荭叶心通软胶囊中三七提取工艺研究*

石凌云，黄 勇，郑 林，王爱民，王永林**
（贵阳医学院 药学院，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：优选荭叶心通软胶囊中三七药材的最佳提取工艺。**方法**：采用正交实验法，以人参皂苷 R_{g1}、R_{b1}、三七皂苷 R_1 的转移率为指标，优选三七的提取工艺。**结果**：最佳水煎煮工艺是加药材重量 10 倍的水（第一次多加 2 倍量），煎煮 3 次，每次 1 h；最佳醇沉工艺是加乙醇使含醇量为 55%，放置 12 h。**结论**：优选的提取工艺对三七总皂苷提取率高，操作简便。

［关键词］红蓼；制药工艺（中医）；三七；人参皂苷
［中图分类号］R9－39 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2012）06-0619-04

Study on Extraction Process of *Radix notoginseng* in Hongyexintong Soft Capsule

SHI Lingyun, HUANG Yong, ZHENG Lin, WANG Aimin, WANG Yonglin
(*School of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To optimize the extraction technology process of *Radix notoginseng* in Hongyexintong soft capsule. **Methods**: The orthogonal test was employed for selecting the optimal extraction technology with transfer rates of ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1 and notoginsenoside R1 as indexes. **Results**: The optimal water extraction process was adding 10 fold water of medicinal material weight (adding 2 fold more at the first time), decocting 3 times and 1 h for each time. The optimal alcohol precipitation technology was adding alcohol to concentration of 55% and laying 12 h. **Conclusions**: The optimized extraction process is easy and feasible with high extraction rate and provides a scientific basis for industrial production.

［**Key words**］ *Polygonum ortentale*; pharmaceutical technology (TCM); *Panax notoginseng*; *Panaxosides*

荭叶心通软胶囊为民间验方，由荭草、三七、山楂叶和川芎四味中药组成，采用现代制剂提取技术富集有效成分精制而成，具有活血化瘀，通脉止痛的功效。处方中三七，味甘、微苦，性温，归肝、胃经，以根、根状茎入药，功效能化瘀止血、活血定痛[1]。三七提取物是荭叶心痛软胶囊的重要成分，本研究以创新剂型、提高临床疗效、改善患者用药顺应性为目的，采用正交实验法，对提取工艺中的加水量、煎煮时间、煎煮次数、醇沉浓度等因素进行研究，以优选出荭叶心通软胶囊中三七的最佳提取工艺条件。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪系统（日本岛津，LC-10AVP），Alltech 500 蒸发光散射检测器（美国奥泰科技公司），WYB25000 全自动无油空压机（北京怡丰瑞普科技有限公司），WML 色谱工作站（广西威玛龙色谱科技公司），超声波清洗器（250 W，29～34 kHz；

*［基金项目］贵州省重大专项项目【黔科合重大专项字（2007）6010 号】，贵州省科技计划项目（黔科合计工字［2009］4001 号）。
**通信作者 E-mail：gywyl@gmc.edu.com.cn

北京医疗设备二厂)等。

1.2 试药

三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_{g1} 对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号 110745 - 200312、110704 - 200318、110703 - 200322),三七药材由贵阳医学院药物研究所龙庆德教授鉴定,符合《中国药典》2010 版一部相关规定[2];乙腈为色谱纯,乙醇和甲醇为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 生药量吸水试验

称取三七 30 g 若干份,加 10 倍水浸泡,于不同时间滤出浸泡液,直至吸水率不再增加为止,结果见表 1。结果表明,吸水率为药材重量的 210% 左右,故第一次煎煮时需多加 2 倍量水。

表 1 药材吸水率试验

Tab. 1 Test of water absorption rate of medicinal materials

浸泡时间(h)	滤过量(ml)	吸水量(ml)	吸水率(%)
0.5	259	41	137
1	250	50	167
2	242	61	203
3	238	63	210

2.2 指标成分的含量测定

2.2.1 三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 含量测定 色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 Hypersil C 18(5 μm,150 mm×416 mm,大连依利特科技有限公司),流动相为乙腈 - 水(20∶80),流速 1 ml/min,柱温 40 ℃。蒸发光散射检测器条件:空气输入压力 300 kPa,漂移管温度 40 ℃。对照品溶液制备:精密称取三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 对照品,加甲醇制得含三七皂苷 R_1 0.502 0 g/L 和 1.956 g/L 的混合对照品溶液。供试品溶液的制备及测定:精密量取水煎液和醇沉液适量,用 50% 乙醇稀释至一定体积,摇匀即得。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μl 注入液相色谱仪,计算含量。

2.2.2 人参皂苷 R_{b1} 含量测定[3] 色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 Hypersil C 18(5 μm,150 mm×416 mm,大连依利特科技有限公司),流动相为乙腈 - 水(32∶68),流速 1 ml/min,柱温 40 ℃。蒸发光散射检测器条件:空气输入压力 300 kPa,漂移管温度 40 ℃。对照品溶液制备:精密称取人参皂苷 R_{b1} 对照品,加甲醇制得含人参皂苷 R_{b1} 1.010 g/L 的对照品溶液。供试品溶液的制备及测定:精密量取水煎液和醇沉液适量,用 50% 乙醇稀释至一定体积,摇匀即得。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μl 注入液相色谱仪,计算含量。

2.3 正交试验优选水煎煮工艺

2.3.1 实验设计 以加水量(A)、煎煮时间(B)、煎煮次数(C)为 3 个考察因素,每个因素取 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验,因素水平见表 2。

表 2 煎煮工艺因素水平表

Tab. 2 Factors and levels of decoction process

水 平	因 素		
	A(倍)	B(h)	C(次)
1	8	0.5	2
2	10	1.0	3
3	12	1.5	4

注:A 为加水量,B 为煎煮时间,C 为煎煮次数。

2.3.2 实验结果 取三七 60 g 按正交实验表 1 进行实验,依 2.2 项下法测定三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 和总固体物,以三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 总量的转移率及总固体物收率为评价指标进行综合评价,权重系数分别为 0.8、0.2,正交实验结果见表 3,方差分析结果见表 4。由表 3 可知,各因素对煎煮工艺的影响顺序为 C > B > A,其中提取次数对提取工艺影响较大;表 4 方差分析结果则表明,各因数均有显著性意义($P < 0.05$),两者结论一致,最佳工艺条件为 $A_3B_2C_3$。在 A、C 因素中最佳工艺和次佳工艺的极差较小,故次佳工艺为 $A_2B_2C_2$。为进一步证实该工艺的合理性,以最佳工艺 $A_3B_2C_3$ 和次佳工艺 $A_2B_2C_2$ 进行重复试验,每个条件重复两次,求其平均值。从表 5 可见,甲乙两工艺的三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 总量收率和总固体物收率无明显差异,甲乙两工艺比较,乙工艺有明显的低耗、省时特点,故选择乙工艺进行生产。即加药材重量 10 倍的水(第一次多加 2 倍量),煎煮 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,适当浓缩,备用。

2.3.3 水煎煮正交实验工艺验证 取三七 240 g,按优选工艺 $A_2B_2C_2$ 条件提取,测定三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 总量含量,计算收率。结果表明三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 总量平均收率为 83.15%,总固体物平均收率为 29.07%,说明水煎煮工艺稳定可行。

表 3　煎煮工艺条件 $L_9(3^4)$ 正交试验安排及结果

Tab. 3　L9 (34) orthogonal test design and results of decoction process

试验号	A(倍)	B(h)	C(次)	D	$R_1+R_{g1}+R_{b1}$ 收率(%)	总固体物收率(%)	综合评分
1	1	1	1	1	54.31	16.24	62.34
2	1	2	2	2	76.62	27.06	90.69
3	1	3	3	3	70.46	30.17	86.91
4	2	1	2	3	70.94	26.43	84.88
5	2	2	3	1	84.25	29.19	99.35
6	2	3	1	2	70.33	23.20	82.16
7	3	1	3	2	75.69	24.95	88.41
8	3	2	1	3	74.39	21.36	84.80
9	3	3	2	1	80.75	27.98	95.22
K_1	239.94	235.63	229.30	256.91	G = 774.76		
K_2	266.39	274.84	270.79	261.26	CT = 66694.78		
K_3	268.43	264.29	274.67	256.59			
R	28.49	39.21	45.37	4.67			

注:A 为加水量,B 为煎煮时间,C 为煎煮次数,D 为空白实验。

表 4　煎煮工艺方差分析表

Tab. 4　Variance analysis of decoction process

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	*F* 值	显著性
A	168.38	2	84.19	37.09	$P<0.05$
B	274.46	2	137.23	60.45	$P<0.05$
C	421.66	2	210.83	92.88	$P<0.05$
D(误差)	4.54	2	2.27		

注:A 为加水量,B 为煎煮时间,C 为煎煮次数,$F0.05$ (2, 2) = 19.00 $F0.01$ (2,2) = 99.00。

表 5　煎煮正交试验重复结果

Tab. 5　Orthogonal test repetition results of decoction process

工艺条件	$R_1+R_{g1}+R_{b1}$ 收率(%)			总固体物收率(%)		
	1	2	平均	1	2	平均
甲 $A_3B_2C_3$	85.51	83.78	84.64	33.17	29.95	31.56
乙 $A_2B_2C_2$	82.85	84.13	83.49	28.71	30.09	29.40

注:A 为加水量,B 为煎煮时间,C 为煎煮次数。

2.4　正交实验优选醇沉工艺

2.4.1　实验设计　以对醇沉效率影响较大的药液的相对密度(D)、醇沉浓度(E)、放置时间(F)为考察因素,每个因素取 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验,因素水平见表 6。

2.4.2　实验结果　取正交工艺验证试验中的水煎液,混匀,测定三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 含量,再取相当于 60 g 生药的水煎液 9 份,分别浓缩至所需浓度。按正交试验表 7 进行试验。取样测定三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1},以三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 总量转移率为评价指标进行评价,正交实验结果见表 7,方差分析结果见表 8。由

表 6　醇沉工艺因素水平表

Tab. 6　Factors and levels of alcohol precipitation process

水平	因素		
	D(50 ℃)	E(%)	F(h)
1	1.10(1.5 ml∶1 g 生药)	45	6
2	1.08(2.0 ml∶1 g 生药)	55	12
3	1.05(2.5 ml∶1 g 生药)	65	24

注:D 为相对密度,E 为醇沉浓度,F 为放置时间。

表 7　醇沉工艺条件 $L_9(3^4)$ 正交试验安排及结果

Tab. 7　L9 (34) orthogonal test arrangement and results of alcohol precipitation process

试验号	D(d)	E(%)	F(h)	G	$R_1+R_{g1}+R_{b1}$ 转移率(%)
1	1	1	1	1	66.90
2	1	2	2	2	76.39
3	1	3	3	3	76.14
4	2	1	2	3	79.85
5	2	2	3	1	85.34
6	2	3	1	2	81.99
7	3	1	3	2	73.39
8	3	2	1	3	78.97
9	3	3	2	1	78.61
K_1	219.43	220.14	227.86	230.85	G = 697.58
K_2	247.18	240.70	234.85	231.77	CT = 54068.65
K_3	230.97	236.74	234.87	234.96	
R	27.75	20.56	7.01	4.11	

注:D 为相对密度,E 为醇沉浓度,F 为放置时间,G 为空白实验。

表 8 醇沉工艺方差分析表

Tab. 8 Variance analysis of alcohol precipitation process

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
D	129.56	2	64.78	41.79	$P<0.05$
E	79.33	2	39.66	25.59	$P<0.05$
F	10.89	2	5.44	3.51	
G(误差)	3.1	2	1.55		

注:D 为相对密度,E 为醇沉浓度,F 为放置时间。

表 7 可知,各因素对醇沉效率的影响顺序为 D > E > F,其中相对密度和乙醇浓度对提取工艺影响较大;表 8 方差分析结果则表明,相对密度和乙醇浓度有显著性意义($P<0.05$),放置时间影响不大,两者结论一致。最佳工艺条件为 $D_2E_2F_3$。在 F 因素中,最佳工艺和次佳工艺的极差较小,故可选择低耗、省时的次佳工艺 $D_2E_2F_2$ 进行重复试验。为进一步证实该工艺的合理性,以最佳工艺 $D_2E_2F_3$ 和次佳工艺 $D_2E_2F_2$ 进行重复试验,每个条件重复两次,求其平均值。从表 9 可见,甲乙两工艺的三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 收率和总固体物收率无明显差异,甲乙两工艺比较,乙工艺有明显省工省时特点,故选择乙工艺进行生产。即煎煮液浓缩至相对密度为 1.08(50 ℃)、加乙醇使含醇量为 55%,搅拌,放置 12 h,滤过,滤液减压回收乙醇,浓缩,备用。

表 9 醇沉正交试验重复结果

Tab. 9 Orthogonal test repetition results of alcohol precipitation process

工艺条件	$R_1+R_{g1}+R_{b1}$ 收率(%)			总固体物收率(%)		
	1	2	平均	1	2	平均
甲 $D_2E_2F_3$	84.73	86.30	85.52	17.82	16.42	17.12
乙 $D_2E_2F_2$	84.82	85.22	85.02	16.51	17.35	16.93

2.4.3 醇沉正交实验工艺验证 取三七 960 g,按水煎煮工艺条件煎煮,滤液合并,均分为 4 份,一份测定三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 和总固体物量;其余样品按醇沉最佳工艺 $D_2E_2F_2$ 条件醇沉处理,测定三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 及总固体物量,计算转移率。结果表明,三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 总量平均转移率为 84.99%,平均收率为 72.55%,总固体物平均收率为 16.65%,说明醇沉工艺稳定可行。

3 讨论

正交实验的极差分析结果表明,水煎煮工艺中,煎煮次数对提取工艺影响较大,加水量、煎煮时间、煎煮次数亦有显著影响,最佳工艺条件为 $A_3B_2C_3$,从节省工时和成本考虑,选择工艺条件为 $A_2B_2C_2$。醇沉工艺中,相对密度和乙醇浓度对提取工艺影响较大,最佳工艺条件为 $D_2E_2F_3$,而放置时间影响较小,故选择工艺为 $D_2E_2F_2$。综合考虑,提取工艺为加药材重量 10 倍的水(第一次多加 2 倍量),煎煮 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.08(50 ℃)、加乙醇使含醇量为 55%,搅拌,放置 12 h。

提取工艺的评价指标应是提取的有效成分的质和量,也是提取物临床作用性质和强度的体现。对于有效成分或有效部位明确的药材来说,评价指标较好选择,有效成分可直接测其含量[4]。三七含有总皂苷类成分,提取含三七的中药复方药材,其评价指标常用标志性成分人参皂苷[5]。当然,工艺研究中使用的考察指标越多,分析结果的代表性会越好,而分析成本和难度也相应增加。本研究选用三七中具有代表性的皂苷成分三七皂苷 R_1、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 为工艺评价指标,并采用高效液相色谱法测定提取物中 3 种皂苷含量的和及总固体物收率,筛选出三七的最佳提取工艺条件,不仅对实验研究,也为工业化生产提供了更可信及合理的科学依据。

4 参考文献

[1] 袁继伟,李晶尧,焦跃军. 中药三七对血液系统的药理药效研究进展[J]. 中国医疗前沿,2009(19):13.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 版)Ⅰ部[S]. 北京:化学工业出版社,2010:11 - 12.

[3] 刘志宝,王爱民,苏红,等. HPLC-ELSD 法测定荭叶心通软胶囊中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1},R_{b1} 的含量[J]. 中国中药杂志,2008(2):198 - 200.

[4] 叶茂清,张潮林,廖华卫. 正交试验法优选三七止血贴中三七的提取工艺研究[J]. 中国药业,2011(4):46 - 38.

[5] 穆启运,阮新民. 护心颗粒中人参和三七的皂苷成分的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2010(7):1636 - 1658.

(2012-08-29 收稿,2012-09-11 修回)

编辑:潘 娅