

三七不同部位止血活血成分三七皂苷 Fc 的 HPLC 测定

吴韶^{1,2}, 张瑜², 杨春红¹, 郭正红¹, 李巍^{1,3*}, 赵余庆^{1,3*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 辽宁新中现代医药有限公司, 辽宁 沈阳 110041

3. 沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 测定文山产三七 *Panax notoginseng* 茎、叶、花、果实、果梗和根中三七皂苷 Fc 的量, 为三七皂苷 Fc 原料的制备和条件选择提供依据。**方法** 色谱柱为 Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (65:35); 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm; 进样体积 10 μL。采用 HPLC-UV 法测定三七不同部位提取物 (以乙醇为溶剂, 采用超声法提取) 中三七皂苷 Fc 的量。**结果** 三七皂苷 Fc 在 0.005~1.000 mg/mL 线性关系良好, 在三七茎、叶、花、果实、果梗和根中三七皂苷 Fc 的质量分数分别为 0.07%、1.58%、2.13%、0.39%、0.72% 和 0.02%, 其回收率分别为 98.86%、97.43%、101.03%、99.35%、99.13% 和 98.68%, RSD 分别为 1.90%、1.87%、1.80%、1.82%、1.94%、1.88%。在此条件下, 三七芦头中未检测出三七皂苷 Fc。**结论** 三七皂苷 Fc 存在于文山产三七不同部位中, 其中三七叶和花中三七皂苷 Fc 的量较高, 分别为 1.58% 和 2.13%。该研究结果可为三七叶和花的综合利用和 Fc 的制备应用提供参考。

关键词: 三七; 茎; 叶; 花; 果实; 果梗; 根; 三七皂苷 Fc; HPLC

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)18-3289-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.025

HPLC determination of notoginsenoside Fc, a hemostatic and activating blood component, in different parts of *Panax notoginseng*

WU Shao^{1,2}, ZHANG Yu², YANG Chun-hong¹, GUO Zheng-hong¹, LI Wei^{1,3}, ZHAO Yu-qing^{1,3}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Liao Ning Xin Zhong Modern Pharmaceutical Company, Shenyang 110041, China

3. Key Laboratory of Structure-based Drug Design and Discovery of Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To determine the contents of notoginsenoside Fc in the stems, leaves, flowers, fruits, fruit stalks, and roots of *Panax notoginseng* in Wenshan, and provide the scientific basis for the selection of raw materials and preparation. **Methods** Using chromatographic column Agilent C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase was CH₃OH-H₂O (65:35); Column temperature was 35 °C; Flow rate was 1.0 mL/min; UV detection wavelength was 203 nm; injection volume was 10 μL. Using methanol as the solvent and ultrasonic extraction to extract the medicinal materials, then using the HPLC-UV method to determine the contents of notoginsenoside Fc in different parts of *P. notoginseng*. **Results** Fc had a good linear relationship when the concentration was 0.005–1.000 mg/mL. The Fc contents in the cauline, leaves, flowers, fruits, fruit stalks, and roots of *P. notoginseng* were 0.066%, 1.58%, 2.13%, 0.39%, 0.72%, and 0.019%. The recovery rates were 98.86% (RSD = 1.90%), 97.43% (RSD = 1.87%), 101.03% (RSD = 1.80%), 99.35% (RSD = 1.82%), 99.13% (RSD = 1.94%), and 98.68% (RSD = 1.88%). Under this condition, Fc was not detected in the basal part of stems of *P. notoginseng*. **Conclusion** Fc exists in different parts of *P. notoginseng* in Wenshan, and the contents of notoginsenoside Fc in the flowers and leaves of *P. notoginseng* were higher, 1.58% and 2.13%, respectively. The results can provide a scientific reference for the comprehensive utilization of the leaves and flowers of *P. notoginseng* and the preparation and application of Fc.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; stems; leaves; flowers; fruits; fruit stalks; roots; notoginsenoside Fc; HPLC

收稿日期: 2016-02-23

基金项目: 中药标准提取物的工业化色谱制备平台建设 (2009ZX09301-012-105B); 天然活性成分的工业化色谱制备公共服务平台 (2011412004-7); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划 (LJQ2015108)

作者简介: 吴韶 (1992—), 男, 在读硕士研究生。Tel: 18842364865 E-mail: 729472403@qq.com

*通信作者 赵余庆 (1957—), 男, 教授, 博士生导师。E-mail: zyq4885@126.com

李巍 (1981—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事天然药化、药食同源品的活性成分研究。E-mail: wei_li1981@163.com

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科 (Araliaceae) 人参属 *Panax* L. 重要的药用植物, 载于《中国药典》2015 年版^[1]。研究表明, 三七皂苷具有降低血压^[2]、抗血栓^[3]、抗心肌缺血^[4]、抗脑缺血^[5]、抗动脉粥样硬化^[6]、抗炎^[7]、治疗心律失常^[8]、镇痛^[9]、保肝^[10]、止血活血、补血^[11]等药理作用。

三七含有多种化学成分, 主要含有皂苷、黄酮、挥发油、氨基酸、蛋白质、多糖、三七素等, 此外, 还含有钾、氮、磷、钴等多种无机金属元素^[12]。皂苷类化合物是三七的主要化学成分, 也是三七公认的主要有效成分之一。皂苷主要包括原人参二醇皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、K、L、R₇、F₂, 丝竹皂苷 IX、X、VII, 三七皂苷 Fa、Fc、Fe、F1~F4, 原人参三醇皂苷 Rf、Rg₁、Rg₂、Rh₁、R₁、R₂、R₃、R₄、R₆, 新三七皂苷-B₁^[12-13]。三七皂苷 Fc 是三七特有皂苷, 在三七的多个部位存在。Yang 等^[14]从三七叶和果中分离得到三七皂苷 Fc; 魏均娴等^[15]从三七果梗入手, 分离得到了 11 种皂苷, 其中包括三七皂苷 Fc; 与三七花皂苷相关的报道显示, 三七花^[16]中已得到三七皂苷 Fc。目前据文献报道, 三七皂苷 Fc 具有明显的抑制血小板凝聚、改善心肌缺血、心肌保护等作用, 可用于防治心肌缺血、心肌梗死等各种血栓性疾病^[17-18]。王峥涛^[19]首次阐明三七皂苷是通过作用于血小板受体 P2Y₁₂ 而调控血小板聚集而发挥止血活血作用, 对三七皂苷 Fc、Ft₁、Fe、R₁ 和人参皂苷 Rg₁、Rg₂、Rg₃、Rd、Re、Rh₂ 及原人参萜二醇进行了血小板聚集功能筛选, 发现三七皂苷 Fc 抑制活性最强。研究表明^[17-23], 三七皂苷 Fc 通过脱糖代谢产生的次级苷发挥活血作用, 三七皂苷 Fc 口服给药可以显著降低模型动物心肌梗死面积和对心肌缺血有明显的改善作用。

为了寻找三七皂苷 Fc 所在的廉价资源, 研制开发防治心肌缺血、心肌梗塞等血栓性疾病的创新药物, 本实验采用 HPLC 方法, 对文山产三七不同部位中三七皂苷 Fc 的量进行了测定, 为三七皂苷 Fc 制备的原料选择和综合开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

L-2200 高效液相色谱仪, 日本 Hitachi 集团; XWK-34 空气压缩机, 天津华生分析仪器有限公司; BS124S 型分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 数控超声波清洗器 KQ3200DB, 昆山市超声

仪器有限公司。乙醇 (分析纯), 天津市永大化学试剂有限公司; 甲醇 (色谱纯), 天津市康科德科技有限公司; 二次蒸馏水, 实验室自制。

1.2 药材

样品 (批号 PN20160320) 购自文山南药三七产业有限公司, 经沈阳药科大学赵余庆教授鉴定为三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的茎、叶、花、果实、果梗和根; 三七皂苷 Fc 对照品 (实验室自制, 质量分数大于 99%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Promosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (65:35); 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm; 进样体积 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定 1.0 mg 对照品三七皂苷 Fc, 置于 1.0 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含 1 mg/mL 的三七皂苷 Fc 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

先将三七茎、叶、花、果实、果梗和根粉碎, 精密称定各 2.00 g, 分别置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 70%乙醇 20 mL 热回流提取 3 次, 每次 30 min, 合并提取液, 减压回收乙醇并浓缩至一定浓度 (生药 0.4 g/mL), 离心, 上清液作为上柱供试液。

将上柱供试液直接转入 HPD100 吸附树脂柱 (内径 15 mm, 长 170 mm) 内, 先以水 50 mL 洗脱, 弃去水液, 继用 70%乙醇 50 mL 洗脱 (体积流量 2 mL/min)^[24], 收集洗脱液, 水浴蒸干, 残渣用甲醇定容至 4 mL。精密吸取 1 mL, 置于 10.0 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备

精密吸取“2.2”项中对照品溶液 0.5 mL 于 1 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液, 同法制备质量浓度为 0.1、0.01、0.005 mg/mL 的标准系列溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定质量浓度为 1、0.5、0.1、0.01、0.005 mg/mL 的系列对照品溶液, 记录色谱图。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归计算, 线性回归方程 $Y=2 \times 10^6 X+20871$, $R^2=0.9991$, 结果表明三七皂苷 Fc 在质量浓度为 0.005~1.000 mg/mL 内线性关系良好。

2.5 精密度试验

分别取同一对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,记录峰面积,计算得 RSD 为 1.87%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,室温下放置,分别在 0、2、4、6、8、24 h 后进样分析,按“2.1”项色谱条件进行测定,记录峰面积,得三七茎、叶、花、果实、果梗和根中 Fc 的峰面积 RSD 值分别为 1.96%、1.94%、1.85%、1.92%、1.98%和 1.88%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批三七茎、叶、花、果实、果梗和根各 6 份,按“2.3”项下操作,分别平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样分析,峰面积的 RSD 值分别为 1.94%、1.83%、1.96%、1.86%、

1.91%和 1.82%,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已测定的同一批供试品溶液各 9 份,精密称定,每 3 份为一组。分别单独加入适量的对照品溶液,每次进样 10 μ L 进行测定。计算得三七茎、叶、花、果实、果梗和根中三七皂苷 Fc 的平均回收率分别为 98.86%、97.43%、101.03%、99.35%、99.13%和 98.68%、RSD 值分别为 1.90%、1.87%、1.80%、1.82%、1.94%和 1.88%。

2.9 样品测定

取样品按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件测定,色谱图见图 1。采用外标一点法计算,测定样品中三七皂苷 Fc 的量,在文山产三七茎、叶、花、果实、果梗和根中三七皂苷 Fc 的质量分数分别为 0.07%、1.58%、2.13%、0.39%、0.72%和 0.02%。

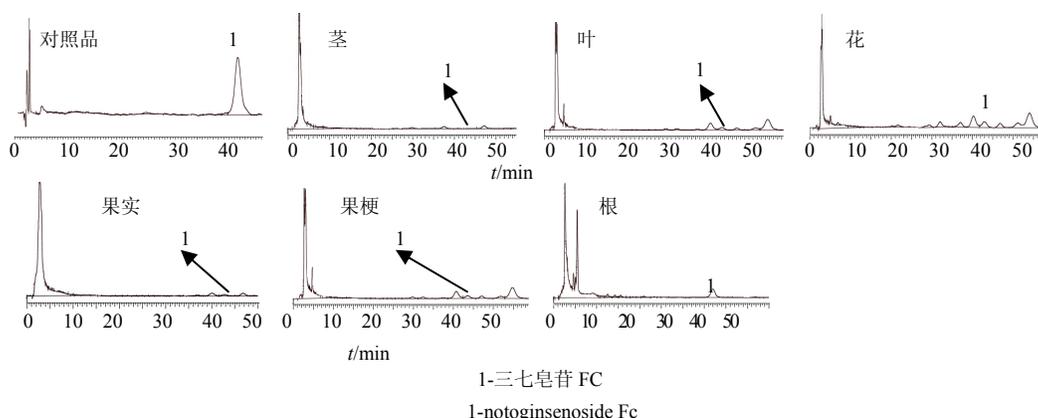


图 1 三七不同部位的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of different parts of *P. notoginseng*

3 讨论

随着三七研究的进展,三七皂苷 Fc 良好的抑制血小板凝聚、改善心肌缺血、保护心肌、防治心肌梗死等作用开始得到了研究和关注,因此,对三七皂苷 Fc 的进一步研究与开发需要大量的样品和制备原料。王峥涛^[19]研究发现三七皂苷 Fc 通过脱糖代谢产生的次级苷发挥活性作用,但目前体内代谢研究还不明确,需进一步对三七皂苷 Fc 的时-效、构-效、组-效关系及其体内代谢测相关性进行研究,这也需要大量的三七皂苷 Fc 样品。目前,三七皂苷 Fc 相关的文献中,未见对三七茎、叶、花、果实、果梗和根中三七皂苷 Fc 量的对比分析。因此,在三七不同的部位中检测三七皂苷 Fc 的量,为三七皂苷 Fc 制备分离条件的优选提供了依据。

云南文山是三七的主产区,也是三七的道地产区。文山产三七具有皂苷量高、多糖量高、低农药残留量等优越品质,被广泛使用,故本实验采用文山产三七作为实验药材。

本研究表明,三七皂苷 Fc 在文山产三七叶和花中量较高,其中三七叶和花资源较为丰富,三七叶价格低廉,可作为获取三七皂苷 Fc 的有效资源进行综合开发和利用。本实验采用的超声提取法提取三七皂苷 Fc 与水提煎煮法的提取率无显著性差异,同时缩短了提取时间,这为三七皂苷 Fc 的分析检测提供了快速简便的处理方法。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[2] 曹敏,楼丹飞,梁逸强,等. 三七花总皂苷对自发性

- 高血压大鼠的降压作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(2): 367-369.
- [3] 曾碧映, 李新才, 曾 嵘, 等. 血三七水煎剂抗血栓作用及其机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 256-259.
- [4] 余丽梅, 邓永坤, 吴秀芝, 等. 三七总皂苷抗心肌缺血的研究概述 [J]. 中国药师, 2011, 14(11): 1685-1687.
- [5] 唐映红, 黄小平, 邓常清, 等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注后神经元凋亡及凋亡线粒体途径和 c-Jun 氨基末端激酶表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 129-132.
- [6] 郑 楚, 杨冬业, 韦桂宁, 等. 三七花总皂苷对动脉粥样硬化模型大鼠血脂及血液流变学影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 162-164.
- [7] 袁惠南, 刘茂坤, 赵雅灵, 等. 三七花总皂苷的抗炎作用 [J]. 特产研究, 1987(2): 3-8.
- [8] 汉 雄, 张宝恒, 谢世荣, 等. 三七二醇苷抗实验性心律失常的作用 [J]. 中草药, 1991, 22(5): 212-214.
- [9] 袁惠南, 彭 茜, 赵雅灵, 等. 三七花总皂苷的镇静作用 [J]. 特产科学实验, 1984(4): 27.
- [10] 王彦武, 赵 鹏, 李 彬, 等. 三七花含片对酒精性肝损伤保护作用的实验研究 [J]. 广西医科大学学报, 2005, 22(1): 62-63.
- [11] 周 莉. 三七花中总皂苷对大鼠血液流变学的影响 [J]. 中国药师, 2007, 20(12): 55-57.
- [12] 夏鹏国, 张顺仓, 梁宗锁, 等. 三七化学成分的研究历程和概况 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2564-2570.
- [13] 时圣明, 李 巍, 曹家庆, 等. 三七果化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1249-1251.
- [14] Yang T R, Kasai R, Zhou J, *et al.* Dammarane Saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(6): 1473-1478.
- [15] 魏均娴, 曹树明. 三七果梗皂苷成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1992, 17(2): 96.
- [16] 张崇喜. 人参、西洋参和三七化学成分的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2004.
- [17] He C Y, Li J, Wang Z T, *et al.* Pharmacokinetics, bioavailability, and metabolism of Notoginsenoside Fc in rats by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 109: 150-157.
- [18] Gao B, Huang L, Wang Z. Platelet P2Y₁₂ receptor involved in the hemostatic effect of notoginsenoside Ft₁, a saponin isolated from *Panax notoginseng* [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(1): 214-223.
- [19] 王峥涛. 三七皂苷 Fc 的医药用途: 中国专利, 2013104650767 [P]. 2014-01-29.
- [20] Wang T, Yu X F, Sui D Y, *et al.* Effect of ginsenoside Rb₃ on myocardial injury and heart function impairment induced by isoproterenol in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 636(1): 121-125.
- [21] Wang T, Yu X F, Sui D Y, *et al.* Ginsenoside Rb₃ inhibits angiotensin II-Induced vascular smooth muscle cells proliferation [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107(2): 685-689.
- [22] Guan Y Y, Zhou J G, He H, *et al.* Ginsenoside-Rd from panax notoginseng blocks Ca²⁺ influx through receptor-and store-operated Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharm*, 2006, 548(1): 129-136.
- [23] 张 琛, 赵 钢. 人参皂苷 Rd 的药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 953-958.
- [24] 张力彬, 韦建荣, 邬梅仙. 田七花精中人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₃ 及三七皂苷 Fc 的含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(5): 310-312.