

HPLC-ELSD 法测定三七叶中人参皂苷 Rb₃、R_c、R_{b1} 的含量朱洁^{1,2}, 杨蓉², 张洪彬^{1,2*}

(1. 云南大学药学院, 云南 昆明 650091; 2. 云大科技股份有限公司, 云南 昆明 650118)

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 的干燥根。在三七叶中以人参皂苷 Rb₃、R_c 和 R_{b1} 含量最高, 是三七叶总皂苷中的主要活性成分。从三七茎叶中提取三七叶总皂苷主要含有 20 (S)-原人参二醇型皂苷。具有镇静安神、清热消肿、活血止血之功效, 能治疗神经衰弱、神经衰弱综合症、风湿性关节炎等疾病^[1]。目前, 其质量控制标准采用的是碘量法^[2], 为完善其质量标准, 本实验对三七叶总皂苷的定量分析方法进行了研究, 以人参皂苷 Rb₁、Rb₃ 和 R_c 作为质量指标, 采用 HPLC-ELSD 法进行检测, 并与 HPLC-UV 法进行了比较。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪: 具有可变波长紫外检测器和色谱工作站; 英国 PL—EL S 1000 型蒸发光散射检测器; 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为二次重蒸水; 人参皂苷 Rb₁、Rb₃ 和 R_c 对照品由云南省天然药物研究中心提供 (纯度分别为: 98.36%, 95.36%, 96.56%, 归一化法测定); 三七叶总皂苷 (批号: 20010901, 20010902, 20010904) 为云南文山特安呐制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备: 精密称取人参皂苷 Rb₁ 3.5 mg, 人参皂苷 Rb₃ 7.5 mg 和人参皂苷 R_c 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。避光保存, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备: 精密称取三七叶总皂苷 0.05 g (精确到 0.000 2 g), 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声处理 10 min, 冷却至室温, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 HPLC-UV 与 HPLC-ELSD 的比较试验

2.2.1 HPLC-UV 的色谱条件: 色谱柱: Agilent Extend-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 采用梯度洗脱: 0 min 25% A, 8

min 35% A, 15 min 40% A; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 22℃; 检测波长为 205 nm。人参皂苷 Rb₃、R_c、R_{b1} 对照品以及三七叶总皂苷样品的 HPLC-UV 的色谱图见图 1。

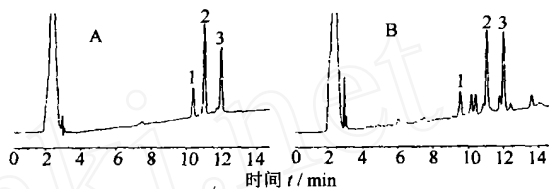
1-人参皂苷 Rb₁ 2-人参皂苷 R_c 3-人参皂苷 Rb₃1-ginsenoside Rb₁ 2-ginsenoside R_c 3-ginsenoside Rb₃

图1 混合对照品(A)和三七叶总皂苷(B)的 HPLC-UV 图

Fig. 1 HPLC-UV chromatograms of mixed reference substances (A) and notoginseng leaf triterpens (B)

2.2.2 HPLC-ELSD 的色谱条件: 色谱柱: Agilent Extend-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 采用梯度洗脱: 0 min 25% A, 8 min 35% A, 15 min 40% A; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 22℃。

ELSD 参数: 氮气流速为 1.5 mL/min, 气化温度为 80℃, 蒸发温度为 90℃。人参皂苷 Rb₃、R_c、R_{b1} 对照品以及三七叶总皂苷样品的 HPLC-ELSD 的色谱图见图 2。

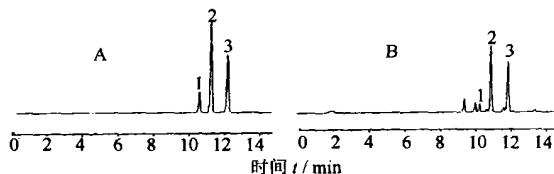
1-人参皂苷 Rb₁ 2-人参皂苷 R_c 3-人参皂苷 Rb₃1-ginsenoside Rb₁ 2-ginsenoside R_c 3-ginsenoside Rb₃

图2 混合对照品(A)和三七叶总皂苷(B)的 HPLC-ELSD 图

Fig. 2 HPLC-ELSD chromatograms of mixed reference substance (A) and notoginseng leaf triterpens (B)

通过比较实验可以看出: HPLC-UV 受噪音和梯度洗脱的影响, 造成基线漂移严重, 重现性差, 定量不准确。而 HPLC-ELSD 灵敏度高, 重现性好, 并

* 收稿日期: 2004-03-21

作者简介: 朱洁 (1973—), 女, 分析化学硕士, 主要研究方向为药物分析。Tel: (0871) 5035699-8814 E-mail: zhuji@eunida.com

不受梯度洗脱的影响,较 HPLC-UV 优越。

2.3 标准曲线和线性范围:精密吸取上述对照品溶液 5、10、15、20、25、30 μL ,在上述 HPLC-ELSD 色谱条件下进样,以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标作标准曲线,回归方程和线性范围见表 1。

表 1 各组份的回归方程和线性范围

Table 1 Standard curves equation and relevant data of ginsenosides Rb₁, Rc, and Rb₃

人参皂苷	回归方程	r	线性范围/ μg
Rb ₁	$Y = 217.38X + 34.789$	0.998 8	1.75~10.50
Rc	$Y = 87.116X + 25.201$	0.999 1	5.0~30.0
Rb ₃	$Y = 134.83X + 21.033$	0.999 7	3.75~22.50

2.4 精密度试验:取上述对照品溶液重复进样 6 次,测得人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rb₃ 峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.23%、0.16%。

2.5 稳定性试验:取上述对照品溶液,每隔 30 min 进样,连续 4 h,结果 4 h 内人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rb₃ 的峰面积积分值基本稳定,峰面积的 RSD 分别为 1.5%、1.9%、0.8%。

2.6 重现性试验:取三七叶总皂苷样品(批号:20010901)共 5 份,制备供试品溶液,测得人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rb₃ 的质量分数的 RSD 分别为 1.9%、2.8%、2.2%。

2.7 加样回收率试验:取已知含量的三七叶总皂苷样品 0.050 g,分别加入人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rb₃ 对照品溶液 1 mL,一式 5 份,按 2.1.2 项下处理并测定,结果测得平均回收率分别为 99.21%、97.32%、98.25%,RSD 分别为 2.1%、1.9%、2.9%。

2.8 样品测定:按上述方法对不同批号的三七叶苷进行了含量测定,结果见表 2。

3 讨论

表 2 样品含量的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Results of samples' determination ($n=3$)

批号	人参皂苷/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			
	Rb ₁	Rc	Rb ₃	总量
20010901	25.8	128.6	127.8	282.2
20010902	31.6	130.7	140.3	302.6
20010904	27.7	129.1	129.9	286.7

3.1 在三七叶总皂苷中人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rb₃ 为三萜皂苷成分,仅在 200 nm 左右有末端吸收,因此采用 HPLC-UV 进行测定时,噪音对结果影响较大,灵敏度也较低。蒸发光散射检测器为质量型通用检测器,其响应值取决于被分析物质颗粒的数量和大小,能用于检测那些不含发色团的化合物,即响应不依赖样品的光学特性,任何挥发性低于流动相的样品都能被检测。

3.2 提取溶剂的选择:取三七叶总皂苷适量,分别用甲醇、75%乙醇、水饱和正丁醇溶液 3 种提取溶剂提取,按前述方法进行测定,结果表明,3 种提取溶剂提取后测得的人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rb₃ 的含量几无差别,说明 3 种提取溶剂都可以选用。由于甲醇提取后制备的供试品溶液杂质含量少,干扰小,处理方便,所以选择甲醇作为提取溶剂。

3.3 超声时间比较试验:取三七叶总皂苷适量,按前供试品溶液制备方法制备,曾比较超声时间:10、20、30、40、50 min,发现 10 min 即将三七叶总皂苷中的有效成分提取完全。

References

- [1] Chen D C. *The Manual of Chemical Reference Substance on Chinese Medicine*. (中药化学对照品工作手册) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2000.
- [2] *Drug Standard in Yunnan Province* (云南省药品标准) [S]. Q/W S 784-1985, 1985

HPLC-ELSD 法测定银杏叶提取物中内酯的含量

单鸣秋, 张 丽, 曹雨诞*

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶,味苦涩、性平,有毒,归肺经,是传统的止咳平喘药。明代李时珍《本草纲目》即有记载。银杏叶主要含有银杏黄酮及内酯等成分,具有收敛定喘、止

带缩尿之功效,主治哮喘咳嗽、带下白浊、小便频数、遗尿等,用于肺虚咳喘以及高血压、冠心病心绞痛、脑血管痉挛等的治疗。银杏叶提取物常用的质量控制指标是黄酮和银杏内酯^[1,2]。因银杏内酯紫外吸收

* 收稿日期: 2004-02-26

作者简介: 单鸣秋(1978—),男,江苏南京人,中药硕士,从事分析化学教学及药品质量研究。