

三七中总皂苷含量测定的对照品筛选

陈旭^{1,2}, 党晓芳¹, 曹飒丽¹, 林龙飞¹, 倪健^{1*}, 冯丽君^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京市药品监督管理局药品审评中心, 北京 100061)

[摘要] 目的: 考察选用不同皂苷类对照品为指标对样品中三七总皂苷含量测定的影响。方法: 以人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、三七皂苷 R₁、三七总皂苷为对照品, 香草醛-高氯酸显色, 采用紫外分光光度法测定三七中三七总皂苷的含量。结果: 以不同对照品为指标测定三七总皂苷含量时, 结果存在明显差异。结论: 紫外分光光度法测定三七及其制剂中总皂苷含量时, 可用三七总皂苷作对照品, 为含有三七的制剂含量测定提供较为可靠的实验数据。

[关键词] 三七; 人参皂苷 R_{g₁}; 人参皂苷 R_{b₁}; 三七皂苷 R₁; 三七总皂苷; 分光光度法; 含量测定

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0066-03

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070066

Screening of Reference Substances for Content Determination of Total Saponins in *Panpax notoginseng*

CHEN Xu^{1,2}, DANG Xiao-fang¹, CAO Sa-li¹, LIN Long-fei¹, NI Jian^{1*}, FENG Li-jun^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Center for Drug Evaluation, Beijing Drug Administration, Beijing 100061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of different control samples on content determination of total saponins from *Panax notoginseng*. **Method:** With ginsenosides R_{g₁}, ginsenoside R_{b₁}, notoginsenoside R₁ and *P. notoginseng* saponins as reference substance, taking HClO₄-vanilin staining method, the content of total saponins in *P. notoginseng* was determined by ultraviolet spectrophotometry. **Result:** There were significant differences in determination of the content of total content from *P. notoginseng* among groups of different references. **Conclusion:** With UV spectrophotometry as content determination method for total saponins from *P. notoginseng*, we could choose *P. notoginseng* saponins as a reference substance, which could provide more reliable experimental data for determining the content of *P. notoginseng* and its preparations.

[Key words] *Panax notoginseng*; ginsenosides R_{g₁}; ginsenoside R_{b₁}; notoginsenoside R₁; *Panax notoginseng* saponins; UV Spectrophotometry; content determination

药用三七常在秋季开花前采挖, 具有散瘀止血、

消肿定痛之功^[1]。其主要有效成分为皂苷类, 三七总皂苷含量已成为三七及其制剂的一个重要质控指标。但在实验过程中发现, 采用不同皂苷类成分作为对照品测定三七中总皂苷的含量时, 其结果有显著性差异。本实验分别以人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、三七皂苷 R₁、三七总皂苷作为对照品, 采用分光光度法测定三七中总皂苷含量, 比较不同对照品对测定结果的影响, 以筛选较为合理的对照品。

1 材料

TU-1810 型紫外可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司)。人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷

[收稿日期] 20121010(007)

[基金项目] 北京中医药大学复方中药制药创新团队项目(2011-CX70-13)

[第一作者] 陈旭, 硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: doudouchen@163.com.

[通讯作者] *倪健, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738607, E-mail: njtcm@263.net; *冯丽君, 硕士, 从事中药制剂新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738607, E-mail: feng.lijun@163.com

Rb₁、三七皂苷 R₁、三七总皂苷对照品(均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 110023-200819, 110045-200911, 110007-200936, 110870),试剂均为分析纯。

三七购于北京同仁堂有限责任公司,批号 000003282,经北京中医药大学药系刘春生教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取各种对照品适量置量瓶中,用甲醇定容,配成人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁、三七总皂苷质量浓度依次为 0.128 4, 0.122 8, 0.125 6, 0.124 4 g·L⁻¹ 的对照品溶液,备用。

2.2 供试品溶液的制备 取三七粉末(过 4 号筛) 0.6 g,精密称定,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,放置过夜,置 80 ℃ 水浴上保持微沸 2 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 检测波长的确定 吸取对照品溶液及供试品溶液各适量,置 80 ℃ 水浴锅上挥干溶剂,精密加入新配制的 5% 香草醛冰乙酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,摇匀。混合液在 60 ℃ 恒温水浴加热 15 min,置冷水浴中冷却 5 min,以空白试剂做参比,于 400~800 nm 进行全波长扫描。结果 4 种对照品及供试品溶液的吸收光谱图基本相同,最大吸收波长均为(548 ± 1) nm。

2.4 标准曲线的绘制 取 4 种对照品溶液适量,按 2.3 项下方法处理,分别于 548 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁、三七总皂苷回归方程依次为 $Y = 5.0369X - 0.0441$ ($R^2 = 0.9998$), $Y = 2.83X + 0.0021$ ($R^2 = 0.9993$), $Y = 4.6159X - 0.0265$ ($R^2 = 0.9999$), $Y = 3.4778 + 0.0851$ ($R^2 = 0.9997$);线性范围分别为 0.038 52~0.141 24, 0.073 68~0.171 92, 0.049 76~0.124 4, 0.075 36~0.163 28 g·L⁻¹。

2.5 精密度试验 精密吸取各对照品溶液 0.05 mL,测定 A,重复 6 次,结果人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁、三七总皂苷 RSD 分别为 0.086%, 0.091%, 0.088%, 0.102%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 平行取同一供试品溶液 6 份,按 2.3 项下方法处理,测定 A,结果人参皂苷 R_{g₁}、人参

皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁、三七总皂苷 RSD 分别为 1.423%, 1.508%, 1.454%, 1.689%,表明方法重复性符合要求。

2.7 稳定性试验 吸取同一供试品溶液适量,每隔 5 min 测定 1 次 A,结果人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁、三七总皂苷 RSD 分别为 1.980%, 2.105%, 2.026%, 2.374%。表明供试品溶液在 20 min 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的供试品溶液 6 份,分别加入一定量已知含量的对照品,按标准曲线制备项下操作,分别测定 A,计算各成分回收率(表 1)。结果表明,人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁、三七总皂苷作为对照品进行含量测定时,加样回收率均能达到定量分析要求。

表 1 不同皂苷类成分含量测定加样回收率试验

成分	No.	加入量 /mg	样品量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
人参皂苷 R _{g₁}	1	0.056 0	0.055	0.112	101.07	102.56	2.00
	2	0.057 0	0.055	0.114	103.47		
	3	0.052 0	0.055	0.109	103.49		
	4	0.056 5	0.055	0.111	99.12		
	5	0.057 5	0.055	0.115	104.64		
	6	0.056 0	0.055	0.113	103.55		
人参皂苷 Rb ₁	1	0.095 0	0.091	0.187	101.31	98.60	2.36
	2	0.095 0	0.091	0.182	96.10		
	3	0.097 0	0.091	0.189	100.68		
	4	0.098 0	0.091	0.185	96.04		
	5	0.096 0	0.091	0.187	99.89		
	6	0.099 0	0.091	0.188	97.57		
三七皂苷 R ₁	1	0.070 5	0.065	0.138	103.70	102.69	1.81
	2	0.071 0	0.065	0.139	104.50		
	3	0.068 0	0.065	0.133	99.87		
	4	0.066 0	0.065	0.133	103.22		
	5	0.069 0	0.065	0.135	100.93		
	6	0.062 0	0.065	0.129	103.94		
三七总皂苷	1	0.064 5	0.062	0.126	99.09	99.69	2.87
	2	0.061 2	0.062	0.124	100.67		
	3	0.058 0	0.062	0.121	101.27		
	4	0.063 5	0.062	0.124	97.48		
	5	0.067 0	0.062	0.126	95.82		
	6	0.061 0	0.062	0.125	103.83		

2.9 样品中总皂苷含量测定 称取三七粉末适量,

按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,精密吸取同一供试品溶液适量,于 548 nm 处测定 A ($n = 5$),计算总皂苷含量。结果发现当以人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 、三七总皂苷为对照品时,总皂苷含量分别为 0.883 (RSD 1.117%), 1.434 (RSD 1.21%), 0.932 (RSD 1.154%), 0.970 (RSD 1.472%) $mg \cdot g^{-1}$ 。采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行 One-Way ANOVA 方差分析(表 2)及 Student-Newman-Keuls(SNK)多重比较分析(表 3)。结果表明以不同皂苷类成分为对照品时,所测三七总皂苷结果差异极显著,4 个组别相互之间差异极显著。

表 2 三七中总皂苷含量测定 One-Way ANOVA 统计分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
组间	0.979	3	0.326	1.199×10^{-3}	<0.01
误差	0.04	16	0.00		
总和	0.983	19			

表 3 三七中总皂苷含量测定多重比较分析

组别*	N	$\alpha = 0.05$			
		人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_{b_1}	三七皂苷 R_1	三七总皂苷
人参皂苷 R_{g_1}	5	0.883 00			
三七皂苷 R_1	5		0.932 00		
三七总皂苷	5			0.969 60	
人参皂苷 R_{b_1}	5				1.434 20
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

注:“*”表示 Uses Harmonic Mean Sample Size(使用调和平均样本大小) = 5.000。

3 讨论

在中药药物开发研究中,目前多以某一成分或多成分含量作为评价指标,进行 HPLC 测定^[2-3]。但在研究有效成分为总皂苷或总黄酮类化合物的提取、分离工艺时,宜选用总皂苷或总黄酮为评价指标,得出的结果对指导中药工艺及质控方面更有意义。

采用紫外分光光度法测定总皂苷含量时,发现以不同皂苷类成分为对照品所得结果并不一致,且组间具有显著性差异。在选择显色试剂时,发现香

草醛-高氯酸显色反应较硫酸、盐酸、磷酸、三氯乙酸等更稳定^[4-5]。显色反应原理主要包括皂苷水解成苷元、羟基脱水成双键、双键移位、分子间缩合、使脂环上产生共轭双键而与高氯酸等反应而呈现多种不同的色调,或在紫外光下呈现荧光。显色反应的快慢主要取决于脂环上双键、羟基数量,脂环上含有共轭双键的呈色很快,只有孤立双键的呈色慢,完全饱和且羟基又少的不呈色。

本实验中 4 种对照品结构均为四环三萜类皂苷,苷元中人参皂苷 R_{b_1} 是人参二醇型,人参皂苷 R_{g_1} 和三七皂苷 R_1 为人参三醇型。人参二醇和人参三醇不同之处在于糖链部分的取代不同(人参二醇结构中,糖链连在 3 位和 20 位。人参三醇结构中,糖链连在 36 位和 20 位)。三七中总皂苷、人参二醇型和人参三醇型含量相差不大^[6],单独以某种类型的皂苷为对照测定三七总皂苷含量有失偏颇,且三七总皂苷中成分较多,其显色反应与三七药材中总皂苷机制相似,故认为以三七总皂苷作为对照品测定时,结果更准确。试验发现选用人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 与选用三七总皂苷为对照品进行含量测定比较时,样品中总皂苷含量的相关系数为分别为 1.10, 0.68, 1.04。因此可以推测:以三七总皂苷对照品作为三七及其制剂中总皂苷含量测定的指标成分较为合理可行。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:11.
- [2] 杨梦玉,王健,孙毅坤. HPLC 测定明目颗粒中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):83.
- [3] 李明梅. 三七活血丸三七皂苷类成分测定及稳定性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):108.
- [4] 郭子杰,黄儒强. 三七中总皂苷的含量测定[J]. 药物鉴定,2007,16(7):13.
- [5] 刘旭,付青姐,李明春,等. 三七总皂苷含量的紫外分光光度法测定[J]. 实用医药杂志,2008,25(4):452.
- [6] 魏凤玲,高娟. 三七总皂苷含量测定及提取工艺优选[J]. 中国现代应用药学杂志,2008,25(z1):623.

[责任编辑 全燕]