

杨庆稳,李洪山,雍康,等.微波辅助酶解提取三七总皂苷[J].江苏农业科学,2017,45(4):149-152.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.047

# 微波辅助酶解提取三七总皂苷

杨庆稳<sup>1</sup>,李洪山<sup>2</sup>,雍康<sup>1</sup>,慈海<sup>2</sup>

(1.重庆三峡职业学院,重庆 404155;2.沈阳高新农业发展有限责任公司,辽宁沈阳 110164)

**摘要:**利用响应面试验设计分析,优选三七总皂苷的最佳提取工艺条件。通过单因素试验,研究原料粒度、底物浓度、酶的添加量、溶液温度、微波功率、提取时间等因素对三七总皂苷提取得率的影响规律;选取 3 个主要因素,通过 3 因素 3 水平响应面中心组合试验设计,获得微波辅助酶解提取三七总皂苷的工艺。结果表明:以水为提取剂,在三七底物浓度 8%、中性纤维素酶添加量 8%、粒度 80 目、微波功率 540 W、溶液温度 57 ℃、微波辅助酶解 12 min 的条件下,总皂苷得率为 16.02%,实际值是预测值的 98.95%,预测结果可靠。微波辅助酶解提取三七总皂苷具有效率高、节能省时、污染小等特点,为进一步开发三七总皂苷提供了参考。

**关键词:**三七;总皂苷;微波;酶解;提取;工艺优化

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0149-04

三七为五加科植物三七的干枯根,是我国传统中药,具有活血散瘀、消肿止痛、杀菌消炎、耐缺氧、降脂、抗衰老和提高免疫力等功效,始记载于《本草纲目》<sup>[1]</sup>。三七对中枢神经有明显抑制和镇痛作用,可用于治疗奶牛关节炎<sup>[2-3]</sup>。三七主要含有皂苷、黄酮、多肽、多糖蛋白、甾醇无机物、挥发油和油脂等成分,其主要活性成分是四环三萜皂苷,如人参皂苷

Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Re 和三七皂苷,其中人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 含量最高<sup>[4-6]</sup>。

提取三七中总皂苷的方法有很多报道,《中华人民共和国药典》应用的方法是冷浸法,此方法操作时间较长;其他传统提取方法有水浴法、回流法、索氏提取法和渗漉法等,这些方法存在提取效率低、温度高、溶剂消耗量大、有效成分被破坏等问题;此外,还有高新技术应用到三七提取中,如加速溶剂提取、加压提取、超声波提取、超临界流体萃取、大孔树脂吸附技术、酶解法、超滤提取、半仿生提取、微波萃取等提取技术<sup>[7]</sup>。

酶法提取具有条件温和、绿色环保、无污染等特点,但是酶解反应需要几个甚至十几个小时,找到有效缩短酶解时间的方法是研究的重点。微波提取因具有环保、高效的特点常作为一种物理辅助手段<sup>[8]</sup>。目前采用微波辅助酶解提取三七总皂苷未见报道,本研究通过香草醛-高氯酸比色法测定

收稿日期:2016-01-05

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(编号:KJ1503406)。

作者简介:杨庆稳(1987—),男,重庆人,硕士,讲师,从事兽医临床诊疗新技术研究工作。E-mail:yangqingwen023@126.com。

通信作者:李洪山,硕士,中级工程师,从事提取工艺研究。E-mail:18640398767@163.com。

[3] Comai S, Bertazzo A, Bailoni L, et al. The content of proteic and non-proteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours[J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1350-1355.

[4] Oshodi A A, Ogungbenle H N, Oladimeji M O. Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamun radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) flours[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1999, 50(5): 325-331.

[5] Vega - Gálvez A, Miranda M, Vergara J, et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(15): 2541-2547.

[6] 肖正春, 张广伦. 藜麦及其资源开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(2): 62-66.

[7] 申瑞玲, 张文杰, 董吉林, 等. 藜麦的主要营养成分、矿物元素及植物化学物质含量测定[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2015, 30(5): 17-21.

[8] Repo - Carrasco R, Espinoza C, Jacobsen S E. Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaiwa (*Chenopodium pallidicaule*)[J]. Food Reviews International, 2003, 19(1/2): 179-189.

[9] Nienke L. Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [D]. Saskatchewan, Canada: University of Saskatchewan, 2005.

[10] Pagno C H, Costa T M, de Menezes E W, et al. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity[J]. Food Chemistry, 2015, 173(173): 755-762.

[11] 周海涛, 刘浩, 么杨, 等. 藜麦在张家口地区试种的表现与评价[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 222-227.

[12] 严衍禄, 赵龙莲, 李军会, 等. 现代近红外光谱分析的信息处理技术[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(6): 777-780.

[13] Delwiche S R, Hruschka W R. Protein content of bulk wheat from near-infrared reflectance of individual kernels[J]. Cereal Chemistry, 2000, 77(1): 86-88.

[14] 严衍禄, 赵龙莲, 韩东海, 等. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 3-10.

[15] 严衍禄, 陈斌, 朱大洲, 等. 近红外光谱分析的原理、技术与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013: 1-7.

[16] 徐广通, 袁洪福, 陆婉珍. 近红外光谱仪器概况与进展[J]. 现代科学仪器, 1997(3): 9-11.

三七主要活性成分人参皂苷  $R_{g_1}$  含量,采用响应面法进行工艺优化,以期对微波辅助酶解提取三七总皂苷进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

三七,购自当地中药材药店;中性纤维素酶(活性单位  $\geq 15$  U/mg),诺维信(中国)生物技术有限公司;人参皂苷  $R_{g_1}$ ,中国药品生物制品检验所。

MAS-II 型微波反应仪,上海新仪微波化学科技有限公司;AG204 电子分析天平(0.1 mg ~ 210 g),瑞士 METTLER TOLEDO;UV2550 紫外-可见分光光度计,日本岛津。

1.2 检验方法

1.2.1 标准曲线的制备<sup>[9]</sup> 准确称取人参皂苷  $R_{g_1}$  5.00 mg,用甲醇溶解后定容为 50 mL,即为 0.10mg/mL 人参皂苷  $R_{g_1}$  的对照溶液。准确移取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 对照品溶液,分别置于 10 mL 干燥具塞试管中,将溶液蒸发,然后加入新配制的含 5% 香草醛的冰乙酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,于 60 ℃ 水浴 10 min,于冷水中冷却,加入冰乙酸 5.0 mL,摇匀后放置 20 min。用对应的试剂溶液作为空白对照,在 560 nm 处测定吸光度  $D_{560\text{nm}}$ 。回归方程:  $C = 1.581A + 0.0012$ ,  $r = 0.9991$ 。

1.2.2 稳定性试验 精确吸取试验溶剂 2 mL,按照“1.2.1”节的试验方法,每隔 10 min 测定 1 次吸光度,共测量 10 次,计算得  $RSD$  为 1.49%,表明试验溶剂在 100 min 内性质稳定。

1.2.3 精密度试验 精确吸取 5 份人参皂苷  $R_{g_1}$ 、1 份对照溶液,各 2 mL,共 6 份,分别测定吸光度,计算  $RSD$  为 1.39%,表明仪器精密度良好。

1.2.4 重复性试验 供试验样品溶液重复制备 6 次,分别测定吸光度,计算  $RSD$  为 1.71%,表明本方法重复性良好。

1.3 单因素试验设计

以水为提取剂,对于三七底物浓度、三七粒度、加酶量(占底物的质量分数)、加热温度、微波功率、提取时间 6 个单因素,选取一定范围条件进行试验。

1.4 响应面试验设计

根据试验数据,进行温度( $Z_1$ )、功率( $Z_2$ )、时间( $Z_3$ )3 因素 3 水平的 Box- Behnken 试验设计,见表 1。对温度、功率和时间作如下变换:  $X_j = (z_j - z_0)/\Delta j$ ,式中:  $z_j$  为最大值,  $z_0$  为中间值,  $\Delta j$  为最大、最小值的 1/2。以 3 次试验得率的平均值为响应值( $Y$ ),应用 Design Expert 软件对试验结果进行响应面分析后建立数学模型,并且进行方差分析,同时优化工艺参数。

表 1 Box- Behnken 设计因素水平

| 编码 | 因素            |               |                 |
|----|---------------|---------------|-----------------|
|    | $Z_1$ : 温度(℃) | $Z_2$ : 功率(W) | $Z_3$ : 时间(min) |
| -1 | 50            | 400           | 10              |
| 0  | 55            | 500           | 11              |
| 1  | 60            | 600           | 12              |

1.5 提取物的得率测定

取一定提取液,水浴挥干后,按照“1.2.1”节的方法显色,测定吸光度  $D_{560\text{nm}}$ ,根据标准曲线,计算总皂苷的含量,测

定 3 次取平均值。

总皂苷提取率为三七样品提取液中总皂苷质量占三七样品干燥粉质量的比例。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

进行响应面试验设计前,对三七底物浓度、粒度、加酶量、加热温度、微波功率、提取时间 6 个单因素进行试验,选取影响较大的单因素,同时确定最优范围。

由图 1-a 可知,在三七粒度 60 目、加酶量为底物质量的 8%、加热温度 55 ℃、微波功率 500 W、提取时间 11 min 条件下,当三七原料的底物浓度为 5% ~ 8% (质量体积分数)时,随着浓度的升高,三七总皂苷的得率由 9.33% 提高到 15.65%,且三七原料浓度越高,与酶的接触面积越大,提取速率越快;但微波对原料作用可能相反,底物浓度大于 8% 后,得率变化不大,且有减少的趋势,可能受吸收到微波能影响。因此,试验选取底物浓度 8%。

由图 1-b 可知,在三七底物浓度 8%、加酶量为底物 8%、加热温度 55 ℃、微波功率 500 W、提取时间 11 min 条件下,当三七原料的颗粒粒度为 10 ~ 60 目时,随着粒度的升高,三七总皂苷的得率由 3.32% 提高到 15.59%,且三七原料粒度越小,与酶的接触面积越大,微波对原料作用越明显,提取速率越快;粒度大于 60 目后,提取得率变化不大,而且粒度过大,溶液出现糊化状态,由于粒度在大于 60 目后,提取得率没有明显提高。因此,试验颗粒粒度选取 60 目。

由图 1-c 可知,在三七底物浓度 8%、粒度 60 目、加热温度 55 ℃、微波功率 500 W、提取时间 11 min 条件下,当中性纤维素酶在底物的加酶量 2% ~ 8% 时,随着浓度的升高,三七总皂苷的得率由 5.93% 提高到 15.73%,三七原料和酶的接触面积越大,提取速率越快;但是浓度大于 8% 后,提取得率变化不大。从减少成本角度考虑,试验酶的加酶量是底物质量的 8%。

由图 1-d 可知,在三七底物浓度 8%、粒度 60 目、加酶量为底物质量的 8%、微波功率 500 W、提取时间 11 min 条件下,当加热温度低于 55 ℃ 时,随着温度的升高,三七总皂苷的得率由 35 ℃ 的 5.64% 提高到 15.71%,温度升高有利于加快三七总皂苷的扩散,有利于酶在最适的温度下分解底物,但是当温度达到 55 ℃ 后,三七总皂苷提取得率下降。分析其原因,主要可能有 2 个方面:一方面,三七总皂苷对热不稳定,高温可以使皂苷分解;另一方面,温度过高导致酶的活性降低,影响三七总皂苷的得率。从节能角度考虑,试验优化溶液温度选择 50 ~ 55 ℃。

由图 1-e 可知,在三七底物浓度 8%、粒度 60 目、加酶量为底物质量的 8%、加热温度 55 ℃、提取时间 11 min 条件下,当微波功率在 100 ~ 300 W 时,随着微波功率增加,三七总皂苷提取得率由 6.32% 提高到 9.13%,增速缓慢;当微波功率为 300 ~ 500 W 时,得率由 9.13% 提高到 15.48%,随着微波功率增加,三七总皂苷提取得率提高迅速,微波的功率越高,提取物吸收的微波能多,对三七总皂苷的细胞破坏作用大,有利于三七总皂苷提取;微波功率在 500 ~ 600 W 时,三七总皂苷提取得率变化不大;微波功率在 600 ~ 700 W 时,三七总皂

苷提取得率降低,其原因可能是三七总皂苷分解,也可能是酶失活,或者酶自身分解。从节能和延长仪器寿命角度考虑,试验优化功率选择 400~600 W。

由图 1-f 可知,在三七底物浓度 8%、粒度 60 目、加酶量为底物 8%、加热温度 55℃、微波功率 500 W 条件下,当提取

时间在 8~11 min 时,随着提取时间增加,三七总皂苷提取得率由 8.32% 提高到 15.63%,14 min 时提取得率达到 15.84%,可能是提取溶液中酶、底物、三七总皂苷达到相对稳定的状态。从提高试验周期和延长仪器寿命角度考虑,将试验优化提取时间选择在 10~12 min。

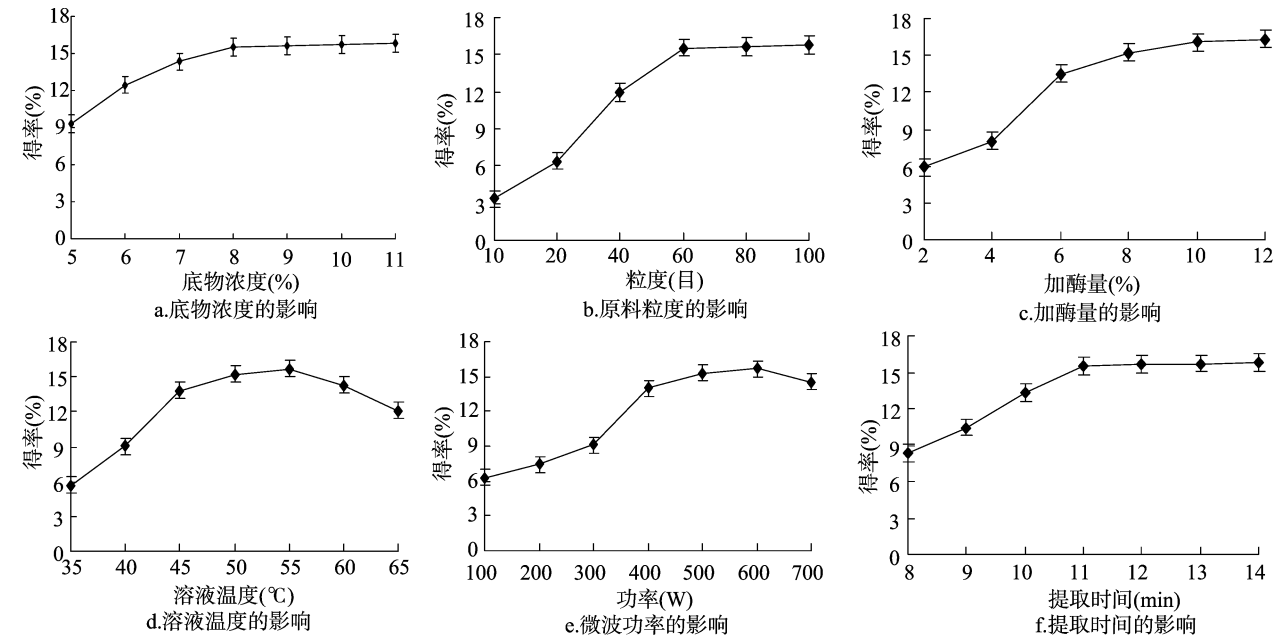


图1 底物浓度、原料粒度等单因素对三七总皂苷得率的影响

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 提取工艺优化试验结果 以三七总皂苷的得率指标作为响应值,采用响应面回归进行数据分析。提取三七总皂苷优化试验设计及试验结果见表 2。

表 2 响应面试验结果

| 序号 | 因素        |           |           | 得率<br>(%) |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|
|    | $X_1$ :温度 | $X_2$ :功率 | $X_3$ :时间 |           |
| 1  | 0         | -1        | -1        | 14.61     |
| 2  | 0         | 0         | 0         | 15.87     |
| 3  | 0         | 0         | 0         | 15.81     |
| 4  | -1        | 1         | 0         | 13.21     |
| 5  | 1         | 1         | 0         | 14.99     |
| 6  | -1        | -1        | 0         | 12.94     |
| 7  | 1         | -1        | 0         | 14.41     |
| 8  | 0         | 0         | 0         | 15.75     |
| 9  | 0         | 1         | 1         | 15.76     |
| 10 | 0         | 0         | 0         | 15.71     |
| 11 | -1        | 0         | 1         | 13.15     |
| 12 | 0         | 0         | 0         | 15.61     |
| 13 | 1         | 0         | -1        | 15.16     |
| 14 | -1        | 0         | -1        | 13.93     |
| 15 | 1         | 0         | 1         | 15.81     |
| 16 | 0         | 1         | -1        | 15.14     |
| 17 | 0         | -1        | 1         | 14.61     |

2.2.2 数学模型的建立及方差分析 以三七总皂苷的得率指标为响应值,经过回归拟合后的二次多项回归方程为  $Y = 15.75 + 0.893X_1 + 0.316X_2 + 0.061X_3 + 0.077X_1X_2 + 0.358X_1X_3 + 0.155X_2X_3 - 1.19X_1^2 - 0.67X_2^2 - 0.05X_3^2$ 。对该模型进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可知,回归方程的

失拟检验  $P$  值 = 0.047 7 < 0.05,差异显著,总回归方程  $F$  检验  $P < 0.000 1$ ,差异极显著,说明该模型与实际试验拟合较好,可以用于三七总皂苷得率指标的理论预测,方程一次项的影响中  $X_1$ 、 $X_2$  的  $P < 0.01$ ,差异极显著;二次项的影响中  $X_1^2$ 、 $X_2^2$  的  $P < 0.01$ ,差异极显著; $X_1X_3$  交互作用  $P < 0.01$ ,差异极显著。由于模型的  $P < 0.01$ ,因此该方程的回归模型差异极显著。从回归系数的大小可以看出温度影响最大,其次是功率。确定系数  $R^2 = 0.985 0$ ,校正系数  $R^2_{Adj} = 0.965 6$ ,说明响应值的变化有 98.50% 来源于所选变量。因此,回归方程可

表 3 响应面试验设计模型评价结果

| 方差来源     | 平方和    | 自由度 | 均方    | $F$ 值   | $P$ 值    | 显著性 |
|----------|--------|-----|-------|---------|----------|-----|
| 模型       | 16.175 | 9   | 1.797 | 50.969  | <0.000 1 | **  |
| $X_1$    | 6.372  | 1   | 6.372 | 180.724 | <0.000 1 | **  |
| $X_2$    | 0.800  | 1   | 0.800 | 22.691  | 0.002 1  | **  |
| $X_3$    | 0.030  | 1   | 0.030 | 0.851   | 0.386 9  |     |
| $X_1X_2$ | 0.024  | 1   | 0.024 | 0.681   | 0.436 3  |     |
| $X_1X_3$ | 0.511  | 1   | 0.511 | 14.498  | 0.006 6  | **  |
| $X_2X_3$ | 0.096  | 1   | 0.096 | 2.725   | 0.092 7  | #   |
| $X_1^2$  | 5.963  | 1   | 5.963 | 169.098 | <0.000 1 | **  |
| $X_2^2$  | 1.904  | 1   | 1.904 | 54.004  | 0.000 2  | **  |
| $X_3^2$  | 0.009  | 1   | 0.009 | 0.269   | 0.619 7  |     |
| 残差       | 0.247  | 7   | 0.035 |         |          |     |
| 失拟项      | 0.208  | 3   | 0.069 | 7.062   | 0.044 7  |     |
| 误差项      | 0.039  | 4   | 0.010 |         |          |     |
| 总和       | 16.422 | 16  |       |         |          |     |

注: $R^2 = 0.985 0$ ,  $R^2_{Adj} = 0.965 6$ ,信噪比 = 21.299 2。“\*\*”表示极显著水平 ( $P < 0.01$ ),“\*”表示显著水平 ( $P < 0.05$ );“#”表示较显著水平 ( $P < 0.1$ )。

以较好地描述提取温度、微波功率、酶解时间 3 个因素和响应值之间的真实关系,通过该回归方程确定最佳提取工艺条件。剔除不显著回归拟合项后的二次多项回归方程为  $Y = 15.75 + 0.893X_1 + 0.316X_2 + 0.358X_1X_3 + 0.155X_2X_3 - 1.19X_1^2 - 0.67X_2^2$ 。

2.2.3 响应面直观分析 响应曲面分析的图形是特定的响应值  $Y$  对应自变量构成的 1 个三维空间图,可以直观地反映各自变量对响应变量的影响<sup>[10]</sup>。以三七总皂苷的得率为响应指标值,对温度、功率、时间 3 个因素进行响应面分析,其响应面结果见图 2。

如图 2-a 所示,在时间值处于中心点时,温度和微波功率对得率的影响:微波功率较低时,随着功率的增加,三七总

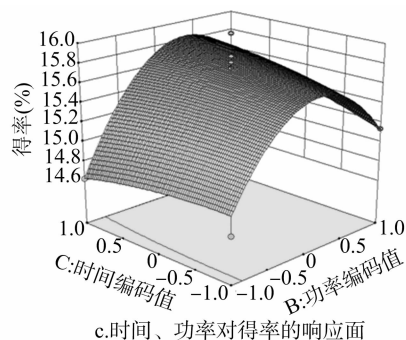
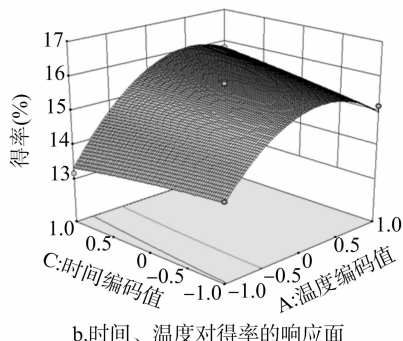
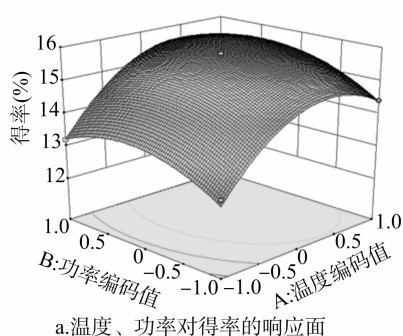


图2 影响三七总皂苷得率的各因素响应面

### 2.3 提取工艺优化和验证

通过模型计算出最优秀工艺:温度 57 ℃,功率 540 W,时间 12 min。该工艺条件下的预测值 16.189 6%。按照优化的最佳工艺提取 3 批三七样品进行验证试验,测得三七总皂苷的提取得率分别是 15.92%、16.08%、16.06%,平均提取得率为 16.02%,实际值是预测值的 98.95%,预测结果可靠。

### 3 讨论

通过 Box - Behnken 试验设计,采用 Design Expert 软件对试验结果进行响应面分析,对三七总皂苷得率与温度、微波功率、提取时间 3 个因素建立数学模型,经方差分析可知,拟合度良好,在三七底物浓度 8%、粒度 60 目、加酶量为底物质量的 8%、加热温度 57 ℃、微波功率 540 W、提取时间 12 min 的条件下,得率达到 16.02%,实际值是预测值的 98.95%,预测结果可靠,可作为微波辅助酶解提取三七总皂苷的优化条件。

采用纤维素酶、果胶酶复合提取三七皂苷,酶解时间 24 h,三七总皂苷含量为 11.17%,提取物得率为 32.43%<sup>[11]</sup>。微波对三七中皂苷浸提速度至少是未经微波处理的 4 倍<sup>[12]</sup>。本试验采用微波辅助酶解提取三七总皂苷,与其他报道相比,大大缩短了试验周期,但是微波辅助提取的三七总皂苷的应用有待于进一步研究。

### 参考文献:

[1] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:17-22.

皂苷得率增大,当达到一定功率度后,继续增加反而导致三七总皂苷得率下降;温度过高或过低对三七总皂苷得率影响明显,高温、低温的抑制程度大致相同。

如图 2-b 所示,当微波功率处于中心点时,时间和温度对三七总皂苷得率的影响:温度较低时,随着时间增加,得率提高;温度较高时,时间增加到一定程度时,得率达到最大值,随着时间进一步增加,得率反而降低。

如图 2-c 所示,当温度处于中心点时,微波功率和时间对三七总皂苷得率的影响:时间一定时,随着微波功率增大,得率逐渐提高后又降低;微波功率过高,不利于三七总皂苷得率。由于微波功率的弧度比时间弧度大,所以在试验优化选取范围内,微波功率比时间影响大。

[2] 郝朝庆,杨帆. 三七总皂苷的抗炎作用[J]. 中国药理学报,1986,7(3):252-255.

[3] 雷伟亚,史栓桃,余恩畅. 三七有效成分“皂苷 EI”对中枢神经系统的抑制作用[J]. 中草药,1986,17(1):15-18.

[4] 刘刚,鲍建材,郑友兰,等. 三七的化学成分研究进展[J]. 人参研究,2004(2):10-11.

[5] Ma W G, Mizutani M, Malterud K E, et al. Saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. Phytochemistry, 1999, 52(6):1133-1139.

[6] Yang C Y, Wang J, Zhao Y, et al. Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(2):231-236.

[7] 董彩玉. 密闭微波辅助萃取三七中的皂苷类化合物以及细梗胡枝子中的还黄酮类化合物[D]. 北京:北京化学大学,2008.

[8] 李洪山. 制备猪血高 F 低聚肽的优化工艺[D]. 长春:吉林大学,2012.

[9] 郭子杰,黄儒强. 三七中总皂苷的含量测定[J]. 药物鉴定,2007,16(7):13-14.

[10] 王亚举,曾虹燕,李玉芹,等. 基于响应面设计水滑石硫酸铵改性条件优化[C]. 长沙:第六届全国化学工程与生物化工年会,2010.

[11] 李元波,殷辉安,唐明林,等. 复合酶解法提取三七皂苷的实验研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(4):488-492.

[12] 郭子杰,黄儒强. 微波对三七中皂苷浸提作用的影响效果研究[J]. 中药材,2007,30(2):232-234.