

三七不同炮制品中皂苷类成分的测定

章洁萍¹, 张广征², 张贇^{1*}, 卫锡锦², 张 炜^{1*}, 刘 变^{1*}

(1. 广西中医学院, 广西南宁 530001; 2. 广西药物研究所, 广西南宁 530022)

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根, 为临床常用贵重中药材, 其主要成分有人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 等多种皂苷类成分, 另含止血活性成分三七氨酸及少量黄酮类成分^[1]。在民间及历代医方本草和炮制专著中记载有多种三七的炮制方法, 如油炸法、蒸制法等。传统中医及民间对三七均有“生撵熟补”之说, 即认为生三七有止血祛瘀、消肿活血、镇痛之效, 而熟三七则有补气补血、强身健体、促进发育之功^[2~4]。本课题研究小组通过多种药效学实验模型研究证实, 用蒸制法炮制的三七饮片具有较好的补血强身作用, 并通过药效学实验筛选出了具有最佳补血强身作用的三七炮制工艺条件为 105 ℃ 高温、高压蒸制 1.5 h。

本实验采用高效液相色谱法测定了不同炮制工艺的三七炮制品中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 3 种皂苷类成分, 并对不同炮制方法对三七皂苷类成分的影响进行了对比分析, 为不同三七炮制饮片质量标准的制定和临床应用提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 含在线真空脱气机(G—1322A)、高压四元梯度泵(G—1311A)、标准自动进样器(G—1313A)、智能化柱温箱(G—1316A)、可变波长紫外检测器(G—1314A)、二极管阵列紫外检测器、Agilent 1100 series 色谱工作站。Millipore 超纯水系统; LG16—W 型离心沉淀机(北京医用离心机厂)。

三七产自广西靖西县, 经南宁市药材站陆善旦副主任药师鉴定, 并按传统炮制方法进行炮制^[4]。人参皂苷 R_{g_1} 对照品(批号 0703-200221)、三七皂苷 R_1 对照品(批号 110745-200312)及人参皂苷 R_{b_1} 对照品(批号 110704-200216)均由中国药品生物制品检定所提供。乙腈为色谱纯, 甲醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及色谱适用性试验: 色谱柱: 日本岛津 Shim-Pack CLC-ODS (150 mm×6.0 mm); 柱温: 25 ℃; 检测波长: 203 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μ L; 流动相为乙腈(A)-水(B), 采用梯度洗脱, 0~70 min, A-B (19:81), 70~80 min, A-B (36:64)。理论塔板数以人参皂苷 R_{g_1} 峰计不少于 8 000。色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液的制备: 取不同方法炮制的三七药材样品粉末(过四号筛)约 0.6~1 g, 精密称定; 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 置 80 ℃ 水浴上回流 2 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 离心, 微孔滤膜(0.45 μ m)滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 混合对照品储备溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 对照品 10.29、8.14、2.10 mg 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备溶液。

2.4 线性关系考察: 分别精密吸取混合对照品储备液 2、3、5、7、10、15、18、20 μ L, 在上述色谱条件下进行测定。以进样量(X)对峰面积的积分值(Y)进行线性回归, 结果三七皂苷 R_1 在 0.420~3.15 μ g 与其峰面积之间呈良好的线性关系, 其线性回归方程为: $Y=295.6X-5.077$, $r=0.9999$; 人参皂苷 R_{g_1} 在 2.06~18.5 μ g 与其峰面积之间呈良好的线性关系, 其线性回归方程为: $Y=338.2X+9.393$, $r=0.9995$; 人参皂苷 R_{b_1} 在 1.63~16.3 μ g 与其峰面积之间呈良好的线性关系, 其线性回归方程为: $Y=260.6X+5.963$, $r=0.9996$ 。

2.5 精密度试验: 取同一份 105 ℃ 蒸 1.5 h 的三七炮制品(批号 E20040321)供试品溶液, 连续进样 6 次, 每次 20 μ L, 进样测定, 结果人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.7% 和 1.4%。

2.6 稳定性试验: 取同一份 105 ℃ 蒸 1.5 h 的三七炮制品(批号 E20040321)供试品溶液, 在 0、3、7、

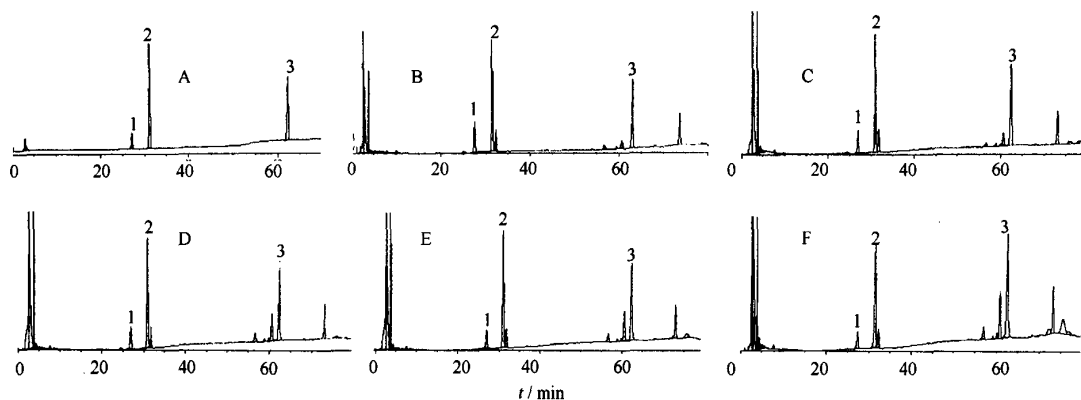
收稿日期: 2005-10-20

基金项目: 广西科技厅科技攻关项目(桂科攻 0322024-4A)

作者简介: 章洁萍(1962—), 女, 教授, 主要研究方向是中药分析与质量控制。

Tel: (0771) 2219877 E-mail: chinaqip6380@yahoo.com.cn

* 广西中医学院中药专业研究生



1-三七皂苷 R_1 2-人参皂苷 R_{g1} 3-人参皂苷 R_{b1}

1-notoginsenoside R_1 2-ginsenoside R_{g1} 3-ginsenoside R_{b1}

图 1 混合对照品(A)、三七生品(B)、油炸品(C)、黑豆汁蒸制 7 h 炮制品(D)、常压蒸制 4 h 炮制品(E)和 105 °C 高温高压蒸制 1.5 h 的炮制品(F)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substance (A), raw *P. notoginseng* (B), deep-fry processed *P. notoginseng* (C), *P. notoginseng* steamed with black bean juice for 7 h (D), *P. notoginseng* steamed for 4 h under normal pressure (E), and *P. notoginseng* steamed for 1.5 h at 105 °C under high temperature and high pressure (F)

12、19、24 h 分别进样测定,结果人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 峰面积的 RSD 分别为 1.5%、2.2% 和 2.0%,表明供试品溶液常温下在 24 h 可保持稳定。

2.7 重复性试验:取同一批 105 °C 蒸 1.5 h 的三七炮制品(批号 E20040321)6 份,制备供试品溶液,测定,结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的平均质量分数分别为 3.22、15.53、17.90 mg/g, RSD 分别为 1.8%、1.5%、2.3%。

2.8 加样回收率试验:精密称取干燥至恒重的三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及人参皂苷 R_{b1} 对照品 1.97、9.97、12.13 mg 置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密吸取上述溶液 5 mL,加甲醇稀释至 10 mL,摇匀,作为混合对照品溶液备用。精密称取已知三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 质量分数的三七炮制品(批号 E20040321)细粉适量,分别准确加入上述混合对照品溶液 2.5、3.0、3.5 mL,制备供试品溶液,测定,计算回收率。结果得人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 平均回收率分别为 98.9%、98.7% 和 98.5%,RSD 分别为 2.4%、1.3% 和 2.6% ($n=9$)。

2.9 三七不同炮制品中主要皂苷类成分的测定:分别取各种不同的三七炮制品样品粉末(过四号筛)适量,精密称定,制备供试品溶液。分别取供试品溶液和稀释后的混合对照品溶液 20 μ L,注入高效液相色谱仪,根据测得的相应峰面积计算样品中三七皂

苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 3 种皂苷类成分的质量分数,结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=3$)

Table 1 Results of sample determination ($n=3$)

序号	样品	三七皂苷 R_1		人参皂苷 R_{g1}		人参皂苷 R_{b1}	
		质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/ %
1	生品	9.39	2.90	27.27	1.80	30.27	1.30
2	油炸品	6.06	0.25	24.76	3.50	26.02	0.73
3	黑豆汁蒸 7 h	4.77	1.40	18.30	2.30	19.23	0.20
4	常压蒸 4 h	3.10	1.40	17.32	0.64	17.55	0.44
5	常压蒸 8.5 h	1.80	2.00	11.65	2.70	12.46	3.10
6	105 °C 蒸 1.5 h	3.00	1.50	15.59	3.60	18.30	2.00
7	110 °C 蒸 2 h	2.06	2.40	13.12	3.00	17.14	3.60

2.10 三七不同炮制品主要皂苷类成分的相对质量分数对比:将以上各种不同三七炮制品中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 3 种皂苷类成分进行对比,可见三七经炮制后各种皂苷类成分总体均有不同程度降低,但其中人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 的量与三七皂苷 R_1 量相比,其相对质量分数却有不同程度提高;对比相关药效学实验结果,可见三七经蒸制后补益作用增加与炮制后人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 相对质量分数的增加具有一定相关性,见表 2。

3 讨论

三七药材所含成分复杂,特别是其所含皂苷成分结构相似,等度洗脱分离效果较差,故采用梯度洗脱方式。经过多次实验摸索,确定采用乙腈-水系统,梯度洗脱方式;在此色谱条件下,80 min 内可使大

表 2 三七不同炮制品中主要皂苷类成分的
相对质量分数对比

Table 2 Comparison of relative saponins in different
processed products of *P. notoginseng*

序号	样品	Rg ₁ /R ₁	Rb ₁ /R ₁	Rb ₁ /Rg ₁
1	生品	2.9	3.2	1.1
2	油炸品	4.1	4.3	1.1
3	黑豆汁蒸 7 h	3.8	4.0	1.1
4	常压蒸 4 h	5.6	5.7	1.0
5	常压蒸 8.5 h	6.5	6.9	1.0
6	105 °C 蒸 1.5 h	5.2	6.1	1.2
7	110 °C 蒸 2 h	6.4	8.3	1.3

部分色谱峰得到基线分离,并且得到的色谱峰形较好,结果较为稳定。

实验结果显示,经炮制后三七中主要皂苷类成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 及 Rb₁ 的量均有不同程度降低,但炮制后人参皂苷 Rg₁ 及 Rb₁ 相对质量分数增加。其中高温高压蒸制(如 105 °C 蒸制 1.5 h 及 110 °C 蒸 2 h)或常压蒸制时间越长(如常压蒸制 8.5 h),主要皂苷类成分的量降低越多;但用油炸或黑豆汁蒸制的炮制法皂苷类成分的量降低相对较少。

将不同三七炮制品的 HPLC 图谱与未经炮制

的三七生品的 HPLC 图谱进行比较,可见油炸、黑豆汁蒸制 7 h、常压蒸制 4 h 的三七炮制品的 HPLC 图谱多出了 2 个小峰;而 105 °C 蒸制 1.5 h 的三七炮制品的 HPLC 图谱比三七生品的 HPLC 图谱多出了 3 个小峰,其色谱图与其他炮制品的图谱相比也有较大差别。这些成分的产生以及蒸制后皂苷类成分的变化与药效学实验结果证实其具有最佳补血强身作用,三七炮制条件及传统中医认为的三七“生撵熟补”之说可能存在一定的联系,待进一步探讨。

References:

- [1] Liu J H, Wang X, Cai S Q, *et al.* Analysis of the constituents in the Chinese drug notoginseng by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chin Pharm Sci* (中国药学), 2004, 13 (4): 225-236.
- [2] Wu K Y, Chen B E, Zhao B T. *Pivotal Technology of Cultivating Chinese Medicinal Materials* (中药材种养关键技术丛书) [M]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Publishing House, 2001.
- [3] Tian H Y, Qu X Y, Xiong P H. *The Experience Integrated for Process of Chinese Ethical Herb* (中国民族药炮制集成) [M]. Beijing: Chinese Ancient Books Publishing House, 2000.
- [4] Ye D J. *Chinese Materia Medica Processing* (中药炮制学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996.

正交设计优选罗布麻叶中总黄酮提取工艺

杨志芳^{1,3}, 王维娜², 杨 坤³, 吴琳琳², 杨新波⁴, 黄正明^{3*}

(1. 军事医学科学院, 北京 100850; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100850; 3. 中国人民解放军 302 医院药学部, 北京 100039; 4. 中国人民解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853)

罗布麻 *Apocynum venetum* L. 为夹竹桃科植物, 又名红麻, 是生长在盐碱沙荒地区的野生植物。我国罗布麻的资源非常丰富, 用罗布麻叶作茶饮及药用有悠久的历史。《中国药典》2005 年版也有记载: “平肝安神, 清热利水, 用于肝阳眩晕, 心悸失眠, 浮肿尿少, 高血压, 神经衰弱, 肾炎浮肿”。现代药理学研究认为其可预防和治疗老年高血压、感冒、气管炎, 对增强机体抗病能力有一定的作用, 为延年益寿, 养生之药^[1]。罗布麻叶中主要含有金丝桃苷、异槲皮素、槲皮素-3-O-槐糖苷、芸香苷、槲皮素等黄酮类成分^[2], 为进一步开发和利用野生植物资源, 本实验进行了罗布麻叶中总黄酮最佳提取工艺的研究。

1 仪器与试剂

罗布麻叶购于北京绿野药业公司, 经安徽天科药物研究所王先荣教授鉴定为夹竹桃科植物罗布麻叶 *A. venetum* L. 的干燥叶, 粉碎, 备用。芦丁对照品购于中国药品生物制品检定所(批号 0080-9705)。试剂均为分析纯。

FA—2004 电子天平(上海天平仪器厂), UV—3400 紫外分光光度计(日本日立公司), 752 型紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 因素及水平考察: 根据罗布麻总黄酮的理化性质, 选择提取次数、乙醇体积分数、提取时间和乙醇

收稿日期: 2005-12-08

作者简介: 杨志芳(1981—), 女, 山西朔州怀仁县人, 军事医学科学院硕士研究生, 研究方向为中药药理及新药研发。

E-mail: yangzf710@126.com

* 通讯作者 黄正明 Tel: (010) 66933233 E-mail: Huang_zhengming@sohu.com