

三七皂苷 K 对照品的制备研究

龚云麒, 王 珺, 高宏涛, 杨兆祥*

昆明制药集团股份有限公司, 云南 昆明 650100

摘要: **目的** 研究三七皂苷 K 对照品的制备。**方法** 利用大孔吸附树脂从三七剪口提取液中分离得三七总皂苷, 再用反相柱色谱法分离得到三七皂苷 K, 并根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构, 同时运用薄层色谱 (TLC)、高效液相色谱 (HPLC) 法检查及测定质量分数。**结果** 三七皂苷 K 单体经 TLC 检查无杂质斑点, 二维及三维 HPLC 测定三七皂苷 K 的质量分数大于 99%, 峰质量分数因数为 998.40。结果表明上述制得的纯品为单一化合物。**结论** 制备的三七皂苷 K 达到中药质量标准用化学对照品的技术要求。

关键词: 三七皂苷 K; 三七剪口; 对照品

中图分类号: R284.2; 286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)08-0869-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.08.009

Preparation of notoginsenoside K reference substance

GONG Yun-qi, WANG Jun, GAO Hong-tao, YANG Zhao-xiang

Kunming Pharmaceutical Group Limited Corporation, Kunming 650100, China

Abstract: **Objective** To study the preparation of notoginsenoside K reference substance. **Methods** The total saponins in the roots and rhizomes of *Panax pseudoginseng* were isolated from the roots and rhizomes of *P. pseudoginseng* by macroporous adsorption resin, then notoginsenoside K was isolated by reverse phase column chromatography. Their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectroscopic data. TLC and HPLC were employed for inspecting its purity and content. **Results** The TLC experiments showed the notoginsenoside K had no impurity spot. 2D and 3D HPLC showed a single peak with a purity factor of 998.4 and the content of notoginsenoside K was above 99%. **Conclusion** The prepared notoginsenoside K complies with the technical requirements of quality standard in Chinese materia medica with chemical reference substance.

Key words: notoginsenoside K; rhizome of *Panax pseudoginseng*; reference substance

三七为五加科植物三七 *Panax pseudoginseng* Wall. var. *notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng 的干燥根及根茎。目前以三七为原药材的制剂有口服剂和注射剂, 其中注射剂主要有血塞通和血栓通两种。三七总皂苷注射剂广泛用于卒中偏瘫、瘀血阻络、脑血管疾病后遗症和视网膜中央静脉阻塞等疾病的治疗^[1]。近年有文献报道三七中含有二醇型皂苷三七皂苷 K (notoginsenoside K), 其结构见图 1。其具有显著的溶血活性, 能够增强被卵白蛋白免疫的小鼠体内有丝分裂原诱导和卵白蛋白诱导的脾细胞扩增^[2]。但与其化学提取分离相关的文献信息报道较少, 为了探索三七皂苷 K 提取分离的相关参数,

对其对照品的制备进行了研究, 以期三七皂苷 K 的研究提供样品, 为完善三七药材及其制剂质量控制研究提供对照品。

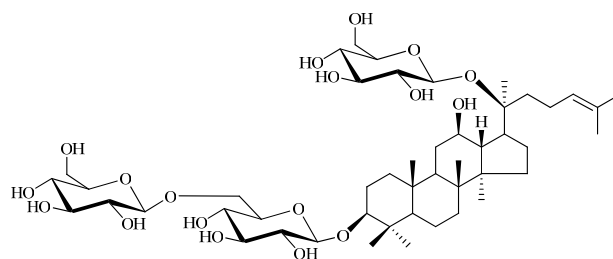


图 1 三七皂苷 K 的结构

Fig. 1 Structure of notoginsenoside K

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 云南省科技厅重大科技专项 (2012ZA002)

作者简介: 龚云麒 (1981—), 男, 工程师, 从事植物有效成分提取研究。E-mail: gongyun911@163.com

*通信作者 杨兆祥, 男, 高级工程师, 硕士生导师, 主要从事新药开发研究。Tel: (0871)68183902 E-mail: yangzxky@163.com

1 仪器与材料

1.1 仪器

WZZ—1 型自动指示旋光仪(上海物理光学仪器厂); R—215 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司); YRT—3 型药物熔点仪(天津大学精密仪器厂); VG Auto Spec-3000 型质谱仪; Bruker AV 400 MHz、DRX 500 MHz 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); Shimadzu UV—2450 紫外分光光度计、FTIR—8400S 傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司); Agilent 1200 液相色谱仪。

1.2 材料

AB-8 吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司); 硅胶、硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂); 反相硅胶 Rp-18、Rp-18 薄层板(Merck 公司); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(GE 公司); 活性炭、氯仿、甲醇等试剂为普通化学纯或分析纯, HPLC 分析用试剂均为色谱纯; 三七剪口由昆明制药集团股份有限公司三七 GAP 种植基地提供。

2 提取分离

三七剪口 2 kg 粉碎成粗粉, 用水煮提 2 次, 每次加 8 倍量水, 煮提 2 h。合并提取液浓缩至 10 L, 放置过夜后离心分离提取液备用。取 AB-8 吸附树脂 5 kg 装柱, 先用 95%乙醇预洗至流出液检查无残留, 再用纯化水洗净柱子备用。取上述提取液加到处理好的树脂柱上使皂苷吸附完全, 树脂以纯化水洗脱至流出液近无色, 再用 70%乙醇洗脱皂苷, 减压回收溶剂得粗皂苷约 260 g。粗皂苷溶于 3 L 甲醇中, 加入粉末活性炭 30 g, 回流 1 h, 脱色, 趁热滤过, 回收溶剂后得三七总皂苷约 170 g。

取三七总皂苷 50 g 溶于甲醇-水(50:50)中, 以 Rp-18 柱色谱分离, 用甲醇-水溶剂(60:40~95:5)梯度洗脱。各流份经薄层色谱(TLC)检查合并, 得到以三七皂苷 K 为主的部位, 回收溶剂得到三七皂苷 K 粗品 1.5 g。粗品再以 Rp-18 中压制备色谱分离, 以甲醇-水溶剂(70:30~95:5)梯度洗脱, 根据吸收峰收集三七皂苷 K 流份, 经 Rp-18 薄层色谱检查, 得到三七皂苷 K 约 0.6 g, 再用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 色谱纯化, 以甲醇洗脱, 流份经 HPLC 检测, 收集质量分数大于 98%的部分, 即得三七皂苷 K 对照品 0.2 g。

3 结构鉴定

三七皂苷 K: mp 207~209 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -19.40 (c 1.00, CH₃OH); FAB-MS m/z : 945 [M-H]⁻, 799

[M-H-146]⁻, 637 [M-H-146-162]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 3.20 (1H, m, H-3), 3.77 (1H, m, H-12), 1.06、0.84、1.68、1.36、1.62、1.28、0.91、0.99 (3H×8, s, H-18、19、21、26、27、28、29、30), 5.11 (1H, t, J =6.9 Hz, H-24), 4.30 (1H, d, J =7.77 Hz, H-1'), 4.34 (1H, d, J =7.74 Hz, H-1''), 4.57 (1H, d, J =7.82 Hz, H-1'''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 40.12 (C-1), 27.23 (C-2), 90.65 (C-3), 40.34 (C-4), 57.55 (C-5), 19.25 (C-6), 35.85 (C-7), 40.96 (C-8), 52.39 (C-9), 37.92 (C-10), 31.49 (C-11), 71.44 (C-12), 49.68 (C-13), 51.1 (C-14), 30.78 (C-15), 27.18 (C-16), 52.89 (C-17), 16.32 (C-18), 16.74 (C-19), 84.95 (C-20), 22.47 (C-21), 36.78 (C-22), 23.88 (C-23), 126.02 (C-24), 132.24 (C-25), 25.98 (C-26), 18.05 (C-27), 16.83 (C-28), 28.44 (C-29), 17.38 (C-30), 106.73 (C-1'), 75.12 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.69 (C-4'), 76.79 (C-5'), 70.20 (C-6'), 104.99 (C-1''), 75.27 (C-2''), 77.92 (C-3''), 71.62 (C-4''), 77.92 (C-5''), 62.78 (C-6''), 98.08 (C-1'''), 75.63 (C-2'''), 77.67 (C-3'''), 71.62 (C-4'''), 77.91 (C-5''') 62.78 (C-6''')。以上数据与文献报道^[3-4]基本一致, 确定该化合物为三七皂苷 K。

4 纯度考察和测定

4.1 TLC

取制得的三七皂苷 K 溶于甲醇制成 1 mg/mL 溶液, 定量吸取点于硅胶 G 薄层板上, 考察显色情况。硅胶 G 薄层板分别以三氯甲烷-甲醇-水(7:3:0.4)、正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5)两种溶剂系统展开, 晾干后喷 10% H₂SO₄-EtOH 显色, 于 105 °C 加热至斑点清晰。结果表明本品以两种溶剂系统展开均为单一斑点, 点样量至 24 μg 也未见其他杂质斑点, 见图 2。

4.2 HPLC

4.2.1 色谱条件 安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(20:80); 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长 203 nm。理论塔板数以三七皂苷 K 峰计算, 不低于 8 000。

4.2.2 三七皂苷 K 的测定 取三七皂苷 K 对照品适量, 用流动相溶解制成质量浓度约为 1 mg/mL 对照品溶液, 使用时按需要用流动相稀释, 注入液相色谱仪测定。

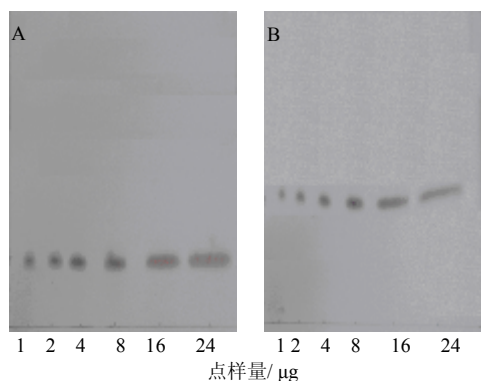


图 2 在三氯甲烷-甲醇-水(A)和正丁醇-冰醋酸-水(B)展开系统下三七皂苷 K 的 TLC 图

Fig. 2 TLC chromatogram of notoginsenoside K in chloroform - methanol - water (A) and *n*-butyl alcohol - glacial acetic acid - water (B) system

二维谱中,三七皂苷 K 峰的保留时间约为 22.6 min,信号采集至 30 min 均无杂质峰出现,按峰面积归一化法计算得三七皂苷 K 质量分数均大于 99%,见图 3。

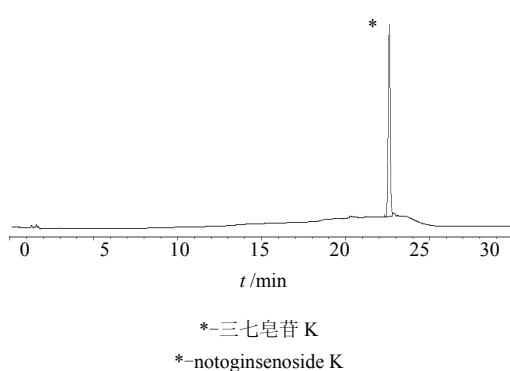


图 3 三七皂苷 K 的二维 HPLC 色谱图

Fig. 3 Two dimensional HPLC chromatogram of notoginsenoside K

三维谱中,二极管阵列检测器 200~400 nm 波长扫描,三七皂苷 K 峰的保留时间约为 22.6 min,信号采集至 30 min 均无杂质峰出现,三七皂苷 K 峰质量分数因数为 998.40,见图 4。

TLC、HPLC 方法检查、测定的结果表明上述

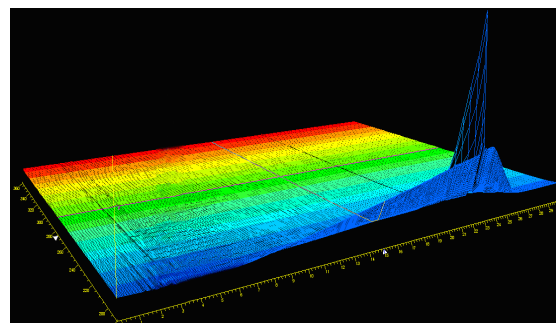


图 4 三七皂苷 K 的三维 HPLC 色谱图

Fig. 4 Three dimensional HPLC chromatogram of notoginsenoside K

制得的三七皂苷 K 纯品为单一化合物,质量分数大于 98%,达到中药质量标准用化学对照品的技术要求,可供单体活性研究使用。

5 讨论

本实验利用反相色谱技术,成功建立了从三七剪口中提取分离三七皂苷 K 单体的方法,产品质量分数符合要求。三七皂苷 K 与人参皂苷 Rd、三七皂苷 R₁ 在薄层色谱中 R_f 值相似,难以分离,反相色谱较正相色谱更易实现其分离,并且所用试剂相对较安全环保。

该方法的建立为三七皂苷 K 单体制备提供了一种便捷方法,为三七皂苷 K 的研究提供了样品,也为三七药材及其制剂质量研究提供了工作对照品。

参考文献

- [1] 徐 鹏, 张国柱. 三七总皂苷注射剂不良反应的回顾性分析 [J]. 医药导报, 2013, 32(1): 127-129.
- [2] Sun H X, Qin F, Ye Y P. Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Vaccine*, 2005, (23): 5533-5542.
- [3] Ma W G, Masanori M, Malterud K E, et al. Saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 1133-1139.
- [4] 钟世舟, 关山越. TOCSY1D 技术在三七人参皂苷-Rd 结构解析中的应用 [J]. 现代仪器, 2004(4): 18-21.