

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110420. 0933. 012

柴胡总皂苷提取工艺的优化

张国松¹, 封传华², 罗晓健^{1,2}, 宿士宁², 胡鹏翼², 王跃生^{1,3*}

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 南昌 330004;
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 考察柴胡总皂苷提取工艺。方法: 以柴胡总皂苷量为指标, 采用单因素和正交试验优选柴胡总皂苷的最佳提取工艺。结果: 柴胡总皂苷最佳提取工艺为柴胡粉末(40 目)加入 8 倍量 80% 乙醇, 调节 pH 8, 80 °C 加热回流提取 2 次, 每次 60 min。结论: 结果表明, 该工艺简单、可靠、重复性好, 适用于工业生产。

[关键词] 柴胡; 柴胡总皂苷; 提取工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)12-0017-04

Optimization of Extraction Technology for Saikosaponins from Bupleurum

ZHANG Guo-song¹, FENG Chuan-hua², LUO Xiao-jian^{1,2}, XIU Shi-ning², HU Peng-yi², WANG Yue-sheng^{1,3*}

(1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese
Herbal Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 20101203(003)

[基金项目] 重大新药创制专项(2009ZX09103); 江西省自然科学基金(201-GQY0048)

[第一作者] 张国松, 硕士, 从事中药新剂型与新制剂研究, Tel:0791-7119617

[通讯作者] * 王跃生, 研究员, 博士生导师, Tel:0791-7119617, E-mail:Wylw915@126.com

[网络出版时间] 2011-04-20 09:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110420.0933.012.html>

- [6] 黄诺嘉, 彭继峰, 张幼扬, 等. 消炎利胆片含量测定方法的比较[J]. 广东药学, 2000, 10(2):34.
- [7] Vikas Anand¹, Mahesh Kataria¹, Vipin Kukkar¹, et al. The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals[J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(5):257.
- [8] Indow T. A general equi-distance scale of the four qualities of taste[J]. Jpn Psychol Res, 1966, 8:136.
- [9] Indow T. An application of the t scale of taste; interaction among the four qualities of taste[J]. Percept Psychophys, 1969, 5:347.
- [10] Katsuragi Y, Mitsui Y, Umeda T, et al. 1997. Basic studies for the practical use of bitterness inhibitors: selective inhibition of bitterness by phospholipids[J]. Pharm Res, 1997, 14:720.
- [11] Xu Jianchen, Bovet Li Li, Zhao Kang. Taste masking microspheres for orally disintegrating tablets[J]. Int J Pharm, 2008, 359:63.
- [12] Beatrice Albertini, Cristina Cavallari, Nadia Passerini, et al. Characterization and taste-masking evaluation of acetaminophen granules; comparison between different preparation methods in a high-shear mixer[J]. Eur J Pharm Sci, 2004, 21:295.
- [13] Phoqus Pharmaceutical Limited, 10 Kings Hill Avenue, Kings Hill, et al. Practical approaches of taste masking technologies in oral solid forms[J]. Expert Opinion, 2007:417.
- [14] 王优杰, 冯怡, 徐德生. 药物掩味技术的研究进展与应用[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(19):1444.
- [15] 王优杰, 徐德生, 冯怡. 中药及其制剂苦味评价方法的建立[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15):1511.

[责任编辑 全燕]

[**Abstract**] **Objective:** To optimize the extraction technology for the saikosaponins from *Bupleurum*. **Method:** The extraction technology for the saikosaponins from *Bupleurum* was optimized by adopting a single factor experiment and an orthogonal experiment with the use of the extraction rate of the saikosaponins from *Bupleurum* as the assessment index. **Result:** The optimized extraction technology for the saikosaponins from *Bupleurum* was as follows: the powder of *Bupleurum* with a diameter less than 355 μm was subjected to reflux extraction for 2 times with 80% ethanol (regulate pH to 8) at 80 $^{\circ}\text{C}$, each extraction lasting 60 min. For each extraction, the solvent to solid ratio was 8. **Conclusion:** The extraction technology for the saikosaponins from *Bupleurum* is simple, reliable, repeatable and suitable for production in industry.

[**Key words**] *Bupleurum*; saikosaponins; extraction technology; orthogonal experiment

柴胡为常用中药,在我国已有 2 000 多年的药用历史^[1]。《中国药典》2010 年版规定^[2],以柴胡 *Bupleurum chinese* DC 和狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* Willd. 的干燥根入药。柴胡的主要药效物质基础有柴胡皂苷及苷元、挥发油及黄酮类等。现代药理学研究表明,柴胡皂苷具有抗炎、抗菌、抗病毒、保肝利胆、降低血压、免疫调节等多方面的药理活性^[3-5]。本实验以北柴胡为原料,系统考察了不同提取工艺条件对柴胡总皂苷的提取效果,优选最佳的柴胡总皂苷提取工艺,为工业生产提供参考。

1 材料

1.1 试药 柴胡皂苷 a 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110777-200507),北柴胡(河北安国),经江西中医学院生药教研室付小梅副教授鉴定为北柴胡(*B. chinese*),试剂均为分析纯。

1.2 仪器 DZF-1B 型真空干燥箱(上海跃进医疗仪器厂),UV-2550 型可见-紫外分光光度计(日本岛津),Mettler240 电子天平(瑞士),AL104/01 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 柴胡总皂苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取柴胡皂苷 a 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取北柴胡根适量,置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 6 h,粉碎过筛(40 目)后得柴胡根部粉末。准确称取柴胡粉末 10 g,按照单因素和正交试验中不同的提取条件加热回流提取,合并所得提取液,减压浓缩至原体积的 1/10,用石油醚萃取 3 次,每次 10 mL,弃石油醚层,提取液用等量的水饱和的正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇,减压浓缩至干燥,残渣用甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,备用。

2.1.3 线性关系考察^[6] 精密吸取柴胡皂苷 a 对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8, 1 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中,用甲醇定容,各精密吸取 0.2 mL 置于 5 支具塞试管中,加 0.1% 对二甲氨基苯甲醛乙醇溶液 0.4 mL, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min, 取出放冷至室温,各加入磷酸 4.0 mL, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 30 min, 取出放冷至室温,在 546 nm 处测定吸光度。以对照品质量浓度(C)对吸光度(A)进行线性回归,得柴胡皂苷 a 的线性回归方程 $A = 0.4238C - 0.0662$ ($r = 0.9991$),柴胡皂苷 a 在 0.05 ~ 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.1.4 样品中柴胡总皂苷的含量测定 精密吸取各供试品溶液 0.2 mL 置于具塞试管中,按照 2.1.3 项下的方法测定吸光度 A, 计算柴胡总皂苷的含量。

2.2 单因素试验 以柴胡总皂苷含量为指标,考察了加热回流提取过程中的多个影响因素,提取溶剂 pH、乙醇体积分数、体积比、提取时间、提取次数及提取温度。

2.2.1 pH 对提取效果的影响 精密称取北柴胡根部粉末 10 g, 5 份, 分别加入 80% 乙醇 80 mL 并调节 pH 为 7, 8, 9, 10, 11, 加热回流 2 次, 每次 60 min。合并所得提取液, 按照 2.1.2 及 2.1.3 项下的方法测定吸光度 A, 计算柴胡总皂苷的质量分数分别为 2.5%, 3.4%, 3.1%, 2.9%, 2.7 (g/100 g 生药)。pH 7 ~ 8 时, 柴胡总皂苷的量随 pH 升高而增加; pH 8 ~ 11 时, 柴胡总皂苷的量随 pH 升高而降低。

2.2.2 乙醇体积分数对提取效果的影响 精密称取北柴胡根部粉末 10 g, 5 份, 分别加入 30% 乙醇, 50% 乙醇, 70% 乙醇, 80% 乙醇, 95% 乙醇各 80 mL 并调节 pH 8, 加热回流 2 次, 每次 60 min。合并所得提取液, 按照 2.1.2 及 2.1.3 项下的方法测定吸光度 A, 计算柴胡总皂苷的质量分数分别为 2.0%,

2.3%,3.0%,3.5%,2.5%。随着乙醇体积分数的提高,总皂苷的量逐渐增加,但是95%的乙醇提取效果反而下好,可能是95%乙醇渗透性差,影响了柴胡皂苷的溶出。

2.2.3 体积比对提取效果的影响 精密称取北柴胡根部粉末10g,5份,加入80%乙醇40,60,80,100,120mL并调节pH8,回流提取2次,每次60min。合并所得提取液,按照2.1.2及2.1.3项下的方法测定吸光度A,计算柴胡总皂苷的质量分数分别为2.0,2.9,3.3,3.4,3.5(g/100g生药)。柴胡总皂苷的量随着提取溶剂用量的增加而增大,但当溶剂用量超过柴胡总量的8倍时,溶剂用量对提取效果无明显提高。

2.2.4 提取时间对提取效果的影响 精密称取北柴胡根部粉末10g,4份,分别加入80%的乙醇80mL并调节pH8,在80℃加热回流提取2次,每份提取时间分别为30,60,90,120min。合并所得提取液,按照2.1.2及2.1.3项下的方法测定吸光度A,计算柴胡总皂苷的质量分数分别为2.4%,3.3%,3.2%,2.7%。随着提取时间的增加,柴胡皂苷逐渐溶出,60~90min达到了平衡阶段,随着时间的继续延长,柴胡总皂苷的量反而下降,可能随着时间的延长,导致部分皂苷降解。

2.2.5 提取次数对提取效果的影响 精密称取北柴胡根部粉末10g,4份,分别加入80%的乙醇80mL并调节pH8,加热回流1,2,3,4次,每次60min。合并所得提取液,按照2.1.2及2.1.3项下的方法测定吸光度A,计算柴胡总皂苷的质量分数分别为2.1%,3.2%,3.4%,3.6%。提取2次所得柴胡总皂苷的量较提取1次有明显增加,随着提取次数的增加,提取效果并没有显著提高。

2.2.6 提取温度对提取效果的影响 精密称取北柴胡根部粉末10g,5份,分别加入80%的乙醇80mL并调节pH8,分别在60,70,80,90,100℃下提取2次,每次60min,合并所得提取液,按照2.1.2及2.1.3项下的方法测定吸光度A,计算柴胡总皂苷的质量分数分别为2.1%,2.5%,3.3%,3.3%,3.3%。随着提取温度的上升,柴胡总皂苷逐渐增加。可能是由于溶剂分子与各皂苷分子运动加剧,扩散增强所致^[7]。但温度过高,会造成柴胡总皂苷中活性成分的分解^[8],故本文选择80℃提取。

2.3 正交试验 从回流提取的单因素试验可以看

出,以上各因素对柴胡总皂苷的提取效果均有不同程度的影响。根据预试验的结果,选择影响提取效果的4个主要因素:pH、乙醇体积分数、体积比、提取时间,每个因素各选3个水平,制定因素水平表,见表1。采用正交表 $L_9(3^4)$ 进行试验,按照正交表的条件进行提取,每次试验均重复3次,合并所得提取液,按照2.1.2及2.1.3项下的方法测定吸光度A,计算柴胡总皂苷的质量分数。试验安排及结果见表2。

表1 柴胡总皂苷提取工艺因素水平

水平	A pH	B 乙醇 体积分数/%	C 体积比 /g·L ⁻¹	D 提取 时间/min
1	7	60	4	60
2	8	70	6	90
3	9	80	8	120

表2 柴胡总皂苷提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验

No.	A	B	C	D	柴胡总皂苷			%
1	1	1	1	1	2.03	2.19	1.91	2.04
2	1	2	2	2	2.72	3.07	2.95	2.91
3	1	3	3	3	3.12	3.60	3.40	3.37
4	2	1	2	3	2.99	2.59	2.61	2.73
5	2	2	3	1	3.51	3.24	3.02	3.26
6	2	3	1	2	2.74	2.81	3.11	2.89
7	3	1	3	2	2.43	2.88	2.37	2.56
8	3	2	1	3	2.14	2.45	2.43	2.34
9	3	3	2	1	3.14	2.93	3.35	3.14
K_1	2.77	2.44	2.42	2.81				
K_2	2.96	2.84	2.93	2.79				
K_3	2.68	3.13	3.06	2.81				
R_K	0.28	0.69	0.64	0.02				

2.4 结果分析 通过比较各因素的极差值(R)可以看出,影响柴胡总皂苷提取效果各因素顺序为 $B > C > A > D$ 。最佳的提取工艺条件为 $A_2B_3C_3D_1$ 或 $A_2B_3C_3D_3$ 。方差分析表明,因素A,B,C有显著性差异,因素D无显著性差异,表明溶剂pH、乙醇体积分数及体积比对柴胡总皂苷的提取效果有显著性影响。提取时间无显著性差异,为节能减排和减少生产成本,提取时间取 D_1 。确定最佳的柴胡总皂苷提取工艺为 $A_2B_3C_3D_1$,即用8倍量80%乙醇并调节

pH 8, 回流提取 60 min 即可。

表 3 柴胡总皂苷方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.358	2	0.179	3.92	<0.05
B	2.149	2	1.075	23.53	<0.05
C	2.047	2	1.024	22.41	<0.05
D	0.004	2	0.002	0.04	>0.05
Error	0.822	18	0.046		

结合预试验、单因素试验及正交试验,最终确定最佳的柴胡总皂苷提取工艺为柴胡根部粉末加 8 倍量 80% 乙醇,调节 pH 8,于 80 °C 加热回流提取 2 次,每次 60 min,合并提取液,减压浓缩干燥即可。

2.5 验证试验 取 3 批样品,按照上述最佳提取工艺进行提取,所得提取物中柴胡总皂苷质量分数分别为 2.95%,3.12%,3.06%,平均值为 3.04%。结果表明该工艺条件简单、可靠、重复性好。

3 讨论

本文通过单因素考察,确定了影响柴胡总皂苷提取的主要影响因素,再采用正交设计法优化柴胡总皂苷最佳提取工艺条件。结果表明乙醇体积分数、体积比、pH 对提取效果有显著性影响。这可能与柴胡皂苷的溶解度及稳定性有关。柴胡皂苷难溶于水而易溶于乙醇,故应选择适宜浓度及体积的乙醇进行提取;柴胡皂苷在酸性条件下,会发生次生化,导致其活性降低,在弱碱性条件下比较稳定。因此,通过正交试验优化了提取工艺条件,综合考虑了各因素的影响,既提高了柴胡总皂苷的提取效果,又最大限度地保持了药效。

柴胡总皂苷是柴胡中一类重要的活性成分,提高柴胡总皂苷得率,不仅可以保证药效,而且可以节约药材。前期实验系统考察了柴胡药材粉碎度对柴胡皂苷得率的影响,分别比较了柴胡饮片(5~6 mm)、

最粗粉、粗粉、中粉和细粉对柴胡的提取效果。结果显示,随着粒径的减小,柴胡总皂苷得率有所提高,柴胡细粉较饮片提高了近 15%,但是过滤比较困难,容易堵塞筛网,提取过程中易出现爆沸现象。结合生产实践,确定采用柴胡根部粉末(40 目)用于柴胡总皂苷的提取。

柴胡总皂苷中柴胡皂苷 a,d 具有较强的药理活性^[9],其含量的高低决定药效的强弱。据文献报道^[8],柴胡皂苷 a,d 会随加热时间的延长而发生转变。为最大限度地发挥柴胡的药效,提高柴胡提取物中柴胡皂苷 a,d 的含量,提取过程中应选择适宜的温度,提取时间不宜过长,浓缩、干燥过程中宜采用真空减压浓缩和低温干燥技术。

[参考文献]

- [1] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983:151.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:263.
- [3] 李芳,李建北,张东明. 柴胡药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2004,15(2):120.
- [4] 叶晓平,宋纯清. 柴胡皂苷药理研究进展[J]. 中草药, 2004,35(12):1434.
- [5] 杨志刚,陈阿琴,孙红祥,等. 柴胡皂苷药理作用研究进展[J]. 中国兽药杂志,2005,39(5):27.
- [6] 王鹏,王玉生,刘斌,等. 不同产地中柴胡总皂苷及柴胡皂苷 a 的含量测定[J]. 中国药物与临床,2008,8(2):228.
- [7] Shuna Zhao, Kin-Chor Kwok, Hanhua Liang. Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from Radix Bupleuri[J]. Sep Purif Technol 2007,55:307.
- [8] 肖功胜,杨云,孙维英,等. 柴胡有效成分提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(8):1829.
- [9] 王艳丽,和水祥,罗金燕. 柴胡皂苷抗肿瘤机制研究进展[J]. 中西医结合学报,2006,4(1):98.

[责任编辑 全燕]