

郑 义,陈晓兰,丁 宁,等. HPLC - ELSD 法测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的含量[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):297-298.

HPLC - ELSD 法测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的含量

郑 义,陈晓兰,丁 宁,朱善元

(江苏畜牧兽医职业技术学院,江苏泰州 225300)

摘要: 采用高效液相 - 蒸发光散射检测器法 (HPLC - ELSD) 测定免疫佐剂——三七总皂苷中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_{g_1} 的含量,色谱柱 Discovery C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 采用梯度洗脱,流动相为水 - 乙腈,流速为 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C。结果显示,三七皂苷 R_1 含量 5.19%, 人参皂苷 R_{b_1} 含量 32.19%, 人参皂苷 R_{g_1} 含量 41.28%, 3 种皂苷含量之和为 78.66%。说明该方法简便、快速、重现性好,可用于控制三七总皂苷的质量。

关键词: PLC - ELSD;三七总皂苷;三七皂苷;人参皂苷;人参皂苷

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 - 1302(2013)05 - 0297 - 02

三七总皂苷 (panax notoginseng saponins, PNS) 是中药三七的主要成分,具有扩张血管、降低心肌耗氧量和抑制血小板凝集等药理作用,目前主要用于治疗心脑血管系统疾病^[1]。其中,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b_1} 和人参皂苷 R_{g_1} 是三七总皂苷的主要活性成分。已有文献报道^[2-3],以三七总皂苷为主要有效成分制备的免疫佐剂可以显著增强抗原的免疫原性,对机体的免疫功能有广泛的调节作用,能诱导 Th_1 、 Th_2 免疫应答。本研究采用高效液相 - 蒸发光散射检测器法 (HPLC - ELSD) 测定了三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_{g_1} 含量,为控制免疫佐剂的质量奠定了基础。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器

人参皂苷 R_{g_1} (对照品)、人参皂苷 R_{b_1} (对照品)、三七皂苷 R_1 均购自于云南省昆明科翔生物科技有限公司;三七总皂苷由江苏省兽用生物制药重点实验室制备;甲醇 (HPLC 级),江苏汉邦科技有限公司;乙腈 (HPLC 级),迪马公司;硅胶,江苏省泰州市恒泰器化玻有限公司;其他试剂均为分析纯。岛津液相色谱仪 (10AT - VP 泵)、检测器 Alltech ELSD 2000ES (美国奥泰公司)、Class - vp 工作站、柱温箱、手动进样器 (20 μ L 定量环)、数显恒温水浴锅、RE - 3000 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备 精确称取三七总皂苷粉末 1 mg,置于 1 mL 量瓶中,加入适量甲醇,摇匀,超声处理 3 min 即可完全溶解,放冷至室温,精确加入甲醇至刻度,密塞,摇匀,即得三七总皂苷供试品溶液。

1.2.2 对照品溶液的制备 取人参皂苷 R_{b_1} (对照品)、人参皂苷 R_{g_1} (对照品) 及三七皂苷 R_1 (对照品),加甲醇制成各含 0.5 mg/mL 混合溶液,作为对照品溶液。

1.2.3 薄层色谱法的鉴别结果 照薄层色谱法试验,吸取上述溶液各 1 μ L,分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以三氯甲烷 - 甲醇 - 水 (65 : 35 : 10) 10 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 下加热至斑点显色清晰。置紫外灯光 (365 nm) 下检视,供试品色谱在对照品色谱相应的位置上显相同的斑点。

1.2.4 HPLC - ELSD 法的测定结果

1.2.4.1 色谱条件 色谱柱 Discovery C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: A 为水 - 0.1% 冰醋酸; B 为乙腈 - 10% 水; 梯度洗脱: 0 ~ 20 min (24% B)、20 ~ 30 min (24% B \rightarrow 37% B)、30 ~ 40 min (37% B \rightarrow 39% B)、40 ~ 50 min (39% B \rightarrow 80% B)、50 ~ 55 min (80% B); 流速为 1.0 mL/min; ELSD 检测器: 漂移管温度 110 $^{\circ}$ C, 载气流速 3.0 L/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L。

1.2.4.2 对照品溶液的制备 取对照品适量,分别置于 2 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得储备液。分别精确移取上述对照品储备溶液适量,置于 5 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,得到三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量 (0.715、1.5、2.928 mg/mL), 备用。

1.2.4.3 样品的制备 取三七总皂苷粉末 25 mg, 精确称定,置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇适量,摇匀,超声处理 3 min 即可完全溶解,放冷至室温,精确加入甲醇至刻度,密塞,摇匀,用微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤,即得三七总皂苷供试品溶液。

1.2.4.4 线性关系 取上述混合对照品溶液,依次制备系列标准品溶液,在“1.2.4.1”节的色谱条件下测定,以对照品溶液浓度的自然对数为横坐标、以峰面积的自然对数为纵坐标,绘制标准曲线进行回归分析。

1.2.4.5 精密度试验 精确吸取“1.2.4.2”节的混合对照品溶液,连续进样 6 次。

1.2.4.6 加样回收率 取同一批已知含量的样品 6 份,分别精确加入三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 对照品,

收稿日期:2012 - 10 - 17

基金项目:江苏高校科研成果产业化推进项目 (编号:JHZD09 - 73)。

作者简介:郑 义 (1976—),女,江苏泰州人,硕士,副教授,从事新兽药的研制工作。E - mail: zysm76@163.com。

通信作者:朱善元,博士,教授,主要从事病原微生物研究。Tel: (0523) 86158001。

在“1.2.4.1”节的色谱条件下分析,计算回收率。

1.2.4.7 重现性试验 取同一批供试液,在“1.2.4.1”节的液相色谱条件下重复测定 6 次。结果显示,*RSD* 均小于 3%,此测定方法的重现性良好。

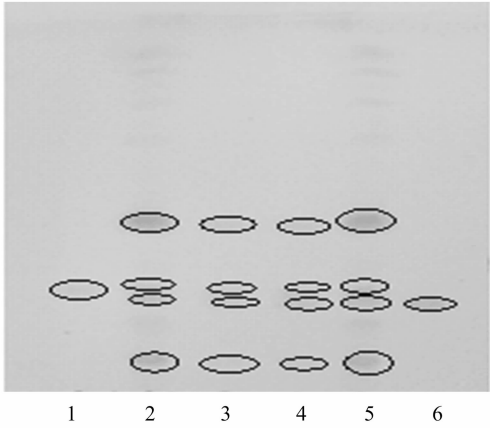
1.2.4.8 稳定性试验 精确吸取在室温下放置供试品溶液,在“1.2.4.1”色谱柱条件下分别测定 0、2、4、6、12、48 h,计算三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 色谱峰面积的 *RSD* 值(2.05%、2.61%、2.99%)。说明样品溶液在 48 h 内稳定。

1.2.4.9 样品测定 按“1.2.4.3”节的方法制备供试品溶液,在“1.2.4.1”节的色谱条件下进行含量测定,平行测定 3 份,并分别计算 3 种皂苷的含量。

2 结果与分析

2.1 薄层色谱法鉴别结果

由图 1 可知,在紫外灯光(365 nm)下检视,结果显示供试品色谱在与对照品色谱相应的位置上显相同的斑点。



1—三七皂苷 R_1 ; 2、5—三七总皂苷提取物; 3、4—混合标准品由下至上分别为 R_{b_1} 、 R_c 、 R_1 、 R_{g_1}

图1 薄层色谱法鉴别结果

2.2 HPLC-ELSD 测定结果

用 HPLC-ELSD 法测定三七总皂苷提取物中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量,在建立的色谱条件下,对照品和供试品溶液中各色谱峰分离度良好(图 2)。

2.3 线性关系的考察

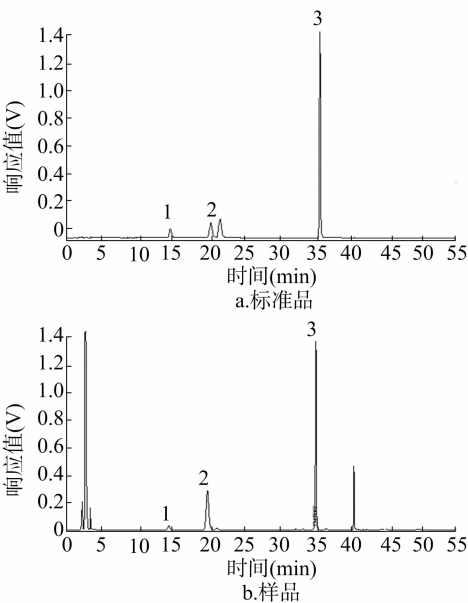
各成分的回归方程、线性范围如表 1 所示。由表 1 可知,3 种皂苷含量在各自的线性范围内线性良好。

2.4 精密度与回收试验结果

精密度试验结果显示,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的 *RSD* 分别为 2.27%、1.32%、2.02%,说明仪器精密度良好。三七皂苷 R_1 平均回收率为 101.27%,*RSD* 为 1.52% ($n=6$);人参皂苷 R_{g_1} 平均回收率为 101.06%,*RSD* 为 1.21% ($n=6$);人参皂苷 R_{b_1} 平均回收率为 98.19%,*RSD* 为 1.21% ($n=6$)。说明各组回收率符合要求。

2.5 重现性和稳定性试验

同一批供试液在“1.2.4.1”液相色谱条件下重复测定 6 次,结果 *RSD* 均小于 3%,说明该测定方法的重现性良好。在 0、2、4、6、12、48 h 后测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 色谱峰面积的 *RSD*,分别为 2.05%、2.61%、2.99%,说明样品溶液在 48 h 内稳定。



1—三七皂苷 R_1 ; 2—人参皂苷 R_{g_1} ; 3—人参皂苷 R_{b_1}
图2 三七总皂苷 HPLC 色谱图

表 1 3 种皂苷含量的线性方程

分析物	线性方程	<i>r</i>	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)
三七皂苷 R_1	$y = 1.508x + 16.55$	0.998 9	35.75 ~ 715
人参皂苷 R_{g_1}	$y = 1.518 1x + 16.17$	0.999 6	75 ~ 1 500
人参皂苷 R_{b_1}	$y = 1.138x + 16.581$	0.995 0	146.4 ~ 2 928

注: $n=6$ 。

2.6 样品测定结果分析

由表 2 可知,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量之和为 78.66%。

表 2 3 种皂苷在三七总皂苷中的含量

皂苷名称	含量(%)	<i>RSD</i> (%)
三七皂苷 R_1	5.19	1.96
人参皂苷 R_{g_1}	32.19	1.09
人参皂苷 R_{b_1}	41.28	1.43

3 结论

通过高效液相色谱法测得三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_{g_1} 等 3 种皂苷在三七总皂苷中的含量,分别为 5.19%、32.19%、41.28%,平均含量之和为 78.66%。结果表明,高效液相色谱法具有较强的针对性和准确性,能很好地反映出三七总皂苷的真正含量,为控制免疫佐剂的质量提供准确的方法。

参考文献:

[1] 张剑峰,张丹参. 三七总皂苷药理作用研究进展[J]. 医学综述, 2007,13(6):472-474.

[2] 夏 芳,罗满林,郭 林,等. 免疫佐剂的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(10):150-152

[3] Sun H X, Pan H J, Pan T J. Haemolytic activities and immunologic adjuvant effect of panax notoginseng saponins[J]. Acta Pharmacol Sin,2003,24(11):1150-1154.