 0.021 95 |
| 人参皂苷 Rk ₁ | $Y=14\ 815X+3.252$ | 0.344~27.526 | 0.999 5 | 0.008 28 | 0.025 23 |
| 人参皂苷 Rk ₃ | $Y=13\ 951X+0.344$ | 0.507~40.563 | 0.999 5 | 0.012 56 | 0.036 71 |
| 三七皂苷 R ₁ | $Y=5\ 918X-1.322$ | 0.399~31.904 | 0.999 5 | 0.030 19 | 0.086 84 |

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，陈慧琳，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.