

三七地下部分皂甙成分的 HPLC 比较研究*

王东, 李海舟, 陈可可, 张颖君**, 杨崇仁**

(中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650204)

摘要: 应用 HPLC 定量分析方法, 对三七 (*Panax notoginseng*) 地下部位的皂甙成分进行分析, 通过比较人参皂甙 R_{g_1} , R_{b_1} , R_e , R_d 和三七皂甙 R_1 等 5 种主要皂甙成分和总皂甙的含量变化, 探讨不同部位和组织中皂甙成分的分布规律。结果表明: 在三七药材的不同商品等级中, 人参皂甙 R_{g_1} 和 R_{b_1} 的含量以主根 60 头为最高, 5 个主要皂甙的总含量也明显高于其他的等级; 根茎的生物产量仅为全根的 18%, 皂甙含量占 25% 以上; 主根和根茎中韧皮部的生物产量和总皂甙的含量均高于木质部; 二年生三七的生物产量及皂甙含量均较三年生三七低得多。不同表型三七的皂甙组成也有区别。

关键词: 三七; 皂甙; 人参皂甙; 三七皂甙; 高压液相色谱**中图分类号:** Q 946**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2700(2005)06-0685-06

HPLC Comparative Analysis of Ginsenoside Saponins in Different Underground Parts of *Panax notoginseng*

WANG Dong, LI Hai-Zhou, CHEN Ke-Ke, ZHANG Ying-Jun**, YANG Chong-Ren**

(State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: In order to elucidate the distribution rule of saponins in *Panax notoginseng*, the contents of ginsenosides R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d and notoginsenoside R_1 in different underground parts of notoginseng were determined by HPLC analysis. The results indicated that the contents of ginsenosides R_{g_1} and R_{b_1} together with total content of ginsenosides R_{g_1} , R_{b_1} , R_d , R_e , notoginsenoside R_1 in the taproot "60 Tou" (viz. 60 taproots per 500 g) are highest among all commercial grades of *P. notoginseng*. The rhizome provided more than 25% saponins, though its biomass is only about 18% of the underground parts. The levels of biomass and saponins of phloem in both taproot and rhizome are significantly higher than those of xylem. The biomass and saponin levels of two years old roots are markedly lower than those of three years old one. The comparative analyses were carried out on *P. notoginseng* of different stem colors.

Key words: *Panax notoginseng*; Saponin; Ginsenoside saponins; Notoginsenoside saponin; HPLC

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30472156)

** 通讯作者: Tel: 86-871-5223235; E-mail: zhangyj@mail.kib.ac.cn, cryang@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2005-04-27, 2005-05-25 接受发表

作者简介: 王东 (1964-) 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物资源与化学研究。

E-mail: wangdong@mail.kib.ac.cn

三七 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 又名田七, 为五加科 (Araliaceae) 人参属植物, 是我国著名的珍贵中药材, 传统用于止血活血、散瘀消肿、止痛等。近 20 多年来从三七中分离鉴定了大量的达玛烷型四环三萜皂甙成分 (Li 等, 2001; Ma 等, 1999; 赵平等, 1993; Zhao 等, 1996), 已发现三七对心脑血管系统、神经系统、免疫系统等均具有多方面的生理作用, 并证明皂甙成分为其主要的生理活性物质。三七主产云南东南部的文山壮族苗族自治州, 已有 200 多年的栽培历史, 经过多年的栽培, 已形成了适合当地自然环境和生产条件的固有模式。为促进三七产业的可持续发展, 开展规范化种植, 按国家中药现代化的要求建立药材生产过程中可控的质量标准体系, 探讨三七皂甙成分形成和积累规律具有重要的意义。本文报道三七地下部位及组织的皂甙成分比较研究结果。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及实验材料

Waters 2695/2996 高压液相色谱仪、Millennium² 色谱数据管理系统。色谱纯乙腈, 分析纯甲醇, 纯水。人参皂甙 R_g、R_d、R_e、R_b₁ 以及三七皂甙 R₁ 标准品均为自行分离纯化, 并经 NMR 和 MS 谱数据鉴定化学结构。

二年生及三年生三七 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 于 2004 年 10 月采自云南文山苗乡三七公司的马关马鞍山种植基地。

1.2 样品的制备

将新鲜三七分为根茎、主根、支根和须根等 4 个部位。将根茎和主根木质部与韧皮部剥离。各样品于 45℃ 干燥, 测定干重, 粉碎, 过 40 目筛, 供测定用。

1.3 总皂甙含量测定

样品在 45℃ 减压干燥至恒重, 精密称取 10 g, 用 70% 甲醇 150 ml 超声提取 5 次 (每次 30 min), 合并提取液, 减压干燥, 混悬于水, 通过 Diaion HP-20 大孔树脂吸附树脂柱层析, 分别用水和甲醇洗脱, 甲醇洗脱部分减压干燥, 得总皂甙。称量, 重复 3 次, 计算平均含量。

1.4 HPLC 定量分析

1.4.1 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱 (3.9 × 150 mm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱; 流速 1.0 ml/min; 检测波长: 203 nm; 柱温 25℃。理论塔板数按人参皂甙 R_g 峰计算不应低于 6000。用外标峰面积法测定, 人参皂甙 R_g 和 R_e 的分离度应大于 1.5。

1.4.2 标准曲线 标准品在 45℃ 减压干燥至恒重, 精密称取, 甲醇定溶至 5 ml, 分别配制含 R₁ (0.232 mg/ml), R_e (0.264 mg/ml), R_d (0.316 mg/ml) 和含 R_g₁ (1.54 mg/ml), R_b₁ (1.656 mg/ml) 的 2 个对照品混合溶液。对照品溶液 1 从 5~80 μl 间隔 5 μl 进样, 对照品溶液 2 从 5~50 μl 间隔 5 μl 进样, 测定标准品线性关系。三七皂甙 R₁: 4.64~18.56 μg 范围内 $y = 3E-06X + 0.525$, $R^2 = 0.9995$; 人参皂甙 R_g₁: 7.7~77 μg 范围内 $y = 3E-06X + 0.744$, $R^2 = 0.9998$; R_e: 3.96~14.52 μg 范围内 $y = 4E-06X + 0.9974$, $R^2 = 0.9996$; R_b₁: 8.28~82.8 μg 范围内 $y = 5E-06X - 0.3172$, $R^2 = 0.9992$; R_d: 1.58~14.22 μg 范围内 $y = 293218X - 3119$, $R^2 = 1.0000$ 。

1.4.3 供试品溶液的制备 供试三七样品粉碎, 过 40 目筛, 精密称取 1 g, 加入 70% 甲醇 10 ml, 精密称定, 超声处理 30 min, 放冷至室温, 用甲醇补足缺失的重量, 静置, 取上清液, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过即得。

1.4.4 系统精密度试验 以同一供试品溶液 10 μl 重复进样 6 次, 测定峰面积, 相对标准偏差 RSD 分别为 R₁: 0.60%, R_g₁: 0.45%, R_e: 0.51%, R_b₁: 2.21%, R_d: 0.52%。

1.4.5 供试品溶液的稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 6, 12, 24 h 进样, 观察稳定性。RSD 分别为 R₁: 2.08%, R_g₁: 0.34%, R_e: 1.65%, R_b₁: 0.73%, R_d: 1.90%。

1.4.6 方法重现性试验 对同一批样品进行 6 次方法重现性试验, 以外标法测定含量计算 RSD 值如下:

R_1 : 0.80%, R_{g1} : 0.60%, R_e : 2.79%, R_{b1} : 0.96%, R_d : 1.11%。

1.4.7 加样回收试验 精密称定同一三七主根样品 6 份, 各约 1.2 g, 置具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇溶液 25 ml, 密塞, 称定重量, 按供试品溶液的制备法如法制备、测定, 计算回收率。结果为: R_1 平均回收率 102.03%, RSD 1.95%; R_{g1} 平均回收率 107.95%, RSD 2.12%; R_e 平均回收率 125.76%, RSD 2.69%; R_{b1} 平均回收率 104.24%, RSD 2.32%; R_d 平均回收率 97.65%, RSD 1.49%。

1.4.8 样品测定 各供试品溶液按上述色谱条件进样 10 μ l, 测定各样品中皂甙成分的含量, 重复测定 3 次, 取平均值。

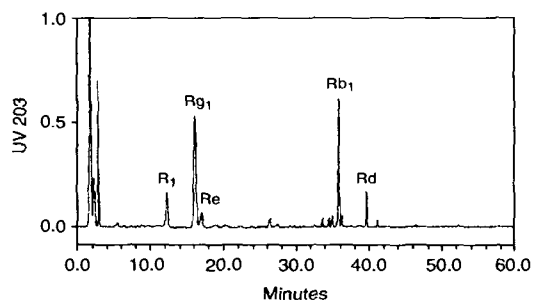


图 1 三七皂甙成分的 HPLC 谱图

Fig. 1 The HPLC chromatogram of saponins in *P. notoginseng*

2 结果与讨论

目前, 通常采用高压液相色谱法 (HPLC) 测定三七中皂甙的含量。由于人参皂甙 R_{g1} 和三七皂甙 R_e 色谱峰的保留时间十分接近, 分离度低, 常不能有效分离而相互重叠。2005 年版的国家药典亦仅规定三七药材中人参皂甙 R_{g1} , R_{b1} 和三七皂甙 R_1 的总和不得少于 5%, 按其所规定的色谱方法, 并不能达到 R_{g1} 与 R_e 的分离 (国家药典委员会, 2005)。本文建立了人参皂甙

R_{g1} 和三七皂甙 R_1 有效分离的色谱方法, 同时对人参皂甙 R_{g1} , R_{b1} , R_d , R_e 和三七皂甙 R_1 进行一次性定量分析 (图 1) 在此基础上开展三七地下部分的组织化学成分比较研究。

三七地下部分由根茎 (rhizome)、主根 (taproot)、支根 (rootlet) 和须根 (fibre) 组成。主根又称“头子”, 为传统的药用部位, 按其重量和头数分级, 大者每 500 g 20 或 30 个头子, 小者为无数头。不同等级三七主根的分析结果表明, 60 头三七的人参皂甙 R_{g1} 和 R_{b1} 的含量最高, 5 个主要皂甙的总含量也明显高于其他的商品等级 (图 2)。

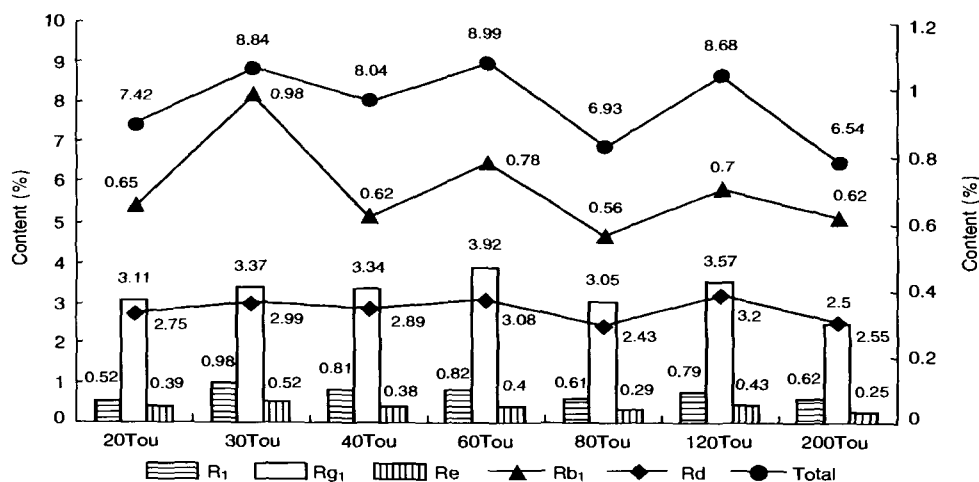


图 2 不同商品等级三七药材的皂甙含量

Fig. 2 The saponin contents in different commercial grades of *P. notoginseng* root

根茎又称“剪口”、“芦头”或“鹦哥嘴”，是提取三七皂甙生产“血塞通”等药物的主要原料。支根和须根则多粉碎，用于生产三七粉。随机取样 180 株三年生栽培植株进行测定，结果表明主根的干重比例最高，其次是根茎，须根最低，分别占 65%，18%，12% 和 5%。总皂甙的含量则为：根茎 > 主根 > 支根 > 须根，各为 17.98%，11.74%，10.28% 和 8.38%。分别占全根总皂甙的 25.4%，61.7%，9.6% 和 3.3%。地下部分的主要皂甙成分 HPLC 定量分析结果表明，在主根、根茎、支根和须根中 5 个主要皂甙成分的总含量分别为 11.02%，15.71%，9.55% 和 6.47%。各个主要皂甙成分在各部位中的比例亦大致相似，均以人参皂甙 R_{g_1} 和 R_{b_1} 的含量最高，二者在根茎中的含量均超过 4%。三七皂甙 R_1 为三七地下部位的特征化学成分，在根茎、主根和支根中的含量超过 1%。人参皂甙 R_d 和 R_e 在根茎中的含量均超过 1%（图 3）。根茎的生物产量仅为全根的 16%，皂甙含量却占 25% 以上。

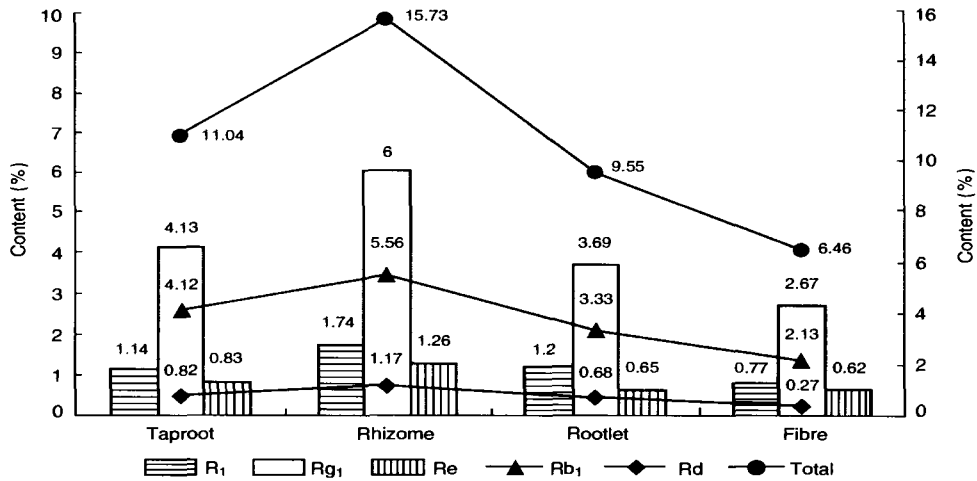


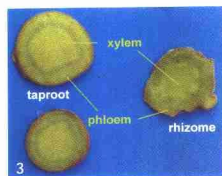
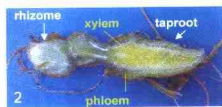
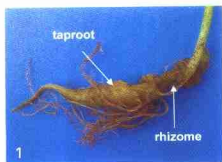
图 3 三七地下部分不同部位的皂甙含量

Fig. 3 The saponin contents of different parts of *P. notoginseng* underground

三七根的组织由表皮层、木栓层、韧皮部、形成层和木质部组成（图 4）。表皮和木栓层甚薄，仅为数列细胞；韧皮部较发达，由筛管、薄壁细胞、射线和树脂道组成；木质部坚硬，导管作径向排列，射线宽广，细胞充满淀粉粒。对 80 株随机取样的三年生栽培植株测定结果表明，主根的韧皮部和木质部的干重比为 58.8:41.2，总皂甙的含量比为 54.1:45.9。根茎中韧皮部和木质部的干重比为 59.5:40.5，总皂甙的含量比为 59.6:40.3。主根和根茎中韧皮部的生物产量和总皂甙的含量均高于木质部。三七药材的初加工过程中常有打磨的工序，该工序不仅除去皮层，并可能导致部分韧皮部的损失，影响药材的质量。

组织化学分析结果提示，根茎木质部的人参皂甙 R_{g_1} 和 R_{b_1} 含量高达 6.67% 和 5.23%，韧皮部中达 6.29% 和 5.79%。木质部中 R_{g_1} 的含量高于韧皮部，而韧皮部中 R_{b_1} 的含量高于木质部。5 个主要皂甙含量的总和在主根的木质部中为 10.63%，韧皮部中为 8.79%；在根茎的木质部中为 16.13%，韧皮部中为 16.26%。显然，三七的根茎是工业化大量提取分离人参皂甙 R_{g_1} 和 R_{b_1} 的理想原料（图 5）。

二年生三七 2-year-old root



三年生三七 3-year-old root

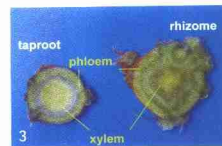
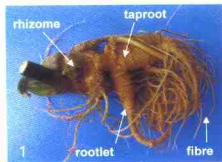


图4 二年生三七与三年生三七: 1. 根全型; 2. 根纵切面, 示木质部及韧皮部; 3. 根横切面, 示木质部及韧皮部
Fig. 4 Comparison of 2-year-old and 3-year-old root of *Panax notoginseng*

1. Morphology of whole root; 2. Longitudinal section, showing xylem and phloem; 3. Transverse section, showing xylem and phloem

二年生三七地下部分总皂甙含量为 9.25%, 明显低于三年生三七。据统计, 12 m² 二年生三七的种植园中共有 1 169 植株, 收获地下部分干重为 2.52 kg, 折合亩产仅 138.5 kg, 仅为三年生三七正常产量的一半左右。对 30 株二年生三七地下部分的木质部和韧皮部及分别进行了生物学产量测定, 结果表明韧皮部的干重和皂甙含量 (分别占 65.7% 和 63.6%) 远大于木质部 (分别占 34.3% 和 36.4%)。5 个主要皂甙成分的分布与三年生三七相似, 以人参皂甙 R_{g1} 和 R_{b1} 含量最高, 在木质部中分别为 3.69% 和 2.52%; 在韧皮部中分别为 3.27% 和 2.58%。5 个主要皂甙含量的总和在木质部中为 8.48%, 在韧皮部中为 7.66%。二年生三七虽然缩短了一年种植期, 但产量及皂甙含量均较三年生三七低得多。显然, 采收二年生三七在经济上是不合理的。

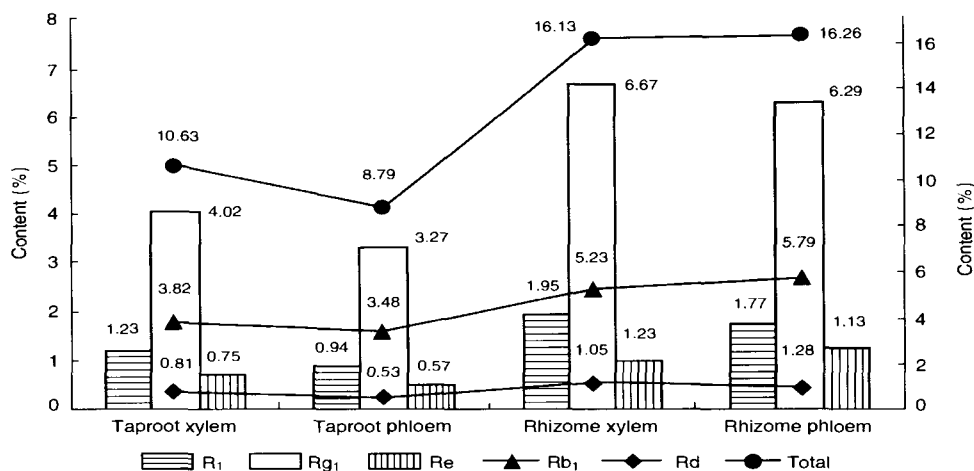


图5 三七地下部分木质部和韧皮部中的皂甙成分

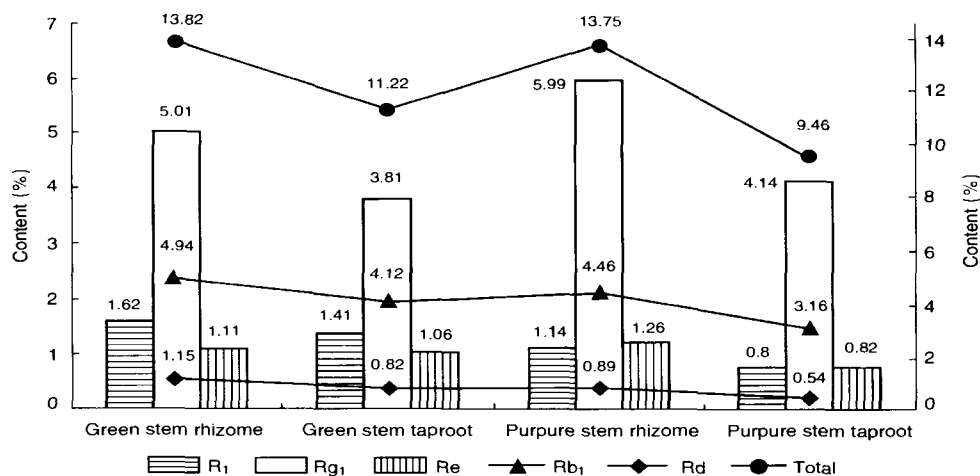
Fig. 5 The saponin content of xylem and phloem in *P. notoginseng* underground parts

图6 不同表型三七地下部分各部位的皂甙含量

Fig. 6 The saponin contents in different underground parts of different phenotype

经过长期的栽培,三七成为一个混杂的群体。在三七的种植园内可以发现形态各异多个表型,为选育品种提供了基础。本文对同一园内的绿茎和紫茎类型进行了初步的分析比较。结果表明,绿茎三七和紫茎三七地下部分的生物学产量差别不大;各相应部位的5种皂甙总含量绿茎三七稍高于紫茎三七,差异不明显。但是,各皂甙成分的比例则有较大区别。差异最明显的是Rg₁与Rb₁的含量,在绿茎三七中,Rb₁含量高于或相当于Rg₁含量;而在紫茎三七中,Rg₁含量则明显高于Rb₁(图6)。以上初步分析结果提示,三七皂甙的成分组成与形态变异是有一定的相关性的。这是否是一个普遍规律,进一步的研究正在进行中。

[下转 694 页]

没食子酸甲酯 (**methyl gallate, 10**), 类白色粉末 (CHCl₃-MeOH), 对 FeCl₃ 试剂显蓝色。ESIMS m/z 183 ($[M-1]^-$)。EIMS m/z : 184 (M^+ , 87), 153 (C₇H₅O₄, 100), 125 (C₈H₇O₂, 39), 107 (C₆H₃O₂, 7), 97 (4), 79 (18), 55 (C₂O₂, 1)。¹H NMR (CD₃OD, TMS, 400 MHz): δ 6.81 (2H, s), 3.74 (3H, s); ¹³C NMR (CD₃OD, TMS, 100 MHz): δ 52.7 (OCH₃), 110.2 (C-2, 6), 120.8 (C-1), 138.1 (C-4), 145.0 (C-3, 5), 169.3 (-COO)。上述数据与文献值一致 (丁岗等, 2001)。

致谢 波谱数据由北京大学分析测试中心测定。

〔参 考 文 献〕

- 罗厚蔚, 吴葆金, 陈节庵等, 1988. 虎耳草有效成分的研究 [J]. 中国药科大学学报, **19** (12): 1—3
- 罗鹏, 田淑琴, 1997. 川西北藏族民间药用虎耳草属植物调查 [J]. 中国民族民间医药杂志, (2): 32—34
- Ahn BT, Oh KJ, Ro JS, *et al.*, 1996. A New Flavonoid from *Euphorbia ebracteolata* [J]. *Planta Medica*, **62**: 383—384
- Ding G (丁岗), Liu YZ (刘延泽), Song MP (宋毛平), *et al.*, Polyphenols from *Terminalia chebula* [J]. *Journal of China Pharmaceutical University* (中国药科大学学报), **32** (3): 193—196
- Isabelle C, Andrew M, Kurt H, 1999. A new gallic acid fructose ester from *Saxifraga stellaris* [J]. *Phytochemistry*, **50** (1): 151—154
- Isabelle C, Andrew M, Kurt H, 2000. New phenolic radical scavengers from *Saxifraga cuneifolia* [J]. *Pharm Biol*, **38** (3): 222—228
- Markham KR, Temal B, Stanley R, *et al.*, 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III [J]. *Tetrahedron*, **34** (9): 1389—1397
- Taneyama M, Yoshida S, Michio K, *et al.*, 1983. Isolation of Norbergenin from *Saxifraga stolonifera* [J]. *Phytochemistry*, **22** (4): 1053—1054
- Taneyama M, 1992. Studies on C-glycosides in higher plants. IV. Intracellular distribution of bergenin and related compounds in *Saxifraga stolonifera* leaves [J]. *Bot Mag*, **105**: 565—571
- Yasuo A, Atsuko K, Shinobu F, *et al.*, 1995. Isolation of antioxidative compounds from *Saxifraga stolonifera* [J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42** (12): 1027—1030

* * * * *

〔上接 690 页〕

〔参 考 文 献〕

- 国家药典委员会, 2005. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 10—11
- Li HZ, Teng RW, Yang CR, 2001. A novel hexanordammarane glycoside from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Chinese Chemical Letters*, **129** (1): 59—62
- Ma WG, Masanori M, Malterud KE, *et al.*, 1999. Saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, **52** (6): 1133—1139
- Zhao P (赵平), Liu YQ (刘玉清), Yang CR (杨崇仁), 1993. Minor constituents from the roots of *Panax notoginseng* (1) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **15** (4): 409—412
- Zhao P, Liu YQ, Yang CR, 1996. Minor dammarane saponins from *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, **41** (5): 1419—1422