

王不留行总皂苷提取工艺优选

洪奎¹, 陈小凤¹, 冯磊¹, 花慧², 马丽萍¹, 杜斌¹, 邱丽颖^{1*}

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡 214028)

[摘要] **目的:** 优选王不留行总皂苷的提取工艺。**方法:** 以总皂苷质量分数和干粉得率为综合评价指标, 采用正交试验考察料液比、乙醇体积分数、超声时间、超声功率对超声波提取工艺的影响, 考察提取时间、乙醇体积分数、料液比和提取次数对乙醇回流提取工艺的影响。**结果:** 最佳超声提取工艺为加 15 倍量 70% 乙醇在 640 W 功率下超声提取 2 次, 每次 40 min; 干粉得率 7.34%, 总皂苷质量分数 10.92%。最佳乙醇回流提取工艺为加 14 倍量 60% 乙醇在微沸状态下提取 2 次, 每次 2 h; 干粉得率 7.17%, 总皂苷质量分数 9.01%。**结论:** 王不留行总皂苷超声波辅助法的提取效果优于乙醇回流法, 且工艺稳定可靠。

[关键词] 王不留行; 总皂苷; 提取工艺; 超声波; 正交试验; 方法学考察

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0027-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070027

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000010.html>

[网络出版时间] 2014-01-20 16:12

Optimization of Extraction Process for Total Saponins from Vaccariae Semen

HONG Kui¹, CHEN Xiao-feng¹, FENG Lei¹, HUA Hui², MA Li-Ping¹, DU Bin¹, QIU Li-ying^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total saponins from Vaccariae Semen. **Method:** With dry powder yield and the mass fraction of total saponins as comprehensive evaluation index, orthogonal tests were adopted to optimize ultrasonic and ethanol reflux extraction processes by taking extraction time, solid-liquid ratio and ultrasonic power, ethanol concentration and extraction times as factors. **Result:** Optimum ultrasonic extraction conditions were as follows: extracted twice with 15 times the amount of 70% ethanol under 640 W, 20 minutes per time; Dry powder yield and the mass fraction of total saponins were 7.34% and 10.92%, respectively. Optimum ethanol reflux extraction technology was as following: extracted twice with 14 times the amount of 60% ethanol under micro-boiling state, 2 h per time; Dry powder yield and the mass fraction of total saponins were 7.17% and 9.01%, respectively. **Conclusion:** Ultrasonic assisted extraction method was better than ethanol reflux extraction method for total saponins from Vaccariae Semen, which were stable and reliable.

[Key words] Vaccariae Semen; total saponins; extraction process; ultrasonic wave; orthogonal test; methodological study

[收稿日期] 20130623(010)

[基金项目] 江苏省卫生职业教育教育研究科研课题 (JZ201113)

[第一作者] 洪奎, 在读硕士, 从事天然药物研究, Tel: 18762651590, E-mail: hongkui25@126.com

[通讯作者] * 邱丽颖, 博士, 教授, 从事天然药物研究, Tel: 0510-85327353, E-mail: qiulydoc@sina.com

王不留行功能行血通经、催生下乳、消肿敛疮等^[1], 前期研究发现其提取物具有显著抑制人内皮细胞增殖的作用^[2-3], 理化性质反应检测到其抑制新生血管有效部位主要为皂苷类成分, 提示其作为血管生成抑制剂具有广阔开发前景^[4]。超声波的空化效应使其具备快速、高效、污染小等优点, 已被广泛用于天然产物成分的提取^[5-7]。本实验

以齐墩果酸为对照品,采用紫外分光光度法测定总皂苷含量,通过正交试验优选王不留行总皂苷的超声波提取工艺和乙醇回流提取工艺,并比较二者的优劣。

1 材料

W201 型恒温水浴锅(上海申顺生物科技有限公司),DJ-04B 型中药粉碎机(上海淀久中华机械制造有限公司),UV-755B 型紫外-可见分光光度计(上海分析仪器总厂)。王不留行购自江苏省无锡市山禾药业股份有限公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子;齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110709-200505),试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取齐墩果酸对照品 5.0 mg,加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取王不留行粉末 4.0 g 至 250 mL 锥形瓶中,加 20 倍量 70% 乙醇于 720 W 超声提取 2 次,每次 20 min,合并提取液,50 °C 减压浓缩至干,加甲醇溶解并定容至 10 mL,即得。

2.3 总皂苷的含量测定

2.3.1 检测波长的确定 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 0.5 mL,分别置于 10 mL 具塞比色管中,70 °C 水浴蒸干,各加入 0.5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,摇匀,于 70 °C 水浴中加热 15 min,取出后流水冷却,加冰醋酸至 5 mL,采用紫外分光光度计于 200 ~ 700 nm 进行全波长扫描,结果显示对照品溶液和供试品溶液均在 540 nm 处有最大吸收,故检测波长选择 540 nm。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 0.02,0.05,0.08,0.1,0.12,0.15,0.2 mL,按 2.3.1 项下方法自“分别置于 10 mL 具塞比色管中”至“加冰醋酸至 5 mL”操作,于 540 nm 处测定吸收度(A),以 A 为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 11.452X - 0.0228$ ($R^2 = 0.9953$),线性范围 0.010 ~ 0.075 mg。

2.3.3 精密度试验 精密吸取对照品溶液 5 份,每份 100 μL,按 2.3.1 项下方法自“分别置于 10 mL 具塞比色管中”至“加冰醋酸至 5 mL”操作,于 540 nm 处测定 A,计算 RSD 1.23%,表明仪器精密

度良好。

2.3.4 稳定性试验 精密量取供试品溶液 200 μL,按 2.3.1 项下方法自“分别置于 10 mL 具塞比色管中”至“加冰醋酸至 5 mL”操作,分别于 0,10,20,30,40,50,60,90 min 在 540 nm 处测定 A,结果 RSD 0.894%,表明供试品溶液在 1.5 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 称取王不留行粉末 5 份,每份 4.00 g,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,精密量取 150 μL 于 540 nm 处测定,结果 A 的 RSD 1.27%,说明该方法重复性较好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知总皂苷质量(13.17 μg)的样品 6 份,每份 2.0 g,各准确加入适量对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下方法自“分别置于 10 mL 具塞比色管中”至“加冰醋酸至 5 mL”操作,计算回收率,结果见表 1。

表 1 王不留行总皂苷含量测定的加样回收率试验

No.	加入量 /μg	实测量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	50	74.64	96.59	95.51	1.01
2	100	107.55	94.38		
3	150	157.01	95.89		
4	200	201.71	94.27		
5	250	253.60	96.17		
6	300	300.45	95.76		

2.4 超声波提取工艺优化 选取乙醇体积分数、超声时间、超声功率及料液比为考察因素,选取总皂苷质量分数和干粉得率的综合评分为指标,权重系数分别为 0.8,0.2^[8],精密称取王不留行石油醚脱脂干燥粉末 4.0 g 置 200 mL 三角烧瓶中,按 L₉(3⁴) 正交表超声提取 2 次,合并提取液,过滤,减压回收溶剂,即得总皂苷粉末,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3。

表 2 王不留行总皂苷超声提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比 /g·mL ⁻¹	B 乙醇体积 分数/%	C 超声时间 /min	D 超声功率 /W
1	1:15	50	20	640
2	1:20	60	30	720
3	1:25	70	40	800

由直观分析可知,各因素对超声波提取工艺的影响顺序为 A > C > B > D。为节约资源,确定最佳提取工艺为 A₁B₃C₃D₁,即加 15 倍量 70% 乙醇于

640 W超声功率下提取2次,每次40 min。按优选的工艺条件进行3次验证试验,结果平均干粉得率7.34% (RSD 0.48%),总皂苷平均质量分数10.92% (RSD 2.43%),表明优选的提取工艺稳定可行。

表3 王不留行总皂苷超声提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	干粉得率/%	总皂苷质量分数/%	综合评分
1	1	1	1	1	6.61	10.43	9.67
2	1	2	2	2	7.13	11.34	10.50
3	1	3	3	3	6.54	12.50	11.30
4	2	1	2	3	6.98	11.02	10.21
5	2	2	3	1	6.79	11.87	10.86
6	2	3	1	2	5.96	10.94	9.95
7	3	1	1	2	7.21	9.29	8.87
8	3	2	3	3	6.61	9.07	8.58
9	3	3	2	1	5.79	11.31	10.21
K_1	31.47	28.75	28.19	30.73			
K_2	31.01	29.94	30.92	29.32			
K_3	27.66	31.46	31.03	30.10			
R	1.27	0.90	0.95	0.47			

2.5 回流提取工艺优化 在单因素试验基础上,选取提取时间、乙醇体积分数、料液比和提取次数为考察因素,选取总皂苷质量分数和干粉得率的综合评分为指标,权重系数分别为0.8,0.2^[9],精密称取王不留行石油醚脱脂干燥粉末50.0 g至1 L锥形瓶中,共9份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表4,试验安排及结果见表5。

表4 王不留行总皂苷回流提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	B 乙醇体积分数/%	C 提取时间/min	D 提取数/次
1	1:10	50	1.5	1
2	1:12	60	2.0	2
3	1:14	70	2.5	3

由直观分析可知,各因素对总皂苷提取工艺的影响顺序为 $A > D > B > C$,确定最佳提取条件为 $A_3B_2C_2D_2$,即加14倍量60%乙醇在微沸状态下提取2次,每次2 h。按最优条件进行3组验证试验,结果平均干粉得率7.17% (RSD 1.48%),总皂苷平均质量分数9.01% (RSD 1.95%),表明优选的乙醇

回流提取工艺稳定可行。

表5 王不留行总皂苷回流提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	干粉得率/%	总皂苷质量分数/%	综合评分
1	1	1	1	1	5.075	4.107	5.107
2	1	2	2	2	7.225	5.011	6.656
3	1	3	3	3	7.300	4.616	6.396
4	2	1	2	3	6.025	6.479	7.243
5	2	2	3	1	4.600	6.957	7.009
6	2	3	1	2	5.775	6.465	7.130
7	3	1	1	2	5.400	9.370	9.113
8	3	2	3	3	5.775	9.336	9.242
9	3	3	2	1	3.950	9.514	8.623
K_1	181.6	214.6	214.8	207.4			
K_2	213.8	239.1	235.2	239.0			
K_3	269.8	221.5	225.2	228.8			
R	29.4	4.8	3.5	7.2			

3 讨论

血管新生在肿瘤的生长扩散和转移等恶性行为过程中具有重要作用,通过抑制肿瘤新生血管的生成来治疗肿瘤已成为国内外研究热点^[9]。前期研究发现总皂苷是王不留行抑制新生血管有效部位的主要成分。目前对王不留行的研究主要集中于药理活性,关于其活性成分提取工艺的研究尚未见报道。本文试验结果显示,与乙醇回流提取法相比,超声波辅助法的提取时间和周期大大缩短,能耗低,干粉得率和总皂苷含量均明显提高。

文献报道王不留行中已发现的皂苷类成分有几十种,这为王不留行总皂苷的测定带来了较大困难。笔者分析了已发现的王不留行皂苷类成分结构,显示母核结构均为五环三萜类的齐墩果烷型或其变型^[9],故采用齐墩果酸为对照品,通过预试验优选香草醛-高氯酸显色体系来建立紫外-可见分光光度法测定王不留行总皂苷的方法。方法学考察结果表明,该方法重复性、精密度、稳定性和加样回收率均较好,可作为王不留行总皂苷的定量检测方法。在超声提取过程中,溶剂温度随着超声时间的持续而迅速升高,进而会引起超声功率的不稳定及由于溶剂温度不同而给试验结果带来误差,故在试验过程中将循环水接入超声仪中,以稳定超声提取过程中溶剂温度。

铁皮石斛超微粉碎破壁工艺的优化

李娟, 麻晓雪, 李顺祥*, 蔡光先, 张家曾

(湖南中医药大学中药现代化教育厅重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 优选铁皮石斛的超微粉碎工艺。方法: 以微粉粒度、细胞破壁率和总多糖含量为综合评价指标, 采用 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交试验考察入磨量、粉碎时间、入磨粒度、粉碎温度和投料水分对铁皮石斛超微粉碎破壁工艺的影响。结果: 最佳超微粉碎工艺为入磨粒径80目, 投料水分4%~6%, 入磨量250g, 粉碎温度0~10℃, 粉碎时间25min; 平均得粉率96.1% (RSD 0.24%), 粒径 $<75 \mu\text{m}$ 的平均得率96.8% (RSD 0.28%), 平均细胞破壁率98.3% (RSD 0.78%), 总多糖平均质量分数42.2% (RSD 2.85%)。结论: 该工艺合理可行、稳定性好, 为铁皮石斛的临床合理应用提供实验数据。

[关键词] 铁皮石斛; 超微粉碎工艺; 细胞破壁; 粒径分布; 正交试验; 综合加权法

[中图分类号] R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0030-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070030

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000007.html>

[网络出版时间] 2014-01-20 16:02

Optimization of Ultrafine Grinding Technology for Cell Wall Disruption of *Dendrobii Officinalis Caulis*

LI Juan, MA Xiao-xue, LI Shun-xiang*, CAI Guang-xian, ZHANG Jia-zeng

(Key Laboratory of Modernization of Chinese Medicine, Department of Education, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrafine grinding technology for cell wall disruption of *Dendrobii*

[收稿日期] 20130724(014)

[基金项目] 湖南省科技计划重大专项项目(2010FJ1010-3); 国家中医药管理局“药用植物学”重点学科课题(国中医药发[2009]30号); 湖南“中药学”重点学科(湘教通[2011]76号); 湖南省高校科技创新团队项目(湘教通[2010]212号)

[第一作者] 李娟, 在读硕士, 助理研究员, 从事中药物质基础与作用机制研究, Tel: 0731-85189068, E-mail: Forever_lijuan@163.com

[通讯作者] *李顺祥, 教授, 研究员, 从事中药有效成分与资源研究, Tel: 0731-88458229, E-mail: lishunxiang@hotmail.com

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 49.
- [2] 高越颖, 蒋秋龙, 冯磊, 等. 王不留行不同提取部位抑制新生血管作用的研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(12): 34.
- [3] Feng L, Zhang X P, Hua H, et al. *Vaccaria segetalis* extract can inhibit angiogenesis[J]. Asian Biomed, 2012, 6(5): 683.
- [4] 高越颖. 王不留行抑制血管新生有效部位的提取分离及其活性评价[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [5] 李敏晶, 韩艳玲, 刘远, 等. 超声波提取法对海燕总皂

- 苷提取工艺的研究[J]. 广东化工, 2010, 37(8): 69.
- [6] 周媛, 严铭铭, 邵帅, 等. 黄花草木犀总皂苷提取纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 1.
- [7] 徐伟, 戴莉, 石海英. 超声波提取牛蒡类胡萝卜素工艺条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(7): 3962.
- [8] 任爱农, 卢爱玲, 田耀洲, 等. 层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 372.
- [9] Han E S, Wakabayashi M, Leong L. Angiogenesis inhibitors in the treatment of epithelial ovarian cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2013, 14(1): 22.

[责任编辑 仝燕]