

东北山梅花根总皂苷提取工艺及抗炎活性研究

盛继文¹, 刘冬梅^{2*}, 李耀辉¹, 李凤荣³

(1. 潍坊医学院医用化学教研室, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院药物化学与分析教研室, 山东 潍坊 261053; 3. 沈阳药科大学有机化学教研室, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 探讨东北山梅花根总皂苷最佳提取工艺, 研究东北山梅花根总皂苷抗炎活性。方法: 通过 $L_9(3^4)$ 正交实验设计优选东北山梅花根总皂苷最佳提取工艺; 采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀法研究东北山梅花根总皂苷抗炎活性。结果: 东北山梅花根总皂苷的最佳提取工艺为 70% 乙醇回流提取 2 次, 料液比 1:20, 提取时间 2 h; 东北山梅花根总皂苷具有显著抗炎活性。结论: 本实验结果将为东北山梅花根总皂苷的进一步研究提供理论依据。

[关键词] 东北山梅花根; 山梅花属; 正交实验; 总皂苷; 提取工艺; 抗炎

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0024-03

东北山梅花属于虎耳草科山梅花属植物, 系多年生落叶灌木, 其花形酷似梅花, 具有较高的观赏价值, 是一种重要的园艺植物。同时东北山梅花还具有较高的药用价值, 花、茎叶、根皮均可入药^[1], 是民间广为应用的一种中草药, 《浙江天目山药植志》及《云南中药资源名录》中均有记载。前期研究表明东北山梅花根含有豆甾醇^[1]、香豆素、香兰素、挥发油^[2]及皂苷等化学成分。定性分析及光谱研究显示皂苷类型为三萜皂苷, 含量较高, 初步药理实验研究表明东北山梅花根总皂苷具有显著的镇痛活性^[3]。为提高东北山梅花根总皂苷利用率、节约天然药用植物资源, 进一步研究东北山梅花根总皂苷的生物活性, 本实验首次对东北山梅花根总皂苷提取工艺进行了探讨, 采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀法对东北山梅花根总皂苷抗炎活性进行了研究。

1 材料

1.1 药材及药品 东北山梅花根采自吉林省抚松县, 由延边大学农学院张君仪高级农艺师鉴定为虎耳草科山梅花属东北山梅花 *Philadelphus schrenkii* Rupr.; 齐墩果酸(购自中国药品生物制品检定所, 批号 110709-200505); 甲醇、香草醛、冰醋酸、

高氯酸、二甲苯等均为国产分析纯; 薄层色谱硅胶 GF254、柱色谱硅胶(100~200 目, 购自青岛海洋化工厂); 吲哚美辛肠溶片(临汾奇林药业有限公司, 批号 0611191), 取 45 片研碎, 用聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温-80)配成 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液 500 mL, 备用。

1.2 仪器 超声波清洗器(KQ-250DE 型); 紫外-可见分光光度计(UV-3010 型, 日本岛津); 旋转蒸发器(RE-52 型, 上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 动物 昆明种小鼠(由沈阳药科大学实验动物中心提供), 雌雄各半, (20 ± 2) g, 标准恒温横湿条件下饲养。

1.4 数据处理 数据用 SPSS 13.0 软件进行处理。

2 方法与结果

2.1 东北山梅花根总皂苷提取方法的选择及结果

2.1.1 总皂苷样品的制备 准确称取粉碎的东北山梅花根干燥粉末 3 份, 各 2 g, 分别用索氏提取法、回流提取法、超声提取法提取东北山梅花根总皂苷。总皂苷提取条件及处理方法均为加入 70% 乙醇 60 mL, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并滤液, 减压浓缩, 将所得浸膏加入甲醇超声溶解, 定容至 10 mL。按上述方法得到索氏提取法、回流提取法、超声提取法提取得到的东北山梅花根总皂苷样品甲醇溶液 3 份, 密封备用。

2.1.2 测定波长的选择 精密称取干燥至恒重的齐墩果酸对照品 0.01 g 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

[收稿日期] 20100809001

[第一作者] 盛继文, 硕士, 讲师, 从事有机合成及天然产物化学研究, Tel: 0536-8462065, E-mail: sjwchy@wfmc.edu.cn

[通讯作者] * 刘冬梅, 硕士, 讲师, 从事天然产物化学的研究, Tel: 0536-8462493, E-mail: liudongmei100163.net

取齐墩果酸对照品溶液 0.04 mL, 2.1.1 项下任一样品溶液 0.5 mL, 分别放入 10 mL 比色管中, 挥干溶剂, 各加入新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 加盖, 摇匀, 于 60 ℃ 水浴中加热 15 min, 取出, 冷水中放置 5 min, 室温放置 10 min, 然后加入冰醋酸 5 mL, 摇匀, 室温静置 10 min 后, 利用 UV-3010 型紫外-可见分光光度计在 400 ~ 700 nm 波长下扫描, 根据扫描吸收光谱确定最大吸收峰波长。

扫描结果显示齐墩果酸对照品和样品溶液在 558 nm 波长处均有最大吸收, 因此选择 558 nm 波长作为测定波长。

2.1.3 线性关系考察 吸取齐墩果酸对照品溶液 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL, 分别置 10 mL 比色管中, 挥干溶剂, 各加入新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 加盖, 摇匀, 于 60 ℃ 水浴中加热 15 min, 取出, 冷水中放置 5 min, 室温放置 10 min, 然后加入冰醋酸 5 mL, 摇匀, 再室温放置 10 min, 以 0 mL 齐墩果酸对照品溶液为空白, 558 nm 波长处比色, 测定系列齐墩果酸对照品溶液吸光度值。以吸光度对齐墩果酸浓度进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.0168X - 0.0371$, $r = 0.9986$ 。线性范围 1.67 ~ 16.7 mg·L⁻¹。

2.1.4 不同提取方法结果 取 2.1.1 项下利用不同提取方法制备的东北山梅花根甲醇溶液各 0.5 mL, 按照 2.1.3 项下方法, 于 558 nm 波长处比色测定吸光度值, 通过回归方程分别计算东北山梅花根总皂苷含量, 比较不同提取方法得到的东北山梅花根总皂苷产率, 结果不同提取方法皂苷产率分别为 1.13% (索氏提取法), 1.64% (回流提取法), 0.82% (超声提取法)。

由表 1 可以看出, 在相同提取条件下, 回流提取法提取率最高, 超声提取法提取率最低。乙醇作为提取溶剂价格低廉, 在提取过程中无发泡现象, 故选择乙醇作为提取溶剂。

2.2 正交试验 为进一步寻找回流提取法的最佳实验条件, 对乙醇浓度、料液比、提取时间及提取次数进行 4 因素 3 水平正交试验, 因素水平见表 1。按照 L₉(3⁴) 表条件进行实验, 共 9 组实验, 每组 2 次平行实验, 以总皂苷含量为指标, 具体操作如下: 取 2 g 东北山梅花根干燥粉末, 按照 L₉(3⁴) 表条件操作得东北山梅花根乙醇提取物, 浓缩至干, 得固体提取物

浸膏, 甲醇超声溶解, 定容至 10 mL, 准确吸取 0.5 mL, 置 10 mL 比色管中, 挥干溶剂, 按照线性关系考察项下方法, 于 558 nm 波长处比色测定吸光度值, 通过回归方程分别计算东北山梅花根总皂苷含量, 确定最佳提取条件, 正交试验结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

表 1 因素水平

水平	A 醇浓度 / %	B 料液比 / 倍	C 提取时间 / h	D 提取次数
1	60	10	1	1
2	70	15	1.5	2
3	80	20	2	3

表 2 正交试验结果

No.	浸膏质量 / g	总皂苷质量分数 / %
1	0.0652	0.814
2	0.0735	1.162
3	0.0868	1.384
4	0.0977	1.746
5	0.0921	1.637
6	0.1086	2.099
7	0.0823	1.232
8	0.0881	1.327
9	0.0847	1.285

表 3 方差分析

方差来源	偏差平方和	F 比	P
A	0.824	824.000	>0.01
B	0.164	164.000	>0.01
C	0.001	1.000	
D	0.122	122.000	>0.01
误差	0.001		

注: $\alpha = 0.01$, $F = 99.000$, $n = 2$

正交实验方差分析表明, 影响东北山梅花根总皂苷提取率的因素依次为: 醇浓度、料液比、提取次数、提取时间, A, B, D 因素对实验均有显著影响, C 因素对考察指标无显著性影响, 最佳提取工艺组合为 A₂B₃C₃D₂, 即在粉碎的干燥东北山梅花根中加入 20 倍药材质量、浓度为 70% 的乙醇, 加热回流提取 2 次, 提取时间 2 h。

2.3 抗炎作用

2.3.1 总皂苷样品的制备 取东北山梅花根干燥粉末 2 kg, 按最佳提取工艺加入 20 倍药材质量 70% 乙醇, 加热回流提取 2 次, 提取时间 2 h, 过滤, 合并

滤液,减压浓缩,得淡黄色固体膏状物。将固体膏状物用蒸馏水超声溶解,依次用乙醚、正丁醇萃取。将正丁醇萃取物减压浓缩,加入甲醇溶解,硅胶柱层析色谱上精制,薄层色谱跟踪检测。石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱(1:10~1:1),至无流份,改用 80% 乙醇洗脱。合并醋酐-硫酸反应呈阳性组分,减压浓缩至干,得东北山梅花根总皂苷。

取总皂苷 0.1 g, 甲醇超声溶解,定容至 10 mL, 移取总皂苷甲醇溶液 0.5 mL, 按照线性关系考察项下方法,于 558 nm 波长处比色测定吸光度,通过回归方程计算总皂苷纯度为 64.23%。另取总皂苷 5.0 g, 蒸馏水超声溶解并定容至 500 mL, 备用。

2.3.2 二甲苯致小鼠耳廓肿胀试验 选取昆明种小鼠 50 只,随机分成 5 组,雌雄各半,每组 10 只。分别按表 5 剂量 ig 总皂苷样品溶液,对照组 ig 等量 0.9% 生理盐水,阳性组按表 5 剂量 ig 吲哚美辛(2 g·L⁻¹)。连续给药 3 d,末次给药后 1 h 用移液枪在小鼠左耳前后两面各均匀涂抹 0.04 mL 二甲苯致炎,右耳对照,致炎后 2 h 颈椎脱臼处死小鼠,沿耳廓基线剪下两耳,用 9 mm 打孔器分别在两耳相同部位打下圆耳片,称重,以两耳片质量之差为肿胀度,并计算肿胀抑制率,肿胀抑制率 = (对照组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度) / 对照组平均肿胀度 × 100%。利用 SPSS 13.0 软件进行数据处理,作组间配对 *t* 检验,见表 4。

表 4 总皂苷抗炎试验(̄x±s, n=10)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	两耳质量差 /mg	抑制率 /%
对照	-	2.88 ±0.16	-
吲哚美辛	20	1.58 ±0.32 ²⁾	45.14
总皂苷	20	2.21 ±0.23 ¹⁾	23.26
	40	1.79 ±0.26 ²⁾	37.85
	60	1.61 ±0.15 ²⁾	44.10

注:与对照组比较,¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

由表 4 可知,东北山梅花根总皂苷在高、中、低 3 个剂量下均有显著抗炎活性,给药剂量为 60 mg·kg⁻¹ 时对由二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀抑制率与阳性给药组相当,且明显存在剂量依赖关系。

3 讨论

前期实验利用人参皂苷 Rb₁ 为对照品测定东北山梅花根总皂苷的含量,测定过程中利用石油醚、乙醚等溶剂依次萃取东北山梅花根总浸膏、柱色谱精制总皂苷,致总皂苷部分损失,含量比本实验优化提取工艺测定结果低。本实验以齐墩果酸为对照品,通过 L₉(3⁴) 正交实验设计,优化东北山梅花根总皂苷的提取工艺,验证实验产率 2.21%,结果令人满意,为东北山梅花根总皂苷的提取提供了便捷、高效的途径。初步抗炎实验表明东北山梅花根总皂苷具有显著抗炎活性,能显著抑制由二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05)。

皂苷是一类具有显著抗炎活性的化合物,人们已经发现几十种植物中含有抗炎作用的皂苷化合物,如人参皂苷、桔梗皂苷、大豆皂苷等。目前,临床使用的抗炎药物多具有严重的副作用,开发具有抗炎作用的天然植物皂苷并进一步以其为先导化合物开发天然抗炎药物日益受到人们的重视。东北山梅花作为一类富含皂苷的药用植物,值得深入研究。

[参考文献]

- [1] 盛继文,刘冬梅,李翠花,等. 东北山梅花根化学成分的研究[J]. 齐鲁药事, 2007, 26(6): 365.
- [2] 张庆镐,韩荣弼,刘冬梅,等. 东北山梅花根化学成分的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(11): 1616.
- [3] 刘冬梅,盛继文,韩慧蓉,等. 东北山梅花根总皂苷的含量测定及镇痛活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 147.

[责任编辑 邹晓翠]