

三七总皂甙的液相色谱分析及其稳定性研究

闫海全, 李崇瑛* (成都理工大学材料与化学化工学院, 四川成都610059)

摘要 [目的] 建立三七总皂甙的液相色谱定量分析方法, 研究三七总皂甙的稳定性。[方法] 以三七总皂甙为考察指标, 采用高效液相色谱法, 探讨不同pH值、温度对三七总皂甙稳定性的影响。色谱条件如下: 色谱柱为Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流速为1.00 ml/min; 检测波长为197 nm; 柱温为室温, 采用二元梯度洗脱, 流动相为乙腈-水。[结果] 三七总皂甙液相色谱定量方法具有较强的针对性和准确性。三七总皂甙在pH值>4, 低温条件下, 比较稳定, 而在强酸高温下受影响较大, 在pH值为3时, 总皂甙含量降低约32.5%, 在100℃下, 总皂甙含量降低约12.5%。[结论] 三七总皂甙在弱酸弱碱, 低温条件下, 比较稳定, 而在强酸高温下受影响大。

关键词 三七; 总皂甙; 高效液相色谱; 稳定性

中图分类号 S567.23+6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)13-05973-02

HPLC Analysis of Total Saponins of *Panax notoginseng* and Study on Its Stability

YAN Hai-quan et al (College of Materials and Chemical Engineering, Chengdu University of Technology, Chengdu, Sichuan 610059)

Abstract [Objective] The study aimed to establish the quantitative analysis method with HPLC on total saponin of *Panax notoginseng* and research the stability of the total saponin. [Method] With the total saponin of *P. notoginseng* as the investigated index, the HPLC method was used to discuss the effect of different pH value and different temperature on the stability of the total saponins of *P. notoginseng*. The chromatographic conditions were as follows: chromatographic column of Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), flowrate at 1.00 ml/min, detection wavelength at 197 nm and column temperature of room temperature, by using the mobile phase of acetonitrile-water with duality gradient elution. [Result] The analytical method with HPLC quantitative measurement on total saponin of *P. notoginseng* was precise and accurate. The content of total saponin of *P. notoginseng* was stable at pH>4 and low temperature, but that was greatly effected under the strong acid and high temperature. The content of *P. notoginseng* was decreased by nearly 32.5% at pH of 3 and by 12.5% at 100℃. [Conclusion] The total saponin of *P. notoginseng* was stable under the weak acid and weak base and low temperature condition, but that was greatly affected under the strong acid and high temperature.

Key words *Panax notoginseng*; Total saponin; HPLC; Stability

三七是五加科人参属的多年生草本植物, 是我国传统名贵中药材, 是驰名中外的“云南白药”的主要成分^[1]。三七在本草纲目之前的《医门秘旨》中已有记载^[2], 其使用历史近600年, 栽培历史在400年以上, 主产于云南、广西, 湖南和四川也有少量种植。作为一种药食同源植物, 三七自古以来都被认为有活血化瘀、消肿定痛^[3]的奇效。现代研究发现, 三七中富含的三七总皂甙对预防和治疗心脑血管疾病具有较好的效果, 也可用于对肝病和癌症等的治疗。三七总皂甙含量测定及药理、毒理研究国内已有报道。为了研究三七总皂甙的稳定性, 以便科学地应用于制剂的研制开发。笔者采用高效液相色谱法, 试验考察了不同pH值、不同温度对三七总皂甙稳定性的影响^[4-6]。

1 材料

1.1 仪器 Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国戴安有限公司); 电子精密天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); DK-S26 型电热恒温水浴锅(海精宏实验设备有限公司); 501 升降恒温水浴锅(巩义市英裕高科仪器厂); DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试剂 三七总皂甙(广西昌州天然产物开发有限公司提供); 甲醇、乙腈(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水(实验室自制); 所用其他试剂均为AR级。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 精密称取三七总皂甙0.1 g, 精确至0.01 g, 置于100 ml 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 即得浓度为1 ng/ml 的三七总皂甙对照品溶液, 作为供试品溶液。

2.2 高效液相色谱分析

2.2.1 紫外波长的确定。 对供试品溶液采用HPLC进行190

~600 nm 的紫外可见区域波长扫描, 由图1可知, 波长在197 nm 处三七总皂甙具有最大紫外吸收。确定该色谱的检测波长为197 nm。

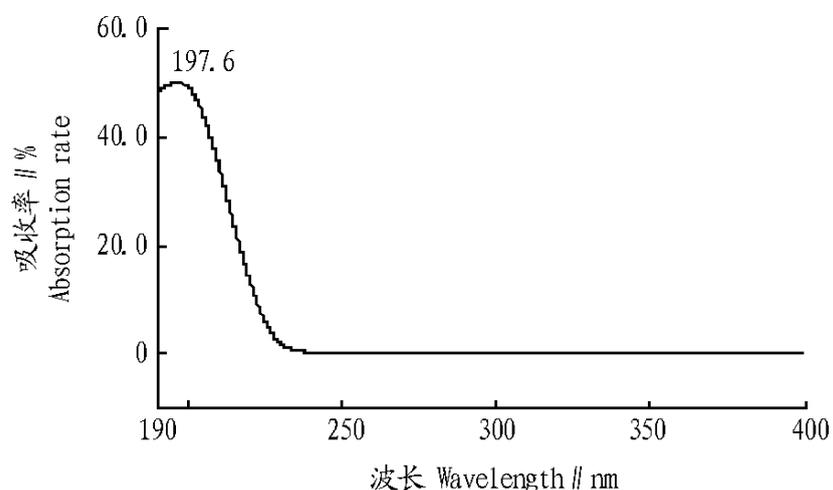


图1 三七总皂甙紫外吸收谱图

Fig.1 Ultraviolet spectra of total saponins from *Panax notoginseng*

2.2.2 色谱条件。 色谱柱: Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流速: 1.00 ml/min; 检测波长: 197 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μl。采用二元梯度洗脱: A相为乙腈, B相为水, 洗脱比例见表1, 三七总皂甙色谱图见图2。

表1 液相色谱流动相的梯度洗脱比例

Table 1 The gradient elution ratio of mobile phase of HPLC

保留时间 min	流速 ml/min	A	B
Retention time	Flow velocity	%	%
0	1	10	90
5	1	20	80
20	1	35	65
30	1	35	65
45	1	43	57
52	1	43	57
67	1	58	42
82	1	75	25

作者简介 闫海全(1982-), 男, 黑龙江佳木斯人, 硕士研究生, 研究方向: 分离科学与技术。* 通讯作者。

收稿日期 2009-04-07

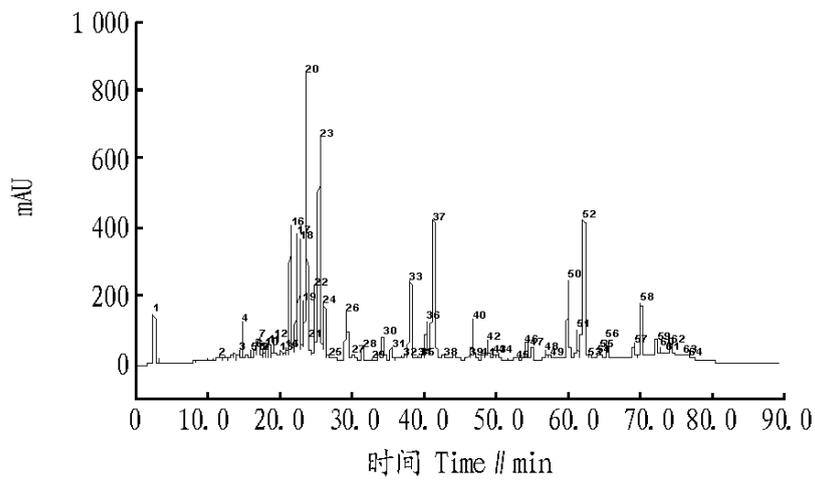


图2 三七总皂甙高效液相色谱图

Fig.2 HPLC of total saponins from Panax notoginseng

2.3 HPLC 分析方法学考察

2.3.1 线性关系。精密吸取供试品溶液 5、10、15、20 和 25 μ l, 注入液相色谱仪, 三七总皂甙为复杂的混合物, 故把所有峰面积进行加和, 按上述色谱条件测定, 以总峰面积为纵坐标, 三七总皂甙含量为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程: $y = 85.882x - 1.3457$, $R^2 = 0.9999$ 。线性范围在 5 ~ 25 μ g。

2.3.2 精密度试验。取相同三七总皂甙供试品溶液, 20 μ l 重复进样 5 次, 测定总皂甙峰面积积分值, 三七总皂甙的 RSD 为 1.03%。

2.3.3 稳定性试验。配置 1 份三七总皂甙供试品溶液, 按上述色谱条件, 于配置后的 0、3、6、9、12、24 h 测定, 结果三七总皂甙的 RSD 为 0.30%, 表明在 24 h 内稳定。

2.3.4 重现性试验。精密称取三七总皂甙 4 份, 每份 0.1 g, 溶于 100 ml 蒸馏水中, 按上述色谱条件测定, 记录三七皂甙类化合物的峰面积和保留时间, 计算三七总皂甙 RSD 为 0.35%。

2.3.5 含量测定。精密吸取供试品溶液 20 μ l, 注入高效液相色谱进行测定, 结果测得总皂甙的峰面积为 1 667.83 mAU·min, 通过标准曲线计算含量为 19.42 μ g。

2.4 不同 pH 值对三七总皂甙的稳定性影响

2.4.1 样品的处理。精密称取三七总皂甙 0.1 g, 置 100 ml 容量瓶中, 在室温下, 分别用盐酸和氢氧化钠调 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 的三七总皂甙水溶液, 摇匀后备用。

2.4.2 样品的测定。采用高效液相色谱法测定, 谱图见图 3, 由标准曲线方程计算三七总皂甙的含量, 结果见表 2, 图 4 中 1、2、3 分别为 pH 值在 7.0、3.0、12.0 的谱图。

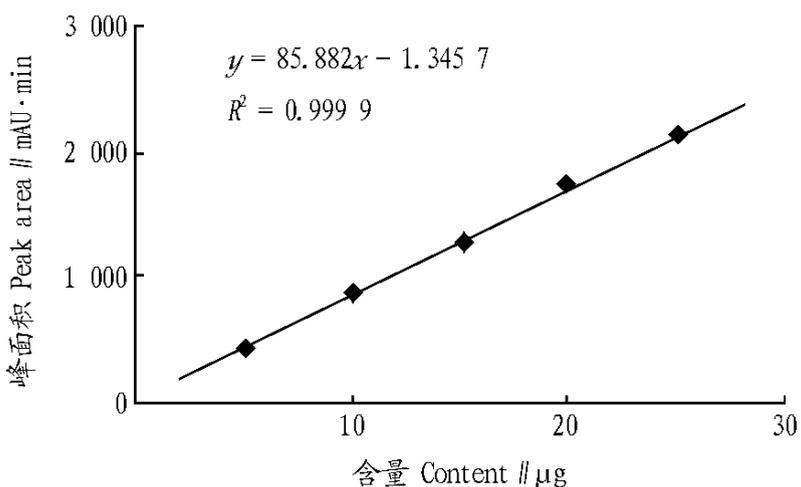


图3 三七总皂甙标准曲线

Fig.3 Standard curve of total saponins from Panax notoginseng

表2 不同 pH 值对三七总皂甙的稳定性试验结果

Table 2 Result of stability test of total saponins from Panax notoginseng under different pH value

pH 值	峰面积 mAU·min	含量 μ g	含量 %
pH value	Peak area	Content	Proportion
3.0	1 123.6	13.10	67.44
4.0	1 603.2	18.68	89.90
5.0	1 611.4	18.78	96.69
6.0	1 604.1	18.69	90.02
7.0	1 608.5	18.74	96.52
8.0	1 618.7	18.86	90.84
9.0	1 613.3	18.57	96.81
10.0	1 605.7	18.71	96.35
11.0	1 602.8	18.68	89.94
12.0	1 612.1	18.79	96.73

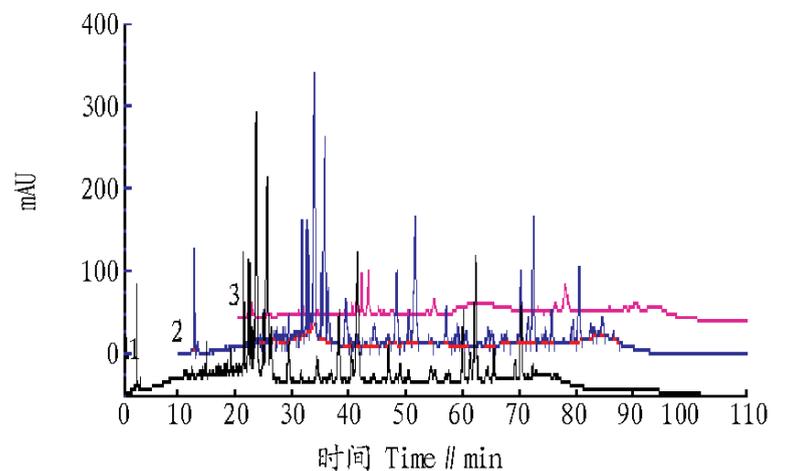


图4 不同 pH 值下三七总皂甙谱图

Fig.4 The spectrogram of total saponins from Panax notoginseng under different pH value

2.5 温度对三七总皂甙的稳定性影响

2.5.1 样品的处理。精密称取三七总皂甙 0.1 g, 置 100 ml 容量瓶中, 各取 5 ml 三七总皂甙溶液于试管中, 分别在温度 20、40、60、80、100 $^{\circ}$ C 下反应 1 h, 冷却后测定含量。

2.5.2 样品的测定。采用高效液相色谱法测定, 由标准曲线方程计算三七总皂甙的含量, 结果见表 3。

表3 不同温度对三七总皂甙的稳定性试验结果

Table 3 Result of stability test of total saponins from Panax notoginseng under different temperature

温度	峰面积 mAU·min	含量 μ g	含量 %
Temperature	Peak area	Content	Proportion
20	1 653.8	19.27	99.24
40	1 620.3	18.88	97.23
60	1 634.8	18.70	96.30
80	1 622.7	17.28	88.98
100	1 617.8	16.92	87.13

3 结论与讨论

(1) 试验需要分离的皂甙成分多、极性分布较大, 进行梯度洗脱比等度洗脱分析时间短, 分离度好。所以选择梯度洗脱。该试验参考不同文献最终选择了乙腈-水作为流动相, 并通过试验考察了皂甙的分离度, 确定流动相梯度。

(2) 表 2 试验数据表明, 在 pH 值 4.0 到 pH 值 12.0 条件下, 常温保持, 三七总皂甙的含量无显著变化, 说明三七总皂甙在此条件下比较稳定。在 pH 值 3.0 条件下, 对三七总皂甙的含量有些影响, 约降低 32.5%; 部分皂甙峰面积明显降

(下转第 5991 页)

此,血清高密度脂蛋白的升高有益于动物健康。中药添加剂 HMS 极显著提高了肉杂鸡血清高密度脂蛋白含量,减少了

LDL C 在血管壁上的存量,增加了胆固醇的排出,从而降低了组织中的胆固醇含量,保障了动物循环系统的健康。

表4 HMS 对供试肉杂鸡血清生化指标的影响

Table 4 Effects of HMS on serum biochemical indices of tested neat hybrid chickens

组别 Group	总蛋白 g/L Ttd protein	白蛋白 g/L Albumin	球蛋白 g/L Globulin	碱性磷酸酶活性 IU/L Alkaline phosphatase	胆固醇 mmol/L Cholesterol
A	34.23 ±0.70	13.61 ±0.39	20.61 ±0.30	2 222.56 ±450.00 a	2.85 ±0.16 ABa
B	35.09 ±2.99	13.77 ±0.32	21.64 ±2.80	2 203.22 ±436.60 a	2.88 ±0.17 Aa
C	35.08 ±2.49	13.40 ±0.14	22.33 ±1.87	2 459.89 ±473.40 a	2.34 ±0.13 Bb
CK	37.06 ±1.10	13.31 ±0.14	24.03 ±1.76	1 349.11 ±202.88 b	2.76 ±0.20 ABa
P 值	0.431 5	0.235 7	0.241 3	0.043 3	0.013 6
P value					
组别 Group	甘油三酯 mmol/L Triglyceride	高密度脂蛋白 mmol/L High density lipoprotein	低密度脂蛋白 mmol/L Low density lipoprotein	尿素氮 mmol/L Urea nitrogen	尿素 mmol/L Uric acid
A	0.35 ±0.05	1.92 ±0.17 A	0.73 ±0.53	0.55 ±0.06 ABb	217.67 ±21.66 Bcb
B	0.26 ±0	1.81 ±0.03 A	1.06 ±0.02	0.49 ±0.01 Bb	173.33 ±29.28 Cb
C	0.33 ±0.03	1.44 ±0.12 B	0.86 ±0.02	0.63 ±0.03 Aa	283.33 ±37.82 ABa
CK	0.33 ±0.05	1.57 ±0.07 B	0.94 ±0.12	0.65 ±0.04 Aa	316.11 ±28.86 Aa
P 值	0.116 2	0.002 8	0.543 1	0.003 8	0.001 6
P value					

表5 HMS 对供试肉杂鸡免疫器官指数的影响

Table 5 Effects of HMS on immune organ indices of tested neat hybrid chickens

组别 Group	法氏囊指数 Index of bursa of Fabricius	脾脏指数 Index of spleen
A	1.35 ±0.61	1.73 ±0.44
B	1.69 ±0.30	1.62 ±0.07
C	1.38 ±0.33	2.02 ±0.37
CK	0.84 ±0.01	1.54 ±0.16
P 值 P value	0.126 1	0.279 6

尿素氮、尿酸是禽体内蛋白质分解代谢产物,尿酸水平能反映机体氮的代谢状况,进而反映蛋白质代谢的变化。该试验中,各中药添加组血清尿素氮、尿酸含量极显著降低,表明氨基酸的分解减少,进入蛋白质合成代谢的氨基酸增多,提高了饲料利用率。

麦饭石能延长饲料在消化道的停留时间,使饲料充分消耗吸收,也提高了饲料的利用率。中药添加组肉杂鸡耗料量极显著降低可能与肉杂鸡采食中枢受到中药中的多糖、脂肪酸和糖蛋白等有效成分的抑制作用有关,其机理有待进一步研究。

综上所述,中药添加剂 HMS 可能通过提高肉杂鸡的血清

碱性磷酸酶活性和血清高密度脂蛋白的含量,降低肉杂鸡的血清胆固醇、尿素氮、尿酸含量等生理作用,从而降低了饲料消耗量和料肉比,提高了饲料的利用率,达到了促生产的效果,可作为肉鸡保健增重剂使用。该试验3个中药添加组中,以B组(1%添加量)的料肉比改善效果最佳,这与蒋培红^[7]、王志祥^[8]、周克年^[9]等以黄芪为主的添加剂的试验结果一致。

参考文献

- [1] 房兴堂,朱抑燕,朱惠民.绿色饲料添加剂的开发现状[J].畜禽业,2000(7):14-15.
- [2] 张常书,肖怀平.代抗生素绿色饲料添加剂的开发应用[J].兽医与饲料添加剂,1998,3(2):19-22.
- [3] 程忠刚.营养保健饲料添加剂的研究与应用[J].饲料工业,1998,19(9):25-28.
- [4] 田允波,葛长荣,韩建众,等.绿色饲料添加剂的研制与开发[J].饲料工业,1999,20(4):43-46.
- [5] 李呈敏.中药饲料添加剂[M].北京:北京农业大学出版社,1993:82-86.
- [6] 胡元亮.中药饲料添加剂的开发与应用[J].北京:化学工业出版社,2005.
- [7] 蒋培红.黄芪组方对肉鸡免疫功能影响的研究[J].中国兽医杂志,2007,34(4):87-90.
- [8] 王志祥.黄芪活性成分提取物对肉仔鸡生长、代谢及消化酶的影响[J].河南农业大学学报,2006,40(3):279-283.
- [9] 周克年,周明.黄芪苦参散饲喂雏鸡的效果[J].中国畜牧杂志,1998,34(3):33-34.

(上接第5974页)

低。温度对三七总皂甙的含量不大,在20~80 比较稳定,100 以上皂甙峰面积降低,总皂甙含量降低约12.5%。

(3)综合试验结果可以看出,三七总皂甙液相色谱定量方法具有较强的针对性和准确性。三七总皂甙在弱酸弱碱低温条件下,比较稳定,而在强酸高温下受影响大。为综合利用三七总皂甙药材资源研制开发三七制剂提供了科学依据,有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用[M].北京:北京学苑出版

社,1997:56-60.

- [2] 徐冬英.三七名称及其有文字记载时间的考证[J].广西中医学院学报,2000,17(3):91-92.
- [3] 何蔚,朱遵平.三七总皂苷大鼠脑缺血再灌注损伤血清IL-8的影响[J].放射免疫学杂志,2002,15(5):267-268.
- [4] 黄永悼,王宁生.HPLC/ELSD法测定复方丹参滴丸中人参皂甙Rg₁, Rb₁和三七皂甙R1的含量[J].中药新药与临床药理,2002,13(3):174-176.
- [5] Mikhu Kov, et, Detn of Seven Major Gnsesides by H Performance liquid Chromatography[J].Chew Nit Comp.1990,26(1):46.
- [6] PARK M.K. Detn of Gnsesids by IC PAD HPLC[J].J Liq Chm Mitogr, 1994,17(5):1171.