

三七不同加热炮制品中 5 种皂苷类成分的含量测定^{*}

周新惠^{1,2}, 赵荣华¹, 张荣平², 朱培芳^{3△}

(1. 云南中医学院中药学院, 云南昆明 650500; 2. 昆明医科大学药学院, 云南昆明 650500;
3. 云南中医学院实验中心, 云南昆明 650500)

摘要: **目的** 建立一种用 HPLC 测定三七生品及不同温度加热炮制品中 5 种皂苷类成分含量的方法, 为研究三七炮制机理及探索生熟三七药理作用差异提供物质基础。**方法** 采用 HPLC 同时测定生品及不同炮制品中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd 的含量。Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6mm×250mm, 5μm), 乙腈和水梯度洗脱, 流速 1.0mL·min⁻¹, 柱温 20℃, 检测波长 203nm。**结果** 该方法中 5 种化合物线性关系良好, *r* 均在 0.9997 及以上, 回收率为 97.6%~101.7%。3 种炮制品(蒸制品、油炸品和砂炒品)中 5 种皂苷类成分含量整体比生品均有不同程度下降, 同时均有新成分产生。炮制品中五种成分含量下降幅度和新产生成分含量增加幅度与加热温度相关。砂炒品中 5 种皂苷类成分含量下降幅度最大, 新产生成分的含量最高。**结论** 该方法可用于三七炮制品中皂苷类成分的含量测定和质量控制。砂炒法是一种有前景的三七炮制方法。生品与炮制品三七的物质组成和含量各不相同, 这也许就是导致生熟三七药理作用差异的直接原因, 相关研究正在进行中。

关键词: 三七; 炮制; 皂苷; 含量; HPLC

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2013)06-0011-04

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng*(Burk.)F. H. Chen 的干燥根和根茎^[1], 是云南的道地药材和名贵药材。三七中含有皂苷、挥发油、三七素、黄酮、多糖和其他成分, 其中皂苷是主要活性成分之一^[2]。三七皂苷具有抑制血小板凝集、延长凝血时间、扩张血管、降低心肌耗氧量、清除自由基、抗炎、抗氧化、降血脂等功效^[3]。

通过炮制可以改变三七的药物作用趋向。生三七以散瘀止血、消肿定痛作用偏盛; 熟三七力偏滋补, 多用于补血、补气^[4]。炮制三七的方法以蒸制和油炸^[4]为主, 还有砂炒^[5]、酒制^[5]、烘焙^[6]等。

2010 年版《药典》^[1]中未列入三七炮制品质量控制方法, 对三七的定量控制采用 HPLC 测定三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁ 这 3 个成分的含量。文献中对三七炮制品进行了浸出物、总皂苷, 1 种或 3 种、4 种皂苷类成分的含量测定, 只有文献^[6]中测定了这 5 种皂苷类成分的含量。

目前研究中三七的炮制方法主要是蒸制法^[7-11]

和油炸法^[8-9]。本实验除了研究这两种传统炮制方法外, 增加了一种传热快、加热温度更高的炮制三七的方法——砂炒法。为了研究不同加热温度对三七中皂苷类成分的影响, 本文建立了 HPLC 同时测定三七中 5 种皂苷类成分的含量, 并对生品和不同加热温度炮制品中这些成分的含量变化进行了分析比较。

1 仪器与试药

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪, VWD 紫外检测器, Agilent chemstation 工作站。超声波清洗器(型号 SK7210HP, 上海科导超声仪器有限公司), 十万分之一电子分析天平(型号 AB265-S, 瑞士梅特勒-托利多公司)。

三七购于云南文山苗乡三七实业有限公司, 由云南中医学院赵荣华教授鉴定为五加科植物三七的干燥块根。生熟三七炮制方法见表 1。

三七皂苷 R₁(批号: 110745-200415)、人参皂苷 R_{g₁}(批号: 110703-201027)、人参皂苷 Re(批号:

^{*} 基金项目: 国家中医药管理局科研专项(NO: 201107007)

收稿日期: 2013-10-31 修回日期: 2013-11-12

作者简介: 周新惠(1987~), 女, 新疆喀什人, 在读研究生, 研究方向: 天然药物资源开发与利用。

△通信作者: 朱培芳, E-mail: sophiazpf@163.com

10754-200822)、人参皂苷 Rb_1 (批号:110704-201122)、人参皂苷 Rd (批号:111818-201001)及三七总皂苷(批号:110870-201002)对照品均购于中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

表 1 三七炮制方法

样品名称	炮制方法
生三七	将三七粉碎、过 80 目筛
蒸三七	将三七润软、切片、常压蒸 6h、干燥、粉碎、过 80 目筛
油炸三七	将三七用植物油中火油炸至金黄色、沥油、粉碎、过 80 目筛
砂炒三七	将片状三七用河砂武火炒至黄棕色、过筛、粉碎、过 80 目筛

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB- C_{18} (4.6mm×250mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,梯度见表 2;柱温:20℃;进样量:10 μ L;流速:1.0mL·min⁻¹;检测波长:203nm。

表 2 流动相洗脱梯度

流动相	时间/min						
	0	21	30	41	51	56	66
A/%	20	20	25	41	45	20	20
B/%	80	80	75	59	55	80	80

2.2 对照品溶液的制备

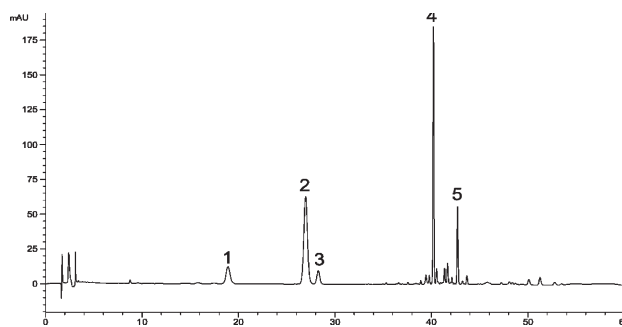
精密称取三七总皂苷对照品,加适量甲醇,配制成浓度为 1.516mg·mL⁻¹的对照品溶液。其中五种成分的浓度分别为三七皂苷 R_1 0.105mg·mL⁻¹、人参皂苷 Rg_1 0.409mg·mL⁻¹、人参皂苷 Re 0.051mg·mL⁻¹、人参皂苷 Rb_1 0.418mg·mL⁻¹、人参皂苷 Rd 0.104mg·mL⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取三七粉末 0.6g,置 250mL 圆底烧瓶中,加入 50mL 70%甲醇溶液,80℃回流 2h,放冷,补重,摇匀,静置后用 0.45 μ m 滤膜过滤,取续滤液。

2.4 各成分保留时间

按照对照品溶液浓度配制三七总皂苷对照品溶液,连续进样 6 次,得出 5 种成分的保留时间、理论塔板数、分离度的平均值。结果见图 1 和表 3。



注:1.三七皂苷 R_1 ; 2.人参皂苷 Rg_1 ; 3.人参皂苷 Re ; 4.人参皂苷 Rb_1 ; 5.人参皂苷 Rd

图 1 三七总皂苷对照品 HPLC 图

表 3 5 种成分的平均保留时间、理论塔板数和分离度

名称	保留时间/min	理论塔板数	分离度
三七皂苷 R_1	18.2	9438	8.6
人参皂苷 Rg_1	26.2	17112	10.2
人参皂苷 Re	27.6	31155	2.1
人参皂苷 Rb_1	40.2	932415	31.5
人参皂苷 Rd	42.7	1010587	14.9

2.5 线性关系考察

精密吸取三七总皂苷对照品溶液 4,6,8,10,12,14,16 μ L,进样,按上述色谱条件测定峰面积。以进样量(m)为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),进行线性回归计算,结果见表 4。结果表明,该色谱条件下 5 种成分的线性和相关性良好。

表 4 5 种成分的标准曲线、相关系数与线性范围

成分	线性方程	r	线性范围/ μ g
三七皂苷 R_1	$y=304.60x-1.1457$	0.9998	0.420~1.470
人参皂苷 Rg_1	$y=371.97x-29.646$	0.9998	1.636~6.544
人参皂苷 Re	$y=391.18x-6.7571$	0.9997	0.204~0.816
人参皂苷 Rb_1	$y=270.76x+1.0893$	0.9998	1.672~6.688
人参皂苷 Rd	$y=329.50x+1.3643$	0.9997	0.416~1.664

2.6 精密度实验

精密吸取三七总皂苷对照品溶液,按前述色谱条件,连续进样 6 次,测定峰面积,计算平均值和相对标准偏差(RSD)。5 种成分峰面积的 RSD 分别是三七皂苷 R_1 0.88%、人参皂苷 Rg_1 1.01%、人参皂苷 Re 1.28%、人参皂苷 Rb_1 0.71%、人参皂苷 Rd 0.90%。结果表明仪器精密度良好。

2.7 重复性实验

取同一批样品 6 份,按供试品制备方法制备,

按前述方法测峰面积,计算5种成分的相对标准偏差。三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 5种成分峰面积的RSD分别为1.14%,0.62%,1.72%,0.81%,0.61%。实验结果表明该方法重复性满足要求。

2.8 稳定性实验

取同一供试品溶液,分别放置0,2,4,8,16,24h进行测定,计算相对标准偏差。三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 5种成分峰面积的RSD分别为0.61%,0.44%,1.17%,0.68%,0.43%。结果表明5种成分在24h内稳定性良好。

2.9 加样回收率实验

取已知含量的样品6份,每份120mg,分别加入3种质量的三七总皂苷对照品,按供试品溶液制备方法制备,计算加样回收率及其相对标准偏差。三七皂苷 R_1 的平均加样回收率为101.7%,RSD为1.78%;人参皂苷 R_{g1} 的平均加样回收率为100.8%,RSD为2.26%;人参皂苷 R_e 的平均加样回收率为99.0%,RSD为3.63%;人参皂苷 R_{b1} 的平均加样回收率为98.7%,RSD为2.22%;人参皂苷 R_d 的平均加样回收率为97.6%,RSD为2.24%。实验结果表明该方法准确度良好。

2.10 样品含量测定

精密称取三七生品和3种炮制品各600mg,平行3次,按供试品溶液制备方法制备样品,按2.1中色谱条件测定,计算4个样品中5种成分的含量,结果及色谱图见表5和图2、3。

由图2看出,3种炮制品中5种皂苷类成分的含量相对生品均有不同程度下降,整体下降程度为蒸制品<油炸品<砂炒品。

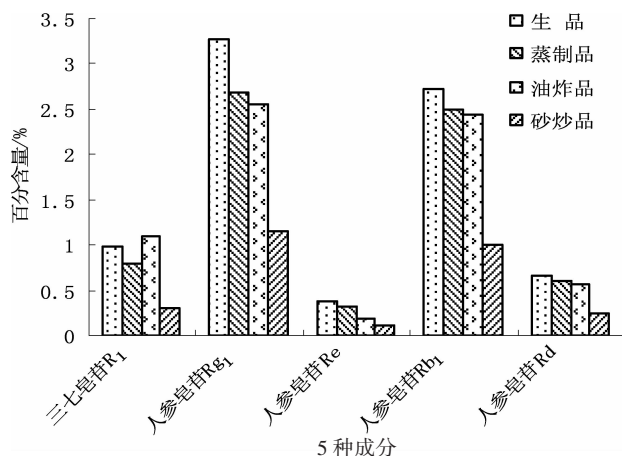
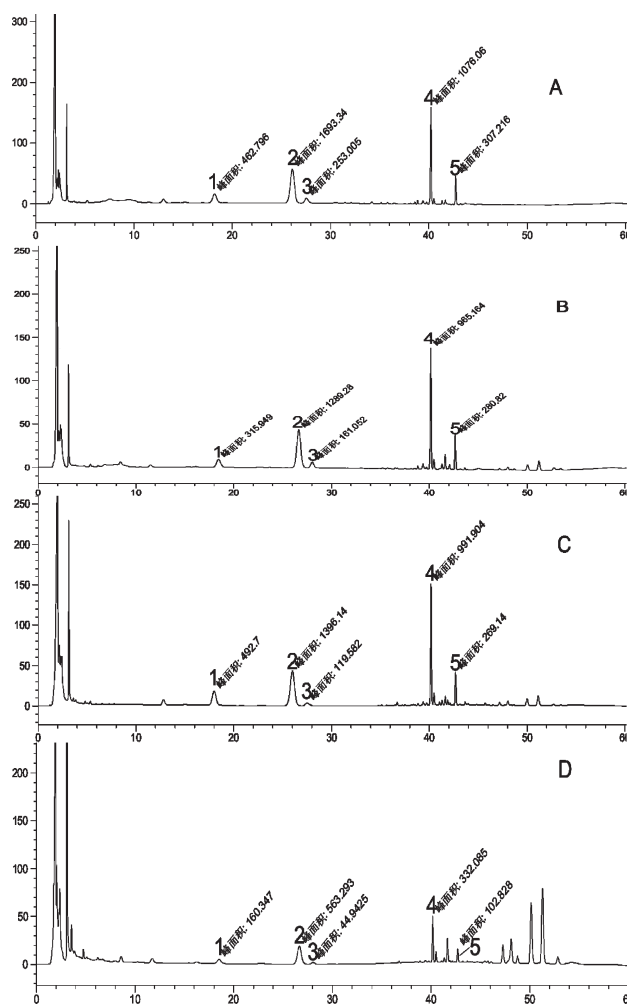


图2 不同样品5种成分含量对比

表5 生品与不同炮制品中5种成分的含量(%) (n=3)

样品	三七皂苷 R_1	人参皂苷 R_{g1}	人参皂苷 R_e	人参皂苷 R_{b1}	人参皂苷 R_d
生品	0.98	3.27	0.38	2.72	0.66
蒸制品	0.79	2.69	0.33	2.49	0.61
油炸品	1.09	2.56	0.18	2.44	0.57
砂炒品	0.30	1.15	0.11	1.00	0.24



注: 1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g1} ; 3. 人参皂苷 R_e ; 4. 人参皂苷 R_{b1} ; 5. 人参皂苷 R_d ; A. 生三七; B. 蒸制三七; C. 油炸三七; D. 砂炒三七

图3 生品与不同炮制品HPLC图

由图3看出,图B、C、D相对图A消失了一些峰,同时又有新的峰出现。即炮制过程不同程度破坏了一些成分,同时生成了一些新成分。图B、C、D中46~52min 4个共有峰的峰面积大小顺序是B<C<D,即4种新成分含量增加程度是蒸制品<油炸品<砂炒品。

由不同加热炮制品中 5 种成分含量减少程度顺序和新产生成分含量增加程度顺序以及炮制温度(蒸制品<油炸品<砂炒品)可以得出,不同加热温度对三七中皂苷类成分的影响与加热温度有关。

3 讨论

目前研究中三七的炮制方法多是蒸制或油炸,本实验尝试了一种传热快、加热温度更高、温度易于控制的炮制方法——砂炒法。从含量测定和色谱图中可以看出,经过砂炒三七成分发生了比较大的变化,对于新产生成分的定性定量研究和砂炒品的药理研究有待进行。

蒸制法多采用净制三七直接进行高压或常压蒸制。本实验中先将三七润软、切片后再常压蒸制。此方法解决了三七质地坚硬、切片难的问题,同时增大受热面积,利于三七均匀受热。

三七中富含皂苷成分,这类成分易溶于水。常压蒸制水蒸气冷凝后的水珠会带走一些皂苷成分。为避免此现象,我们在蒸制过程中用灭菌清洁的平板培养皿放置三七片,再放置蒸屉中蒸。三七在油炸过程中浸入了植物油,这些油脂有可能影响到皂苷类成分的分析,因此实验中先用索氏提取器除去油炸三七中油脂,再按照供试品处理办法处理。

我们在实验中发现,不同的炮制方法 5 种成分含量变化不同。即使同一种炮制方法,具体炮制条件不同,得到的结果也各不相同。为使三七炮制品的相关研究具有可比性,规范三七的炮制方法很有必要。

本实验中,炮制品中 5 种成分含量比生品均有不同程度下降(油炸品中三七皂苷 R_1 除外),砂炒品下降最多。但从新产生成分来看,炮制品相对生品均有新成分出现,且砂炒品中产生一些含量相对

较高的新成分。三七不同加热炮制品中物质基础不同,为三七生熟异用提供物质基础,相关研究正在进行中。目前三七相关研究中多以不同炮制品中一种或几种皂苷成分含量减少程度来评价炮制方法的优劣,但这些研究没有考虑新产生成分的作用。因此对于评价炮制方法优劣的标准有待制定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:11.
- [2] 鲍建才,刘刚,丛登立,等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药,2006(2):246-253.
- [3] 甘雨,徐惠波,孙晓波. 三七总皂苷的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2007(5):1251-1252.
- [4] 叶定江,张世臣. 中药炮制学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:188-189.
- [5] 潘巧建,黎振华. 一种熟三七的炮制方法[J]. 中药材,1988,11(2):17.
- [6] Wang D, Liao P Y, Zhu H T. The processing of *Panax notoginseng* and the transformation of its saponin components[J]. Food Chemistry, 2012, 132(4):1808-1813.
- [7] 覃洁萍,张广征,张赟赟,等. HPLC 指纹图谱及主成分含量测定用于蒸制熟三七炮制品的质量控制[J]. 中成药,2006,28(8):1446-1449.
- [8] 覃洁萍,张广征,张赟赟,等. 三七不同炮制品中皂苷类成分的测定[J]. 中草药,2006,37(8):1175-1177.
- [9] 万晓青,夏伯候,楼招欢,等. 三七不同炮制品中皂苷类成分的含量比较[J]. 中华中医药杂志,2011,26(4):841-843.
- [10] 盖雪,刘波. 熟三七炮制方法的改进[J]. 齐鲁药事,2005,24(5):304-305.
- [11] 柯金虎,孙玉琴,陈中坚,等. 蒸制法炮制熟三七粉对皂苷含量的影响[J]. 时珍国医国药,2003,14(8):475-476.

(编辑:李平)

Determination of 5 Saponins in Different Heat Processed *Panax Notoginseng*

ZHOU Xin-hui^{1,2}, ZHAO Rong-hua¹, ZHANG Rong-ping², ZHU Pei-fang³

(1. Yunnan university of TCM, Kunming Yunnan 650500, China;

2. Pharmacy School of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China;

3. Experimental Center of Yunnan College of TCM, Kunming Yunnan 650500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the quantitative determination of 5 saponins in raw and different temperature processed *panax notoginseng*, which would provide the material basis of processing mechanisms and pharmacological effects differences of raw and processed *panax notoginseng*. **Methods** The contents of notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d were determined by HPLC simultaneously. The separation was performed on Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6mm×250mm, 5 μ m) column,

(下转第 18 页)

- (5):527-534.
- [2] Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(1):200-216.
- [3] 严骅, 高俊杰. 强心饮对心肌病大鼠模型细胞凋亡因子的影响[J]. 中国医药指南, 2011, 9(16):71-72.
- [4] 解金洪, 姜卫东, 高想, 等. 利心冲剂对心衰大鼠血流动力学和凋亡相关基因表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(11):1352-1353.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:203.
- [6] Zhou X, Tan M, Hawthorne VS, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers [J]. Clin cancer Res, 2004, 10(20):6779-6788.
- [7] Clemente CF, Neto J X, Costa AP, et al. Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic growth by activating the AKT and mTOR pathways [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(2):493-501.
- [8] 徐燕, 杨爱东, 唐靖一, 等. 严世芸治疗充血性心力衰竭的经验[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(10):10-11.
- [9] 阎爱荣, 张宏. 附子的药理研究 [J]. 中国药物与临床, 2008, 8(9):745-747.
- [10] 李绍生, 杨杰, 张荣庆, 等. 鳖甲和三七对心肌成纤维细胞增殖影响的实验研究[J]. 中国临床康复, 2004, 8(15):2878-2879.
- (编辑:李平)

Experimental Study on the Effect of Qiangxin Decoction on the Cardiac Function and Cardiac Hypertrophy in Rats with Heart Failure

ZHENG Xiao-dan¹, JIANG Wei-dong¹, GAO Xiang¹, NI Wei-bing¹, TAO Zhi-qiang¹, CAI Juan¹, REN Xiu-mei², YANG Ying-qiao³, GAO Jun-jie⁴

(1. Nantong Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong Jiangsu 226001, China;

2. Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong Jiangsu 226001, China;

3. Jinzhou Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinzhou Liaoning 121014, China;

4. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of Qiangxin decoction on protein expression of regulation cell growth and proliferation in Rats with Adriamycin (ADR)-induced cardiac hypertrophy, and to investigate potential molecular mechanisms of cardiac hypertrophy. **Methods** Forty Sprague Dawley rats were randomly divided as follows: ADR group, normal control group, rapamycin treatment group, high and low dosage Qiangxin decoction groups. The morphology, hemodynamic, brain natriuretic peptide, and relative protein expression of cardiac hypertrophy were observed. **Results** Compared with ADR group, Qiangxin decoction treatment significantly inhibited the extent of the cardiac hypertrophy, improved cardiac function, while the expression level of phosphorylated mTOR (p-mTOR) and phosphorylated p70S6K (p-p70S6K) significantly reduced. **Conclusion** The present study demonstrated that Qiangxin decoction significantly relieve the myocardial hypertrophy and improve the cardiac function, The protective effect of the derivatives could be due to the inhibition of the activities of p-mTOR and p-p70S6K.

KEY WORDS: Qiangxin decoction; cardiac hypertrophy; p-mTOR; p-p70S6K

(上接第 14 页)

the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 20 °C and the wavelength of UV detector was 203 nm. **Results** With this method, 5 compounds showed a good linear relationship ($r \geq 0.9997$) with recovery range 97.6% -101.7%. There were differences among the contents of five saponins in raw and processed (steamed, fried and sand fried) *panax notoginseng*. Compared with the raw one, the contents of the 5 saponins in processed samples decreased and new components increased. Changes extent of both were relative with the heat temperature. The contents of 5 components decreased more, and newly produced components increased more in sand fried sample. **Conclusion** This chromatographic method can be used to content analysis and quality control of processed *panax notoginseng*. The processing method—sand fry is a promising method. The compositions and contents of raw and various processed *panax notoginseng* were both different, which may be the direct cause of the pharmacological differences among raw and various processed *panax notoginseng*, the more study about which is underway.

KEY WORDS: *Panax Notoginseng*; processing; Saponins; content analysis; HPLC