

三七叶与茎 HPLC 的比较分析及 Rb₃ 含量的测定

郑立雄^{1,2}, 陈金东^{1,2,△}, 任杨帆^{1,2}, 杨崇仁^{1,2,3}

(1. 云南维和药业股份有限公司, 云南玉溪 653100; 2. 云南省植物提取物工程研究中心, 云南玉溪 653100;

3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650201)

摘要:目的 比较三七叶和三七茎的皂苷成分, 为叶苷相关产品的质量提供技术保障。方法 采用 HPLC 对三七叶和三七茎的皂苷成分进行比较, 其中主要以人参皂苷 Rb₃、Rb₁ 的含量为考察指标。结果 三七叶中主要成分为 Rb₃, 其中三个产地的三七叶中 Rb₃ 平均含量为 1.025%。三七茎秆中以 Rb₁ 为主, Rb₃ 微量。结论 三七叶和三七茎中主要皂苷成分有显著的差异, 为保证叶苷产品的质量稳定, 应重视生产原料的选择, 控制三七叶和茎的比例。

关键词:三七茎叶; HPLC; Rb₃ 含量

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2014)05-0032-04

三七(*Panax notoginseng*(Burk.)F.H.Chen)为著名中药, 通常以根入药。三七叶性温, 味辛, 民间常为茶饮。《本草纲目》称三七茎叶“治折伤、跌扑出血, 敷之即止, 青肿经夜即散, 余功同根”。现代药理研究表明: 三七叶总皂苷具有抑制血小板聚集、降低血脂、抗心律失常、抗脑缺血、抗炎、镇静安神以及抗抑郁功能等作用, 尤其在临床上被用于改善神经功能, 治疗失眠以及缓和焦虑等^[1-5]。

三七叶主要的活性成分为三萜皂苷以及黄酮类化合物, 迄今为止, 已从三七茎叶中分离到了 24 个皂苷类化合物, 但多为原人参二醇型皂苷, 包括: 人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rg₃、Rc、20(R)-Rh₂、20(R)-Rg₃、Mc、F₁、Rh₁、Rh₂、C-K、Re、F₂、Rg₁、Rd, 三七皂苷 Fa、Fe、Fe、R₁, 七叶胆皂苷 IX、七叶胆皂苷 XIII、XVII、O-β-D-glucopyranoside-3β, 12β, 23β-triol-20-ene-damma^[6-12]。

上世纪 80 年代以三七叶总皂苷为原料开发的天然药物“七叶神安片”, 有显著的临床疗效, 受到患者的欢迎, 现该品种收载于《中国药典》(2010 年版)^[13]。本文在优化三七叶总皂苷提取工艺技术的基础上, 应用 HPLC 分析技术, 对三七叶和茎的主要皂苷成分进行分析比较, 对不同产地的三七叶皂苷成分进行比较, 为提升三七叶质量分析技术, 对三七叶及其产品的品质评价提供技术基础, 为叶苷相

关产品的生产提供技术及质量控制依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

分析用三七茎叶收购自云南 3 个产地, 经昆明植物研究所杨崇仁研究员鉴定为五加科植物 *Panax notoginseng*(Burk.)F.H.Chen 的茎叶, 经挑选将三七叶和茎分开, 共 18 批样品(见表 1)。

表 1 三七茎叶样品

编号	产地	批号	编号	产地	批号
	文山	WY20110921		文山	WJ20110921
	文山	WY 20111009		文山	WJ 20111009
	文山	WY 20121013		文山	WJ20121013
三	玉溪黄草坝	XY20120918	三	玉溪黄草坝	XJ20120918
七	玉溪黄草坝	XY 20120927	七	玉溪黄草坝	XJ20120927
叶	玉溪黄草坝	XY 20121016	茎	玉溪黄草坝	XJ20121016
	大理南涧	DY20120924		大理南涧	DJ20120924
	大理南涧	DY 20121022		大理南涧	DJ20121022
	大理南涧	DY 20121025		大理南涧	DJ20121025

1.2 仪器

Agilent 1200 液相色谱仪, 二极管阵列检测器, Zorbax SB-C18 色谱柱(5μm, 4.6×250mm); 流动相溶剂: 甲醇(色谱纯, Merck), 磷酸(分析纯, 上海试剂一厂), 反渗透纯化水, SK3300LH 超声清洗器(上海科导), TB-215D 电子天平(德国赛多利斯); 人参

收稿日期: 2014-05-15

作者简介: 郑立雄(1983-), 男, 云南陆良人, 工程师, 执业药师, 从事中药化学及中药质量控制研究工作。

△通信作者: 陈金东 E-mail: 94153761@qq.com.

皂苷 Rb₃ 和 Rb₁,三七叶皂苷 Fa 和 Fc(中科院昆明植物研究所,纯度 98%以上)。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备

分别精密称取三七叶和茎样品各 1g,加 50mL 甲醇,超声 30min,回收甲醇,残渣定容至 10mL,微孔滤膜(0.45μm)滤过,即得。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取人参皂苷 Rb₃ 和 Rb₁,以及三七叶皂苷 Fa 和 Fc 各 5mg,置于 10mL 容量瓶中,甲醇溶解,稀释至刻度,使浓度为 0.5mg/mL,微孔滤膜(0.45μm)滤过,即得。

2.3 Rb₃、Rb₁ 的含量测定

精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10μL,注入液相色谱仪,参照 2010 版中国药典“七叶神安片”项下方法进行含量测定^[13]。

2.4 三七叶与茎的 HPLC 指纹图谱比较

2.4.1 HPLC 方法

Agilent 1200 液相色谱仪,二极管阵列检测器,Zorbox SB-C18 色谱柱(5μm 4.6×250mm),流动相:乙腈(A)-0.3%磷酸水(B),梯度洗脱 0min 20%A,5min 30%A,20min 45%A;流速:1.0mL/min;柱温:25℃;检测波长:203nm。

2.4.2 重复性、稳定性、精密度考察

① 精密度考察:取同一份供试品溶液(WY20110921)连续进样 6 次,每次 10μL。计算其主要峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD,结果表明主要峰的相对保留时间 RSD 值在 0.32%~0.69%之间,相对峰面积的 RSD 值在 1.47%~2.93%之间。

② 重复性考察:取同一批号三七叶

(WY20110921)同时称取 6 份,按供试液制备方法平行处理,制备供试品,进样,每次 10μL,计算其主要峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD,主要峰的相对保留时间 RSD 值在 0.19%~0.67%之间,相对峰面积的 RSD 值在 2.21%~2.85%之间。

③ 稳定性考察:取一份供试品溶液(WY20110921)分别在 0,2,4,6,8,12 h 进样,每次 10μL。计算其主要峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,主要峰的相对保留时间 RSD 值在 0.30%~1.25%之间,相对峰面积的 RSD 值在 1.57%~2.16%之间,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

根据 3 个产地一共 18 个批次的样品的导出数据,运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》(研究版)软件,时间漂移在 0.3~0.8 范围内变化其结果稳定,各产地三七叶相互之间的相似度均>0.85,各产地三七茎相互之间的相似度均>0.65(大理南涧产三七茎与另外 2 产地差异较大)。

3 实验结果

3.1 三七茎与叶中 Rb₃、Rb₁ 的含量测定

分析结果:三七叶以人参皂苷 Rb₃ 为主,除此之外,文献报道三七叶中还主要含有人参皂苷 Rc、三七皂苷 Fc^[5]。从本次测定的结果来看南涧产三七叶人参皂苷 Rb₃ 平均含量为 1.146%。文山产三七叶的 Rb₃ 平均含量为 1.117%。玉溪黄草坝产三七叶的 Rb₃ 平均含量为 0.813%。显然,产地对主要皂苷的含量有一定的影响,而个体差异也不容忽视。三七茎以人参皂苷 Rb₃ 为主。其中南涧产三七茎人参皂苷 Rb₁ 平均含量为 1.043%。文山产三七茎的 Rb₁ 平均含量为 0.819%。玉溪黄草坝产三七茎的 Rb₁ 平均含量为 0.628%。见表 2。

表 2 三七茎与叶中 Rb₃、Rb₁ 的含量测定结果

编号	批号	Rb ₃ /%	Rb ₁ /%	编号	批号	Rb ₃ /%	Rb ₁ /%
	WY20110921	0.959	0.054		WJ20110921	0.152	0.800
	WY 20111009	1.172	0.060		WJ 20111009	0.148	0.792
	WY 20121013	1.220	0.063		WJ20121013	0.160	0.865
	XY20120918	0.836	0.048		XJ20120918	0.034	0.613
三七叶	XY 20120927	0.793	0.043	三七茎	XJ20120927	0.036	0.650
	XY 20121016	0.811	0.045		XJ20121016	0.035	0.622
	DY 20120924	1.055	0.057		DJ20120924	0.431	1.020
	DY 20121022	1.108	0.059		DJ20121022	0.467	1.110
	DY 20121025	1.274	0.069		DJ20121025	0.430	1.000

3.2 三七茎与叶的指纹图谱比较 (见图 1~图 4)

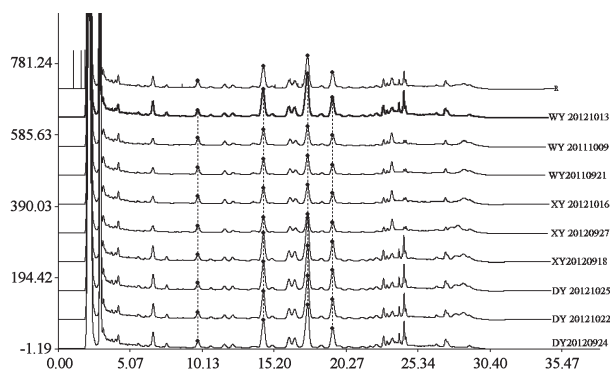


图 1 三七叶 HPLC 匹配图

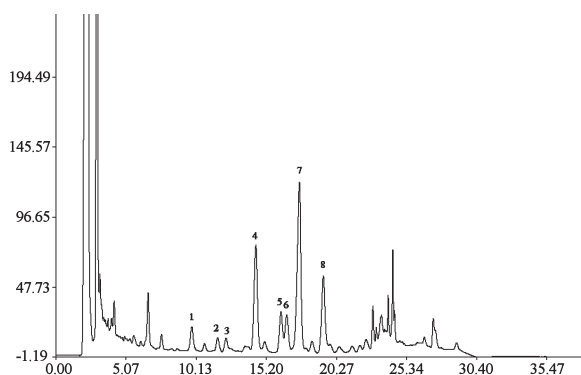
三七叶皂苷 Fa(1) 人参皂苷 Rb₁(2) Rb₂(3) Rc(4) Rb₃(7)

图 2 三七叶共有模式图

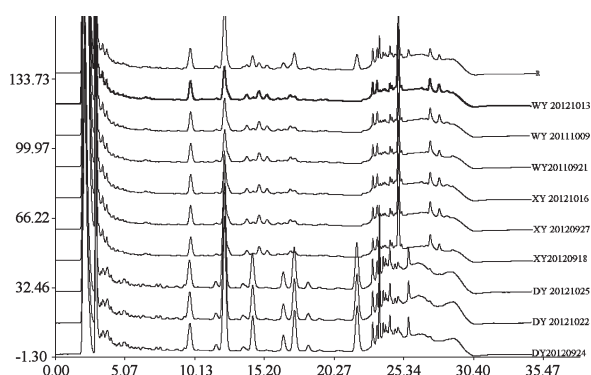


图 3 三七茎 HPLC 匹配图

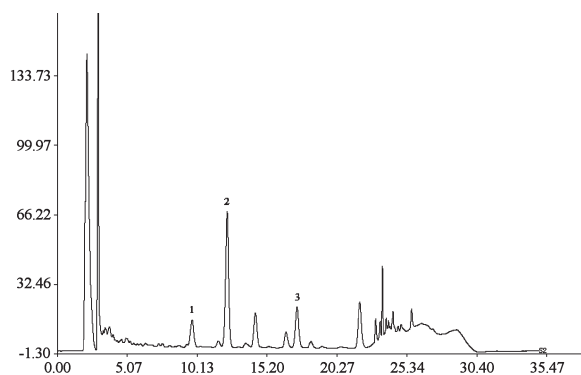
三七茎皂苷 Fa(1) 人参皂苷 Rb₁(1) Rb₃(3)

图 4 三七茎共有模式图

4 讨论

三七叶与茎中的成分是不相同的,本次 HPLC 测定分析结果表明三七叶中以 Rb₃ 为主,有少量的 Rb₁,此外有文献报道三七叶中还主要含有 Rc、Fc 等成分^[5],而三七茎中以 Rb₁ 为主,其茎中几乎不含 Rb₃ 成分。

① 从 3 个产地的比较结果来看,三七叶 HPLC 图谱呈现显著的相似性,可以从定性上表明检测的 3 个产地三七叶主要成分的一致性。而三七茎的 HPLC 图谱却有差异,主要表现在:大理南涧产三七茎中除了主要成分 Rb₁ 与另外两产地一致外,南涧产三七茎中还平均含有 0.44% 的 Rb₃,其含量远高于另外两产地。以上结果提示,南涧产三七茎叶质量相对优于另外两产地,而且, HPLC 指纹图谱分析对三七叶的质量鉴定具有一定的实用价值。

② 三七叶在采收过程中一般会混有一定量的茎秆,在干燥、储存和运输过程中叶子易脆碎脱落,一般需拣选除去茎秆,若拣选不细致,在叶苷的实际生产过程中原料就会因三七茎所占比例不同,导致三七叶总皂苷的成分组成与含量均有差异,影响其产品的质量稳定,显然,从原料上重视质量是三七叶生产的重要环节,尤其是从原料上解决了茎叶混合导致的叶苷产品质量不过关的问题。

参考文献:

- [1] 陈鹏,胡晓立,雷伟亚,等.三七叶甙对兔血小板聚集功能的影响[J].云南大学学报(自然科学版),2005,27(1):82-85.
- [2] 吕萍,陈海峰.三七叶苷降脂作用的实验研究[J].中国生化药物杂志,2004,25(4):235-236.
- [3] 黄胜英,谢世荣,黄彩云,等.三七叶皂甙抗心律失常作用的实验研究[J].大连大学学报,2001,22(6):82-87.
- [4] 雷伟亚,史栓桃,余思畅,等.三七叶总皂甙的镇痛及对中枢神经系统的抑制作用[J].中药通报,1984,9(3):38.
- [5] Hui Xiang, Yingxue Liu, Baibing Zhang et al. The antidepressant effects and mechanism of action of total saponins from the caudexes and leaves of *Panax notoginseng* in animal models of depression[J]. Phytomedicine, 2011, 18: 731-738.
- [6] Yang C R, Kasai R, Zhou J et al. Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(6): 1473-1478.
- [7] 陈业高,詹尔益,陈红芬,等.三七叶中低糖链皂苷的分离与鉴定[J].中药材,2002,25(3):176-178.
- [8] 李海舟,张颖君,杨崇仁.三七叶化学成分的研究

- [J]. 天然产物研究与开发, 2006(18): 549-554.
- [9] 姜彬慧, 王承志, 韩颖, 等. 三七叶中微量活性皂苷的分离与鉴定[J]. 中药材, 2004, 27(7): 489-491.
- [10] 魏均娴, 唐宝书, 王菊芳, 等. 三七叶皂苷成分研究[J]. 华西药理学杂志, 1986, 1(1): 7-10.
- [11] 王军. 三七茎叶资源综合利用的化学基础研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2009.
- [12] Mao Q, Yang J, Cui X M, et al. Target separation of a new anti-tumor saponin and metabolic profiling of leaves of *Panax notoginseng* by liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 59: 67-77.
- [13] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.

(编辑: 杨阳)

Comparative Analysis and Quantitative of Rb₃ Leaves and Stems of *Panax notoginseng* by HPLC

ZHENG Li-xiong^{1,2}, CHEN Jin-dong^{1,2}, REN Yang-fan^{1,2}, YANG Chong-ren^{1,2,3}

(1. Yunnan Weihe Pharmaceuticals Co., Ltd, Yuxi 653100, China;

2. Yunnan Engineering Research Center of Plant Extracts, Yuxi 653100, China;

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

ABSTRACT: **Objective** Comparison of the Saponins content of *Panax notoginseng* stems and leaves, and to provide technical support for the quality of related products. **Methods** Rb₃ content was used as indicator to compare the difference between the leaves and stems of *Panax notoginseng* by HPLC. **Results** The leaves' main components are Ginsenoside Rb₃, R_c, F_c, et al. and the stems' main component is Ginsenoside Rb₁. **Conclusion** The main saponin components in leaves and stems have significant difference, in order to ensure the stable quality of product we should pay attention to the selection of raw material, control the proportion of leaf and stem of *Panax notoginseng*.

KEY WORDS: leaves and stems of *Panax notoginseng*; HPLC; quantitative of Ginsenoside Rb₃

(上接第 26 页)

- [2] 王浩. “鼻敏爽胶囊”治疗鼻黏膜脾肺气虚证临床疗效[J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(4): 29-32.
- [3] Bjerner L, Diamant Z. Current and emerging nonsteroidal anti-inflammatory therapies targeting specific mechanisms in asthma and allergy [J]. Treat Respir Med, 2004, 3(4): 235-246.
- [4] Hansen I, Klimek L, Mosges R, et al. Mediators of inflammation in the early and the late phase of allergic rhinitis [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004, 4(3): 159-163.
- [5] Brown V, Warke TJ, Shields MD, et al. T cell cytokine profiles in childhood asthma. Thorax [J]. 2003, 58: 311-316.
- [6] 黄少鹏, 张锐生. 变应性鼻炎患者白细胞介素 4、 γ 干扰素水平与 IgE 的相关性研究[J]. 福建医药杂志, 2004, 26: 14.
- [7] 黄少鹏, 张锐生, 陈明, 等. 变应性鼻炎患者外周血单个核细胞 Th1/Th2 细胞因子的检测及其意义 [J]. 山东医大基础医学院学报, 2002, 16: 144.
- [8] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell [J]. 2000, 100: 655-669.

(编辑: 徐建平)