

## 不同入药方式下三七的药效成分与砷含量测定

蒋艳雪<sup>1,2</sup>, 姜阳<sup>1,2</sup>, 朱美霖<sup>2,3</sup>, 崔斌<sup>2,3</sup>, 曹红斌<sup>2,3\*</sup>, 张文生<sup>2,4</sup>

- (1. 北京师范大学, 中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875;
2. 北京师范大学资源学院资源生态与中药资源研究所, 北京 100875;
3. 北京师范大学, 资源药物教育部工程研究中心, 北京 100875;
4. 云南省三七生物技术与制药工程研究中心, 昆明 650000)

**[摘要]** 目的:通过对不同入药方式下三七中有效成分三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$  和类金属砷的含量进行测定,研究不同入药方式对三七安全有效利用的影响。方法:三七生粉试样按照直接入药、水提取和乙醇提取 3 种方式进行前处理,经湿法消解后,采用氢化物发生原子荧光法(AFS)测定砷含量;采用高效液相色谱法(HPLC)测定有效成分含量,色谱柱为 Agilent TC-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.05% 磷酸(B)进行梯度洗脱,检测波长为 203 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30℃。结果:乙醇提取液的砷含量最少,人参皂苷  $R_{g_1}$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$  含量最多。结论:乙醇回流的提取方法与水煎煮的提取方法相比,其砷含量较低(平均值分别为 0.023 5, 0.110 8 mg·kg<sup>-1</sup>)且保留更多药效成分含量(总皂苷含量平均值分别为 9.098%, 7.738%),可能可代替水煎煮的提取方法。

**[关键词]** 三七;有效成分;高效液相色谱;砷;氢化物发生原子荧光法;醇回流

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0128-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013140128

## Determination of Arsenic and Pharmaceutical Components in *Panax notoginseng* with Different Extracting Manner

JIANG Yan-xue<sup>1,2</sup>, JIANG Yang<sup>1,2</sup>, ZHU Mei-lin<sup>2,3</sup>, CUI Bin<sup>2,3</sup>, CAO Hong-bin<sup>2,3\*</sup>, ZHANG Wen-sheng<sup>2,4</sup>

- (1. Beijing Area Major Laboratory of Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100875, China;
2. Institute of Natural Medicine and Chinese Medicine Resources, College of Resource Science and Technology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;
3. Center for Natural Medicine Engineering, Ministry of Education, Beijing 100875, China;
4. Sanqi Biotechnology and Pharmaceutical Engineering Center, Kunming 650000, China)

**[Abstract]** **Objective:** Using the HPLC and atomic fluorescence spectrometry, to analyze notoginsenoside  $R_1$ , ginsenoside  $R_{g_1}$ , ginsenoside  $R_{b_1}$  and the total arsenic content in *Panax notoginseng* and its two extracting solutions. **Method:** The chromatographic separation was achieved on an Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with acetonitrile (A) -0.05% phosphoric acid (B) as mobile phase for gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30℃ and the detection wavelength was set at 203 nm. Treat *Panax notoginseng* with different extracting manners (unprocessed, traditional decocting and refluxing by ethanol). Run wet digestion process before measuring the fluorescence intensity, and then get the content of total arsenic. **Result:** The content of total arsenic differs in different extracting manner, unprocessed > traditional decocting > refluxing by ethanol. **Conclusion:** *Panax notoginseng* refluxing by ethanol can extract more pharmaceutical

**[收稿日期]** 20121017(001)

**[基金项目]** 中央高校基本科研业务费专项资金

**[第一作者]** 蒋艳雪, 硕士研究生, 从事中药安全性评价研究, Tel: 010-62200669, E-mail: 0810190006@mail.bnu.edu.cn

**[通讯作者]** \* 曹红斌, 博士, 教授, 从事天然药物安全性评价研究, Tel: 010-62200669, E-mail: caohongbin@bnu.edu.cn

components with low total arsenic. The traditional decocting could be replaced by the ethanol way.

**[Key words]** *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; effective components; HPLC; AFS; Arsenic; refluxing by ethanol

药材三七为五加科植物三七的干燥根,因其止血、活血、补血的独特功效在中药中占有重要位置,用于咯血、吐血、衄血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺痛、跌扑肿痛等<sup>[1]</sup>,有“善化血瘀,又善止血安行”的美誉。三七主产区位于云南东南部和广西西南部,而该地区土壤的砷背景值较全国平均值高,且由于矿石开采、工业生产等导致的该地区的砷污染也较为严重<sup>[2-3]</sup>,三七中的砷含量也存在超标现象<sup>[4-6]</sup>(《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》(WM2-2001)对砷的限量指标为 $\leq 0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。

在现有关于三七中药效成分和砷的含量测定的研究中<sup>[7-12]</sup>,大多考虑原药材、三七制品,而缺乏不同入药方式的差异研究。在实际制药过程中存在多种入药方式<sup>[13]</sup>,加工后成品药中的砷含量与原药材中的砷含量一般并不相同,故有必要考察不同入药方式的三七中的药效成分与砷的含量,以保障三七的安全高效利用。

本实验通过使用原子荧光和 HPLC 的方法,同时对不同方式下三七的砷含量和三七中三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$  进行了测定,并比较不同入药方式对其含量的影响,为制定三七饮片的质量标准及其临床应用提供科学依据。

## 1 材料

Pulverisette-14 型可变速高速旋转粉碎机(德国 Fritsch 公司),Mettler Toledo 型 1/10 万电子分析天平,KQ-250DB 型台式数控超声波清洗器(上海昆山舒美超声仪器有限公司),AFS-830 型双道全自动原子荧光分光光度计(北京吉天仪器公司),Waters1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),S36 型电热平板消解仪(北京莱伯泰科仪器有限公司),1,5 mL 移液器(法国吉尔森 Gilson 公司)。

黄芪生物成分分析标准物质(GBW10028GSB-19)、砷单元素溶液标准物质(GBW08611)及人参皂苷  $R_{g_1}$  对照品(批号 110703-200424)均购自中国计量科学研究院国家标准物质研究中心;人参皂苷  $R_{b_1}$  对照品(批号 110704-200420)、三七皂苷  $R_1$  对照品(批号 110745-200415)均购自中国食品药品检定研究院,甲醇、乙醇、乙腈为色谱纯,水为 Milli-Q 超纯水,其余试剂均为优级纯。

三七植物样品于 2011 年 10 月 27、28 日,采自

云南曲靖市罗平县中和村(N 24°48.947', E 104°12.020', 海拔 1 978 m)以及文山州砚山县干河乡(N 23°42.516', E 104°25.111', 海拔 1 503 m)。取根部,除去表面泥土后于 50 ~ 60 °C 烘干至恒重,冷却至室温后研磨成细粉,装入自封袋中,于玻璃干燥器中密闭保存。

## 2 方法与结果

### 2.1 药效成分测定

**2.1.1 对照品溶液制备** 精密称取人参皂苷  $R_{g_1}$  对照品、人参皂苷  $R_{b_1}$  对照品及三七皂苷  $R_1$  对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含人参皂苷  $R_{g_1}$  0.4 mg、人参皂苷  $R_{b_1}$  0.4 mg、三七皂苷  $R_1$  0.1 mg 的混合溶液。

### 2.1.2 供试品溶液制备

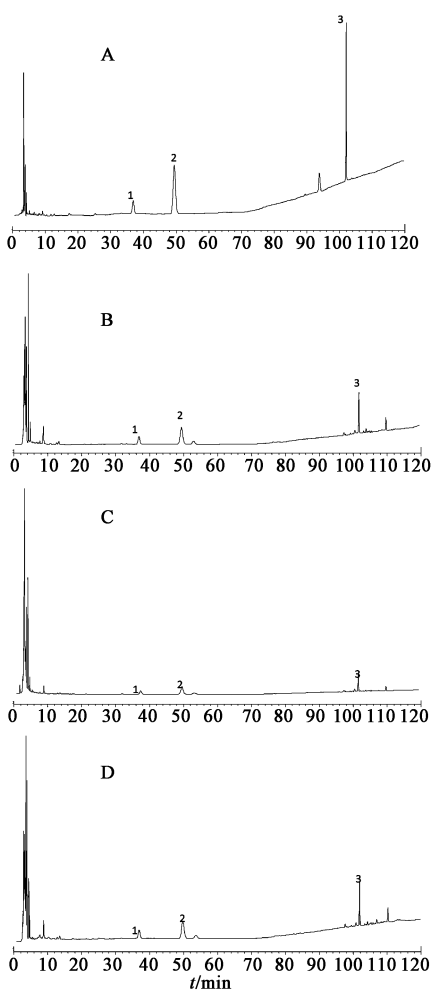
**甲醇提取液:**精密称取样品 0.6 g,置 50 mL 具塞比色管中,加入甲醇,定容至 50 mL,称定质量,超声 30 min,冷却至室温,用甲醇补足减少的质量,摇匀,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜备用。

**水提取液:**精密称取样品 0.6 g,加入 10 倍量水,煎煮 2 次,每次 1 h,过滤,合并两次滤液,加水定容至 50 mL,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜备用。

**乙醇提取液:**精密称取样品 0.6 g,以适量 60% 乙醇浸泡 40 min,以 8 倍量 60% 乙醇回流两次,每次 1 h,过滤,合并两次滤液,加乙醇定容至 50 mL,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜备用。

**2.1.3 色谱条件** Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min, 19% A; 15 ~ 16 min, 19% ~ 20% A; 16 ~ 60 min, 20% A; 60 ~ 120 min, 20% ~ 46% A);进样量 10  $\mu\text{L}$ ,体积流量 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 203 nm,柱温 30 °C。色谱图见图 1,三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$  3 种成分分离度均 > 1.5。

**2.1.4 线性关系考察** 取对照品溶液,分别进样 3, 5, 8, 10, 13, 15  $\mu\text{L}$ ,进行测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,进行线性回归,得回归方程:  $Y_{三七皂苷 R_1} = 5\ 307.971\ 7X - 809.411\ 9$  ( $r^2 = 0.999\ 0$ );  $Y_{人参皂苷 R_{g_1}} = 27\ 243.245\ 3X - 4\ 650.707\ 5$  ( $r^2 = 0.999\ 7$ );  $Y_{人参皂苷 R_{b_1}} = 19\ 245.801\ 9X + 1\ 301.949\ 7$  ( $r^2 = 0.999\ 6$ );表明三七皂苷  $R_1$  在



A. 对照品; B. 甲醇提取液; C. 水提取液; D. 乙醇提取液;  
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 HPLC

0.3 ~ 1.5 μg, 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 在 1.2 ~ 6.0 μg 线性关系良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取供试品溶液分别于 0, 4, 8, 16, 20, 24 h 进样, 按上述色谱条件测定, 结果显示三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 峰面积的 RSD 分别为 3.25%, 3.66%, 3.26%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.1.6 精密度试验** 取对照品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 结果显示三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 峰面积的 RSD 分别为 2.63%, 3.08%, 2.66%, 表明本法精密度良好。

**2.1.7 重复性试验** 取同一样品, 按照 2.1.2 项甲醇制备方法制备 6 份供试液, 在上述色谱条件下分别进样测定。结果显示供试品中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 峰面积的 RSD 分别为 3.87%, 3.86%, 4.01%, 符合要求。

**2.1.8 加样回收率试验** 精密称取样品 6 份, 分别

加入三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的对照品适量, 按照 2.1.2 方法 1 制备, 在上述色谱条件下分别进样测定, 计算回收率。结果显示三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的平均回收率分别为 99.52%, 99.96%, 96.93%, RSD 分别为 1.94%, 2.92%, 1.77%。

**2.1.9 样品测定** 按照 3 种制备方法制备供试品溶液, 每种方法平行制备 5 份, 测定后, 计算样品中 3 种皂苷的含量, 结果见表 1。

表 1 三七药材中有效成分的质量分数 (n=5) %

	三七皂苷 R <sub>1</sub>	人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	人参皂苷 R <sub>b<sub>1</sub></sub>
水提取液	1.460	3.878	2.400
乙醇提取液	1.625	4.589	2.884
甲醇提取液	1.640	4.569	2.869

## 2.2 砷含量测定

**2.2.1 供试品及所需溶液制备** 水提取液: 精密称取三七粉 0.6 g, 加入 10 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并 2 次滤液。

乙醇提取液: 精密称取三七粉 0.6 g, 以 60% 乙醇浸泡 40 min, 以 8 倍量 60% 乙醇回流 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并 2 次滤液。

砷标准溶液系列: 分别移取不同量砷单元素标准溶液 (1 g·L<sup>-1</sup>), 加入适量预还原剂 (5% 硫脲-5% 抗坏血酸), 并用 5% 盐酸定容至 100 mL, 分别制成砷浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 30 μg·L<sup>-1</sup> 的标准系列溶液。

其他溶液: 还原剂溶液 2.0% KBH<sub>4</sub> (W/V), 0.5% KOH (W/V); 载流液 5% HCl (V/V)。

**2.2.2 标准曲线** 在 1.00 ~ 30.00 μg·L<sup>-1</sup> 砷标准系列回归方程为 Y = 58.001 304X - 16.799 783, (r<sup>2</sup> = 0.999 9)。表明在检测范围内, 线性关系良好。

**2.2.3 检出限的确定** 根据仪器设定的测定检出限程序, 连续测定标准空白溶液 25 次和标准系列溶液的荧光信号, 测定结果的 RSD 1.10%, 检出限 0.071 μg·L<sup>-1</sup>, 绝对检出限为 0.729 ng。

**2.2.4 精密度试验** 对黄芪标准物质连续测定 6 次, 比较各测定值的差距, 其 RSD 1.09%。

**2.2.5 重复性试验** 取同一样品平行制备 5 份供试液, 测定其中的砷含量, 比较各测定值的差距, 其 RSD 3.21%。

**2.2.6 稳定性试验** 对同一个样品每隔 1 h 测定 1 次, 连续测定 5 次, 比较各测定值的差距, 其

RSD 1.24%。

**2.2.7 样品测定**<sup>[14]</sup> 三七生粉以及供试品溶液平行制备5份,经湿法消解后,上机测定其荧光强度,计算砷含量,结果显示水提取液、乙醇提取液和生粉中的砷含量平均值分别为0.110 8,0.023 5,0.382 9 mg·kg<sup>-1</sup>。

### 3 结论

实验选取的三七其砷含量符合国家标准(≤2.0 mg·kg<sup>-1</sup>),皂苷含量满足药典规定(三者总量不得少于5.0%)。

水提取液中砷的含量0.110 8 mg·kg<sup>-1</sup>和乙醇提取液的砷含量0.023 5 mg·kg<sup>-1</sup>均比三七粉中的砷含量0.382 9 mg·kg<sup>-1</sup>低,其中水提取液的砷的溶出率为28.74%,与已有研究结果<sup>[15-16]</sup>相似,乙醇提取液的砷的溶出率为6.14%,砷含量更低。

由此说明即使三七原药材中的砷含量超标,其水煎液和乙醇提取液等加工制品的砷含量可能在规定的范围之内,只要在制药过程中经过良好的炮制,砷含量是可以降低的。在三七的制药工艺中可以结合不同的提取方式,在不降低有效成分的同时,降低其中有毒有害物质的含量,提高其质量与安全性。

乙醇回流提取的3种皂苷含量均较水提取高,与甲醇提取的皂苷含量相差不大,同时其砷含量仅为总砷含量的6.14%,是一种极好的提取方法。缺点是提取时间过长,且由于加热温度较高,可能会损失其他有效成分,如三七三醇皂苷在煎煮温度大于60℃时<sup>[17]</sup>,极易降解失效,在以后的研究中可以尝试超声的方式进行加工。

三七入药方式很多,且操作步骤冗长。本文实验中所采用的入药方式为实际工艺的简化,仅仅是对于这一问题的初步探讨,可以作为相应类别入药方式的参考。每一种实际三七入药加工工艺的有效成分及砷的提取率,需要进一步的实验探讨。

### [参考文献]

- [1] 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.  
[2] 张毅. 赤红壤红壤中砷的污染效应临界含量及土壤

- 环境容量研究[J]. 农业环境保护,1992,11(6):260.  
[3] 李卫东. 文山州三七种植区环境质量状况调查[J]. 云南环境科学,2004,23(增刊1):168.  
[4] 郝南明,田洪,苟丽. 三七生长初期不同部位重金属元素含量测定[J]. 微量元素与健康研究,2004,21(5):27.  
[5] 冯光泉,张文斌,陈中坚,等. 三七及其栽培土壤中几种重金属元素含量的测定[J]. 中草药,2003,34(11):1051.  
[6] 阎秀兰,廖晓勇,于冰冰,等. 药用植物三七对土壤中砷的累积特征及其健康风险[J]. 环境科学,2011,32(3):880.  
[7] 杨雪梅,刘旭,刘艳山,等. 高效液相色谱法测定三七中三七皂苷R<sub>1</sub>及人参皂苷Rg<sub>1</sub>,Rb<sub>1</sub>的含量[J]. 时珍国医国药,2005,16(8):710.  
[8] 王雁. HPLC法测定三七药材中3种皂苷的含量[J]. 中南药学,2004,2(6):344.  
[9] 张文斌,陶尚贵,曾鸿超,等. HPLC法测定血塞通胶囊中人参皂苷Rg<sub>1</sub>,Rb<sub>1</sub>和三七皂苷R<sub>1</sub>的含量[J]. 特产研究,2010,(4):49.  
[10] 柳晓娟,林爱军,孙国新,等. 三七中砷的来源及其健康风险初步评价[J]. 环境化学,2009,28(5):770.  
[11] 冷静,魏伯平,杨华蓉,等. 氢化物发生原子荧光法测定三七、三七三醇皂苷及其制剂中的砷[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):54.  
[12] 张文斌,曾鸿超,冯光泉,等. 不同栽培地区的三七总砷及无机砷含量分析[J]. 中成药,2011,33(2):291.  
[13] 云南省卫生厅. 云南省药品标准[M]. 昆明:云南大学出版社,1996.  
[14] 刘桂明,邓义敏,冉亚莉. 氢化物发生-原子荧光法测定三七制品中的砷[J]. 中国卫生检验杂志,2004,14(5):592.  
[15] 苑春刚. 砷及典型区域底泥中重金属形态分析研究[D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心,2005.  
[16] 罗艳,黄文琦,蒋天成,等. 中药煎制前后重金属含量测定及溶出特性研究[J]. 化学分析计量,2011,20(4):48.  
[17] 孟琼,陈治宇. 三七总皂苷提取分离及分析方法研究进展[J]. 承德医学院学报,2010,27(2):198.

[责任编辑 顾雪竹]