

三七总皂苷含量测定及提取工艺优选

魏凤玲,高娟(中日友好医院药学部,北京 100029)

摘要:目的 比较不同对照品对三七总皂苷含量测定的影响和优选提取工艺。方法 分别以人参二醇和三七皂苷 R₁ 作对照品,比色法测定均匀设计法安排的各组试验的三七总皂苷含量,同时优选溶剂种类、溶剂用量、乙醇浓度、回流时间、三七药材粒度的三七总皂苷提取工艺条件。结果 以人参二醇和三七皂苷 R₁ 为对照品,比色法测定三七总皂苷总含量相近,组间无明显差异。结论 比色法测定三七总皂苷含量,可以用人参二醇或三七皂苷 R₁ 作对照品,优选的三七总皂苷提取工艺,对大生产工艺参数的选择提供较为可靠的实验数据。

关键词:三七总皂苷;提取;均匀设计

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)07-0623-03

中药三七主要有效成分为三七皂苷类化合物。据报道多以人参二醇或三七皂苷 R₁ 等作对照品,比色法测定其三七总皂苷含量,对此,有人提出疑问用不同的对照品其结果是否一致,为此,本实验分别以人参二醇和三七皂苷 R₁ 作对照品,比色法测定其三七总皂苷含量,同时采用均匀设计安排实验,考察提取时间,提取次数,乙醇浓度,乙醇用量,三七粒度五个因素对三七总皂苷提取效率影响。

1 仪器与试剂

UV-3000型双光束双波长紫外分光光度计(日本岛津);人参二醇对照品(批号:0702-9707)、三七皂苷 R₁ 对照品(0745-9804)均为中国药品生物制品检定所提供,并经 105℃干燥处理;其他试剂均为分析纯;大孔吸附树脂,ZTC-I型,天津正天成澄清技术有限公司生产;三七药材购于北京市药材公司,经中国药品生物制品检定所鉴定为五加科三七 [*Panax notoginseng*(Burk.) F. H. Chen] 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取人参二醇和三七皂苷 R₁ 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.929 mg 和 0.962 mg 的溶液,既得。

2.2 线性范围考察

分别精密称取人参二醇和三七皂苷 R₁ 对照品适量,加甲醇制成人参二醇标准储备液(0.929 mg·mL⁻¹)和三七皂苷 R₁ 标准储备(0.962 mg·mL⁻¹)。分别精密吸取 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 μL,分别置磨口具塞试管中,热水浴挥干溶剂,加 5%香草醛-冰醋酸溶液(新配制)0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,于 60℃恒温水浴 15 min,立即置冰水浴内冷却,精密移取冰醋酸 5 mL,摇匀,以相应试剂为空白,分别在 560 nm 波长处测定 A 值^[1],结果见表 1、表 2。数据经回归处理,得直线回归方程:(1)人参二醇 = 0.072 8X + 0.033 7, r = 0.999 2 人参二醇浓度在 9.29 ~ 55.74 μg·mL⁻¹ 之间呈良好的线性关系。(2)三七皂苷 R₁ = 9.334 3X + 0.666 7, r = 0.999 4。三七皂苷 R₁ 浓度在 9.62 ~ 57.72 μg·mL⁻¹ 之间呈良好的线性关系。

表 1 人参二醇线性范围考察

实验号	取样量 /μL	剂量 /μg	吸收度 /A
1	10	9.29	0.045
2	20	18.58	0.112
3	30	27.87	0.176
4	40	37.16	0.257
5	50	46.45	0.328

表 2 三七皂苷 R₁ 线性范围考察

实验号	取样量 /μL	剂量 /μg	吸收度 /A
1	10	9.62	0.019
2	20	19.24	0.048
3	30	28.86	0.082
4	40	38.48	0.108
5	50	48.10	0.138

2.3 精密度试验

分别精密称取人参二醇和三七皂苷 R₁ 对照品溶液 30.0 μL,按上述 2.2 项下操作,重复 6 次,结果 RSD 为 0.23% 和 0.31%。

2.4 提取工艺优选

实验考察提取时间(0.5~3.5 h),提取次数(1~4 次),乙醇浓度(0~95%),乙醇用量(4~13 倍),三七粒度(0.2~8 mm)五个因素对三七总皂苷提取效率影响(见表 3 和表 4)。选择 U11(11)表,将对应的各因素水平数填入表中,分别取三七药材 5.0 g,按照均匀设计安排表进行试验^[5]。记录各组提取液的体积,精密吸取各试验号提取液总体积的 1/10(相当于生药量 0.5 g)量,置小烧杯中,水浴挥干溶剂,(95℃~100℃),热水溶解至 1:3,溶液与硅胶 G(薄层色谱用)0.3 g 拌匀,置已预处理好的大孔吸附树脂柱上端,用蒸馏水 40 mL 洗去糖类杂质(流出液无 molish 反应),流速 0.5 mL·min⁻¹;再以 50%乙醇洗脱三七皂苷类物质,流速 0.5 mL·min⁻¹,分段收集洗脱液。用薄层色谱检视(氯仿-甲醇-水 65:35:10 下层为展开剂,上行法展开,取出,晾干,10%硫酸乙醇液显色,105℃烘 8 min,观察斑点),至无皂苷斑点为止。合并洗脱液,定容至 200 mL。精密吸取 0.4~0.6

mL(相当三七总皂苷约 50 μg)^[2],热水浴挥干溶剂,加 5%香草醛-冰醋酸溶液(新配制)0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,于 60℃恒温水浴 15 min,立即置冰水浴内冷却,精密移取冰醋酸 5 mL,摇匀,以相应试剂为空白,分别在 560 nm 波长处测定 A 值^[1]。结果分别代入人参二醇和三七皂苷 R₁ 线性回归方程,分别计算出三七总皂苷百分含量,见表 3 表 4^[1]。

表 3 因素与水平

	X1	X2	X3	X4	X5
编号	回流时间	回流次数	乙醇浓度	乙醇用量	三七粒度
	/h	次	/%	倍	/mm
1	0.5	1.0	0	4.0	0.20
2	1.0	2.0	15.0	5.0	0.45
3	1.5	3.0	25.0	6.0	0.90
4	2.0	4.0	35.0	7.0	1.25
5	2.5	1.0	45.0	8.0	2.00
6	3.0	2.0	55.0	9.0	3.00
7	3.5	3.0	65.0	10.0	4.00
8	1.0	4.0	75.0	11.0	5.00
9	2.0	1.0	85.0	12.0	6.00
10	3.0	3.0	95.0	13.0	8.00

表 4 实验安排与结果

编号	回流时间	回流次数	乙醇浓度	乙醇用量	三七粒度	三七总皂苷 /%	
	/h	次	/%	倍	/mm	Y1	Y2
1	0.5	2.0	25.0	8.0	6.0	6.977	6.090
2	1.0	4.0	55.0	13.0	0.9	10.525	10.480
3	1.5	2.0	85.0	7.0	12.0	6.942	6.894
4	2.0	4.0	0.0	12.0	4.0	3.207	3.110
5	2.5	3.0	35.0	6.0	0.45	7.522	7.506
6	3.0	1.0	95.0	5.0	2.0	10.210	10.316
7	3.5	3.0	95.0	5.0	2.0	10.084	10.272
8	1.0	1.0	15.0	10.0	0.2	3.764	3.529
9	2.0	3.0	45.0	4.0	8.0	10.591	10.444
10	3.0	1.0	75.0	9.0	0.9	9.778	9.742

注: Y1: 人参二醇线性方程计算三七总皂苷的含量; Y2: 三七皂苷 R₁ 线性方程计算三七总皂苷的含量

Note: Y1: By Panaxadiol liner relationship to compute Panax notoginseng contents; Y2: By Panax notoginseng in Rg₁ group liner relationship to compute Panax notoginseng contents

(1) 人参二醇为对照品:

三七总皂苷 % = { [(0.072 8 X + 0.033 7) × 2.0 × 稀释倍数] / 供试品量 } × 100% 式中 0.072 8 X + 0.033 7 为人参二醇线性回归方程, 2.0 为对照品人参二醇对三七总皂苷的换算系数^[2], X 为吸光度 (A 值)。

(2) 以三七皂苷 R₁ 为对照品:

三七总皂苷 % = { [(9.334 3 X + 0.666 7) × 稀释倍数] / 供试品量 } × 100%

式中 9.3343X + 0.6667 为三七皂苷 R₁ 线性回归方程, X 为吸光度 (A 值)。

每实验号分别做三次, 对其含量测定结果取平均值填入

表中, 将人参二醇为对照品和三七皂苷 R₁ 为对照品数据进行配对比较, t 检验结果两组数据无显著性差异 (t < t_{0.05}, 见表 7)。数据分别用 UROS 系统软件进行回归处理, 得回归方程如下:

$$Y_1 (\text{人参二醇作对照品}) = 0.763\,9 - 1.226\,4 X_1 + 0.288\,8 X_3 + 0.177\,2 X_1 X_1 - 0.001\,9 X_3 X_3 + 0.083\,8 X_1 X_2 + 0.179\,0 X_1 X_5 + 0.204\,3 X_2 X_5 - 0.013\,4 X_3 X_5$$

$$Q = 0.000\,7 \quad S = 0.026\,8 \quad RR = 1.000 \quad F = 11\,304.764\,5$$

查表得 F(8, 1) 0.01 = 598

$$F = 11\,304.764\,5 > 598 > F(8, 1) 0.01. \quad F \text{ 检验通过。}$$

$$Y_2 (\text{三七皂苷 R}_1 \text{ 作对照品}) = -0.304\,9 + 0.283\,2 X_3 - 0.221\,9 X_1 X_1 - 0.001\,8 X_3 X_3 + 0.130\,0 X_1 X_2 + 0.002\,4 X_1 X_3 + 0.224\,1 X_1 X_5 + 0.159\,9 X_2 X_5 - 0.014\,2 X_3 X_5$$

$$Q = 0.000\,0 \quad S = 0.002\,0 \quad RR = 1.000\,0 \quad F = 999\,999.999\,9$$

查表得 F(8, 1) 0.01 = 598

$$F = 999\,999.999\,9 > 598 > F(8, 1) 0.01. \quad F \text{ 检验通过。}$$

分析上述方程, 在考察范围内, 乙醇浓度提取次数应取较大值, 回馏次数应取较小值, 三七粒度、乙醇用量影响不大。故选择优化条件如下:

$$X_1 = 0.5, X_2 = 4.0, X_3 = 76.0, X_4 = 6.0, X_5 = 0.45.$$

$$\text{预测值 } Y_1 = 11.29\%, Y_2 = 10.97\%.$$

2.5 验证实验

按优化条件分别进行 3 次试验 (按“2.4”项下操作), 以人参二醇为对照品, 三七总皂苷平均含量 = 11.27%; 以三七皂苷 R₁ 为对照品: 三七总皂苷平均含量 = 11.22%, 接近预测值, 且较前述 10 次试验结果都好, 证明条件可行。

2.6 稳定性试验

分别取同一批三七药材, 进行 3 次试验, 按上述优化条件制备样品溶液, 将制备样品溶液在室温下贮存, 依据预试验结果, 于 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 按上述条件测定 A 值^[2]。结果分别代入人参二醇和三七皂苷 R₁ 的线性回归方程, 分别计算出三七总皂苷百分含量, 人参二醇为对照品总皂苷平均含量为 11.27%, RSD 为 0.25%。三七皂苷 R₁ 为对照品总皂苷平均含量为 11.22%, RSD 为 0.33%。

2.7 重复性试验

取同一批三七药材 6 份, 按上述验证实验方法制备样品溶液, 分别以人参二醇和三七总皂苷为对照品, 按“2.4”项下测定条件和方法测定 A 值和分别计算出三七总皂苷百分含量, 人参二醇为对照品总皂苷平均含量为 11.25%, RSD 为 0.22%。三七皂苷 R₁ 为对照品总皂苷平均含量为 11.20%, RSD 为 0.31%。

2.8 加样回收率测定

取已知含量的三七药材 (人参二醇为对照品测得总皂苷含量为 11.25%, 三七皂苷 R₁ 为对照品测得总皂苷含量为 11.20%), 分别称取 0.25 g, 精密称定, 分别精密加入 5.0 mL 对照品溶液 (人参二醇对照品浓度为 5.64 mg·mL⁻¹; 三七皂苷 R₁ 对照品溶液 5.52 mg·mL⁻¹), 按优化条件提取总皂苷, 提取液水浴挥干溶剂, 以下按上述 2.4 项下操作, 其结果为:

人参二醇为对照品测得总皂苷平均回收率为 99.31%,RSD为 0.17%。三七皂苷 R_I 为对照品总皂苷平均回收率为 99.35%,RSD为 0.24%,见表 5和表 6。

表 5 人参二醇回收率试验结果

取样量 /g	样品含 量 /mg	加入对照 品量 /mg	测得量 mg	回收率 %	平均回收 率 %	RSD /%
0.2502	28.15	28.20	56.14	99.25		
0.2503	28.16	28.20	56.20	99.43	0.17	
0.2503	28.16	28.20	56.25	99.61	99.31	
0.2502	28.15	28.20	56.12	99.18		
0.2504	28.17	28.20	56.14	99.18		
0.2507	28.20	28.20	56.18	99.22		

表 6 三七皂苷 R_I 回收率试验结果

取样量 /g	样品含 量 /mg	加入对照 品量 /mg	测得量 mg	回收率 %	平均回收 率 %	RSD /%
0.2514	28.16	27.60	55.55	99.24		
0.2509	28.10	27.60	55.50	99.27	0.24	
0.2506	28.07	27.60	55.43	99.13	99.38	
0.2518	28.20	27.60	55.73	99.75		
0.2513	28.15	27.60	55.64	99.60		
0.2506	28.07	27.60	55.48	99.31		

表 7 人参二醇和三七皂苷 R_I 作对照品三七总皂苷的含量结果比较

编号	Y1	Y2	差值 d	s _d	
1	6.977	6.090	0.887		
2	10.525	10.480	0.045		
3	6.942	6.894	0.048		
4	3.207	3.110	0.097		
5	7.522	7.506	0.016	0.747 0	0.310 9
6	10.210	10.316	- 0.106		
7	10.084	10.272	- 0.188		
8	3.764	3.529	- 0.235		
9	10.591	10.444	0.147		
10	9.778	9.742	0.036		

注: t分布的临界值表, t_{0.05,9} = 2.262,两组比较无显著性差异

3 讨论

3.1 据报道^[1-2]三七皂苷的苷元部分主要为人参二醇型,人参二醇作为对照品,计算三七皂苷含量时乘换算因数 2.0,三七皂苷 R_I 为三七皂苷类成分,本实验分别以人参二醇和三七皂苷 R_I 为对照品,比色法测定三七皂苷总含量,三七皂苷总含量相近,组间无明显差异。

3.2 提高三七总皂苷的提取率,宜采用少量溶媒,短时间,多次数的提取工艺。实验发现,三七粉碎过细时,因含大量皂苷极易产生泡沫和爆沸,不宜大生产。由均匀设计的实验数据经回归处理得回归方程,进行分析,在考察范围内(0.2~8 mm),三七粒度对总皂苷提取率影响不大。

3.3 本实验考察结果,76%乙醇的提取率最高。含量测定时采用大孔吸附树脂纯化三七总皂苷,应选用 76%乙醇。但根据文献报道^[3],由于 70%乙醇洗脱液中脂溶性杂质多,且 50%乙醇和 70%乙醇洗脱三七总皂苷量相似,故选择 50%乙醇为洗脱液。

3.4 三七总皂苷含量采用比色法^[1-2]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,糖类吸收干扰显著。总皂苷测定以 60℃加热 15 min为宜。三七总皂苷显色在 1 h内稳定,故显色后需在 1 h内测定。

3.5 目前,我国在中药新药开发研究中,多用薄层扫描或液相色谱法,以其中某一成分含量作为评价指标,进行提取和分离工艺研究。此法用于中药的有效成分为总皂苷或总黄酮等总成分的提取和分离工艺研究,我们认为用总皂苷或总黄酮为评价指标或同时用两种方法作为评价指标,得出结果较为准确。

参考文献

[1] 蔡庆顺,欧阳胜等.三七粉末透皮吸收研究[J].江西中医学院学报,2002,14(4):9-10.
[2] 魏璐雪,袁昌鲁,中药制剂分析,上海科学技术出版社 1990,186.
[3] 唐第光,中成药,1990;12(8):5-6.
[4] 曾昭均,均匀设计及其应用,1994:209.

收稿日期:2007-07-09