

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0129-05

# HPLC 法测定不同产地三七果梗中 6 种成分含量

李 影<sup>1,2</sup>, 刘迪秋<sup>1,2</sup>, 杨 野<sup>1,2</sup>, 崔秀明<sup>1,2</sup>, 王承潇<sup>1,2</sup>, 熊 吟<sup>1,2</sup>, 曲 媛<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup> 昆明理工大学生命科学与技术学院; <sup>2</sup> 昆明市道地药材可持续发展利用重点实验室, 云南昆明 650500

**摘要:**为综合评价不同产地来源的三七果梗质量,本文中运用 HPLC 法对三七果梗中人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 6 种单体皂苷含量进行测定。色谱条件为 Thermo Scientific Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流速:1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL。结果表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 在 0.7813 ~ 3.0000 × 10<sup>2</sup> μg/mL 范围内呈良好线性关系; 平均加样回收率分别为 102.33% (RSD 为 2.82%)、97.29% (RSD 为 4.15%)、97.41% (RSD 为 2.37%)、98.65% (RSD 为 1.96%)、96.13% (RSD 为 2.35%) 和 97.83% (RSD 为 4.87%)。三七果梗中 6 种单体皂苷含量为 Rb<sub>3</sub> > Fc > Rb<sub>1</sub> > Fa > Rc > Rb<sub>2</sub>, 不同产地和生长年限的三七果梗皂苷含量呈现一定的差异性, 范围为 2.11% ~ 3.84%。本方法操作简便, 结果准确, 可用于三七果梗中皂苷含量测定, 为三七果梗的质量评价和综合开发提供依据。

**关键词:**三七果梗; 不同产地; 皂苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号:R917; Q946.3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.023

## Determination of Six Components in *Panax notoginseng* Fruit Stems from Different Producing Areas by HPLC

LI Ying<sup>1,2</sup>, LIU Di-qiu<sup>1,2</sup>, YANG Ye<sup>1,2</sup>, CUI Xiu-ming<sup>1,2</sup>, WANG Cheng-xiao<sup>1,2</sup>, XIONG Yin<sup>1,2</sup>, QU Yuan<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup> Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology;<sup>2</sup> Kunming key laboratory of sustainable development and utilization of famous-region drug, Kunming 650500, China

**Abstract:** To evaluate the quality of *Panax notoginseng* Fruit stems in different areas, the HPLC method was established to determine the contents of six components in *Panax notoginseng* Fruit stems such as ginsenosides Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub> and notoginsenosides Fa, Fc. The conditions were as follows, Thermo Scientific Hypersil GOLD C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), flow rate: 1.0 mL/min, detection wavelength: 203 nm, injection volume: 10 μL. This method showed a good linearity with the range of 0.7813-3.0000 × 10<sup>2</sup> μg/mL. The average recovery of Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Fa and Fc was respectively 102.33% (RSD = 2.82%), 97.29% (RSD = 4.15%), 97.41% (RSD = 2.37%), 98.65% (RSD = 1.96%), 96.13% (RSD = 2.35%) and 97.83% (RSD = 4.87%). The contents of six components in *Panax notoginseng* Fruit stems are Rb<sub>3</sub> > Fc > Rb<sub>1</sub> > Fa > Rc > Rb<sub>2</sub>, and it showed some differences by area and year, ranging from 2.11% to 3.84%. The method was simple and reliable, and could be used in the quantitative determination of saponins and development in *Panax notoginseng* fruit stems.

**Key words:** *Panax notoginseng* fruit stems; different areas; saponins; HPLC; content determination

三七果梗是五加科人参属植物三七 (*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen) 摘除红籽后的干燥果梗。三七主要以根入药, 而其地上部分如茎叶、花、果梗等大部分被废弃。三七果梗与三七茎叶的化学成分较为相似<sup>[1-3]</sup>, 目前市售安神类中成药七叶神安

片是以三七叶总皂苷为功效成分, 而对于三七果梗相关研究则较少。早期研究发现三七果梗中含有丰富的活性皂苷成分, 如人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd、Re、Rg<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>1</sub>、R<sub>7</sub>, 三七皂苷 Fc、Fa、R<sub>1</sub>、Fp<sub>1</sub>、Fp<sub>2</sub>, 绞股蓝皂苷 IX、X VII、X III, 竹节参皂苷 L<sub>5</sub> 等<sup>[1,2]</sup>。这些成分是三七质量控制的重要指标。魏俊娴等<sup>[5]</sup>采用薄层扫描法测定了三七果梗中主要皂苷的相对含量, 其中绞股蓝皂苷 IX (29.6%)、人参皂苷 Rb<sub>3</sub> (16.9%)、三七皂苷 Fe (16.4%)、人参皂苷 Rc (11.0%)、绞股蓝皂苷 XVII、XV (8.3%)、

收稿日期:2016-09-27 接受日期:2018-01-08

基金项目: 云南省应用基础研究计划(2013FA031); 昆明理工大学自然科学研究基金(201326022, 201326116); 云南省教育厅科学研究基金(2014Y090); 昆明理工大学分析测试基金(2016T20120047, 2016M2014718027)

\* 通讯作者 Tel:86-013669706827; E-mail: quyuan2001@126.com

人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(4.9%)、三七皂苷 Fc(2.5%)以及三七皂苷 Fa(0.5%)。由于此方法操作过程中干扰因素多、重现性差,只可用作一般物质的检查。在进一步研究中,我们采用 HPLC 法分析三七果梗中皂苷成分,发现其主要成分为人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc(见图 1)。因此,本论文以这 6 种单体皂苷为指标,对云南省不同产地三七果梗的皂苷含量进行测定,为三七果梗进一步开发利用提供理论依据。

## 1 仪器与材料

LC-20AB 高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括在线脱气机 DGU-20A3R(C)、二元泵 LC-20AB、自动进样器 SIL-20A、柱温箱 CTO-20A、检测器 SPD-20A);Ultimate XB - C<sub>18</sub> 色谱柱(月旭 Welch 公司,250 mm × 4.6 mm, 5 μm);DFY-500 型摇摆式高速

中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司);优普系列超纯水器 UPT-I-20T(成都超纯科技有限公司);AX124ZH 电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司);TD25-WS 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

对照品三七皂苷 Fa 由本实验室自制,三七皂苷 Fc(批号:20150806)购自上海谷研实业有限公司,人参皂苷 Rc(批号:20140908)、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(批号:20140828)、人参皂苷 Rb<sub>2</sub>(批号:20141015)、人参皂苷 Rb<sub>3</sub>(批号:20141102),均购自上海金穗生物科技有限公司;乙腈(美国 Sigma 公司);甲醇(美国 Sigma 公司);超纯水(来自优普系列超纯水器),其他所有试剂均为国产分析纯。

10 批三七果梗于 2016 年 1 月采集于云南省各地,其详细信息见表 1。

表 1 所测样品信息

Table 1 Information of all the tested samples

编号 Symbol	产地 Location	生长年限 Harvest	海拔 Altitude (m)
1	文山州马关县 Wenshan Maguan county	二年生 2y	1312
2	红河州建水县青龙镇 Qinglong Town Jianshui County Honghe Prefecture	二年生 2y	1391
3	文山州砚山县 Wenshan Yanshan county	二年生 2y	1542
4	文山州麻栗坡县 Wenshan Malipo county	三年生 3y	1057
5	红河州建水县 Wenshan Jianshui county	三年生 3y	1323
6	红河州建水县青龙镇 Qinglong Town Jianshui County Honghe Prefecture	三年生 3y	1391
7	文山州文山县古木镇 Gumu Town Wenshan County Wenshan Prefecture	三年生 3y	1423
8	文山州丘北县 Wenshan Qiubei county	三年生 3y	1451
9	文山州砚山县 Wenshan Yanshan county	三年生 3y	1542
10	文山州文山县平坝镇 Pingba Town Wenshan County Wenshan Prefecture	三年生 3y	1762

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Scientific Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 色谱柱(美国 Thermo Scientific 公司,250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为水(A)-乙腈(B)进行线性洗脱(V/V):0 min 25% B, 10 min 25% B, 80 min 40% B, 90 min 60% B, 95 min 100% B;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;检测波长:203 nm。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三

七皂苷 Fa、Fc 对照品适量,加 5 mL 甲醇溶解并定容,其质量浓度均为 0.0040 g/mL,作为对照品溶液。分别取人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 对照品溶液各 0.5 mL,加甲醇定容至 5 mL,配置成混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液制备

精密称取三七果梗粉末(过 20 目筛)0.5 g,至 50 mL 具塞锥形瓶中,加 30 mL 70% 甲醇溶液,超声 30 min,离心,经 0.45 μm 滤膜过滤,作为供试品溶液。

### 2.4 测定方法

分别吸取上述混合对照品溶液和供试品溶液,

按“2.1 色谱条件”下的测定方法进行测定,HPLC 色谱图见图 1。其色谱图基线平稳,各成分分离度较好。

## 2.5 方法学考察

### 2.5.1 标准曲线和线性范围考察

将“2.2”项下混合对照品溶液用甲醇稀释成浓度分别为  $3.0000 \times 10^2$ 、 $2.0000 \times 10^2$ 、 $0.5000 \times 10^2$ 、 $0.1250 \times 10^2$ 、 $3.1250$ 、 $0.7813 \mu\text{g/mL}$  的对照品溶液,在“2.1 色谱条件”下,取  $10 \mu\text{L}$  进样,测得峰面积。以样品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算的回归方程,结果见表 2,人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 在  $0.7813 \sim 3.0000 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$  范围内呈现良好的线性关系,对应  $R^2$  值均大于 0.999。

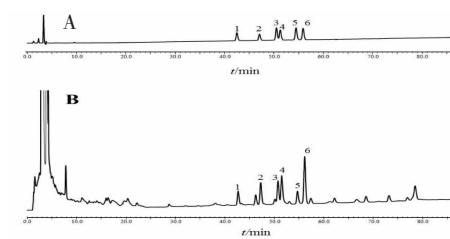


图 1 混合对照品(A)和三七果梗样品(B)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standard compounds (A) and the sample of *Panax notoginseng* Fruit stems (B)

注:1. 三七皂苷 Fa;2. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>;3. 人参皂苷 Rc;4. 三七皂苷 Fc;5. 人参皂苷 Rb<sub>2</sub>;6. 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>。

Note: 1. notoginsenoside Fa; 2. ginsenoside Rb<sub>1</sub>; 3. ginsenoside Rc; 4. notoginsenoside Fc; 5. ginsenoside Rb<sub>2</sub>; 6. ginsenoside Rb<sub>3</sub>.

表 2 对照品的线性关系和范围

Table 2 Linearities and ranges of six saponins

名称 Name	线性范围 Ranges ((g/ml))	回归方程 Regression equation	$R^2$
Rb <sub>1</sub>	$0.7813 \sim 3.0000 \times 10^2$	$Y = 2 \times 10^6 X + 1994.1$	0.9998
Rc	$0.7813 \sim 3.0000 \times 10^2$	$Y = 3 \times 10^6 X - 1711.6$	0.9999
Rb <sub>2</sub>	$0.7813 \sim 3.0000 \times 10^2$	$Y = 3 \times 10^6 X - 1814.3$	0.9999
Rb <sub>3</sub>	$0.7813 \sim 3.0000 \times 10^2$	$Y = 3 \times 10^6 X - 2940.9$	0.9998
Fa	$0.7813 \sim 3.0000 \times 10^2$	$Y = 2 \times 10^6 X + 1414.9$	0.9999
Fc	$0.7813 \sim 3.0000 \times 10^2$	$Y = 2 \times 10^6 X + 3069.3$	0.9999

### 2.5.2 精密度试验

取混合对照品溶液,按“2.1 色谱条件”项重复进样 5 次,测得人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 峰面积的 RSD 值分别为 0.82%、0.53%、0.91%、1.20%、1.02%、1.69%,表明该仪器精密度良好。

### 2.5.3 重复性试验

取同一批三七果梗 6 份,按“2.3”项方法平行制备 6 份供试品溶液,测定含量。人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 含量的 RSD 值分别为 4.87%、3.94%、5.91%、3.19%、3.53%、2.73%,表明该试验方法重复性良好。

### 2.5.4 稳定性试验

取供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 内进样,测定其含量,计算 RSD 值。结果表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 含量的 RSD 值分别为 5.87%、

4.33%、5.17%、4.84%、1.78%、3.88%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.5.5 加样回收率试验

精密称取已知含量的三七果梗粉末 18 份,每份约 0.5 g,分别加入一定量的标准品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 3。人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 的平均加样回收率分别为 102.33%、97.29%、97.41%、98.65%、96.13%、97.83%,其相应的 RSD 值分别为 2.82%、4.15%、2.37%、1.96%、2.35%、4.87%。

## 2.6 样品测定

分别取不同产地三七果梗供试品溶液,按照“2.1”色谱条件测定,记录色谱图。将测得峰面积代入各自的线性方程,计算不同产地 6 种单体人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 的百分含量,结果见表 4 和 5。

表3 加样回收率试验  
Table 3 Results of recovery test of six saponins

名称 Name	取样量 Amount of sampling (g)	含有量 Content (g)	加入量 Addition (g)	测得量 Detection (g)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
$Rb_1$	0.5012	2105	2000	4146	102.05	102.33	2.82
	0.5042	2118	2000	4110	99.60		
	0.5040	2117	2000	4224	105.34		
$Rc$	0.5022	1908	2000	3865	97.85	97.29	4.15
	0.5024	1909	2000	3929	101.01		
	0.5041	1915	2000	3775	93.0		
$Rb_2$	0.5010	1002	1000	1968	96.61	97.41	2.37
	0.5039	1008	1000	1964	95.61		
	0.5038	1008	1000	2008	100.00		
$Rb_3$	0.5032	4428	4000	8374	96.86	98.65	1.96
	0.5040	4435	4000	8371	98.40		
	0.5011	4410	4000	8438	100.69		
$Fa$	0.5030	1710	2000	3623	95.63	96.13	2.35
	0.5035	1712	2000	3595	94.16		
	0.5015	1705	2000	3677	98.60		
$Fc$	0.5025	3920	4000	8053	103.32	97.83	4.87
	0.5043	3933	4000	7791	94.78		
	0.5026	3920	4000	7736	95.39		

表4 二年生三七果梗中6种单体皂苷的含量测定结果

Table 4 Determination of contents of six saponins in *Panax notoginseng* fruit stems

编号 Symbol	$Rb_1\%$	$Re\%$	$Rb_2\%$	$Rb_3\%$	$Fa\%$	$Fc\%$	$Rb_1:Rc:Rb_2:Rb_3:Fa:Fc$	6种成分总和 Sum (%)
1	0.42	0.38	0.20	0.88	0.34	0.78	1:0.90:0.48:2.10:0.81:1.86	3.00
2	0.63	0.38	0.19	0.84	0.50	0.64	1:0.60:0.30:1.33:0.79:1.02	3.18
3	0.43	0.31	0.22	0.68	0.34	0.77	1:0.72:0.51:1.58:0.79:1.79	2.75
平均 Average	0.49	0.36	0.20	0.80	0.39	0.73	1:0.72:0.41:1.62:0.80:1.48	2.98

### 3 讨论

本研究采用 HPLC 法对不同产地不同生长年限三七果梗中人参皂苷  $Rb_1$ 、 $Rc$ 、 $Rb_2$ 、 $Rb_3$  及三七皂苷  $Fa$  和  $Fc$  这 6 种成分进行测定。结果表明,6 种单体皂苷分离程度较好。同时对仪器精密度、样品稳定性、实验重复性以及加样回收率进行测定,结果表明该方法具备较强可行性。

三七果梗样品采集于云南省三七主产区文山州

与红河州各地,种植海拔为 1057 ~ 1762 m。从表 4 和 5 结果可以看出,云南省不同产地三七果梗样品皂苷含量存在差异性,且与其生长年限无关。各产地样品中 6 个指标性成分总和为 2.11% ~ 3.84%,其中三年生文山州砚山县果梗中总皂苷含量最高,为 3.84%。对于同一样品,比较各单体皂苷含量, $Rb_3 > F_c > Rb_1 > Fa > Rc > Rb_2$ 。三七果梗与三七主根在皂苷成分上具有较大差异。三七主根中主要皂苷成分为人参皂苷  $Rg_1$ 、 $Re$ 、 $Rb_1$ 、 $Rd$  及三七皂苷

表5 三年生三七果梗中6种单体皂苷的含量测定结果

Table 5 Determination of contents of six saponins in *Panax notoginseng* fruit stems

编号 Symbol	Rb <sub>1</sub> %	Rc%	Rb <sub>2</sub> %	Rb <sub>3</sub> %	Fa%	Fc%	Rb <sub>1</sub> :Rc:Rb <sub>2</sub> :Rb <sub>3</sub> :Fa:Fc	6种成分总和 Sum (%)
4	0.54	0.33	0.18	0.65	0.39	0.70	1:0.61:0.33:1.20:0.72:1.30	2.79
5	0.80	0.43	0.22	0.85	0.32	0.63	1:0.54:0.28:1.06:0.40:0.79	3.25
6	0.47	0.25	0.16	0.64	0.40	0.58	1:0.53:0.34:1.36:0.85:1.23	2.50
7	0.45	0.24	0.16	0.53	0.25	0.48	1:0.53:0.36:1.18:0.56:1.07	2.11
8	0.64	0.37	0.21	0.83	0.42	0.66	1:0.58:0.33:1.30:0.66:1.03	3.13
9	0.67	0.53	0.28	1.01	0.49	0.86	1:0.79:0.42:1.51:0.73:1.28	3.84
10	0.51	0.30	0.18	0.65	0.37	0.56	1:0.59:0.35:1.27:0.73:1.10	2.57
平均 Average	0.58	0.35	0.20	0.74	0.38	0.64	1:0.60:0.34:1.26:0.65:1.10	2.88

R<sub>1</sub>。与三七果梗中皂苷相比,仅有人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 为二者所共有,即在三七主根中未检出人参皂苷 Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc,而三七果梗中未检出人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rd 及三七皂苷 R<sub>1</sub>。就人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 而言,其在三七果梗中的含量(0.45%~0.80%)明显低于在根部的含量(约3%)。此外,另有研究发现三七果梗与茎叶所含皂苷成分较为相似。比较三七茎叶与果梗中人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 含量差异。与三七茎叶相比,果梗中人参皂苷 Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 含量均低于茎叶,而 Rb<sub>1</sub> 含量高于茎叶<sup>[2]</sup>。目前已有相关研究证实三七茎叶总皂苷具备抗心律失常、抗心绞痛、抗炎、镇静镇痛<sup>[6,7]</sup>等药理作用,而三七果梗的活性研究尚属空白。本研究对三七果梗6种指标性成分人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 及三七皂苷 Fa、Fc 进行了系统分析,为评价三七果梗质量及其深入研究开发提供理论依据。

## 参考文献

- Yang TR, Kasai R, Zhou J, et al. Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22:1473-1478.
- Liu Y(刘英), Cui XM(崔秀明), Yang Y(杨野), et al.

Quality evaluation of the stems and leaves of *Panax notoginseng* from different origins [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2015, 46:701-703.

- Zhu J(朱洁), Yang R(杨蓉), Zhang HB(张洪彬). Determination of ginsenoside Rb<sub>3</sub>, Rc, Rb<sub>1</sub> in leaves of *Panax notoginseng* by HPLC-ELSD [J]. *China Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004, 35:1365-1366.
- Wei JX(魏均娴), Cao SM(曹树明). Study on the saponins of the fruits pedicels of *Panax notoginseng* [J]. *Chin J Chin Material Media*(中国中药杂志), 1992, 17:96-98.
- Wei JX(魏均娴), Chen YG(陈业高), Cao SM(曹树明). Study on the saponins of the fruits pedicels of *Panax notoginseng* (the continuance) [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1992, 17:611-613.
- Mao Q, Yang J, Cui XM, 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]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59:67-77.
- Wang Y(王莹), Chu Y(褚扬), Li W(李伟), et al. Advances in study on saponins in *Panax notoginseng* and their pharmacological activities [J]. *China Tradit Herb Drugs*(中草药), 2015, 46:1381-1392.