

半仿生酶法提取三七皂苷工艺研究

宋宏新,刘静,张彦娟*

(陕西科技大学生命科学与工程学院,陕西西安 710021)

摘要:目的 研究酶法及半仿生法从三七中提取皂苷的最佳工艺。方法 以提取液中总皂苷得率和干膏收率为指标,对乙醇回流法、纤维素酶酶解、果胶酶酶解、 α -淀粉酶酶解、复合酶酶解和半仿生 α -淀粉酶酶解提取法进行比较,并对半仿生酶法进行了正交试验优化。结果 该法的最佳提取条件为温度 70℃,时间 2.5 h,料液比为 1:10。结论 半仿生 α -淀粉酶酶解提取三七皂苷的方法最经济有效。

关键词:三七;皂苷;半仿生法;酶法

中图分类号:R286.4;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)06-0905-03

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥块根,具有散瘀止血,消肿定痛的作用^[1]。因三七药材含有大量的淀粉多糖,传统的提取方法水提醇沉法,在水煎煮过程中容易糊化,难于滤过^[2],醇沉后由于沉淀的吸附作用,皂苷损失较大,提取率低;渗漉法虽然提取率较高,但溶剂消耗过大,提取周期较长^[3]。而酶法提取具有活性高,专一性强,条件温和,不污染环境,对药效成分的保存率、提取率高等优点。半仿生法则是模拟口服给药及药物经胃肠道转运的原理,将药料先经酸再经碱提取处理,是为经消化道给药的中药制剂设计的一种提取工艺^[4]。因此,本实验对酶法和半仿生法提取三七皂苷的工艺进行研究。

1 实验材料

752 分光光度计(上海精密)。

三七药材产自云南文山,购于西安市药材市场,经西北大学生命科学学院中药教研室鉴定为三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥块根,含总皂苷约为 13%;人参皂苷 Rg₁ 对照品购自陕西省药品检验所,质量分数大于 95%;纤维素酶(酶活为 1950 U/g)、果胶酶(酶活为 526 U/g)、 α -淀粉酶(酶活为 3913 U/g);D-101 大孔树脂(西安电力树脂厂);半乳糖醛酸、香草醛、高氯酸、乙醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 三七皂苷的测定

2.1.1 标准曲线的制备:精密称取干燥至恒重的人参皂苷 Rg₁ 对照品 5 mg 于 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度。精密量取 10、20、40、60、80、100 μ L 置 10 mL 具塞试管中,水浴挥发溶剂,各加入新配制的 5% 的

香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL 于 60℃ 水浴恒温 15 min,立即置于冰水中冷却 5 min,加入冰醋酸 5 mL 摇匀,放置 10 min,以试剂空白作参比,测定在 545 nm 下的吸光度(《中国药典》2005 年版一部附录 V 分光光度法)。以吸光度为横坐标,三七皂苷质量浓度为纵坐标绘制标准曲线,回归得方程 $C=0.1997A+0.0025$, $R^2=0.9992$ 。

2.1.2 测定方法:取一定量的三七提取液,采用 D-101 树脂进行分离,提取液上柱后先水洗,再收集 70% 乙醇洗脱液,合并提取液后浓缩,用比色法定量测定,计算总皂苷得率(总皂苷得率 = 皂苷质量/加入三七干粉总量 $\times 100\%$)。

2.2 干膏收率的计算:精密量取各提取液 50 mL 于水浴上挥干,然后置恒温干燥箱中 105℃ 烘 3 h 至恒重,于干燥器中冷却 30 min,称定质量,即为提取物总量,计算干膏收率(干膏收率 = 提取物总量/加入三七干粉总量 $\times 100\%$)。

2.3 不同提取方法比较

2.3.1 乙醇回流法:取三七粉 10 g,加入 8 倍量 70% 的乙醇浸泡 30 min,加热回流 1.5 h,滤过,滤渣再加入 5 倍量 70% 乙醇回流 1.5 h,滤过,合并两次滤液,定容至 200 mL,即得。

2.3.2 酶解法提取:取三七粉 10 g,加入 50 mL 蒸馏水冷浸 24 h,按每克生药加入一定量的酶(U/g),不同酶的加入量及调节的 pH 值见表 1,50℃ 水浴酶解 2 h,酶解期间时时搅拌,酶解后滤过,药渣加入 70% 乙醇回流 2 次,合并滤液定容至 200 mL,即得。各种酶提取基本程序相同,仅是酶的加入量及作用 pH 值不同,复合酶是按每克生药加入 14 U 纤维素酶和 21 U 果胶酶的量。

表 1 不同酶解法提取工艺

Table 1 Comparison of extracting process by four zymolysis method

酶解法	加酶量/(U·g ⁻¹)	酶解 pH 值
纤维素酶	15	4.5
果胶酶	140	4.5
-淀粉酶	200	6.0
复合酶	15+21	4.5

2.3.3 半仿生-淀粉酶酶解法:根据仿生学原理,人体胃,小肠,大肠的体液最佳 pH 值为 2.0、7.5、8.3^[4]。取三七粉 10 g,加柠檬酸缓-磷酸氢二钠缓冲液 70 mL,pH 值调到 2.0,50 恒温振荡 2 h,85 水浴糊化后 pH 值调到 6.0,再加入 300 U 的 -淀粉酶于 60 酶解 40 min 后滤过,滤渣依次加入 pH 值分别为 7.5、8.3 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液作为提取液,80 水浴 1.5 h,合并 3 次提取液,定容至 200 mL,即得。

2.3.4 结果:将上述各种方法所得的提取液,测定总皂苷得率和干膏收率,结果见表 2。结果显示,与乙醇回流法相比,各种酶的加入均提高了总皂苷得率和干膏收率。各酶解提取方法对总皂苷得率的影响是:半仿生-淀粉酶 > 复合酶 > 纤维素酶 > -淀粉酶 > 果胶酶;且半仿生-淀粉酶法的转移率高达

表 3 半仿生-淀粉酶酶解法正交试验及其结果

Table 3 Orthogonal design and results of semi-bionic -amylase zymolysis

试验号	A 温度/	B 时间/h	C 料液比/(g·mL ⁻¹)	D(空白列)	总皂苷得率/%	干膏收率/%	综合评分
1	60	1.5	1 10		10.87	48.24	91.72
2	60	2.0	1 14		11.26	49.24	94.28
3	60	2.5	1 18		11.77	50.24	97.32
4	70	1.5	1 14		11.34	49.28	94.64
5	70	2.0	1 18		12.37	51.28	100.76
6	70	2.5	1 10		13.01	52.76	104.80
7	80	1.5	1 18		11.98	55.48	103.40
8	80	2.0	1 10		11.02	48.92	93.00
9	80	2.5	1 14		11.18	49.12	93.84
K ₁	283.32	289.76	289.52	286.32			
K ₂	300.20	288.04	282.76	302.48			
K ₃	290.24	295.96	301.48	284.96			
k ₁	94.44	96.59	96.51	95.44			
k ₂	100.07	96.01	94.25	100.83			
k ₃	96.75	98.65	100.49	94.99			
R	5.63	2.64	6.24	5.84			

直观分析得出最佳的提取条件是 A₂B₃C₃,由于料液比的极差 R 最大,对试验影响最大。综合考虑,最佳实验方案是 A₂B₃C₁,即水浴温度 70,提取时间 2.5 h,料液比为 1 10。

2.5 验证试验:按半仿生-淀粉酶酶解法工艺进行 3 批药材的验证试验,结果见表 4。可以看出半仿生-淀粉酶酶解法工艺稳定,具有可行性。

表 2 提取方法的比较结果

Table 2 Comparison of extracting methods

提取方法	总皂苷		干膏	
	得率/%	RSD/%	收率/%	RSD/%
乙醇回流法	8.38	0.56	38.58	6.81
-淀粉酶	8.80	0.26	42.95	0.26
纤维素酶	9.39	1.25	42.58	0.68
果胶酶	8.78	0.78	44.64	0.94
复合酶	10.71	0.42	49.85	0.91
半仿生-淀粉酶	11.96	0.23	51.92	0.56

92%。对干膏收率的影响是:半仿生-淀粉酶酶解法 > 复合酶 > 果胶酶 > -淀粉酶 > 纤维素酶。

故以总皂苷得率和干膏收率为指标,进一步优化半仿生-淀粉酶酶解法提取工艺。

2.4 半仿生-淀粉酶酶解法正交试验优化工艺:在对溶剂和提取方法初步选择后,选定提取温度、时间和料液比作为考察的 3 个因素,每个因素各取 3 个水平:水浴温度(60、70、80),提取时间(1.5、2.0、2.5 h),料液比(1 10、1 14、1 18 g/mL)。采用 L₉(3⁴)正交表进行试验,以总皂苷得率和干膏收率的综合评分(综合评分 = 总皂苷得率 × 4 + 干膏收率 × 1)为考察指标,考察因素间的最佳配比,结果见表 3。

表 4 验证试验结果

Table 4 Verification of three batches of medicinal materials

批 次	皂苷得率/%	干膏收率/%
1	11.86	49.48
2	12.14	15.33
3	12.02	50.72

3 讨论

由于三七药材中淀粉的含量高, -淀粉酶可以迅速水解淀粉,再结合半仿生提取,模拟了肠胃环境,为药效成分创造了更好的溶出环境。提取过程中由于淀粉酶可以很快降低糊化淀粉的黏度,不仅有利于传质溶出,还可提高原料药的起始投放浓度,所以半仿生-淀粉酶法可以显著节约时间,提高生产效率;又由于其直接用弱酸和弱碱溶液提取,可以减少乙醇用量;另外,-淀粉酶在食品工业普遍使用,食用安全性良好并且价格低廉,所以,综合考虑提取效果及经济效益,半仿生-淀粉酶提取法是最佳提取工艺。

实验结果分别以提取液中总皂苷得率和干膏收率为考察指标,总皂苷得率可以直接评价该工艺提取粗三七皂苷的能力。而干膏收率一方面可直观地

表明酶解后产物量增多,如酶解产生的小分子(其他水溶性物质,糖、糊精等),但高提取物得率也表明总提取物中必定存在较多的杂质,甚至是非药效成分。这些通过酶作用后与三七皂苷共同被提取的小分子化合物,是否会与三七皂苷的药效产生协同作用,使传统中药复方多组分更有效,这些都有待于进一步的成分解析及药效学研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 唐红芳,毛丽珍,徐世芳.正交试验法研究三七提取工艺[J].中草藥,2001,32(1):26-28.
- [3] 周琳,李元波,曾英.超声酶法提取三七总皂苷的研究[J].中成藥,2006,28(5):642-645.
- [4] 陈晓娟,周春山.酶法及半仿生法提取杜仲叶中绿原酸和黄酮[J].精细化工,2006,23(3):257-260.

HPLC法测定注射用双黄连中黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸

阎 姝¹,田书霞¹,徐茂玲²,李惠芬^{2*}

(1.天津市南开医院药剂科,天津 300100; 2.天津医科大学药学院,天津 300070)

摘要:目的 建立同时测定注射用双黄连中黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸5种有效成分的方法。方法 高效液相色谱法。Phenomenex C₁₈色谱柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-1%冰醋酸水溶液,作梯度洗脱;检测波长为327 nm;体积流量为1 mL/min;柱温为40℃,灵敏度为0.100 0 AUFS。结果 在筛选色谱条件下,测定了注射用双黄连中的黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸5种有效成分。结论 本方法简便、快速、准确、可靠,可用于注射用双黄连中有效成分的测定。

关键词:注射用双黄连;黄芩苷;野黄芩苷;黄芩素;咖啡酸;绿原酸;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2009)06-0907-03

注射用双黄连由金银花、黄芩和连翘提取精制而成,用于治疗细菌和病毒感染引起的疾病,临床应用广泛^[1]。《中国药典》2005年版一部注射用双黄连(冻干)项下采用3个不同的色谱条件分别对绿原酸、黄芩苷和连翘苷进行了测定。另有文献采用HPLC法同时测定该制剂中3个组分^[2]。本实验采用梯度洗脱高效液相色谱法对注射用双黄连中黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸5种有效成分进行测定,方法简单易行,测定结果准确可靠,为注射用双黄连的质量控制提供了一种有效的方法。

1 仪器与试剂

Agilent1100全自动液相色谱仪系统(四元梯度泵,二极管检测器)(美国安捷伦公司);注射用双黄连(冻干粉针)(哈药集团中药二厂);黄芩苷(批号715-8501)、野黄芩苷(批号110842-200605)、黄芩素(批号111595-200604)、咖啡酸(批号110885-200102)、绿原酸(批号110753-200413)对照品均由中国药品生物制品检定所提供;水为纯化水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Phenomenex C₁₈色谱柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-1%冰醋酸水溶

* 收稿日期:2008-12-15

作者简介:阎 姝(1968—),女,天津市人,副主任药师,博士,南开医院药剂科副主任,研究方向:中药及中药制剂分析、临床药学。

E-mail: ysyx0234@126.com

*通讯作者 李惠芬 E-mail: lihui fen@tjmu.edu.cn