

# 三七总皂苷中各组分含量测定方法的改进

冯 亮, 蒋学华\*, 叶利民

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

**摘要:** 目的 用薄层扫描法(TLSC)和高效液相色谱法(HPLC)测定三七总皂苷中人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(Rb<sub>1</sub>)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(Rg<sub>1</sub>)和三七皂苷 R<sub>1</sub>(R<sub>1</sub>) 3种主要成分的含量,并对两种方法进行比较,为修订质量标准中含量测定方法及含量限度提供依据。方法 TLSC 法用正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5)上层溶液为展开剂,27%硫酸无水乙醇溶液为显色剂,测定波长 λ<sub>s</sub>=535 nm, λ<sub>R</sub>=460 nm; HPLC 法用 C<sub>18</sub> 色谱柱,以乙腈-水线性梯度洗脱,0 min (25:75)~15 min (45:55); 流速 1.5 ml·min<sup>-1</sup>; 测定波长 200 nm。结果 TLSC 法测得三七总皂苷原料中 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 的含量分别为 31.07%、23.30%、9.35%; HPLC 法测得三七总皂苷原料中 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub>、R<sub>1</sub> 含量分别为 30.46%、22.65%、5.83%。结论 HPLC 法能将多种皂苷很好地分离并检测,简便快速,减少了误差。其准确度和测定结果的稳定性均优于 TLSC 法。

**关键词:** 薄层扫描法; 高效液相色谱法; 三七总皂苷; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 三七皂苷 R<sub>1</sub>

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1006-0103(2006)02-0187-03

## Improvement of determination method of the main components in *Panax notoginseng* saponions

FENG Liang, JIANG Xue-hua\*, YE Li-ming

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** TLSC and HPLC were adopted to determine the contents of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and sanchinoside R<sub>1</sub> in *Panax notoginseng* saponions. And results of the two methods were compared, which could provide the basis of revising the determination method in quality standard. **METHODS** TLSC has been established with the upper layer of the mixture of butanol-ethyl acetate-H<sub>2</sub>O (4:1:5) as developing solvent, and 27% sulphuric acid ethanol solution as coloring reagent, λ<sub>s</sub>=535 nm, λ<sub>R</sub>=460 nm. HPLC was adopted with C<sub>18</sub> column, acetonitrile-H<sub>2</sub>O (25:75 at 0 min and 45:55 at 15 min, linear gradient elution) was used as mobile phase and detective wavelength was set at 200 nm. The flow rate was 1.5 ml·min<sup>-1</sup>. **RESULTS** The content of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and sanchinoside R<sub>1</sub> in *Panax notoginseng* saponions determined by TLSC was 31.07%, 23.30% and 9.35%; and that determined by HPLC was 30.46%, 22.65% and 5.83%, respectively. **CONCLUSION** HPLC could separate and determine various components in *Panax notoginseng* saponions and determine them. Its accuracy and stability are better than TLSC.

**Key words:** TLSC; HPLC; *Panax notoginseng* saponions; Ginsenoside Rb<sub>1</sub>; Ginsenoside Rg<sub>1</sub>; Sanchinoside R<sub>1</sub>

**CLC number:** R927

**Document code:** A

**Article ID:** 1006-0103(2006)02-0187-03

三七是五加科人参属植物 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen 的干燥根; 含有皂苷、多糖、氨基酸等多种化学成分。其中三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponions) 为其主要的有效成分, 具有活血化瘀的功效。三七总皂苷含有人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc、Rd、Re、Rf、Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub> 等 20 余种皂苷成分, 均属达玛烷型(Dammarane type) 四环三萜皂苷。其中人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(Rb<sub>1</sub>)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(Rg<sub>1</sub>) 是三七总皂苷中含量最高的两个成分, 而三七皂苷 R<sub>1</sub>(R<sub>1</sub>) 则是三七总皂苷的特征化合物<sup>[1]</sup>。对于三七总皂苷原料及其口服制剂, 文献<sup>[2]</sup>规定采用比色法测定总皂苷含量。而比色法在操作过程中存在操作烦琐、影响因素多及重复性差等问题<sup>[3]</sup>, 尤其是不能分别测定三七总皂苷中各主要成分的含量。为此, 特建立了薄层扫描法(TLSC) 测定

三七总皂苷原料中 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub> 的含量<sup>[4]</sup>; 同时建立了 HPLC 含量测定法, 并与 TLSC 法进行比较, 为重新修订质量标准中含量测定方法及含量限度提供依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-9A 高效液相色谱仪, SPD-6AV 紫外检测器(日本岛津); CS-930 薄层扫描仪; Dikma Diamorsil C<sub>18</sub> 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Dikma 公司); 硅胶 G 板(大连化物所)。Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub> 对照品(中国药品生物制品检定所); 三七总皂苷(云南特安钠制备厂); 乙腈(色谱纯, 美国 Dikma 公司); 水(超纯水); 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 TLSC 法

**1.2.1 含量测定** 取三七总皂苷样品约 50 mg, 精

作者简介: 冯亮(1980-), 男, 正攻读药剂学专业的博士学位。

\* 通讯作者(Correspondent author): jkh0113@jpu.163.com

密称定后置 25 ml 量瓶中, 加甲醇溶解定容, 摇匀。用干燥滤纸滤过, 弃初滤液, 精密量取续滤液 2 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 作为供试品溶液。另取经过 60 °C 真空干燥 3 h 的对照品 Rb<sub>1</sub> 3 mg、Rg<sub>1</sub> 3 mg 和 R<sub>1</sub> 1 mg, 精密称定后置同一 25 ml 量瓶中, 加甲醇溶解定容, 摇匀, 作为对照品溶液。吸取供试品溶液 2 μl、对照品溶液 2、4 μl, 分别交叉点于同一薄层板上(使用前 105 °C 活化约 30 min), 以正丁醇 - 乙酸乙酯 - 水(4:1:5)上层液为展开剂; 27% 硫酸无水乙醇溶液为显色剂; 105 °C 烘至斑点清晰, 取出放冷至室温。测定波长 λ<sub>s</sub> = 535 nm, λ<sub>R</sub> = 460 nm, SX = 4, 反射式锯齿扫描, 灵敏度中。取峰面积, 采用外标法分别计算样品中 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub> 的含量。

**1.2.2 线性范围的考察** 分别取 3 种对照品适量, 精密称定后置 1 ml 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容; 分别精密吸取 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μl 点于同一薄层板上。按“1.2.1”项下方法展开, 显色, 测定峰面积。将峰面积对点样量进行线性回归。回归方程分别为:  $A_{Rb_1} = 2.097 \times 10^3 C + 1.107 \times 10^4$  ( $r = 0.9914$ ), 点样量在 2.30~36.80 μg 范围内, 线性关系良好;  $A_{Rg_1} = 6.549 \times 10^3 C + 1.970 \times 10^4$  ( $r = 0.9921$ ), 点样量在 1.25~20.00 μg 范围内, 线性关系良好;  $A_{R_1} = 2.211 \times 10^3 C + 1.130 \times 10^4$  ( $r = 0.9964$ ), 点样量在 1.75~28.00 μg 范围内, 线性关系良好。

**1.2.3 峰面积检测精密度** 分别精密吸取 3 种对照品溶液 2 μl, 点于薄层板上, 按“1.2.1”项下方法展开, 显色, 测定峰面积。对同一待测斑点连续重复扫描测定 5 次。峰面积的 RSD 为 1.04%~1.85%, 表明峰面积检测精密度良好。

**1.2.4 板内精密度** 精密吸取 3 种对照品溶液, 在同一块薄层板上点 5 个点, 每次点样 2 μl。按“1.2.1”项下方法展开, 显色, 测定峰面积。峰面积的 RSD 为 6.34%~7.30%。RSD 值大于 5%, 可见板内精密度低, 故需多取几个样品点样测定, 并取平均值。

**1.2.5 板间精密度** 精密吸取 3 种对照品溶液, 分别在 5 块薄层板上点样, 每次点样 2 μl。按“1.2.1”项下方法展开, 显色, 测定峰面积。峰面积的 RSD 为 9.54%~14.85%。RSD 大于 5%, 可见板间精密度低, 故在测定时必须保持色谱条件的稳定并使用随行对照。

**1.2.6 方法精密度** 精密称取三七总皂苷样品 5 份(每份约 50 mg), 按“1.2.1”项下方法制备供试品溶液。展开, 显色, 测定每份样品中 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub> 的含量, 其 RSD 为 7.74%~10.65%。3 种组份含量的 RSD 均大于 5% ( $n = 5$ )。表明方法精密度低。

**1.2.7 显色稳定性考察** 分别精密吸取 3 种对照

品溶液 2 μl, 点于薄层板上。按“1.2.1”项下方法展开, 显色, 对待测斑点于显色后 0、1、2、3 h 测定峰面积。其 RSD 为 1.39%~4.20%。表明三七总皂苷的 3 个主成分显色后的斑点在 3 h 内基本稳定。

**1.2.8 回收率试验** 精密称取已测定含量的样品 9 份, 分别加入相应的对照品适量。按“1.2.1”项下方法展开, 显色, 测定其含量并计算回收率。测定结果见表 1。3 种成分高、中、低 3 个浓度的回收率均在 91%~105% 之间。

表 1 TLSC 法的回收率测定结果(μg,  $n = 3$ )

Table 1 Results of recovery test of TLSC(μg,  $n = 3$ )

Components	Original	Added	Recovered	Recovery( $\bar{x} \pm s$ )/%
Rb <sub>1</sub>	low	6.900	10.384	100.99 ± 0.07
	middle	6.900	11.439	98.67 ± 0.27
	high	6.900	13.614	97.30 ± 12.32
Rg <sub>1</sub>	low	3.750	5.000	100.00 ± 10.45
	middle	3.750	6.089	93.56 ± 6.17
	high	3.750	7.436	98.29 ± 6.31
R <sub>1</sub>	low	5.250	6.852	91.54 ± 7.69
	middle	5.250	8.737	99.63 ± 1.37
	high	5.250	10.759	104.93 ± 5.91

### 1.3 HPLC 法

**1.3.1 含量测定** 除溶解和稀释所用溶剂改为蒸馏水外, 其余操作均按照“1.2.1”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液。分别吸取供试品溶液和对照品溶液各 20 μl, 注入液相色谱仪分析。使用的色谱条件为: Dikma diamonsil C<sub>18</sub> 分析柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 水, 采用线性梯度洗脱, 0 min(25:75)~15 min(45:55); 流速 1.5 ml · min<sup>-1</sup>; 测定波长 200 nm。所有组分在 15 min 内出峰(图 1)。以外标法用峰面积计算样品中 Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub> 和 R<sub>1</sub> 的含量。

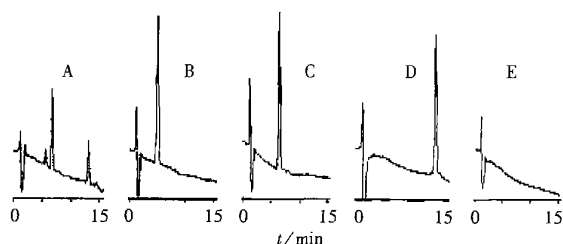


图 1 三七总皂苷(A)、三七皂苷 R<sub>1</sub>(B)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(C)、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(D) 和空白对照(E) 的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of *Panax notoginseng* saponins solution (A), sanchinoside R<sub>1</sub> solution (B), ginsenoside Rg<sub>1</sub> solution (C), ginsenoside Rb<sub>1</sub> solution (D) and blank solution (E)

**1.3.2 线性关系** 取 3 种对照品适量, 精密称定后置同一 25 ml 量瓶中。用蒸馏水定容, 然后依次作等倍稀释。分别吸取各稀释液 20 μl, 注入液相色谱仪, 测定不同浓度对照品的峰面积。以色谱峰面积对浓度(mg · ml<sup>-1</sup>) 进行线性回归, 得各组分的回归

方程:  $A_{Rb1} = 2.932 \times 10^6 C + 2.200 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围  $1.1 \sim 280.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $A_{Rg1} = 3.645 \times 10^6 C + 9.712 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围  $1.2 \sim 304.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $A_{R1} = 3.094 \times 10^6 C - 1.693 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围  $1.5 \sim 380.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

**1.3.3 精密度** 取“1.3.1”项下对照品溶液, 于测定条件下进样, 重复 5 次。以 3 种组分峰面积, 分别计算其浓度,  $RSD$  为  $0.58\% \sim 0.91\%$ 。3 种组分的  $RSD$  均小于  $1.0\%$  ( $n = 5$ ), 表明进样精密度高。

**1.3.4 方法精密度** 分别精密称取三七总皂苷原料 5 份。按照“1.3.1”项下方法测定含量, 其  $RSD$  为  $0.34\% \sim 1.04\%$ 。3 种组分的  $RSD$  均小于  $1.5\%$  ( $n = 5$ )。表明方法精密度高。

**1.3.5 加样回收率试验** 分别精密吸取 3 种对照品溶液各 9 份, 分成高、中、低 3 组。再分别精密加

表 2 HPLC 法的回收率实验结果 ( $\mu\text{g}$ ,  $n = 3$ )

Ingredients	Original	Added	Recovered	Recovery ( $\bar{x} \pm s$ ) / %
Rb <sub>1</sub>	low	0.140	0.056	100.00 ± 0.86
	middle	0.140	0.112	100.89 ± 1.33
	high	0.140	0.168	100.60 ± 0.44
Rg <sub>1</sub>	low	0.152	0.041	97.56 ± 0.40
	middle	0.152	0.082	102.44 ± 0.32
	high	0.152	0.123	100.00 ± 0.59
R <sub>1</sub>	low	0.128	0.011	109.09 ± 1.07
	middle	0.128	0.022	104.55 ± 0.97
	high	0.128	0.033	96.97 ± 0.33

入已知量的三七皂苷原料, 混匀。按“1.3.1”项下方法测定其含量, 再计算回收率 (表 2)。3 种成分高、中、低 3 个浓度的回收率在  $97\% \sim 110\%$  之间。

**1.4 TLSC 法与 HPLC 法的比较**

**1.4.1 TLSC 法与 HPLC 法测定结果的比较** 用 TLSC 法与 HPLC 法测定同一批三七总皂苷样品中

表 4 TLSC 法与 HPLC 法的方法学考察结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Results of methodological inspect for TLSC and HPLC ( $\bar{x} \pm s$ )

Items	TLSC			HPLC		
	Rb <sub>1</sub>	Rg <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	Rb <sub>1</sub>	Rg <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>
Linear range / mg	2.30- 36.80	1.25- 20.00	1.75- 28.00	0.02- 5.60	0.24- 6.08	0.03- 7.60
r	0.9914	0.9921	0.9964	0.9999	0.9999	0.9999
RSD / %	8.61	7.74	10.65	0.91	0.76	0.58
Recovery	low	100.99% ± 6.07%	100.00% ± 10.45%	91.54% ± 7.69%	100.00% ± 0.86%	97.56% ± 0.40%
	middle	98.67% ± 5.27%	93.56% ± 6.17%	99.63% ± 1.37%	100.89% ± 1.33%	102.44% ± 0.32%
	high	97.30% ± 12.32%	98.29% ± 6.31%	104.93% ± 5.91%	100.60% ± 0.44%	100.00% ± 0.59%

**参考文献:**

[1] 郑光植, 杨崇仁. 三七生物学及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1994. 9- 14.  
 [2] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂 (第十九册) [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 98- 99

各组分的含量, 测定结果见表 3。

表 3 TLSC 法与 HPLC 法的测定结果比较

Table 3 Comparison of results determined by TLSC and HPLC

No.	Rb <sub>1</sub> / %		Rg <sub>1</sub> / %		R <sub>1</sub> / %	
	TLSC	HPLC	TLSC	HPLC	TLSC	HPLC
1	29.30	30.64	24.01	22.85	8.96	5.77
2	31.96	30.33	23.76	22.79	9.69	5.83
3	30.43	30.42	24.59	22.34	10.08	5.91
4	32.15	30.33	22.14	22.69	9.44	5.72
5	31.48	30.59	21.98	22.56	8.58	5.93
$\bar{x}$	31.07	30.46	23.30	22.65	9.35	5.83
RSD	3.81%	0.48%	5.02%	0.90%	6.33%	1.54%

对两种方法所得结果进行双侧  $t$  检验, TLSC 法和 HPLC 法测得的人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 含量无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 而三七皂苷 R<sub>1</sub> 含量则有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), TLSC 法测得值明显偏高。

**1.4.2 方法学比较** 将 TLSC 与 HPLC 的方法学考察结果进行比较 (表 4)。从表 4 可知: TLSC 法的灵敏度、线性范围、精密度、回收率等均低于 HPLC 法。

**2 讨论**

用 TLSC 法测得的三七皂苷 R<sub>1</sub> 含量一般在  $9\%$  以上, 而 HPLC 法测得值在  $6\%$  左右, 其原因是 TLSC 法不能有效地分离三七皂苷 R<sub>1</sub> 与人参皂苷 R<sub>d</sub> 两种成分<sup>[5]</sup>, 致测定结果偏高。而 HPLC 法能够将其有效分离并测定, 结果也准确。

TLSC 法操作烦琐, 影响因素很多, 测定条件不易控制, 结果重复性差, 而 HPLC 法测定条件容易控制, 测定所需时间短, 测定的灵敏度、线性范围、精密度、回收率均优于 TLSC 法。用 HPLC 梯度洗脱同时测定三七总皂苷中 3 种主要成分, 简便易行。样品整个分析过程在 15 min 内完成, 进样间隔 3~ 5 min 即可达平衡。

[3] 王宝渠. 中成药质量标准与标准物质研究 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997. 67- 70.  
 [4] 何元凯. 双波长薄层扫描测定血塞通片中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2003 (5): 292- 294  
 [5] 王梅, 范亚刚. RP- HPLC 梯度洗脱法同时测定三七总皂苷及血塞通注射液中三种皂苷含量 [J]. 药物分析杂志, 2000, 20 (6): 410- 412

收稿日期: 2005- 08