

## 三七提取液中皂苷类成分的热稳定性分析

党晓芳, 曹飒丽, 林龙飞, 祁娟娟, 张晋, 张慧, 倪健\*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的: 考察三七水煎液中人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  的热稳定性。方法: 采用 HPLC 测定人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  含量, 色谱条件为流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~12 min, 19% A; 12~60 min, 19%~36% A), 检测波长 203 nm。通过单因素试验考察温度和加热时间对三七水煎液和混合对照品溶液中人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  含量的影响。结果: 三七水煎液中人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$  和三七皂苷  $R_1$  在不同温度下加热 12 h 均会发生不同程度的转化, 随温度的增高转化速率增大, 于 100 °C 时分别约降至初始含量的 30%, 50%, 30%; 混合对照品溶液中 3 种皂苷类成分则几乎不发生转化。结论: 三七水煎液中 3 种皂苷类成分含量的变化主要不是温度引起的, 而可能是三七内部特殊物质的作用效果。

**[关键词]** 三七; 人参皂苷  $R_{g_1}$ ; 人参皂苷  $R_{b_1}$ ; 三七皂苷  $R_1$ ; 稳定性

**[中图分类号]** R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0031-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014010031

## Thermal Stability Analysis of Saponins from Notoginseng Radix et Rhizoma Extract

DANG Xiao-fang, CAO Sa-li, LIN Long-fei, QI Juan-juan, ZHANG Jin, ZHANG Hui, NI Jian\*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate thermal stability of ginsenosides  $R_{g_1}$ , ginsenoside  $R_{b_1}$  and notoginsenoside  $R_1$  in water decoction of Notoginseng Radix et Rhizoma. **Method:** Contents of ginsenosides  $R_{g_1}$ , ginsenoside  $R_{b_1}$  and notoginsenoside  $R_1$  were determined by HPLC, acetonitrile (A)-water (B) system was taken as mobile phase with gradient elution (0-12 min, 19% A; 12-60 min, 19%-36% A), detection wavelength was 203 nm. Effects of heating time and temperature on contents of index components from water decoction and mixed standard solution were investigated by single factor tests. **Result:** When heating time came to 12 h, ginsenoside  $R_{g_1}$ , ginsenoside  $R_{b_1}$  and notoginsenoside  $R_1$  had different degree of degradation, and they degraded rapidly when temperature increased. It's reduced to 30%, 50%, 30% of the initial content at 100 °C; While contents of these three kinds of saponins in mixed standard solution was almost no conversion. **Conclusion:** Contents change of three kinds of saponins in water decoction of Notoginseng Radix et Rhizoma was not primarily caused by temperature, but it may be due to effect of specific substances in Notoginseng Radix et Rhizoma.

**[Key words]** Notoginseng Radix et Rhizoma; ginsenosides  $R_{g_1}$ ; ginsenoside  $R_{b_1}$ ; notoginsenoside  $R_1$ ; stability

三七具有活血化瘀、消肿定痛、调节免疫等功效, 始载于《医门秘旨》和《跌损妙方》<sup>[1]</sup>。三七根中

主要有效成分包括达玛烷型人参皂苷  $R_{b_1}$ ,  $R_{g_1}$ ,  $R_e$  及三七皂苷  $R_1$ ,  $R_{g_2}$ ,  $R_{h_1}$  等<sup>[2]</sup>。研究发现生三七中

**[收稿日期]** 20130824(005)

**[基金项目]** 北京中医药大学复方中药制药创新团队项目(2011-CXTD-13)

**[第一作者]** 党晓芳, 硕士, 从事中药制药新剂型与新技术研究, E-mail: yangmuju@163.com

**[通讯作者]** \* 倪健, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738607, E-mail: njtem@263.net

人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ ,  $R_e$ , 三七皂苷  $R_1$  的含量明显高于蒸制过的三七<sup>[3]</sup>;同时确认超声法较索氏提取法的提取率更高<sup>[4]</sup>,推测索氏提取时温度对皂苷类成分会产生一定影响。预试验发现三七在水煎煮提取时人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  不稳定,故本实验拟通过考察温度和加热时间对三七水煎液和混合对照品溶液中人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  含量的影响,为三七药材的临床应用提供参考。

### 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),HH-4 型恒温水浴锅(国华电器有限公司),Transferpette 型移液枪(德国 Brand 公司)。人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ ,  $R_1$  对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110023-200819,110045-200911,110007-200936),三七[购自北京同仁堂有限责任公司,经北京中医药大学大学生药系刘春生教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎],乙腈、甲醇为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[5]</sup> Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 19% A; 12 ~ 60 min, 19% ~ 36% A),检测波长 203 nm,流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C。

**2.2 供试品溶液的制备** 取三七 120 g(过 1 号筛),加 12 倍量水煎煮 3 次,每次 2 h,合并水煎液,浓缩至 200 mL。精密量取浓缩液 5 mL 置于 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

#### 2.3 标准曲线的绘制

**2.3.1 对照品溶液的配制** 精密称取人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  适量,用甲醇制成质量浓度分别为 0.404, 0.409, 0.103 g · L<sup>-1</sup> 的混合储备液。

**2.3.2 线性关系** 精密量取储备液,加甲醇制成系列质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  的回归方程分别为  $Y = 0.0004X - 10.31$  ( $r = 0.9994$ ),  $Y = 0.0004X - 2.24$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 0.0003X - 11.61$  ( $r = 0.9992$ ), 线性范围分别为 81.6 ~ 1224, 80.8 ~ 1212, 76.8 ~ 288 μg。

**2.4 精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液,连续进样 6 次,按 2.1 项下色谱条件测定,结果人参

皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.5%, 0.5%。

**2.5 重复性试验** 取供试品溶液按 2.1 项下色谱条件平行操作 6 份,计算人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  含量的 RSD 分别为 1.2%, 1.6%, 2.0%。

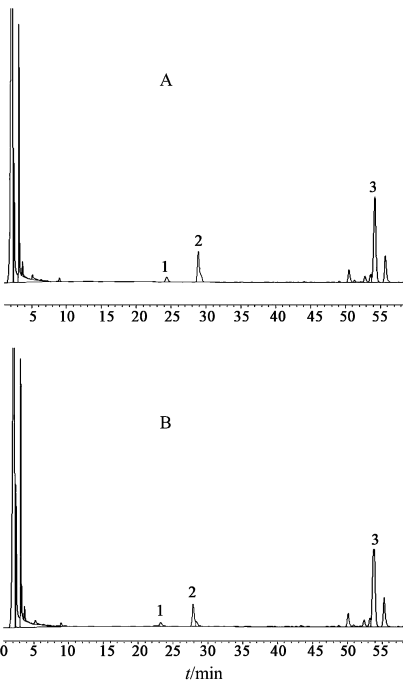
**2.6 稳定性试验** 取制备好的供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样,按 2.1 项下色谱条件测定,结果人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  峰面积的 RSD 分别为 2.18%, 1.27%, 1.89%, 表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

**2.7 回收率试验** 精密量取三七浓缩液 6 份,每份 5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,各加入已知量的人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  对照品,加甲醇定容,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$ , 三七皂苷  $R_1$  含量测定的加样回收率试验

成分	样品中 质量 /mg	加量	测得量	回收率	平均 回收率 /%	RSD /%
		/mg	/mg	/%		
人参皂苷 $R_{g_1}$	4.306	4.331	8.681	101.02	98.80	2.61
	4.307	4.262	8.412	96.31		
	4.306	4.194	8.302	95.28		
	4.307	4.412	8.649	98.41		
	4.306	4.280	8.674	102.06		
	4.308	4.314	8.609	99.70		
人参皂苷 $R_{b_1}$	4.228	4.086	8.359	101.10	99.46	2.55
	4.229	4.143	8.337	99.16		
	4.228	4.361	8.403	95.73		
	4.229	4.263	8.469	99.46		
	4.229	4.317	8.669	102.85		
	4.228	4.332	8.494	98.48		
三七皂苷 $R_1$	0.902	0.962	1.848	98.34	99.61	1.76
	0.902	0.914	1.821	100.55		
	0.903	0.876	1.765	99.42		
	0.901	0.933	1.823	98.82		
	0.902	0.931	1.816	98.17		
	0.901	0.885	1.807	102.37		

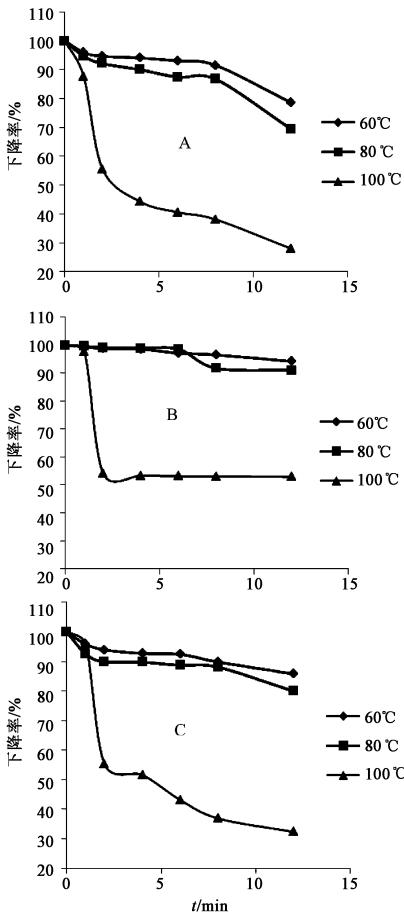
**2.8 热稳定性考察** 精密量取三七浓缩液样品 21 份,每份 5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中。随机取出 3 份,作为对照组,不加热,其余 18 份,等分为 3 组,分别置恒温水浴锅中以 60, 80, 100 °C 加热,分别在 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 各取出 1 份,用甲醇定容至 25 mL,作为供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果见图



A. 对照组;B. 100 °C 加热 12 h 样品;

1. 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 2. 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>; 3. 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>

图 1 三七药液 HPLC

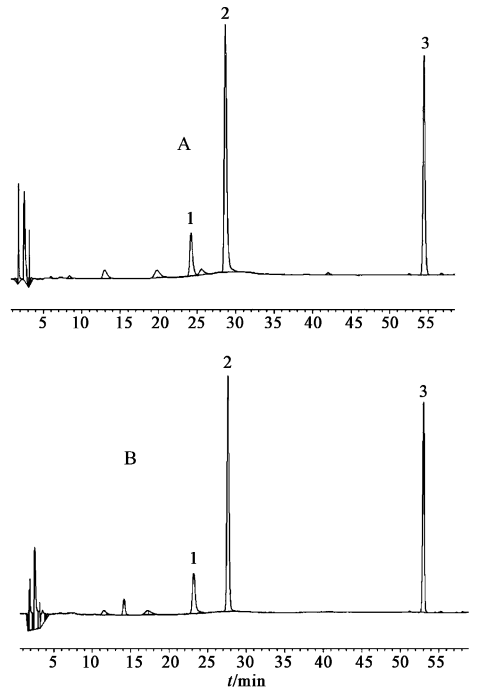


A. 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>; B. 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>; C. 三七皂苷 R<sub>1</sub>

图 2 三七浓缩液中 3 种皂苷类成分含量随加热时间的变化曲线

1,2,表明人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, R<sub>b<sub>1</sub></sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 在加热 12 h 时,发生了不同程度的转化反应,含量随加热时间延长呈不断下降趋势;温度对 3 种皂苷类成分的分解速率影响较大,100 °C 加热 12 h 时人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, R<sub>b<sub>1</sub></sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 分别降至初始含量的 30%, 50%, 30%, 提示人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 较人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 更易转化,但 60 °C 时加热分解速率相对较慢。

精密量取配制好的混合对照品溶液 21 份,每份 1 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,按上述三七浓缩液处理方法进行试验,结果见图 3,4。表明三种皂苷类成分对温度较稳定,在 12 h 内随着加热时间延长,几乎不发生转化,推测三七浓缩液中出现的皂苷转化主要不是温度引起的,而可能是三七自身所含有的一些物质及其他因素共同引起的。



A. 对照组;B. 100 °C 加热 12 h 样品;

1. 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 2. 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>; 3. 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>

图 3 皂苷类成分混合对照品溶液 HPLC

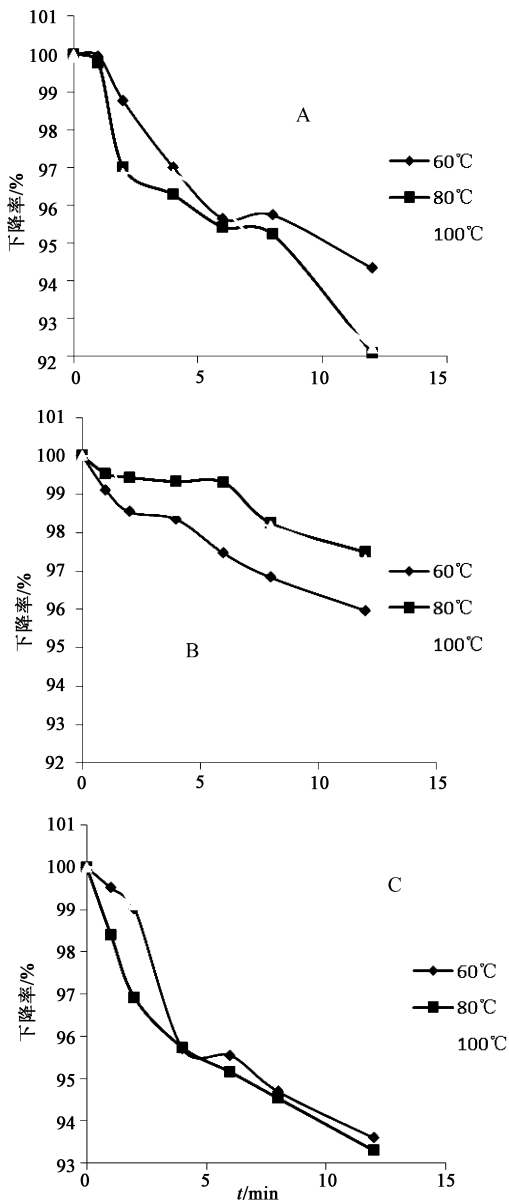
### 3 讨论

在三七水煎煮提取过程中,迅速加热,人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, R<sub>b<sub>1</sub></sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 在 100 °C 时均发生了转化,其中人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 在 12 h 时 >70% 发生了转化;而混合对照品溶液中 3 种皂苷类成分则对温度较稳定。故推测三七水煎液中 3 种皂苷类成分发生的转化不仅仅由温度引起,而可能是三七中某些特殊物质的作用,如三七自身糖苷酶。三七皂苷脱糖基化的方法有多种,酶催化为其中之一<sup>[6]</sup>。虽然药材中自身的糖苷酶在分离纯化后非常不稳定,

通常游离酶在 80 °C 时会变形失活<sup>[7]</sup>,但三七内部环境较复杂,存在多糖类、肽类等物质保护酶蛋白<sup>[8]</sup>,因此未从三七中分离的酶在 <100 °C 时活性不强,促皂苷转化的能力较弱,加热至 100 °C 时,酶活性较强,能够较好地促进皂苷的转化,证明在传统的中草药煎煮提取及炮制过程中,中草药自身酶对成分的作用不容忽视。

[参考文献]

[ 1 ] 徐冬英.三七名称及其有文字记载时间的考证[J].广西中医学院学报,2000,17(3):91.  
[ 2 ] 刘刚,鲍建材,郑友兰,等.三七的化学成分研究进展[J].人参研究,2004(2):10.  
[ 3 ] Lau A J, Woo S O, Koh H L. Analysis of saponins in raw and steamed *Panax notoginseng* using high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. J Chromatogr A, 2003, 1011(1/2):77.  
[ 4 ] Toh D F, New L S, Koh H L, et al. Ultra-high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/TOFMS) for time-dependent profiling of raw and steamed *Panax notoginseng* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(1):43.  
[ 5 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:11.  
[ 6 ] 薛冬令,韩祥,金凤燮,等.麦冬多糖糖苷酶的分离纯化及其酶性质[J].大连工业大学学报, 2009, 28(4):235.  
[ 7 ] 高娟.糖苷酶转化人参皂苷的研究[D].长春:东北师范大学, 2012.  
[ 8 ] 柴瑞华,姜彬慧,赵余庆.三七茎叶总皂苷酶转化产物和 C-K 的抗肿瘤作用[J].中国现代中药, 2007, 9(12):14.



A. 人参皂苷 R<sub>g1</sub>; B. 人参皂苷 R<sub>b1</sub>; C. 三七皂苷 R<sub>1</sub>

图 4 混合对照品溶液中 3 种皂苷类成分含量随加热时间的变化曲线

[责任编辑 仝燕]