

三七不同单株的皂苷成分比较分析^{*}

游建军¹, 龙 莉², 王 东³

(1 中国医学科学院药用植物研究所云南分所, 云南景洪 666100;

2 昆明医学院, 云南昆明 650031; 3 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204)

摘 要: 目的: 分析比较三七不同单株主根中皂苷含量的差异。方法: 随机抽取 3 年生三七单株, 以 HPLC 测定其人参皂苷 R_g、R_{b₁}、R_d、R_e 以及三七皂苷 R₁ 等 5 个成分的含量。结果: 不同的三七单株间在总皂苷含量及各单体皂苷的含量上均存在较大的差异, 各皂苷成分的组成比例也存在明显差异。结论: 三七个体间存在较大差异, 提示在进行三七药材样品的含量测定时, 应该尽可能地采用大样本, 以消除由于植株间的个体差异所导致的偏差。认为三七是一个具有较大个体间差异的群体, 作为良种选育的材料来源有较好的前景。

关键词: 三七; 皂苷; 含量分析; 成分比较

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000—2723(2009)04—0010—04

三七 (*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen) 为五加科人参属植物, 是我国名贵的传统中药材, 也是云南省重要的特色药物资源, 是发展中药和天然药物产业的重要原料^[1]。三七已有数百年的栽培历史。在长期的人工栽培条件下, 已从野生状态逐渐演化为家种, 目前三七的野生资源已难寻迹。长期以来, 三七的栽培以七农自繁、自选、自留、自用为主, 种苗市场是经营者自然采集、自然流通、随意种植、自然形成的。目前, 三七已成为一个混杂的种群, 田间有许多形态变异类型, 例如: 根、茎干、果实、叶片的形状与颜色等均有明显的差异, 造成三七种源混杂, 种苗品质无保证, 产量和质量均受到影响。

三七的主要药用部位是主根 (又称作头子), 其主要成分为达玛烷型三萜皂苷, 其中以人参皂苷 R_g、R_{b₁}、R_d、R_e 以及三七皂苷 R₁ 等 5 个成分的含量最高^[2~8]。在以往对三七原料的分析工作中, 我们发现对同一批产品进行成分检测时, 不同重复的样品在皂苷含量检测结果上往往存在一定的差异, 而且这种差异的大小与取样量的大小有关。由此不难得出推测, 由于生物个体间的差异使得不同三七植株在皂苷含量上存在较大的差别, 但是这种差异有多大, 目前尚未见到相关的文献报道。

本研究拟在原有基础上建立高效液相色谱分析

技术, 通过对不同皂苷成分的含量分析结合相关的统计分析, 对田间三七的不同单株进行初步的分析和比较, 探讨三七皂苷成分的含量差异。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器及试剂

Waters 2695/2996 高效液相色谱仪、Millennium³² 色谱数据管理系统。色谱纯乙腈, 分析纯甲醇, 纯水。人参皂苷 R_g、R_d、R_e、R_{b₁} 以及三七皂苷 R₁ 标准品均为自行分离纯化, 经波谱数据分析并与文献值^[9~11]对比确定其化学结构。

1.2 植物材料

3 年生三七于 2004 年 10 月底采自云南省文山县苗乡三七实业有限公司文山菲白种植基地, 随机抽取 23 株, 取主根 40 干燥后分别粉碎, 过 40 目筛, 待测。

2 方法

2.1 高效液相测定含量的方法学考察

2.1.1 色谱条件及系统适应性试验

参照文献 [12] 的方法进行, 色谱柱: Angilant Hypersil 柱 (3.9 × 200mm); 流动相: 乙腈 - 水, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL/min; 检测波长: 203nm; 柱温 25。理论塔板数按人参皂苷 R_g 峰计算不低于 6 000。用外标峰面积法测定, 人参皂苷 R_g 和 R_e 的分离度大于 1.5。

^{*}收稿日期: 2009—05—25 修回日期: 2009—06—24

作者简介: 游建军 (1965~), 男, 云南人, 助理研究员, 主要从事药用植物资源研究。

2.1.2 标准曲线

标准品在 45 减压干燥至恒重, 精密称取, 70%甲醇定溶至 10mL, 分别配制成含 R_1 (0.084mg/mL), R_g (0.332mg/mL), R_e (0.047mg/mL), R_{b_1} (0.344mg/mL)和含 R_d (0.082mg/mL)的对照品溶液。对照品溶液从 5 μ L、10 μ L ~ 90 μ L 间隔 10 μ L 进样, 测定标准品线性关系。结果如下表所示:

表 1 标准品线性关系表

皂苷	线性范围 (μ g)	线性方程	r^2
R_1	0.42—7.52	$y = 49124x - 47740$	0.9999
R_g	1.66—29.89	$y = 214158x + 46049$	0.9999
R_e	0.24—4.22	$y = 28988x - 36027$	0.9993
R_{b_1}	1.72—30.97	$y = 157138x + 125610$	0.9996
R_d	0.43—7.80	$y = 50384x - 14119$	0.9999

2.1.3 系统精密度试验

以同一主根样品溶液 10 μ L 重复进样 5 次, 测定峰面积, 计算得相对标准偏差 RSD 在 0.97% ~ 1.39%之间。

2.1.4 供试品溶液的稳定性试验

取同一主根供试品溶液分别在 0, 6, 12, 24h 进样, 测定峰面积, 观察稳定性。RSD 值在 0.43% ~ 1.41%之间。

2.1.5 方法重现性试验

对同一批主根样品进行 5 次方法重现性试验, 以外标法测定含量计算 RSD 值如下: 0.36% ~ 1.24%之间。

2.1.6 加样回收试验

精密称定三七主根样品, 加入标准品, 按供试品溶液的制备法如法制备, 测定、计算回收率, 重复 5 次测定。结果 5 种皂苷的平均回收率在 95.87% ~ 99.62%之间, RSD 在 0.27% ~ 0.78%之间。

2.2 供试品溶液的制备及样品测定

精密称取样品约 0.5g, 用 70%甲醇于 10mL 容量瓶定容, 超声提取 30min, 放冷至室温, 用甲醇补足至刻度, 静置, 取上清液, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过。各供试品溶液按上述色谱条件进

样 10 μ L, 测定各样品中皂苷成分的含量, 重复测定 3 次, 取平均值。

3 结果与讨论

皂苷是三七中最主要的化学成分, 本项研究建立了三七地下部分 5 个主要皂苷成分 (人参皂苷 R_g 、 R_e 、 R_{b_1} 、 R_d 和三七皂苷 R_1) 的 HPLC 定量分析技术 (图 1), 并以这 5 种主要皂苷的含量及其总和为指标, 对不同样本的三七皂苷成分进行比较。

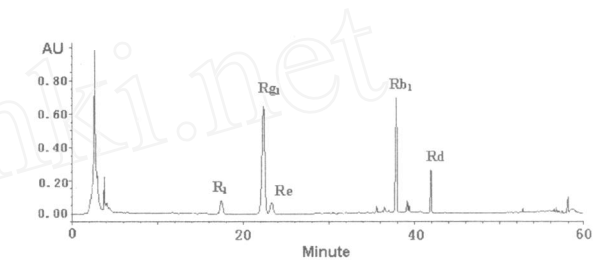


图 1 三七皂苷的 HPLC 分析图谱

在文山苗乡三七公司的同一批采收的产品中随机采集 A、B、C 3 份样品, 每份样品量为 200g (干重), 测量皂苷含量, 结果表明, 不同样本的皂苷含量之间虽然存在一定的差异, 但差异不明显 (表 2)。

表 2 不同样品的皂苷含量 (%)

样品编号	R_1	R_g	R_e	R_{b_1}	R_d	合计
A	1.01	2.70	0.44	3.30	0.67	8.12
B	1.07	3.05	0.38	3.16	0.66	8.33
C	1.22	3.18	0.37	3.55	0.73	9.06

为了作进一步的详细比较, 我们对 23 株生长于同一地块的 3 年生三七主根作了单株的皂苷含量分析。分析检测结果见表 3。

从以上结果中可以很容易地看出一些十分明显的差异, 如: 总皂苷含量从 5.47%至 13.67%; 人参皂苷 R_g 的单株含量最高达 6.93%, 最低为 2.19%; 人参皂苷 R_{b_1} 的单株含量最高达 5.14%, 最低为 1.42%; 人参皂苷 R_1 的单株含量最高达 3.53%, 最低为 0.48%, 人参皂苷 R_e 的单株含量最高达 0.96%, 最低为 0.25%; 人参皂苷 R_d 的单株含量最高达 1.10%, 最低为 0.20%。

表 3 不同单株皂苷含量 (%) 及方差分析结果

样品编号	R ₁	R _g	Re	R _{b1}	R _d	合计
1	0.66	2.95	0.42	1.72	0.25	6.01
2	1.50	3.57	0.46	3.72	0.59	9.84
3	0.60	4.73	0.54	4.42	0.69	10.98
4	1.06	5.27	0.96	3.26	0.45	11.00
5	0.97	4.37	0.32	2.24	0.26	8.16
6	1.52	5.79	0.64	4.01	0.76	12.72
7	0.54	3.26	0.78	2.93	0.46	7.96
8	1.44	6.93	0.59	3.10	0.38	12.44
9	1.33	5.77	0.85	3.85	0.56	12.34
10	0.78	6.35	0.68	3.86	0.88	12.55
11	1.04	5.69	0.52	3.73	0.60	11.58
12	3.53	3.74	0.33	3.04	0.41	11.04
13	0.59	2.19	0.25	1.62	0.20	4.85
14	0.77	3.28	0.48	2.51	0.48	7.51
15	0.86	5.73	0.42	5.14	1.10	13.24
16	0.85	2.91	0.45	1.65	0.23	6.10
17	1.28	4.19	0.57	3.85	0.67	10.56
18	0.85	3.32	0.36	5.08	0.85	10.46
19	1.16	5.47	0.78	4.26	0.67	12.34
20	0.48	2.93	0.43	1.42	0.22	5.47
21	0.61	4.15	0.57	2.78	0.50	8.61
22	0.93	6.91	0.86	4.27	0.70	13.67
23	0.79	3.60	0.35	3.15	0.56	8.45
平均数	1.05	4.48	0.55	3.29	0.54	9.91
最小值	0.48	2.19	0.25	1.42	0.20	4.85
最大值	3.53	6.93	0.96	5.14	1.10	13.67
标准差	0.62414	1.39087	0.19388	1.07267	0.23367	2.67073
方 差	0.38955	1.93451	0.03759	1.15062	0.05460	7.13279

三七各单株间不仅在皂苷含量上存在很大的差异,而且在各皂苷成分的组成比例上也存在非常明显的差异。R_g 和 R_{b1} 是三七中含量最高的两个皂苷成分,在所检测的多数植株中 R_g 的含量高于

R_{b1},而在个别 (18号样品) 植株中则反之。R₁、Re和 R_d的比例亦存在类似情况。而在 12号样品中, R₁ 的含量达到 3.53%,甚至高于 R_{b1} 的含量,与 R_g 含量相当。

利用 SPSS统计分析软件对上述 23个单株样本的皂苷含量进行了方差分析,结果也表明皂苷含量在个体之间的差异十分显著 (表 1)。

研究结果表明,三七不同个体间在皂苷含量上存在较大的差异,含量较高的 R_g 和 R_{b1} 及总皂苷的差异尤为明显。提示在进行三七样品的含量测定时,为了使结果能够客观地反映样品的真实情况,应该尽可能地采用大样本,多设重复,以尽可能地消除由于植株间的个体差异所导致的偏差。

种质资源是中药产业的源头,优良的种源是保证中药材质量稳定的先决条件,也是中药材种植业可持续发展的关键环节。我国虽有个别中药才优良品种选育的成功案例。例如:从人参的农家栽培表型变异中筛选出优良品种大马牙等;从板兰根中选育出了多倍体优良品种等。但对于大多数栽培中药材而言,种质资源系统的评价与研究仍十分缺乏,这已成为我国中药材种植业可持续发展和有效实施 GAP的重要制约因素^[13]。本研究表明目前田间栽培的三七是一个具有较大个体间差异的群体,可以作为进行三七的良种选育的材料来源基础。开展三七的选育种工作以获得具有良好经济性状的三七品系,进一步提高三七种植的经济效益,不仅具有重要的意义,同时也具有十分现实的可行性。

[参考文献]

[1] 郑光植,杨崇仁.三七——生物学及其应用 [M]. 昆明:云南科技出版社,1994 25

[2] 伍明珠.滇产植物的皂素成分研究.三七的两种皂甙 (1) [J]. 云南植物研究,1979, (1): 119 - 124

[3] Zhou J., Wu M. Z., Taniyasu S., Besso H., Tanaka O., Sanwatari Y., Fuwa T. Dammarane - saponins of Sanchi - ginseng, roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen (Araliaceae): Structures of new saponins, notoginsenoside - R₁ and - R₂ and identification of ginsenoside - R_g and - R_{h1} [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 1981, 29 (10): 2844 - 2850

[4] Matsuura H., Kasai R., Tanaka O., Sanwatari Y., Fuwa T., Zhou J. Further studies on dammarane - saponins of Sanchi - ginseng [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 1983, 31 (7): 2281 - 2287.

- [5] Zhao P., Liu Y. Q., Yang C. R. Minor dammarane saponins from *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41 (5): 1419 - 1422
- [6] Ma W. G., Mizutani M., Malterud K. E., Lu S. L., Ducrey B., Tahara S. Saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52 (6): 1133 - 1139
- [7] Sun H. X., Yang Z. G., Ye Y. P. Structure and biological activity of protopanaxatriol - type saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *International Immunopharmacology*, 2006, 6: 14 - 25
- [8] Wang C. Z., McEntee E., Wicks S. Wu J. A., Yuan C. S. [J]. *Phytochemical and analytical studies of Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen [J]. *J. Nat. Med.*, 2006, 60: 97 - 106
- [9] Teng R. W., Li H. Z., Chen J. T., Wang D. Z., He Y. N., Yang C. R. Complete assignment of ¹H and ¹³C - NMR data for nine protopanaxatriol glycosides [J]. *Magn. Reson. Chem.*, 2002, 40: 483 - 488
- [10] Zhou J., Wu M. Z., Taniyasu S., Besso H., Tanaka O., Sanuwatari Y., Fuwa T. Dammarane - Saponins of Sanchi - Ginseng, roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen (Araliaceae): structures of new saponins, notoginsenosides - R1 and R2, and identification of ginsenosides - Rg₂ and Rh1 [J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 1983, 29: 2844 - 2850
- [11] Matsuura H., Kasai R., Tanaka O., Sanuwatari Y. I., Fuwa, T., Zhou, J. Further studies on dammarane - saponins of Sanchi - ginseng [J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 1983, 31: 2281 - 2287
- [12] 王东, 李海舟, 陈可可, 等. 三七地下部分皂苷成分的 HPLC 比较分析 [J]. *云南植物研究*, 2005, 27 (6): 686 - 690 (694).
- [13] 李隆云, 钟国跃, 卫莹芳, 等. 中国中药种质资源的保护与评价研究 [J]. *中国中药杂志*, 2002, 27 (9): 641 - 645

(编辑: 岳胜难)

Comparative Analysis of Saponin Components in Different Single Root of *Panax notoginseng*

YOU Jian - jun¹, LONG Li², WANG Dong³

(1. Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of

Medical Sciences, Jinghong Yunnan, 666100, China;

2. Kunming Medical College, Kunming Yunnan 650031, China;

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

ABSTRACT: Contents of total saponin and five main saponin constituents including notoginsenoside R₁, ginsenosides Rg, Re, Rb₁ and Rd in different individuals of *Panax notoginseng* were analyzed by HPLC. Current results showed that there were notable differences both in the contents and in the proportions of saponins among different single taproots. The results indicated that to make an objective result when analyzing saponin contents, large sample should be examined. And the results also implied that cultivated *P. notoginseng* has become a highly mixed population and can be used as the materials for breeding.

KEY WORDS: *Panax Notoginseng*; Saponins; Content Analysis; Differences

欢迎订阅, 欢迎投稿!