

## 三七发酵产物总皂苷指纹图谱

闫炳雄, 贺帅, 许文迪, 张晓倩, 邱智东, 王伟楠\*  
(长春中医药大学, 长春 130117)

**[摘要]** 目的:建立三七发酵产物总皂苷的 HPLC 指纹图谱,为三七发酵产物的质量评价提供参考。方法:收集 10 批三七发酵产物,采用 HPLC 建立三七发酵产物指纹图谱方法,并根据相对保留值  $\alpha$  和相对面积  $S_r$  对指纹图谱进行分析对比研究,考察指标成分人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_e$ ,  $R_{b_1}$ ,  $R_{g_2}$ ,  $R_{h_1}$ ,  $R_d$ ,  $R_{g_3}$  和 CK 的变化。结果:通过对 10 批次三七发酵产物总皂苷进行指纹图谱分析,建立了 HPLC 指纹图谱共有模式,其相似度均  $>0.98$ ,标定了 14 个共有峰,并对其中 8 个峰对应的皂苷进行确认。结论:该文为三七发酵产物的成分分析提供了一个快速、简便的方法,鉴定了主要的皂苷类成分变化,并通过三七发酵产物指纹图谱的建立为全面控制三七发酵产物的质量奠定基础。

**[关键词]** 三七发酵产物; 高效液相指纹图谱; 质量控制

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0052-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240052

**HPLC Fingerprints of Total Saponins in *Panax notoginseng* Fermentation Product** YAN Bing-xiong, HE Shuai, XU Wen-di, ZHANG Xiao-qian, QIU Zhi-dong, WANG Wei-nan\* (Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish HPLC fingerprints of total saponins to control the quality of *Panax notoginseng* fermentation product (PnFP). **Method:** The 10 batches of PnFPs were collected, and HPLC method was developed to build the fingerprints of PnFP. Then an investigation on chemical changes of ginsenoside  $R_{g_1}$ ,  $R_e$ ,  $R_{b_1}$ ,  $R_{g_2}$ ,  $R_{h_1}$ ,  $R_d$ ,  $R_{g_3}$  and CK was conducted according to relative retention value  $\alpha$  and relative peak area  $S_r$ . **Result:** The common pattern of HPLC fingerprints was established after analyzing ten batches of PnFP, with a similarity  $>0.98$ . 14 common peaks were marked, and corresponding saponins of 8 peaks of them were confirmed. **Conclusion:** The paper provides a rapid and adequate method for the components analysis of PnFP by which the chemical changes of major saponins were detected. Hence it will lay a solid foundation for the quality control of PnFP by establishing the fingerprints of PnFP.

**[Key words]** *Panax notoginseng* fermentation product; HPLC fingerprints; quality control

三七又名田七,是五加科人参属植物的根茎,是传统名贵中药材之一,具有化瘀止痛,活血定痛的功效,对出血症,跌打损伤,瘀血肿痛,虚损劳伤等病症疗效显著。现代研究发现三七的主要活性物质为皂苷类成分,其药理作用主要包括对心脑血管的影响、对中枢神经系统的影响、对血液的影响、对免疫系统的影响和抗肿瘤等方面<sup>[1-15]</sup>。虽然三七中的皂苷含量与其他五加科植物相比较,但活性和生物利用度较好的稀有皂苷类成分如人参皂苷  $R_{h_1}$ ,  $R_{h_2}$ ,

$R_{g_3}$ , CK 等含量极少,甚至不可检出,因此如何提高稀有皂苷含量成为了三七深度开发利用的关键问题。

目前应用微生物发酵技术提高中药活性成分含量,改变物质基础组成是中药研究领域的热点。中药材经过微生物发酵之后,化学成分发生了明显的变化,有的由大分子降解成小分子,易于被人体吸收,提高药材生物利用度;有的增加了有效成分或有效部位的含量,改善了药效<sup>[16-21]</sup>。然而,发酵菌种

**[收稿日期]** 20150704(009)

**[基金项目]** 吉林省科技发展计划项目(20140204014YY)

**[第一作者]** 闫炳雄,在读硕士,从事中药药剂学研究,Tel:13756487046,E-mail:ybx10528@foxmail.com

**[通讯作者]** \*王伟楠,博士,讲师,从事中药化学相关领域研究,Tel:15500070857,E-mail:cnweinanwang@163.com

和发酵参数的变化会对中药发酵产物的品质产生巨大的影响,如果不能建立相应的质量分析和控制方法对发酵条件进行监测,中药发酵产品的开发和工业化生产必将受到严重的阻遏。

高效液相指纹图谱作为一种综合的、量化的识别模式,具有系统性、特征性和稳定性等特点,通过对指纹图谱中的特征峰进行指认、分析组分之间的对应关系,构建不同批次药材物质基础的共有模式,可以从化学成分的角度实现对中药材品质的评价以及对药材加工过程中工艺的监控,保证中药及其产品的质量,是目前最主流的健康产品质量分析和控制手段<sup>[22-23]</sup>。本课题组前期利用优选的药食两用真菌在一定条件下对三七药材进行双向发酵,获得三七发酵产物。三七药材经过发酵之后,皂苷类成分产生了较大的变化,原有的三七总皂苷指纹图谱方法已经不适用于现在的发酵产物,因此,我们收集了 10 批次三七发酵产物,通过色谱条件优化和方法学考察建立了三七发酵产物总皂苷的指纹图谱,并对其中的单体皂苷进行了指认,为开发三七发酵产物总皂苷的新药或相关健康产品奠定基础。

## 1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent), YXQ-LS-50A 型立体压力蒸气灭菌器(上海博迅实业有限公司), DZF-6090 型真空干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司), KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 500 W, 40 kHz)。三七药材(吉林国安药业有限公司), 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(批号 110703-201529), 人参皂苷 Rg<sub>2</sub>(批号 111779-200801), 人参皂苷 Rg<sub>3</sub>(批号 110804-200603), 人参皂苷 Re(批号 110754-201324), 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(批号 110704-201223), 人参皂苷 Rh<sub>1</sub>(批号 MUST-11041201), 人参皂苷 Rd(批号 111818-201302)对照品均购于中国食品药品检定研究院, 人参皂苷 CK(批号 39262-14)对照品购于成都曼斯特生物科技有限公司。

乙腈、甲醇均为色谱纯,实验用水均为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称定人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rg<sub>2</sub>, 人参皂苷 Rh<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rd, 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 和人参皂苷 CK 对照品适量,用甲醇溶解稀释制备质量浓度均为 0.03 g·L<sup>-1</sup>的对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 取三七发酵产物总皂苷

干燥粉末(过 60 目筛)0.05 g,精密称定,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声处理 30 min,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

**2.3 色谱条件** 采用 ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~20 min, 20% A; 20~45 min, 20%~46% A; 45~55 min, 46%~55% A; 55~60 min, 55% A; 60~65 min, 55%~20% A),流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,进样量 10 μL。各个主要色谱峰的分离效果较好。见图 1。

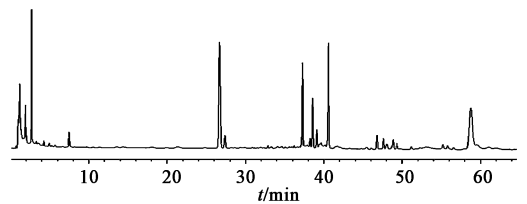


图 1 三七发酵产物总皂苷 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of total saponins of PnFP

**2.4 方法学考察** 利用高效液相色谱法和已经确定的色谱条件对三七发酵产物总皂苷进行测定,并进行精密度、稳定性、重复性等方法学考察,以峰面积最大的色谱峰作为对照峰(S),与其他峰的保留时间和峰面积进行参比,并进行计算。

**2.4.1 精密度考察** 取同一供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,以峰面积最大的色谱峰为参照峰,计算共有峰与特征峰的相对保留时间和相对峰面积,计算。结果表明 14 个色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.1%。表明仪器的精密度良好。

**2.4.2 重复性考察** 取同一批次三七发酵产物样品 6 份,依 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,记录色谱图,以峰面积最大的色谱峰为参照峰,计算共有峰与特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,14 个色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%。表明方法的重复性良好。

**2.4.3 稳定性考察** 取同一供试品溶液分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.3 项下色谱条件测定,记录色谱图,以峰面积最大的色谱峰为参照峰,计算共有峰与特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,14 个色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

## 2.5 三七发酵产物总皂苷 HPLC 指纹图谱的建立及定性分析

**2.5.1 HPLC 指纹图谱共有模式的建立** 精密称取 10 批三七发酵产物总皂苷各 0.05 g, 按 2.2 项下方法制备成供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 记录色谱图。采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)对 10 批三七发酵产物总皂苷的 HPLC 图谱进行分析, 以平均数法生成对照图谱, 时间窗宽度为 0.10 min, 共选择 14 个色谱峰, 对这 14 个色谱峰进行多点校正和自动匹配, 并确定这 14 个峰为三七发酵产物总皂苷的共有峰。见图 2, 3。

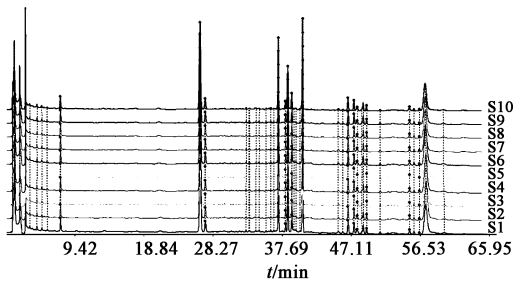


图 2 10 批三七发酵产物总皂苷的 HPLC 指纹谱叠加  
Fig. 2 HPLC fingerprints for total saponins in ten batches of PnFP

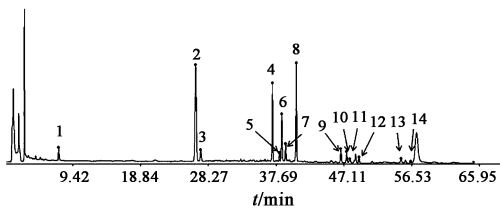
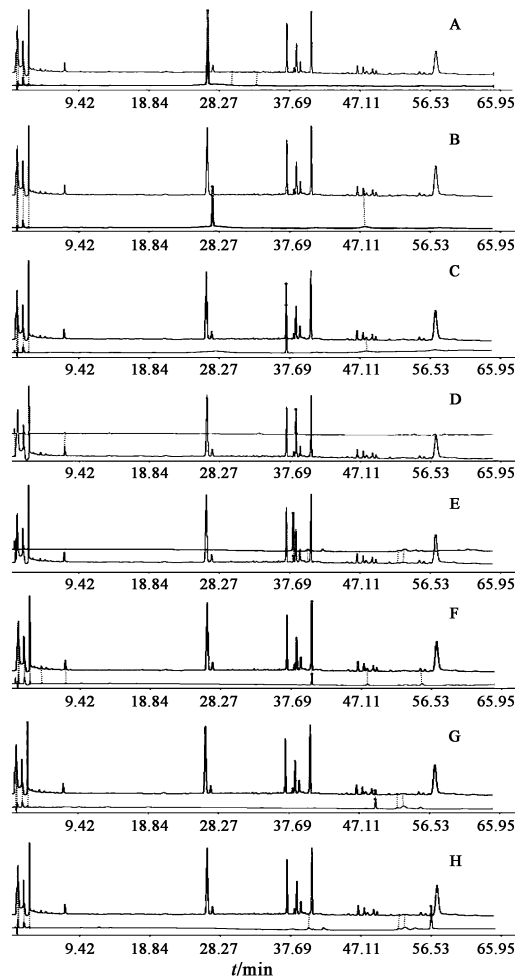


图 3 10 批三七发酵产物总皂苷 HPLC 指纹谱共有模式  
Fig. 3 Common mode of HPLC fingerprints for total saponins in 10 batches of PnFP

**2.5.2 三七发酵产物总皂苷指纹图谱中相关共有峰的标定** 将人参皂苷  $R_{g_1}$ , 人参皂苷  $R_e$ , 人参皂苷  $R_{b_1}$ , 人参皂苷  $R_{g_2}$ , 人参皂苷  $R_{h_1}$ , 人参皂苷  $R_d$ , 人参皂苷  $R_{g_3}$  和人参皂苷 CK 对照品溶液按 2.3 项下色谱条件测定, 记录色谱图, 将对照品色谱图与样品图谱进行比较, 确定了 2 号峰为人参皂苷  $R_{g_1}$ , 3 号峰为人参皂苷  $R_e$ , 4 号峰为人参皂苷  $R_{b_1}$ , 5 号峰为人参皂苷  $R_{g_2}$ , 6 号峰为人参皂苷  $R_{h_1}$ , 8 号峰为人参皂苷  $R_d$ , 12 号峰为人参皂苷  $R_{g_3}$ , 14 号峰为人参皂苷 CK。这 8 个成分在指纹图谱中所占的峰面积比例超过 50%, 在不同批次三七发酵产物指纹图谱中重复性较高, 稳定性较好, 可以作为控制三七发酵产物总皂苷质量的指标性成分。见图 4。



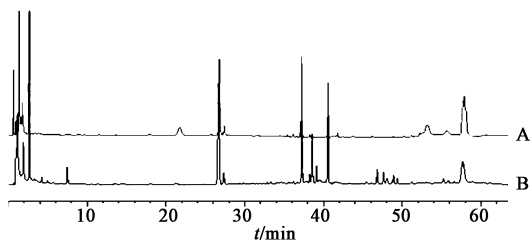
A. 人参皂苷  $R_{g_1}$ ; B. 人参皂苷  $R_e$ ; C. 人参皂苷  $R_{b_1}$ ; D. 人参皂苷  $R_{h_1}$ ; E. 人参皂苷  $R_{g_2}$ ; F. 人参皂苷  $R_d$ ; G. 人参皂苷  $R_{g_3}$ ; H. 人参皂苷 CK  
图 4 三七发酵产物总皂苷指纹谱峰的指认

Fig. 4 Qualification for chromatographic peaks of HPLC fingerprints for total saponins in PnFP

**2.5.3 三七发酵产物总皂苷与三七总皂苷的成分比较** 三七发酵产物总皂苷及三七总皂苷各 0.05 g, 按 2.2 项下方法制备成供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 记录色谱图。

与三七总皂苷色谱图进行比较, 发现三七发酵产物总皂苷中人参皂苷  $R_{g_1}$ , 人参皂苷  $R_e$ , 人参皂苷  $R_{b_1}$  明显减少; 人参皂苷  $R_{g_2}$ ,  $R_{h_1}$ , 人参皂苷  $R_d$  含量升高; 同时在三七发酵产物总皂苷中检出了人参皂苷  $R_{g_3}$ , CK。以上结果表明在三七发酵过程中可能存在  $R_e \rightarrow R_{g_2}$ ,  $R_e \rightarrow R_{g_1} \rightarrow R_{h_1}$ ,  $R_{b_1} \rightarrow R_d \rightarrow R_{g_3}$  以及  $R_{b_1} \rightarrow R_d \rightarrow CK$  等生物转化途径, 并出现了许多在三七总皂苷中不能检出的物质, 推测为生物转化产物, 结果见图 5。

**2.6 三七发酵产物总皂苷指纹图谱相似度评价** 将 10 批三七发酵产物总皂苷的色谱数据导入由国家



A. 三七药材; B. 三七发酵产物

图 5 三七发酵产物总皂苷与三七总皂苷色谱图对比

Fig. 5 Chromatographic comparison between total saponins in Panax notoginseng and PnFP

表 2 三七发酵产物总皂苷指纹图谱相似度计算

Table 2 Similarity analysis results of HPLC fingerprints for total saponins in PnFP

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.987	0.994	0.993	0.976	0.980	0.984	0.984	0.984	0.989	0.997
S2	0.987	1.000	0.994	0.994	0.993	0.983	0.978	0.957	0.957	0.967	0.991
S3	0.994	0.994	1.000	0.999	0.985	0.984	0.974	0.968	0.968	0.976	0.994
S4	0.993	0.994	0.999	1.000	0.985	0.986	0.974	0.968	0.968	0.975	0.994
S5	0.976	0.993	0.985	0.985	1.000	0.983	0.977	0.940	0.940	0.950	0.982
S6	0.980	0.983	0.984	0.986	0.983	1.000	0.984	0.965	0.965	0.972	0.990
S7	0.984	0.978	0.974	0.974	0.977	0.984	1.000	0.982	0.982	0.986	0.992
S8	0.984	0.957	0.968	0.968	0.940	0.965	0.982	1.000	1.000	0.998	0.986
S9	0.984	0.957	0.968	0.968	0.940	0.965	0.982	1.000	1.000	0.998	0.986
S10	0.989	0.967	0.976	0.975	0.950	0.972	0.986	0.998	0.998	1.000	0.991
对照指纹图谱	0.997	0.991	0.994	0.994	0.982	0.990	0.992	0.986	0.986	0.991	1.000

### 3 讨论

总皂苷是三七发酵产物的主要成分,根据《中国药典》(2010年版)规定,三七总皂苷的检测波长应设定为 203 nm,故本课题选择在此波长下进行实验。

实验采用 1.2, 1.5, 1.7 mL·min<sup>-1</sup> 的不同流速和 20, 25, 30 °C 的不同柱温条件对供试品溶液进行梯度洗脱。结果表明流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C 为最佳实验条件。

通过色谱条件优化和方法学考察建立了三七发酵产物总皂苷的指纹图谱,并对 10 批次三七发酵产物总皂苷进行了指纹图谱分析和比对,确定了一套精密度高、稳定性好、重复性强的指纹谱图共有模式。

从指纹图谱共有模式中我们确定了 14 个共有峰,并以色谱图中峰面积最大的 2 号峰为参照峰,计算共有峰与特征峰的相对保留时间和相对峰面积的

药典委员会编写的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版),计算各图谱与共有模式的相似度,结果见表 2。

结果表明 10 批三七发酵产物总皂苷的指纹图谱与其共有模式之间的相似度均达到 0.98 以上,10 批三七发酵产物总皂苷各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,各共有峰的相对保留峰面积的 RSD 均 < 3.0%,说明这 10 批不同三七发酵产物所提取纯化而得的总皂苷的化学成分一致,生产工艺和产品质量稳定。

一致性。其中,相对保留值  $\alpha$ : 1.000 0, 1.258 9, 1.341 2, 1.413 3, 1.613 9, 1.684, 2.258 9, 2.341 2 的 8 个化合物含量较高,峰面积比较稳定,经对照品对照,这 8 个色谱峰分别鉴定为人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rg<sub>2</sub>, 人参皂苷 Rh<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rd, 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 和 CK, 可作为鉴别三七发酵产物物质基础的重要指标,为全面控制三七发酵产物总皂苷的质量提供理论依据。

#### [参考文献]

[1] 张海港, 李晓辉, 李淑惠, 等. 三七总皂苷对烫伤大鼠心肌 GsqmRNA 表达的影响[J]. 中草药, 2001, 32(11): 1000-1002.

[2] 高瑞兰, 徐卫红, 林筱洁, 等. 三七皂甙对造血细胞 GATA-1 和 GATA-2 转录调控蛋白的诱导作用[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(5): 281-284.

[3] 陈北阳, 李花, 熊艾君. 三七总皂苷对脑缺血再灌注后海马 CA1 区损伤的影响[J]. 湖南中医学院学报,

- 2004,24(4):4-6.
- [4] 王根发,王文安,周永炜,等.三七皂甙对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国临床康复,2002,6(9):1268-1269.
- [5] 马丽森,肖培根.三七总皂苷对突触体谷氨酸释放及谷氨酸受体特异性结合的影响[J].中国药理学通报,1998,14(4):309.
- [6] 苏雅,赵益桂,张宗鹏,等.三七三醇皂苷对动物血小板功能及血栓形成的影响[J].中草药,1996,27(11):666-669.
- [7] 马岩岩.三七皂甙成分对脂多糖诱导巨噬细胞炎症因子的影响及其机制的研究[D].广州:暨南大学,2013.
- [8] 赵鹏,李彬,何为涛,等.三七皂苷对小鼠免疫功能影响的实验研究[J].中国热带医学,2004,4(4):522-524.
- [9] 刘昱良.三七皂甙制剂抑制小鼠胰腺癌皮下移植瘤的实验研究[D].昆明:昆明医科大学,2013.
- [10] 周欣,李章万,张雪琴,等.银杏叶片剂中银杏黄酮的HPLC指纹图谱研究[J].中国药学杂志,2005,40(2):93-95.
- [11] 贾晓斌,陈彦,蔡宝昌,等.黄芪皂苷类成分的HPLC指纹谱研究[J].中医药学刊,2004,10(12):106-109.
- [12] Wakabayashic, Murakamik, Hasegawah, et al. Anintestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiolsaponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells[J]. Bio Chem Biophys Res Commun,1998,246(3):725-730.
- [13] 全燕,夏前明,李福祥,等.三七总皂苷对博莱霉素致大鼠肺纤维化的干预作用[J].西南国防医药,2005,15(3):235-237.
- [14] 余万桂,张恒文.三七总皂苷对肝纤维化小鼠 TNF $\alpha$  及 IL-6 活性的影响[J].中药药理与临床,2005,21(4):31-34.
- [15] 张荣华,李景怡,陈如泉,等.三七总皂苷对肝纤维化大鼠肝脏超微结构的影响[J].第三军医大学学报,2005,27(24):2410-2413.
- [16] 屈泽强,谢智光,王乃平,等.三七总皂苷抗衰老作用的实验研究[J].广州中医药大学学报,2005,22(2):130-132.
- [17] Li X H, Dong Z R, Hao H L. Effect of panaxnotoginsengsaponin on procoagulant activity and differentiation induction in NB4 cells[J]. Chin J Integr Traditional West Med,2004,24(1):63-65.
- [18] Cicero A F, Vitale G, Savion G, et al. Panaxnoto ginseng effects fibrinogen and lipidplasma lever in rats fed on a high-fat diet [J]. Phytother Res, 2003, 10 ( 25 ): 129-131.
- [19] 吴志勇.采用生物工程技术发酵中药获得成功[J].世界科学技术——中药现代化,2002,3(3):22-26.
- [20] 陈俊荣,张永建,王梅,等.发酵型黄芪制剂“芪醇粉”对 CTX 模型鼠监督作用的实验研究[J].亚太传统医药,2008,4(10):43-45.
- [21] 李国红,沈月毛,王启方,等.发酵三七中的皂苷成分研究[J].中草药,2005,36(4):499-500.
- [22] 谢培山.色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J].中药新药与临床药理,2001,12(3):141-134.
- [23] 吕春平,关铭.中药指纹图谱的应用[J].天津药学,2004,16(2):58-62.

[责任编辑 顾雪竹]