

## 三七有效成分提取工艺的比较研究

赵惠莹<sup>1</sup>,刘福强<sup>2</sup>,王艳萍<sup>2</sup>,赵楠<sup>2</sup>,吴艳云<sup>2</sup>,王相阳<sup>1</sup> (1. 延边大学药学院,吉林 延吉 133000; 2. 中国人民解放军第208医院,吉林 长春 130062)

**摘要** 目的:研究三七有效成分的最佳提取工艺。方法:采用水煎煮法、乙醇回流法、超声提取法提取,用超滤法和大孔吸附树脂进行分离,以不同提取方法得到提取物中三七总皂苷、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、R<sub>g</sub> 的含量为考察指标。结果:最佳提取工艺为:75%的乙醇超声提取 3次,每次 2 h。结论:经优选得到最佳提取工艺,有效成分含量高,工艺简便。

**关键词** 三七;正交试验;提取工艺;含量测定

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2009)03-0205-04

## Comparative study of extraction process on the effective components of *Panax notoginseng*

ZHAO Hui-ying<sup>1</sup>, LIU Fu-qiang<sup>2</sup>, WANG Yan-ping<sup>2</sup>, ZHAO Nan<sup>2</sup>, WU Yan-yun<sup>2</sup>, WANG Xiang-yang<sup>1</sup> (1. College of pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. 208th Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

**ABSTRACT Objective:** To study optimum technology of extracting the active components of *Panax notoginseng*. **Methods:** Extracting the components by hot water, ethanol reflux and ultrasonic extraction method, then separating with ultrafiltration and macroporous adsorption resin. The total saponins yield, and ginsenoside R<sub>b1</sub>, R<sub>g</sub> contents extracted from of *Panax notoginseng* were determined. **Results:** The optimum extraction for *Panax notoginseng* is ultrasound extraction three times per day and two hours for each time. **Conclusion:** The best extraction process could get the largest amount of active components, and the simple process is simple.

**KEY WORDS** *Panax notoginseng*; orthogonal design; extraction process; content determination

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根,具有散瘀止血,消肿定痛的作用,是传统止血化瘀良药<sup>[1]</sup>。其双向调节作用,为人们所共识,使用日趋广泛。在治疗心血管疾病方面的单味药和复方药已有:口服剂、注射剂,外用止血也不断出现新的剂型。笔者研究从三七中提取三七总皂苷和人参皂苷 R<sub>b1</sub>、R<sub>g</sub> 的最佳提取工艺,为企业化大生产提供了优良的工艺条件。

### 1 仪器、材料与试剂

**1.1 仪器** SPD-10AV 液相色谱仪(日本 Shimadzu); N2000 色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程有限公司); Cary 50 Conc 型紫外分光光度计(美国 VARIAN 公司); HP-8452A 型紫外分光光度计(美国惠普公司); CQX25-06 型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司); TP10-20 型中空纤维膜过滤器(天津膜天膜工程技术有限公司)。

**1.2 材料** 三七(吉林省北药药材加工有限公司),经嘉兴医学院王俊博士鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根; D<sub>101</sub> 大孔吸附树脂(天津市北联精细化学品开发有限公司,批号 20070528)。

**1.3 试剂** 人参皂苷 R<sub>g</sub> (中国药品生物制品检定所,批号 110703-200424); 人参皂苷 R<sub>b1</sub> (中国药品生物制品检定所,批号 110703-200420); 三七总皂苷(中国药品生物制品检定所,批号 870-20001); 水为重蒸水(实验室自制); 甲醇、乙腈为色谱纯; 高氯酸、冰醋酸、乙醇、硫酸均为分析纯。

### 2 方法与结果<sup>[2-4]</sup>

#### 2.1 超声提取法正交试验、验证和提取方法

**2.1.1 超声提取正交试验**, 选用 L<sub>9</sub> (3<sup>3</sup>) 因素水平表, 结果见表 1、2、3。

由直观分析可知,影响提取效果因素的顺序为:乙醇浓度 > 超声提取时间 > 超声提取次数; 经方差分析可知,乙醇浓度、超声提取时间、超声提取次数

对提取均有显著性影响。故选择最佳工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即 75%的乙醇超声提取 3次,每次 2 h。

**2.1.2 验证实验** 称取三七粗粉 20 g,分别按超声提取方法中最佳提取工艺 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>和直观较佳提取工艺 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>进行提取,结果见表 4。

表 1 超声提取法因素水平

因素水平	A	B	C
	超声时间 (h)	乙醇浓度 (%)	超声次数
1	1	60	1
2	2	75	2
3	3	85	3

表 2 超声提取三七有效成分正交试验结果

试验号	A	B	C	三七总皂苷提取率 (%)	占总皂苷含量 (%)		权重值
					人参皂苷 R <sub>g1</sub>	人参皂苷 R <sub>b1</sub>	
1	1	1	1	93.23	6.24	52.26	71.77
2	1	2	2	100.29	8.74	66.72	85.63
3	1	3	3	95.32	11.29	47.43	79.65
4	2	1	2	87.19	9.68	47.81	72.76
5	2	2	3	101.12	16.43	59.59	97.24
6	2	3	1	92.28	9.63	57.51	79.95
7	3	1	3	80.06	13.02	37.67	71.03
8	3	2	1	97.81	9.75	57.15	82.19
9	3	3	2	84.04	9.01	47.84	71.21
K <sub>1</sub>	237.05	217.81	222.91				
K <sub>2</sub>	250.4	264.61	230.50				
K <sub>3</sub>	225.78	230.80	248.82				
$\bar{K}_1$	79.02	72.60	77.97				
$\bar{K}_2$	83.47	88.20	76.83				
$\bar{K}_3$	75.26	76.93	82.94				
R	8.21	15.60	6.12				

表 3 方差分析表

方差来源	方差平方和	自由度	均方	F值	显著性 (P)
A	101.30	2	50.65	33.06	P < 0.05
B	389.16	2	194.58	127.00	< 0.05
C	63.31	2	31.66	20.66	< 0.05
误差	5.41	2			
总计	582.12	8			

表 4 三七最佳提取工艺验证实验结果

实验	三七总皂苷提取率 (%)	占总皂苷含量 (%)		权重值
		人参皂苷 R <sub>g1</sub>	人参皂苷 R <sub>b1</sub>	
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	101.08	16.14	55.54	96.12
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	99.87	8.71	66.68	85.52

试验证实,正交筛选最佳工艺,得率最高,具有稳定性。

**2.1.3 超声波提取方法**<sup>[5]</sup> 称取三七粗粉 20 g,经正交选择,用 75%的乙醇超声提取 3次,每次 2 h,提取后回收乙醇,剩余提取液用蒸馏水稀释,使提取液中乙醇含量不超过 0.5%,再用中空纤维膜过滤器进行超滤,获取 2 000分子量以下的超滤液(三七皂苷的分子量在 2 000以下),浓缩,上 D<sub>101</sub>大孔吸附树脂柱,用水洗至流出液无色,改用 75%的乙醇洗脱,收集 75%的乙醇洗脱液<sup>[6,7]</sup>,减压浓缩,真空干燥得三七总提取物(测总皂苷、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、R<sub>g</sub>的含量),结果见表 5。

**2.2 水煎煮方法**<sup>[8]</sup> 称取三七粗粉 20 g,选择煎煮时间、用水倍数、煎煮次数三因素,应用 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验表实施方案,优选出最佳提取工艺:10倍量的水煎煮 2次,每次 1 h。水提取液用中空纤维膜过滤器进行超滤,以下按 2.1.3项获取 2 000分子量以下的超滤液开始同法操作,结果见表 5。

**2.3 乙醇回流提取方法** 称取三七粗粉 20 g,选择回流时间、乙醇浓度、回流提取次数三因素,应用 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验表实施方案,优选出最佳提取工艺:75%的乙醇回流提取 2次,每次 1 h。提取后回收乙醇,剩余提取液用蒸馏水稀释,使乙醇含量不超过 0.5%,再用中空纤维膜过滤器进行超滤,以下按 2.1.3项获取 2 000分子量以下的超滤液开始同法操作,结果见表 5。

**2.4 提取工艺的得率比较** 用上述三种提取方法,即水煎煮法、乙醇回流法、超声提取法三法的最佳工艺提取结果进行比较,见表 5。

表 5 三七有效成分不同提取方法结果比较

提取方法	三七总皂苷提取率 (%)	占总皂苷含量 (%)		权重值
		人参皂苷 R <sub>g1</sub>	人参皂苷 R <sub>b1</sub>	
水煎煮法	83.29	10.74	44.12	88.3
乙醇回流法	80.07	14.08	55.18	89.47
超声提取法	101.12	16.43	59.59	97.24

由表 5 可知,三种提取方法中超声提取方法的提取效果最好,即应采取超声提取方法中的最佳工艺  $A_2B_2C_3$ ,即 75%的乙醇超声提取 3 次,每次 2 h。

### 3 含量测定

#### 3.1 三七总皂苷的含量测定

**3.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取三七总皂苷对照品 5 mg,用无水乙醇定容至 50 mL 容量瓶中,做对照品溶液。

**3.1.2 供试品溶液的制备<sup>[9]</sup>** 称取样品适量,用无水乙醇定容在 10 mL 容量瓶中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,弃去初滤液,选择续滤液。

**3.1.3 线性关系考察** 精密称取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、4.0  $\mu\text{L}$ ,分别注入具塞试管中,去塞,水浴蒸去乙醇,每只试管分别精密加入新配制的 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,摇匀,置 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴中加热 15 min,取出,用冷水迅速冷却,加冰醋酸溶液 5 mL,摇匀,在 560 nm 处测吸收度  $A$ ,以吸收度  $A$  为纵坐标 ( $Y$ ),浓度  $C$  为横坐标 ( $X$ ),绘制标准曲线,得回归方程,  $Y = 0.01366X + 0.0074$ ,  $r = 0.9990$ ,结果表明,三七总皂苷在 3.3 ~ 66.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内线性关系良好。

**3.1.4 稳定性试验** 取供试品溶液 0.1 mL,按 3.1.3 项中从加 5% 香草醛冰醋酸比色法显色后操作,在 560 nm 处每隔一段时间测定吸收度  $A$ ,在显色 10 min 后  $A$  趋于稳定,时间约为 1 h 内无变化,因此采用 5% 香草醛冰醋酸比色法显色,测定时间应在 1 h 内完成。结果:1 h 内稳定,与文献报道一致。

**3.1.5 回收率试验** 取已知总皂苷含量的样品 9 份,精密称定,分别准确加入 1.2、1.5、1.8 mL 对照品溶液 (0.585 mg/mL),照 3.1.3 项下方法作加样回收试验,分别测定其含量,得平均回收率为 99.18%,  $RSD = 0.92\%$ 。

#### 3.2 人参皂苷 $R_g$ 的测定

**3.2.1 色谱条件** 色谱柱: Agilent Tc- $C_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  250 mm); 检测器为紫外检测器; 流动相: 乙腈-水 (40:60); 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

**3.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取人参皂苷  $R_g$  标准品 9.01 mg,用水定容至 100 mL 容量瓶中,作为对照品溶液。

**3.2.3 供试品溶液的制备** 精密称取三七提取物 4.13 mg,用水定容至 10 mL 容量瓶中,用 0.45

$\mu\text{m}$  滤膜过滤,弃去初滤液,备用续滤液,作为供试品溶液。

**3.2.4 线性关系考察** 取对照品溶液适量,用 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤分别量取 2、4、8、12、16、20 mL,置 25 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,取 20  $\mu\text{L}$  进样,以浓度  $C$  为横坐标 ( $X$ ),峰面积值为纵坐标 ( $Y$ ) 进行线性回归,得回归方程为  $Y = 5516.0189X + 28804.6932$ ,  $r = 0.9999$ ,结果表明,人参皂苷  $R_g$  在 0.1802 ~ 1.802 mg 范围内线性关系良好。

**3.2.5 精密度试验** 取 3.2.2 项下溶液于测定条件下进样 20  $\mu\text{L}$ ,重复进样 6 次,色谱峰  $RSD = 1.64\%$ 。

**3.2.6 稳定性试验** 取 3.2.3 项下溶液分别于 0、2、4、6、8、12、24 h,进样 20  $\mu\text{L}$ ,色谱峰的  $RSD$  为 1.54%,表明样品在 24 h 内稳定。

**3.2.7 重现性试验** 取 5 份三七总皂苷粗品,按 3.2.3 项供试品溶液的制备方法制备,分别依法测定,得  $RSD$  为 1.66%,表明本试验重现性良好。

**3.2.8 回收率试验** 称取同一已知含量样品 9 份,分 3 组,每组分别准确加入 1.2、1.5、1.8 mL 对照品溶液 (0.554 mg/mL),按 3.2.4 项下方法制备加样回收试样,分别测定其含量,得平均回收率为 98.6%,  $RSD = 1.34\%$ 。

#### 3.3 人参皂苷 $R_b$ 的含量测定

**3.3.1 色谱条件** 色谱柱: Agilent Tc- $C_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  250 mm); 检测器为紫外检测器; 流动相: 乙腈-水 (40:60); 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

**3.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取人参皂苷  $R_b$  标准品 13.25 mg,用水定容于 100 mL 容量瓶中,作为对照品溶液。

**3.3.3 供试品溶液的制备** 精密称取三七提取物 3.16 mg,用水定容至 10 mL 容量瓶中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,弃去初滤液,备用续滤液,作为供试品溶液。

**3.3.4 线性关系考察** 取对照品溶液适量用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,分别量取 2、3、5、7、10 mL,置 25 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,取 20  $\mu\text{L}$  进样,以浓度  $C$  为横坐标 ( $X$ ),峰面积值为纵坐标 ( $Y$ ) 进行线性回归,得回归方程为  $Y = 274461.77X - 146545.33$ ,  $r = 0.9998$ ,结果表明,人参皂苷  $R_b$  在 1.06 ~ 5.31  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

**3.3.5 精密度试验** 精密称取 3.3.2 项下的对照品溶液,重复进样 6 次,色谱峰的  $RSD$  为 1.43%。

**3.3.6 稳定性试验** 取 3.3.3项下供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,测得  $RSD$  为 1.21%,表明样品在 24 h 内稳定。

**3.3.7 重现性试验** 用同种方法提取 5份三七总皂苷粗品,按 3.3.3项下供试品溶液的制备方法制备,分别依法测定,得  $RSD = 0.48\%$ ,说明本试验重现性良好。

**3.3.8 回收率试验** 称取同一已知含量样品 9份,分三组,每组分别准确加入 1.2、1.5、1.8 mL 对照品溶液 (0.598 mg/mL),按 3.3.4项下方法制备加样回收试样,分别测定其含量,得平均回收率为 99.3%, $RSD = 1.06\%$ 。

## 4 讨论

**4.1** 将样品上大孔吸附树脂后,以水洗脱至无色澄清,先后用 30%、50%、70%、95%的乙醇洗脱,并分别收集洗脱液,制成供试品溶液,发现 75%乙醇的洗脱液色谱峰的强度最大,故选择水洗后,再用 75%的乙醇洗脱。

**4.2** 三七总皂苷的含量采用分光光度法进行测定时,应注意控制加热温度和加热时间,当温度高于 60 长时间加热时,糖类吸收干扰显著,总皂苷的测定以 60 ,加热 15 min 为宜,三七总皂苷显色在 1 h 内稳定,故显色后均要求 1 h 内测定。

**4.3** 本研究认为超声提取法最好:方法简捷,只需 6 h 即可完成全部提取过程。提取率高,总皂苷提取率可达到 99%以上,杂质减少,剂量减小,使用提取物体积最小,故本试验方法的提取物适于做现代制剂如缓释片、速崩片等。

## 参考文献:

- [1] 魏均娴,杜元冲.三七——现代科学研究与应用[M].昆明:云南科技出版社,1996:31.
- [2] 谢茵,刑桂琴.三七提取液中三七总皂苷分离纯化工艺研究[J].山西医科大学学报,2006,37(6):613.
- [3] 郑明,楼宜嘉.三七总皂苷分离纯化工艺研究[J].中国现代应用药学杂志,2007,24(2):118.
- [4] 魏风玲,朱春波,朱丽萍,等.三七总皂苷提取工艺优选[J].中国中药杂志,2000,25(12):722.
- [5] 张宪臣,王淑敏,陈光,等.人参总皂苷超声提取工艺的研究[J].现代中药研究与实践,2008,19(6):55.
- [6] 章观德.吸附树脂法测定三七及其制剂冠心宁总皂苷[J].中草药,1981,12(11):23.
- [7] 吴清,陈贤春.大孔吸附树脂法富集人参叶中人参总皂苷的工艺研究[J].北京中医药大学学报,2006,29(5):344.
- [8] 刘向前.三七总皂苷水提取工艺的优化试验[J].中国药师,2006,9(3):215.
- [9] 常新全,丁丽霞.中药活性成分分析手册[M].北京:学苑出版社,2006,2:63.

收稿日期:2009-03-30

(上接第 169 页)

- [16] Yokoyama A, Sato Y, Nodasaka Y, *et al* Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats[J]. Nano Lett, 2005, 5: 157.
- [17] Muller J, Huaux F, Moreau N, *et al* Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207: 221.
- [18] Zhang LW, Zeng L, Barron AR, *et al* Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes [J]. Int J Toxicol, 2007, 26(2): 103.
- [19] Sayes CM, Liang F, Hudson JL, *et al* Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro[J]. Toxicol Lett, 2006, 161: 135.
- [20] Pulskamp K, Diabate S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants [J]. Toxicol Lett, 2007, 168(1): 58.
- [21] Chou CC, Hsiao HY, Hong QS, *et al* Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model[J]. Nano Lett, 2008, 8(2): 437.
- [22] Shama CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, *et al* Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2007, 7(7): 2466.
- [23] Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, *et al* Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis[J]. Br J Pharmacol, 2005, 146: 882.
- [24] Li Z, Huldeman T, Salmen R, *et al* Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(3): 377.
- [25] Nel A, Xia T, Maedler L, *et al* Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311: 622.
- [26] Wang HF, Wang J, Deng XY, *et al* Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2004, 4: 1019.
- [27] Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, *et al* Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 3357.

收稿日期:2008-05-27