

· 基础研究 ·

薄层扫描法同时测定三七细粉中皂苷含量[△]何福龙¹, 郑艳萍^{2,3*}, 任娟³, 金俊杰^{2,3}, 白发平³, 蔡宝昌^{2,3}

(1. 广西贺州职业学院, 桂东卫生学校, 广西 贺州 542899; 2. 南京海昌中药集团有限公司, 江苏 南京 210061; 3. 南京海源中药饮片有限公司, 江苏 南京 210061)

[摘要] 目的: 建立同时测定三七细粉中人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 含量的方法。方法: 采用双波长薄层扫描法, 吸附剂为硅胶 G, 展开剂为三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2) 10 ℃ 以下放置 12 h 的下层液, 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液, 110 ℃ 加热显色, 测定波长 510 nm, 参比波长 700 nm。结果: 三种皂苷分别在 0.504~5.04、0.501~5.01、0.492~4.92 μg 范围呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 96.40%、96.97%、98.97%, RSD 分别为 1.40%、0.98%、1.70% (n=6)。结论: 该方法操作简便、快速、高效、准确。

[关键词] 三七细粉; 人参皂苷 Rb₁; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 薄层扫描法

Content Determination of Ginseng Saponin by TLC-scanning in *Panax Notoginseng* PowderHE Fu-long¹, ZHENG Yan-ping^{2,3*}, REN Juan³, JIN Jun-jie^{2,3}, BAI Fa-ping³, CAI Bao-chang^{2,3}

(1. Hezhou Vocational College of Guangxi, Health School of Guidong, Hezhou 542899, China;

2. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Co. Ltd., Nanjing 210061, China;

3. Nanjing Haiyuan Chinese Medicine Co. Ltd., Nanjing 210061, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of ginsenosides content in *Panax notoginseng* powder. **Methods:** The double wavelength thin layer scanning method was applied with silica gel G as the adsorbent, the low layer of chloroform-methanol-water (13:7:2) under 10 ℃ placed 12 h was used as developing solvent, 10% ethanol solution of sulfuric acid was used as the chromogenic agent with 110 ℃ heating, the determining wavelength was set at 510 nm, reference wavelength was 700 nm. **Results:** The three saponins showed a good linear relationship in the range of 0.504-5.04, 0.501-5.01, 0.492-4.92 μg. The average recoveries were 96.40%, 96.77%, 98.97%; RSD were 1.40%, 0.98%, 1.70% (n=6). **Conclusion:** The established method is simple, rapid and accurate.

[Keywords] *Panax notoginseng* powder; ginseng saponin Rb₁; notoginsenoside R₁; ginseng saponin Rg₁; TLC-scanning
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180111001

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的块根^[1]。三七现代药理作用主要体现在对心血管和脑血管等血液系统、神经系统、代谢和免疫调节系统等的影 响^[2-3]。三七自古以活血散瘀功效著名, 能抗血小板聚集, 抗血栓形成^[4]。其主要有效成分为皂苷类化合物^[1], 迄今已从三七中分离得到 70 余种三萜皂苷, 其中以三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 和 Rd 等皂苷类成分含量较高。三七皂苷类成份的定量分析可采用 TLC、HPLC、GC 和比色法等方法。比色法基于三萜骨架结构或糖基和羧基的化学反应, 专属性差且

只能测定总皂苷的含量^[5]; 气相色谱虽然具有较高的灵敏度和分辨率, 但样品需要复杂的前处理以降低其沸点^[6]; 高效液相色谱法是目前广泛使用的方法, 利用梯度洗脱, 可使大部分皂苷较好的分离, 但是由于三萜皂苷分子中不具备较好的发色团^[7], UV 检测常用波长为 203 nm, 许多化合物及溶剂都对检测有干扰。TLCS 可以同时进行多通道的展开、扫描, 节约使用溶剂和时间, 是皂苷类成分分析的常用方法之一。

本研究通过薄层扫描法同时测定三七细粉中人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的含量,

[△] [基金项目] 国家中医药管理局公益性行业专项(201507002-2)

* [通信作者] 郑艳萍, 助理研究员, 研究方向: 中药分析与质量标准研究; Tel: 15951797765, E-mail: zyp611@163.com

建立同时测定三种皂苷的含量的薄层扫描的方法。本实验采用薄层色谱扫描法,通过对供试品溶液的制备、展开条件的改进,使人参皂苷 Rb_1 、三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1 的色谱斑点分离良好,扫描色谱峰稳定、可测,并在不同批次的三七粉中得到了验证,取得了较好的分离效果,可以同时测定多个样品中三个皂苷的含量,大大提高了该品种的检测效率。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CAMAG 公司薄层色谱系统,包括半自动点样仪 linomat5-1507 及自动成象系统 Visnaliter-151204; FA1104 型电子分析天平,精度 0.01 mg(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

三七细粉:南京海源中药饮片有限公司,批号:151023、160307、160601,规格:66 g/瓶,亳州中药材市场购买两批(S1、S2),云南文山购买一批(Y1);人参皂苷 Rg_1 对照品(批号:110703-201530)、三七皂苷 R_1 对照品(批号:110745-201619)、人参皂苷 Rb_1 对照品(批号:110704-201424),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶 G(青岛海洋化工厂分厂);其余试剂均为分析纯;水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

取人参皂苷 Rb_1 、三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1 对照品适量,分别精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇制成浓度分别为 0.504、0.501、0.492 $mg \cdot mL^{-1}$ 混合对照品溶液,备用。

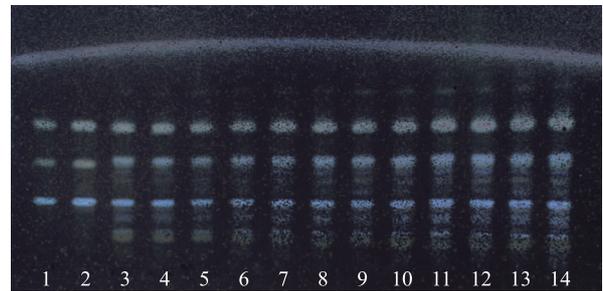
2.2 供试品溶液的制备

取本品三七细粉 0.2 g,置索式提取器中,加乙醚 80 mL,加热回流提取 1 h,弃去乙醚液,药渣挥发去溶剂,加甲醇 80 mL,加热回流至无色,提取液挥发,残渣加甲醇适量,并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液,备用^[8-9]。

2.3 预处理、层析及测定

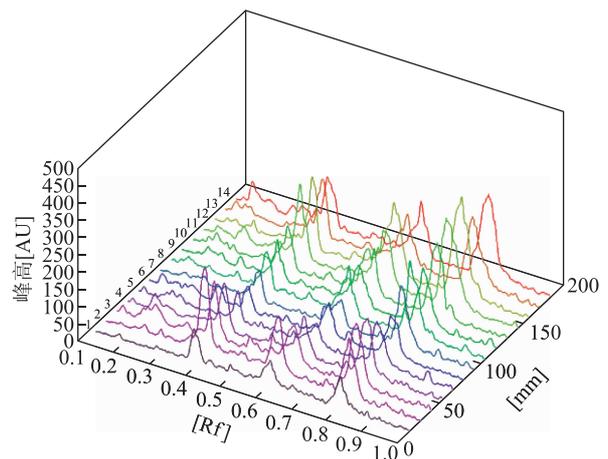
照薄层色谱法(《中华人民共和国药典》2015 年版通则 0502)试验,精密吸取混合对照品溶液 2、

8 μL ,供试品溶液 2 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10 $^{\circ}C$ 以下放置 12 h 的下层液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 110 $^{\circ}C$ 加热至斑点显色清晰,晾干,至 366 nm 下检视后(见图 1),在薄层板上覆盖同样大小的玻璃板,周围用胶带固定,照薄层色谱法(《中华人民共和国药典》2015 年版通则 0502)进行扫描(见图 2),检测波长 510 nm,参比波长 700 nm,测得供试品吸收度积分值与对照品吸收度积分值,根据外标两点法计算,即得。



注:1. 混合对照品 2 μL (从下到上分别是人参皂苷 Rb_1 、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1); 2. 混合对照品 8 μL (从下到上分别是人参皂苷 Rb_1 、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1); 3~4. 供试品 Y1; 5~6. 供试品 S1; 7~8. 供试品 S2; 9~10. 供试品 151023; 11~12. 供试品 160307; 13~14. 供试品 160601。

图 1 三七薄层色谱图(366 nm)

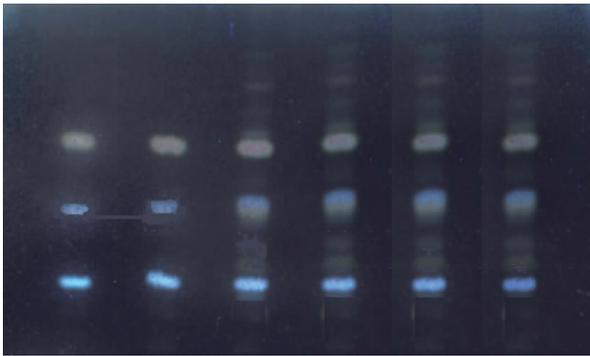


注:1. 混合对照品 2 μL (从左到右分别是人参皂苷 Rb_1 、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1); 2. 混合对照品 8 μL (从左到右分别是人参皂苷 Rb_1 、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1); 3~4. 供试品 Y1; 5~6. 供试品 S1; 7~8. 供试品 S2; 9~10. 供试品 151023; 11~12. 供试品 160307; 13~14. 供试品 160601。

图 2 三七薄层扫描 3D 色谱图
(检测波长 510 nm, 参比波长 700 nm)

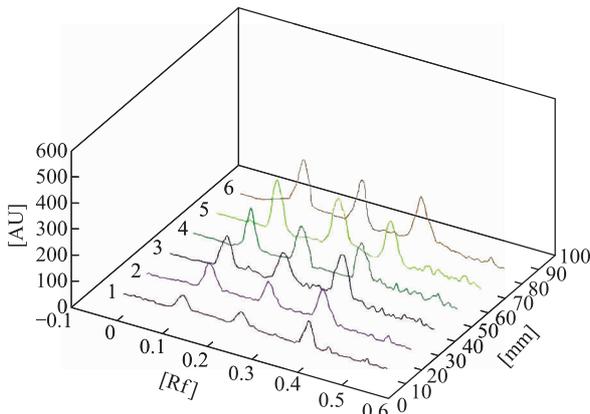
2.4 线性关系的考察

精密吸取上述混合对照品溶液各1、2、4、6、8、10 μL，分别点于薄层板上，按上述2.3项方法测定(见图3，图4)吸光度积分值，以人参皂苷Rb₁、三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁进样量为自变量(X)，峰面积积分值为因变量(Y)，进行线性回归，



注：从下到上分别是人参皂苷Rb₁、三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁对照品。

图3 混合对照品薄层色谱图(366 nm)



注：1~6分别为混合对照品溶液1、2、4、6、8、10 μL点样的薄层扫描图(从左到右分别是人参皂苷Rb₁、三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁扫描峰)。

图4 混合对照品薄层扫描3D色谱图(检测波长510 nm，参比波长700 nm)

得回归方程 $Y_{\text{人参皂苷 Rb}_1} = 1\ 120.1X + 271.29, r = 0.998\ 5$; $Y_{\text{三七皂苷 R}_1} = 2\ 105.2X + 135.20, r = 0.999\ 1$; $Y_{\text{人参皂苷 Rg}_1} = 1\ 085.1X + 71.034, r = 0.998\ 2$ 。实验表明，人参皂苷Rb₁、三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁在0.504~5.04、0.501~0.504、0.492~4.92 μg范围内具良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液2 μL，分别点于2块薄层板上，各点6份，按2.3项下方法进行测定，结果人参皂苷Rb₁、三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁的RSD分别为1.87%、1.02%、1.56%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取供试品溶液(批号：160601)2 μL按上述方法于0、10、20、40、60 min测定，结果，人参皂苷Rb₁、三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁峰面积RSD分别为1.64%、1.96%、1.72%。结果表明样品60 min内测定稳定。但文献^[9]认为显色后30 min测定较好。

2.7 重复性试验

取三七粉(批号：160601)样品5份，按2.2、2.3的方法进行提取、展开、显色、测定。测得该批号三七细粉中人参皂Rb₁、三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁质量分数平均值为31.25、50.72、59.86 mg·g⁻¹，RSD分别为1.53%、1.05%、1.86%，结果表明此方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

精密称定三七粉(批号：160601，含人参皂苷Rb₁ 31.25 mg·g⁻¹、三七皂苷R₁ 50.72 mg·g⁻¹、人参皂苷Rg₁ 59.86 mg·g⁻¹)样品0.1 g，精密加入人参皂苷Rb₁对照品约3 mg、三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁对照品约6 mg，按2.2项下方法制备供试品溶液，平行6份，按上述方法测定，计算回收率，结果见表1。

表1 加样回收实验结果(n=6)

待测成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
人参皂苷 Rb ₁	3.47	3.20	6.50、6.62、6.54、6.52、6.56、6.59	94.68、98.44、95.94、95.31、96.56、97.50	96.40	1.40
三七皂苷 R ₁	5.20	5.09	10.20、10.15、10.09、10.08、10.18、10.12	98.23、97.25、96.07、95.87、97.84、96.66	96.97	0.98
人参皂苷 Rg ₁	6.34	6.12	12.39、12.30、12.38、12.59、12.40、12.32	98.86、97.39、98.69、102.12、99.02、97.71	98.97	1.70

2.9 样品测定

取三七粉6批,按照2.2项下方法制备供试品溶液,同法测定,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3, \%$)

批号	人参皂苷 Rb ₁	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 Rg ₁
151023	3.058	4.251	5.865
160307	2.981	5.021	4.982
160601	3.125	5.072	5.986
S1	2.561	4.251	3.125
S2	2.088	3.145	3.254
Y1	2.951	4.058	5.205

3 讨论与小结

《中华人民共和国药典》2015年版一部三七项下鉴别方法处理三七样品,展开后薄层斑点较多,分离度不好,薄层扫描色谱峰相互交叉,定量不精确。本实验测定方法在此基础上进行了修改,采取先用乙醚提取,除去部分极性较低的成份后,加甲醇回流提取人参皂苷类成分进行薄层色谱分析,薄层色谱斑点少,分离度良好,定量精准^[10]。

样品预提取、展开晾干后,喷10%硫酸乙醇溶液110℃烘至显色清晰后,应立即用等大的透明玻璃板覆盖,周围并用透明胶封严,以免斑点氧化褪色。人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的定量测定方法也有采用 HPLC 法^[11],但因其为末端吸收低,测定时间长、成本高、速度慢等问题不适

合三七检测,而 TLCS 法解决了过这些问题,可以在同一块薄层板上同时测定多个样品,且速度快,同时避免了末端吸收差的问题。因此本研究所建立的方法更易于广泛推广和三七的快速检测。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:11-12.
- [2] 王莹,褚扬,李伟,等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展[J]. 中草药,2015,46(9):1381-1392.
- [3] 乔春玲,丁艳芬,杨崇仁. 三七总皂苷药理研究进展[J]. 中国现代中药,2012,14(11):25-30.
- [4] 冯陆冰,潘西芬,孙泽玲. 三七的药理作用研究进展[J]. 中国药师,2008,11(10):1185-1187.
- [5] 余河水,张丽娟,宋新波,等. 三七炮制品化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(22):3910-3917.
- [6] 曾江,崔秀明,周家明,等. 三七根茎的化学成分研究[J]. 中药材,2008,30(11):1388-1391.
- [7] 陈斌,许慧琳,贾晓斌. 三七炮制研究进展与研究思路[J]. 中草药,2013,44(4):482-487.
- [8] 胡俊明,蒋晓煌,蒋孟良. 双波长薄层扫描法定量测定二至九中齐墩果酸与熊果酸[J]. 中成药,2013,35(6):1343-1345.
- [9] 李霄,万丹丹,郭洛宏. 薄层色谱对复方丹参片中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Re 的鉴别[J]. 中成药,2009,31(9):1470-1472.
- [10] 章睿. 薄层扫描特征图谱在牡丹皮饮片质量控制中的应用[J]. 中医药临床杂志,2013,25(6):539-541.
- [11] 王超群,贾秀虹,陈季,等. 中药三七“一测多评”质量控制方法的系统研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(22):3438-3445.

(收稿日期 2018-01-11)

(上接第967页)

- [6] 纪亚明. 不同产地决明子的有效成分含量差异与品质评价[J]. 中医药信息,2012,29(6):24-26.
- [7] 张毅,黄小平,翁代群,等. HPLC 测定不同产地决明子中蒽醌类成分[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2797-2799.
- [8] 卫莹芳,胡慧玲,闫婕,等. 决明子药用植物资源调查[C]//中药与天然药高峰论坛暨第十二届全国中药和天然药物学术研讨会论文集. 海口,2012:30-34.
- [9] 刘红卫. 决明子产销趋势分析[J]. 中国现代中药,2013,15(2):159-160.
- [10] 黄桂茹,黄晋,罗芬. 决明子规范化种植技术研究[J]. 亚太传统医药,2016,(8)8:46-47.
- [11] 闫婕,卫莹芳,胡慧玲,等. HPLC 测定全国不同产地及进口决明子大黄酚与橙黄决明素含量[J]. 时珍国医国药,2015,27(1):56-58.

(收稿日期 2017-11-15)