

· 基础研究 ·

三七叶、三七花质量标准研究[△]赵振霞¹, 王敏¹, 段吉平¹, 刘永利^{1*}, 庄爱爱²

(1. 河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2. 河北科技大学 化学与制药工程学院, 石家庄 050016)

[摘要] 目的: 建立三七叶和三七花的质量标准。方法: 用TLC法定性鉴别; 按《中华人民共和国药典》方法对水分、总灰分、酸不溶性灰分进行测定; 采用高效液相色谱法测定了人参皂苷Rb₁; 人参皂苷Rb₂; 人参皂苷Rb₃三种成分的含量, 用Thermo C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈和水为流动相梯度洗脱, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为203 nm, 柱温30℃。结果: 薄层鉴别方法斑点清晰, 分离度好; 三七叶和三七花水分的平均值为9.1%、10.0%, 总灰分的平均值为10.1%、6.9%, 酸不溶性灰分平均值为0.40%、0.062%; 含量测定人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rb₂和人参皂苷Rb₃与相邻峰完全分离, 线性关系良好, 三七叶平均加样回收率(n=6)分别为101.5%、100.9%、99.5%; 三七花平均加样回收率(n=6)分别为100.6%、98.6%、101.3%。结论: 建立的方法可用于三七叶和三七花的质量控制。

[关键词] 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 三七叶; 三七花; 人参皂苷Rb₁; 人参皂苷Rb₂; 人参皂苷Rb₃

Quality Specification Study of Leaves and Flower Buds of *Panax notoginseng*ZHAO Zhen-xia¹, WANG Min¹, Duan Ji-ping¹, LIU Yong-li^{1*}, ZHUANG Ai-ai²

(1. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China;

2. School of chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard for Leaves and flower buds of *Panax notoginseng*. **Methods:** The TLC was used for qualitative identification. According to the Chinese Pharmacopoeia methods, the moisture, total ash and acid insoluble ash were determined. The content analysis was performed on a Thermo C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μm), with acetonitrile(A)-water(B) as the mobile phase with gradient elution and the flow rate was 1 ml·min⁻¹. The column temperatures was set at 30℃ and the detection wavelength was 203nm. **Results:** The spots on the TLC plate were clear and the resolution was well. For leaves and flower buds of *P. notoginseng*, the mean moisture were 9.1%, 10.0%, the mean total ash were 10.1%, 6.9%, the mean acid insoluble ash were 0.40%, 0.062%. Ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rb₂ and ginsenoside Rb₃ were separated with chromatographic peak of consecutive. The linear relationships of calibration curves were favorable. The recoveries (n = 6) of ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rb₂ and ginsenoside Rb₃ were 101.5%、100.9%、99.5% (leaves of *P. notoginseng*) and 100.6%、98.6%、101.3% (flower buds of *P. notoginseng*). The contents were probably identical in different batch of leaves of *P. notoginseng*. **Conclusion:** The established qualitative and quantitative analysis method is applicable for quality control of leaves and flower buds of *P. notoginseng*.

[Keywords] TLC; HPLC; leaves of *Panax notoginseng*; flower buds of *Panax notoginseng*; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rb₂; ginsenoside Rb₃

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180322002

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科人参属多年生草本植物, 是我国重要的传统中

药^[1], 以干燥根及根茎入药, 传统用于活血化瘀, 跌打损伤, 以及滋补强壮等。现阶段主要以三七的

[△] [基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项: 2014ZX09304307-002。

* [通信作者] 刘永利, 主任药师, 研究方向: 中药质量控制方法研究; Tel: (0311)85212008-8041, E-mail: liuyongli2008@126.com

地下部分使用为主,生产过程中产生大量的三七叶、三七花等未得到充分开发利用。三七叶、三七花具有一定的清凉、平肝等功效,传统上作为茶饮料使用,现代研究表明对心血管系统、中枢神经系统、免疫系统均具有显著作用^[2-4],三七叶和三七花已作为商品流通于医药市场。文献报道三七叶、三七花主要含原人参二醇型皂苷,几乎不含原人参三醇型皂苷,这是与三七主根含皂苷的主要不同点,含量较高的有人参皂苷 Rb₁、Rb₃、Rc 以及三七皂苷 Fc 等^[5-7]。人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃ 为三七叶、三七花的药理活性物质,对中枢神经系统及心血管系统等方面具有一定的药理作用^[8-11]。本文在相关文献^[12]测定基础上,选择人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃ 为检测指标,对薄层鉴别及含量测定进行了系统研究,建立了三七叶、三七花的质量标准。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(配备四元泵,UV 检测器,Waters e 2695,美国 Waters 公司);AE240 电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 材料

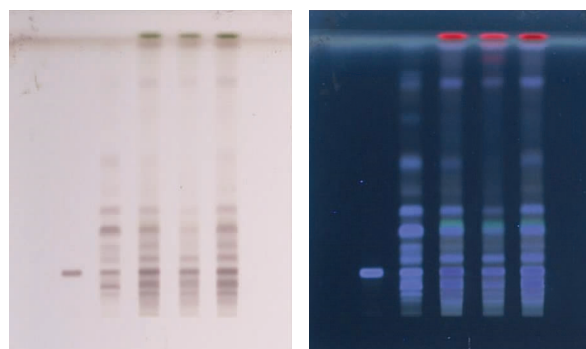
实验用三七叶、三七花样品来自产地云南、广西及亳州、玉林、廉桥、高桥、安国等药材市场,经鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥茎叶与干燥花序。对照品:人参皂苷 Rb₁ (批号:110704-201424,含量以 93.7% 计)、人参皂苷 Rb₂ (批号:111715-201203,含量以 93.8% 计)、人参皂苷 Rb₃ (批号:111686-201504,含量以 97.0% 计)均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用;三七茎叶皂苷(批号:1553-200201)购自中国食品药品检定研究院,供鉴别用;乙腈(色谱纯,Merck, Germany),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

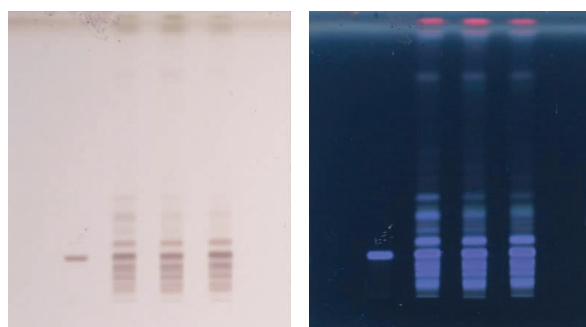
取三七叶粉末 0.6 g (或三七花粉末 0.2 g),加水 1 mL,搅匀,再加水饱和的正丁醇 15 mL,密塞,振摇 10 min,放置 30 min,离心,取上清液,加正丁醇饱和的水 20 mL,摇匀,放置使分层,取正丁

醇层蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。再取人参皂苷 Rb₃ 对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,取三七茎叶皂苷对照加甲醇制成每 1 mL 含 3 mg 的溶液作为对照溶液。照薄层色谱法(《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502)试验,吸取上述溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷:乙醇:水(2:2:1)10 ℃ 以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰,分别在日光和紫外光(365 nm)下检视。三七叶供试品色谱中,在与人参皂苷 Rb₃ 对照品和三七茎叶皂苷对照提取物色谱相应的位置上,日光下显相同颜色的斑点,紫外光下显相同颜色的荧光斑点(图 1);三七花供试品色谱中,在与人参皂苷 Rb₃ 对照品色谱相应的位置上,日光下显相同颜色的斑点,紫外光下显相同颜色的荧光斑点(图 2)。



注: 1. 人参皂苷 Rb₃; 2. 三七茎叶皂苷; 3. 三七叶样品; 4. 三七叶样品; 5. 三七叶样品。

图 1 三七叶鉴别薄层色谱图



注: 1. 人参皂苷 Rb₃; 2. 三七花样品; 3. 三七花样品; 4. 三七花样品。

图 2 三七花鉴别薄层色谱图

2.2 水分测定

取三七叶和三七花样品适量,粉碎,取粉末约 2 g,精密称定,平铺于已恒重的称量瓶中,按《中

华人民共和国药典》2015年版四部通则 0832 第二法测定,计算水分的百分含量。结果见表1、表2。

2.3 总灰分、酸不溶性灰分的测定

取三七叶和三七花样品适量,粉碎,取粉末约3 g,精密称定,置已恒重的坩埚中,按《中国药典》2015年版四部通则 2302 测定总灰分与酸不溶性灰分。结果见表1、表2。

表1 三七叶水分、总灰分、酸不溶性灰分的测定结果 %

编号	来源	水分	总灰分	酸不溶性灰分
1	安徽	8.7	9.9	0.40
2	安徽	7.8	11.6	0.49
3	湖南	8.6	10.0	0.44
4	河北	8.6	6.5	0.32
5	河北	10.2	10.0	0.31
6	广西	10.0	13.3	0.43
7	广西	9.6	10.0	0.33
8	云南	9.5	10.0	0.38
9	云南	9.0	6.6	0.35
10	广西	9.1	10.9	0.42
11	广西	8.8	11.3	0.50
12	广西	8.8	11.1	0.41
平均(%)		9.1	10.1	0.40

表2 三七花水分、总灰分、酸不溶性灰分的测定结果 %

编号	来源	水分	总灰分	酸不溶性灰分
1	湖南	11.2	6.9	0.088
2	湖南	9.4	7.1	0.054
3	云南	8.4	8.3	0.058
4	云南	10.8	6.0	0.028
5	湖南	9.8	7.0	0.061
6	湖南	10.0	6.9	0.043
7	河北	11.1	7.0	0.053
8	河北	9.5	5.9	0.078
9	云南	10.1	7.2	0.091
10	湖南	9.3	7.3	0.062
11	云南	10.8	6.5	0.069
平均(%)		10.0	6.9	0.062

2.4 含量测定

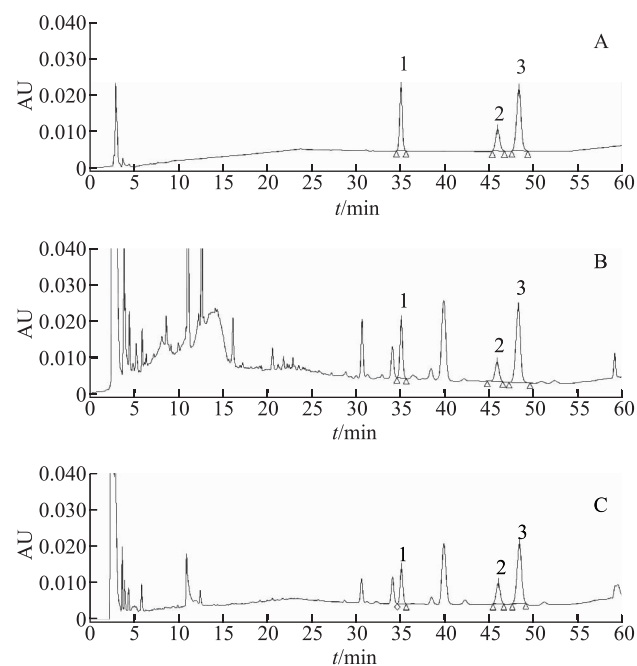
2.4.1 混合对照品溶液的制备 取人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₂和人参皂苷 Rb₃对照品适量,精密称定,

加80%甲醇制成每1 mL含人参皂苷 Rb₁60 μg、人参皂苷 Rb₂60 μg、人参皂苷 Rb₃100 μg的混合溶液,即得。

2.4.2 供试品溶液的制备 三七叶:取本品粉末(过四号筛)0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25 mL,80℃水浴上保持微沸2小时,取出,放冷,再称定重量,用80%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

三七花:取本品粉末(过四号筛)0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇50 mL,置80℃水浴上保持微沸2小时,取出,放冷,再称定重量,用80%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.3 色谱条件 色谱柱: Thermo C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm), 流动相: 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱: 0~20 min, A 10%→33%, 20~50 min, A 保持33%。流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 30℃, 检测波长: 203 nm, 进样量: 10 μL。按上述色谱条件,各成分分离度良好,测定结果见图3。



注: 1. 人参皂苷 Rb₁; 2. 人参皂苷 Rb₂; 3. 人参皂苷 Rb₃。

图3 对照品(A)及三七叶(B)、三七花(C)色谱图

2.4.4 线性关系考察 精密吸取人参皂苷 Rb₁对照品溶液(浓度依次为: 0.0142 2、0.071 1、0.142 2、0.284 4、0.853 4、1.422 4 mg·mL⁻¹)10 μL,注入高效液相色谱仪;精密吸取人参皂苷 Rb₂对照品溶液(浓

度依次为: 0.037 74、0.075 48、0.151 0、0.563 8、0.845 8、1.409 6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 μL , 注入高效液相色谱仪; 精密吸取人参皂苷 Rb_3 对照品溶液(浓度依次为: 0.021 82、0.109 1、0.218 2、0.436 4、0.872 6、1.454 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 μL , 注入高效液相色谱仪。以对照品进样量(μg)为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得回归方程。结果见表3。

表3 标准曲线测定结果

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
人参皂苷 Rb_1	$y = 2.451 \times 10^5 x + 4.92 \times 10^3$	0.999 9	0.142 2 ~ 14.22
人参皂苷 Rb_2	$y = 9.462 \times 10^4 x - 7.20 \times 10^1$	0.999 9	0.075 48 ~ 14.09
人参皂苷 Rb_3	$y = 2.722 \times 10^5 x - 6.11 \times 10^3$	0.999 9	0.218 2 ~ 14.54

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在配制后0、2、6、10、16、24 h 进样分析, 记录峰面积积分值, 计算 RSD, 结果三七叶、三七花中人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rb_2 和人参皂苷 Rb_3 三种成分 RSD 均小于2%, 表明供试品溶液在24 h 内稳定。

2.4.6 重复性试验 取同一批样品粉末(过四号筛), 三七叶取0.3、0.6、0.9 g 各三份, 三七花取0.1、0.2、0.3 各三份, 精密称定, 按“2.4.2”项下方法分别制备供试品溶液, 按“2.4.3”项下色谱条件进样分析, 记录各成分峰面积, 计算含量及 RSD, 结果见表4, 表明该方法重复性良好。

表4 重复性试验结果($\bar{x} \pm s, n=9$)

成分	三七叶		三七花	
	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD (%)	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD (%)
人参皂苷 Rb_1	4.53	1.5	18.87	1.3
人参皂苷 Rb_2	2.25	1.5	15.74	1.5
人参皂苷 Rb_3	9.69	1.4	48.90	1.8

2.4.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的三七叶约0.3 g、三七花约0.1 g, 每种样品各6份, 分别加入用80% 甲醇配制的混合对照品溶液, 按“2.4.2”项下方法分别制备供试品溶液, 按“2.4.3”项下色谱条件进样分析, 计算各组分平均回收率及 RSD 值, 结果见表5, 表明该方法回收率较好。

表5 加样回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

成分	三七叶		三七花	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
人参皂苷 Rb_1	101.5	1.0	100.6	0.8
人参皂苷 Rb_2	100.9	1.4	98.6	1.1
人参皂苷 Rb_3	99.5	1.1	101.3	1.2

2.4.8 样品测定 采用所建立的方法对收集到的三七叶、三七花样品进行3种皂苷类成分的含量测定, 结果见表6、表7。

表6 三七叶含量测定结果

编号	来源	人参皂苷 Rb_1	人参皂苷 Rb_2	人参皂苷 Rb_3
1	安徽	0.43	0.29	1.22
2	安徽	0.37	0.31	1.39
3	湖南	0.50	0.27	1.12
4	河北	0.52	0.29	1.25
5	河北	0.40	0.32	1.57
6	广西	0.36	0.24	1.25
7	广西	0.38	0.27	0.67
8	云南	0.37	0.42	2.16
9	云南	0.60	0.60	2.55
10	广西	0.43	0.66	3.31
11	广西	0.36	0.54	2.67
12	广西	0.31	0.70	3.41
平均(%)		0.42	0.41	1.88

表7 三七花含量测定结果

编号	来源	人参皂苷 Rb_1	人参皂苷 Rb_2	人参皂苷 Rb_3
1	湖南	2.91	2.22	6.97
2	湖南	2.03	1.69	5.53
3	云南	1.94	1.34	4.60
4	云南	2.48	1.90	6.87
5	湖南	2.12	1.60	5.70
6	湖南	2.23	1.71	5.95
7	河北	2.11	1.54	5.44
8	河北	0.42	2.06	8.21
9	云南	1.47	1.24	4.41
10	湖南	1.11	0.82	2.89
11	云南	1.90	1.56	5.03
平均(%)		1.88	1.61	5.60

3 讨论

三七的薄层鉴别标准中收载较多, 但三七叶、三七花的薄层鉴别相关报道较少, 本文以三七叶与三七花中特征性成分人参皂苷 Rb_3 为对照, 建立了

三七叶、三七花的薄层鉴别方法,该方法简便易行,我们对多个厂家生产的薄层板(青岛海洋化工厂、烟台信德化学有限公司、Merk公司)进行了考察,结果均能很好地分离,表明新建立方法有较好的耐用性。

含量测定比较了40%、60%、80%甲醇、甲醇等不同提取溶剂及不同提取方式(超声和回流)和不同提取时间(0.5、1、1.5、2.0、2.5 h)对提取效果的影响,发现采用80%甲醇回流提取2 h,3种皂苷类成分均可较完全的提取出来,方法简便、易行。对制定方法进行了不同色谱柱、不同仪器以及柱温、流速、流动相比比例微小变化等色谱条件变化的耐用性考察,结果色谱峰均分离较好,测定结果基本一致,表明本方法耐用性较好。

三七叶和三七花的水分、总灰分、酸不溶性灰分和有效成分的含量是影响其质量的主要指标,这些数据将为三七叶和三七花的质量标准制定提供参考。

三七地上部分资源充足,现开发利用较少,因此对三七叶、三七花的质量标准的研究,不仅为三七叶、三七花作为药用资源的质量控制提供技术支持,而且对提高三七的综合开发利用,增加三七的经济价值有重要意义。

参考文献

[1] 杨崇仁.三七的历史与起源[J].现代中药研究与实践,

2015,29(6):83-86.

- [2] 李林子,吕圭源,陈素红,等.三七叶总皂苷对高脂血症大鼠血脂、肝功能及脂质过氧化的影响[J].中国现代应用药学,2014,31(6):662-666.
- [3] 王相如,朱福龙.三七花药理作用及主治功效研究[J].求医问药,2012,10(8):594.
- [4] 马燕斌,于雪,吴小明.三七花治疗亚健康失眠(肝气郁结型)的临床观察[J].中医药信息,2013,30(6):112-113.
- [5] 魏均娟,唐宝书,王菊芳,等.三七叶皂甙成分的研究[J].华西药学杂志,1986,1(1):7.
- [6] 张媛,崔蓉,杜洪建,等.HPLC测定三七花蕾中的皂苷含量研究[J].中国现代应用药学杂志,2009,26(1):68-71.
- [7] 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):1384.
- [8] 卢聪,金剑,王克柱,等.人参皂苷R_{g1}、R_{b1}对睡眠干扰所致SD大鼠认知和运动行为障碍的影响[J].中国现代中药,2016,18(1):82-87.
- [9] 孙光芝,王继彦,刘志,等.人参皂苷R_{b2}的药理学研究概况[J].吉林农业大学学报,2005,27(3):299-305.
- [10] 李爱红,柯开富,吴小梅,等.人参皂甙R_{b1}、R_{b3}、R_{g1}对培养皮层神经细胞的抗缺血效应及其机制[J].中风与神经疾病杂志,2004,21(3):231-233.
- [11] 王凤,周亚滨.人参皂苷R_{b3}的药理研究进展[J].中医药学报,2012,40(1):93-94.
- [12] 王隶书,程东岩,程东红.HPLC法测定不同产地的三七叶中人参皂苷R_{b3}的含量[J].中国药师,2003,6(5):284-285.

(收稿日期 2018-03-22)