

正交试验结合体外抑制肠平滑肌收缩活性研究优化固公果根总三萜提取工艺

石浩源¹, 王春雷², 赵艳敏^{1,2}, 薛天凯², 刘岱琳^{1*}, 魏晓瑶¹, 齐书艺¹, 晁亮¹

1. 中国人民武装警察部队后勤学院, 天津 300162

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 利用正交试验结合体外模型测定固公果根总三萜(TTROG)提取物抑制大鼠离体肠平滑肌收缩活性, 优化其提取工艺。方法 以熊果酸为对照品, 采用香草醛-冰醋酸显色, 紫外分光光度法测定 TTROG 提取物中三萜含量, 单因素考察提取溶剂、料液比、提取温度、提取时间、提取次数对 TTROG 提取率的影响; 在单因素实验的基础上采用正交试验法考察提取溶剂、料液比、提取时间对 TTROG 提取率的影响; 通过张力传感器与 BL-420 生物实验多通道生理信号采集处理系统记录不同提取物对体外肠平滑肌收缩的抑制作用, 利用加权方法使生物活性与提取率相结合评价 TTROG 的提取工艺。结果 TTROG 的最佳提取工艺条件为: 提取溶剂 80%乙醇, 料液比 1:10, 提取时间 2 h, 提取温度 80 °C, 提取次数 3 次; 最优条件下 TTROG 的提取率可达 42.12 mg/g; TTROG 提取物对十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段都具有显著的抑制离体肠平滑肌收缩的作用, 呈剂量相关性, 对空肠的作用最强, 抑制率可达 41.96%。结论 经优化后的 TTROG 提取工艺提取率高、稳定, 且获取的 TTROG 提取物具有显著的抑制大鼠离体肠平滑肌收缩功能。

关键词: 正交试验法; 固公果根; 总三萜; 提取工艺; 抑制率; 离体肠平滑肌收缩

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)11-1581-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.11.010

Optimization of extraction process of total triterpenoid from root of *Rose odorata* var. *gigantea* by orthogonal test and its inhibitory effect on contraction of isolated rat intestinal smooth muscle

SHI Hao-yuan¹, WANG Chun-lei^{1,2}, XUE Tian-kai^{1,2}, ZHAO Yan-min^{1,2}, LIU Dai-lin¹, WEI Xiao-yao¹, QI Shu-yi¹, CHAO Liang¹

1. Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction technology of total triterpenoid from root of *Rose odorata* var. *gigantea* (TTROG) by orthogonal test combined with the contraction effect of TTROG on the isolated intestinal smooth muscle of rats *in vitro*. **Methods** UV spectrophotometric method was used to determine the contents of total triterpenoids in the TTROG extractive at the wavelength of 550 nm by taking ursolic acid as standard substance, and vanillin acetic acid as chromogenic reagent. The extraction rate of total triterpenoids was used as index to evaluate the technology based on single factor test, in which three factors were considered as follows: the concentration of extraction solvent, ratio of material to liquid, extraction time, and their interaction on extraction were studied by orthogonal experimental design. The inhibition effect of different extracts obtained from the optimized extraction process on the contraction of intestinal smooth muscle were recorded by tension transducer to the BL-420 biological experimental multi-channel physiological signal acquisition and processing system. The extraction process of TTROG was evaluated by the combination of biological activity and extraction rate with weighting method. **Results** The optimal extraction conditions of TTROG were as follows: extraction solvent 80% ethanol, solid - liquid ratio 1:10, extraction time for 2 h, three times and extraction

收稿日期: 2017-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673693),

作者简介: 石浩源 (1996—), 男, 学士, 研究方向为天然产物活性成分研究。Tel: 17602649983 E-mail: 18742144498@163.com

*通信作者 刘岱琳, 女, 教授, 研究方向为天然产物活性成分研究。Tel: 13821660597 E-mail: dailinlch@163.com

temperature of 80 °C. The optimized extraction rate could reach 42.12 mg/g. TTROG obtained using the optimized method showed significantly contraction effect on rat intestinal smooth muscle with dose effect dependence, and the effect on jejunum was the strongest, and the inhibition rate was 41.96%. **Conclusion** The optimized extraction technology is stable and effective with high extraction rate. TTROG showed the significant inhibitory function on contraction of isolated rat intestinal smooth muscle.

Key words: orthogonal test; the root of *Rose odorata* var. *gigantea*; total triterpene; extraction technology; inhibitory ratio; contraction of isolated rat intestinal smooth muscle

固公果根是一味传统的彝族民间药材,性平、味酸,具有涩肠止泻的功效^[1],民间常用于治疗腹泻、菌痢等疾病,主要活性成分为鞣质、三萜和小分子酚酸类成分^[2-3]。现代药理学研究表明,三萜类和鞣质类成分具有迅速杀死致病菌,保护消化道黏膜,促进肠壁血液循环,加快溃烂肠黏膜愈合等作用^[4-5]。固公果根中三萜类成分的主要骨架类型属于熊果酸型的五环三萜^[3],本文以熊果酸为对照品建立了固公果根中总三萜类成分的测定方法,考察固公果根药材中的三萜类成分的提取率。为了更有效地提取利用固公果根中三萜类成分,本文以总三萜提取率为评价指标,采用正交试验法优化固公果根总三萜(total triterpenoid from root of *Rose odorata* var. *gigantea*, TTROG)的提取工艺;并通过加权法考察不同工艺提取的 TTROG 抑制大鼠离体肠平滑肌收缩的效果。从而将体外生物活性与三萜提取率相结合,共同评价提取工艺,以便于获得高提取率和高活性的 TTROG 提取条件,确定最佳提取参数,为固公果药材的后续开发奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

FA1204B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司); DZKW-D-2 电热恒温水浴锅(北京永光明医疗仪器厂); BUCHIR-124 型旋转蒸发仪(瑞士步琪公司); SHB-111 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); MT5 百万分之一电子天平(瑞士梅特勒); KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DGG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司); UV-1800 双光束紫外可见分光光度计(日本岛津公司); BL-410 生物机能实验系统、HW-400S 恒温平滑肌浴槽(四川成都泰盟科技电子有限公司); FT-100 生物张力传感器(中国北京航天医学工程研究所)。

1.2 药材及主要试剂

固公果根药材,采自云南省曲靖市,经中科院昆明植物所植物分类学科陈瑜工程师鉴定为蔷薇科

植物大花香水月季 *Rose odorata* Sweet var. *gigantea* (Coll. et Hemsl.) Rehd. et Wils 的干燥根,标本保存在武警后勤学院生药学与药剂学教研室(WJL-012);熊果酸对照品(批号 KMST-X160112,含量>98%,天津科曼思特医药科技发展有限公司);香草醛、冰醋酸、高氯酸等试剂均为分析纯(天津康科德生物科技有限公司);乙醇、甲醇均为国产 AR 级试剂,娃哈哈纯净水。

1.3 实验动物

昆明种 SD 雄性大鼠 20 只,体质量为(200±20)g,由军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK-2012-0004;于(23±2)°C、湿度(60±5)%条件下适应性饲养 1 周后进行实验。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照品 58.19 mg,置于 25 mL 棕色量瓶中,色谱甲醇定溶,摇匀,即得 2.327 6 mg/mL 熊果酸对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 准确称取固公果根干燥药材 10 g(剪成 1 cm 长的小段),置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入体积分数为 80%的乙醇溶液 100 mL,回流提取 2 h,冷却至室温,过滤,即得供试品溶液。

2.1.3 显色方法^[6] 取待测供试品溶液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,依次精密加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.4 mL、高氯酸溶液 1.4 mL,混匀。置 60 °C 水浴 25 min,冰水冷却后加 5 mL 冰醋酸,利用色谱甲醇定容至 10 mL。用 1 mL 色谱甲醇代替样品溶液按上述方法配制,作为空白溶液。

2.1.4 测定波长的选择 取对照品溶液 1 mL,按“2.1.3”项下方法显色后,紫外分光光度计在 200~800 nm 进行全波长扫描。结果显示,反应液在 550 nm 处有明显特征峰,因此选取可见区域 550 nm 的特征吸收峰位作为检测波长。

2.1.5 线性范围考察 精密吸取对照品溶液 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mL 置于 100 mL 量瓶中加入色

谱甲醇定容至刻度, 摇匀。不同浓度的对照品溶液分别依据“2.1.3”项下方法显色后, 在 550 nm 下测定吸光度(A)值。每个浓度平行测定 3 次, 取平均值。以熊果酸浓度为横坐标, A 值为纵坐标绘制标准曲线, 计算回归方程。实验结果显示, 熊果酸在 6.928 2~34.914 0 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈现良好的线性关系, 回归方程为 $A=0.020\ 3C+0.076\ 1$, $R^2=0.999\ 4$ 。

2.1.6 精密度试验 取同一浓度的对照品溶液, 按照“2.1.3”项下显色方法进行显色实验, 在 550 nm 处平行测定 A 值, 连续进行 5 次测定, 计算 RSD 值为 0.15%, 表明在该条件下仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按“2.1.3”项下方法操作, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 测定其 A 值, 计算 RSD 值为 1.04%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 取同一种样品 5 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下方法显色后, 在 550 nm 处平行测定其 A 值, 计算 RSD 值为 1.02%, 表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 分别精密称取 1 g 已知总三萜含量的固公果根药材共 3 份, 分别加入相当于样品中总三萜量 80%、100%、120% 的对照品溶液。按“2.1.2”项下方法进行制备, 按“2.1.3”项下操作, 在 550 nm 处平行测定其 A 值, 加样回收率均

在 95%~105% 之间, 平均回收率为 98.85%, RSD 值为 1.55%, 回收率良好。

2.1.10 干扰试验 精密量取 0.5 mL 对照品溶液 2 份, 分别置于 10 mL 容量瓶中。另取没食子酸 3 mg 准确加入其中 1 份对照品溶液中, 另一份做空白对照, 按“2.1.3”项下的方法平行试验, 在 550 nm 处测定二者的 A 值, 其差值为 0.008。说明没食子酸在该方法下的 A 值贡献很低, 可以确定在本测定方法中固公果根中鞣质类成分未干扰到三萜类成分的定量测定。

2.2 单因素考察^[7]

2.2.1 提取溶剂考察 按“2.1.2”项下方法, 分别考察提取溶剂体积分数为 60%、70%、80%、90% 的乙醇对 TTROG 提取率(1 g 药材中获得的总三萜的量, 单位为 mg/g) 的影响, 实验结果见图 1A。结果显示, 80%乙醇对总三萜的提取率影响最佳, 故确定 80%乙醇为最佳提取溶剂。

2.2.2 料液比考察 按照“2.1.2”项下方法, 分别考察料液比为 1:6、1:8、1:10、1:12 对 TTROG 提取率的影响, 结果见图 1B。结果显示, 当料液比低于 1:10 时, 总三萜的提取率随着料液比升高而增加, 而当提料液比大于 1:10 时, 总三萜提取率的升高趋于平缓, 增加幅度不明显。故确定 1:10 为最佳料液比。

2.2.3 提取时间考察 按照“2.1.2”项下方法, 分

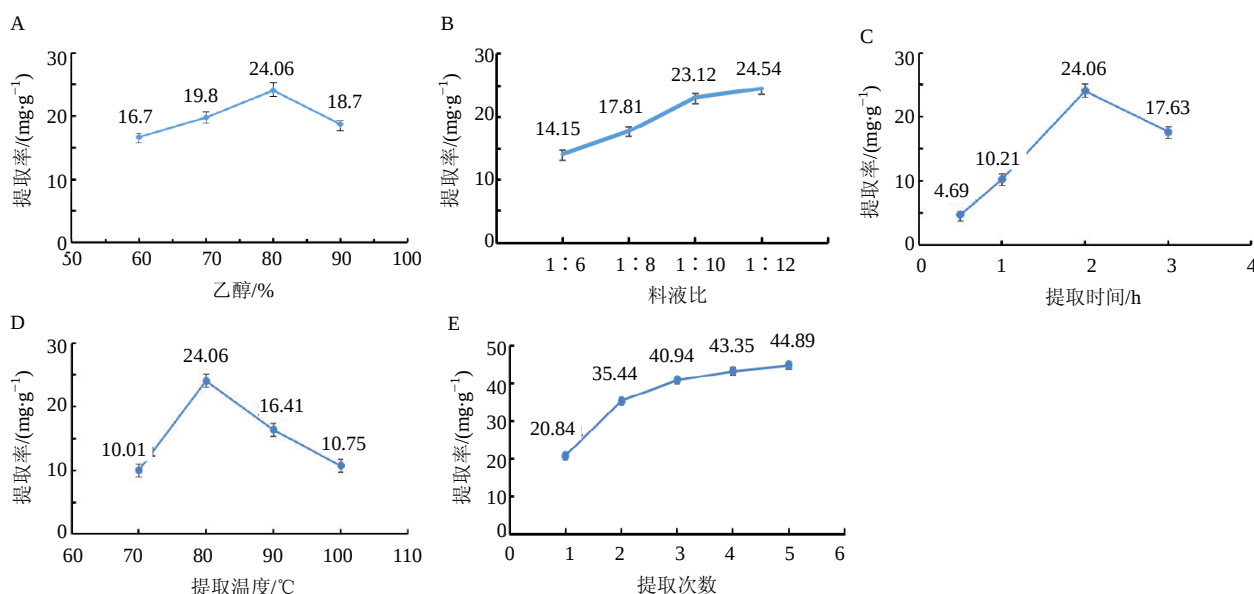


图1 不同提取溶剂、料液比、提取时间、提取温度及提取次数对 TTROG 提取率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effect of different solvent, ratio of material to liquid, extraction time, temperature and extraction times on extraction rate of TTROG ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

别考察提取时间为 0.5、1.0、2.0、3.0 h 对 TTROG 提取率的影响,结果见图 1C。结果显示,当提取时间低于 2 h 时,总三萜的提取率随着提取时间升高而增加,而当提取时间长于 2 h 时,总三萜提取率随着提取时间的增加而稍有降低,故确定 2 h 为最佳提取时间。

2.2.4 提取温度考察 按照“2.1.2”项下方法,分别考察温度为 70、80、90、100 °C 对 TTROG 提取率的影响,结果见图 1D。结果显示,当提取温度低于 80 °C 时,总三萜的提取率随着提取温度升高而增加,而当提取温度高于 80 °C 时,总三萜提取率随着提取温度的增加而降低,故确定 80 °C 为最佳提取温度。

2.2.5 提取次数考察 按照“2.1.2”项下方法分别考察提取 1、2、3、4、5 次对 TTROG 提取率的影响,平行测定 3 次,结果如图 1E 所示,随着提取次数的增加,固公果根中总三萜的提取率呈现上升趋势,当提取 3 次之后,提取率增加的效果变得平缓。结合提取工艺的成本综合考虑,将固公果根中总三萜的提取确定提取 3 次为最佳提取次数。

2.3 体外抑制肠平滑肌收缩活性测试

2.3.1 标本制备^[9] 大鼠禁食 12 h,木槌击鼠头枕部至晕,剖开腹腔,以胃幽门与十二指肠交界处为起点,剪取空肠,将其剪成约 2 cm 的肠段,置于盛有 0 °C 台氏液(氯化钾 2.7 mmol/L、氯化钠 136.9 mmol/L、碳酸氢钠 11.9 mmol/L、磷酸二氢钠 0.4 mmol/L、氯化钙 1.8 mmol/L、氯化镁 1.1 mmol/L、葡萄糖 5.6 mmol/L)的浴管中,调节基本张力为 1.5 g,恒温(37.0±0.5) °C 水浴中进行试验,通气均以每秒 1~2 个气泡的速度持续通入混合气体(95% O₂ 和 5% CO₂)。肠平滑肌收缩活动及变化信号经张力换能器引至 BL-420 生物机能实验多道生理信号采集处理系统。

2.3.2 样品制备 依据“2.2 项”下单因素考察获得的最佳提取工艺进行提取,而后减压浓缩至干,得 TTROG 干燥粉末(1 g 药材可以获得 120 mg 粉末,其中总三萜的量为 42.12 mg)。待实验时,称取该提取物粉末用去离子水配制成浓度为 4 mg/mL^[10] 样品溶液,备用。

2.3.3 TTROG 对肠平滑肌收缩功能的影响 浴管中空肠标本张力稳定后,在浴槽中依次加入 TTROG 0.04、0.08、0.16、0.24、0.56 mg/mL,观察该提取

物在不同质量浓度下对十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段平滑肌收缩幅度的影响,记录 10 min。结果如图 2 所示,TTROG 对十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段都具有显著的抑制收缩作用,且呈现良好的剂量相关性。当给予 TTROG 提取物的质量浓度为 0.56 mg/mL 时显示出最佳的抑制离体肠平滑肌收缩活性,且抑制率强弱表现为空肠(41.96%)>回肠(37.65%)>十二指肠(34.49%)>结肠(28.12%)。因此在后续考察正交试验获得的 TTROG 时,均选取空肠样本进行实验。

肠管抑制率 = (给药前平均张力 - 给药后平均张力) / 给药前平均张力

2.4 正交试验结果及分析^[8]

根据单因素试验结果,选取影响提取率最为显著的提取溶剂(A)、料液比(B)、提取时间(C) 3 个因素,利用 L₉(3⁴) 正交设计表进行试验,因素水平见表 1。

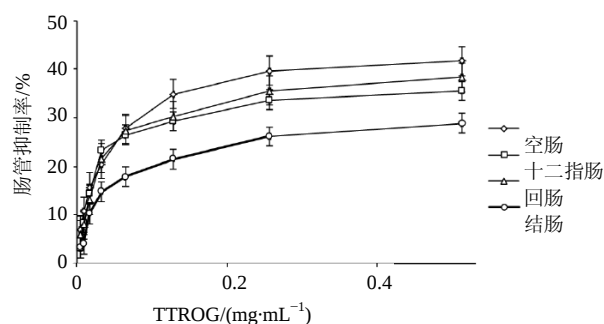


图2 不同浓度的 TTROG 对 4 种不同离体肠段平滑肌收缩的抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Inhibition ratio of TTROG with different concentrations on contraction of different isolated intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 1 正交试验考察的因素水平

Table 1 Factor levels designed in orthogonal test

水平	因素		
	提取溶剂(A)	料液比(B)	提取时间(C)/h
1	70%乙醇	1:8	1
2	80%乙醇	1:10	2
3	90%乙醇	1:12	3

为了快速简便地考察最优的提取参数,提取次数均固定为 1 次,正交试验方案见表 2,方差分析见表 3。将不同试验组获取的 TTROG 配制成 0.4 mg/mL 水溶物,按“2.3.3”项下方法操作,测试其

对大鼠离体空肠平滑肌的收缩作用, 结果见表 2。为了同时考察正交试验提取率和抑制大鼠离体肠平滑肌的收缩活性, 依据提取率和抑制率的比例为 6:4, 人为设定权重系数, 然后进行权重评分, 共同评价正交试验的优化结果。

各因素对实验结果影响的重要性依次为 A>C>B, 即提取溶剂 A 是主要影响因素, 提取时间 C 是次要影响因素, 料液比 B 影响最小; 综合分析正交试验结果, 最佳提取条件为 A2B2C2, 即以 80%乙醇为提取溶剂, 料液比 1:10, 回流提取 2 h, 见表 3。

表 2 正交设计的实验方案及结果

Table 2 Scheme and results in orthogonal design experiment

试验号	A	B	C	提取率/(mg·g ⁻¹)	抑制率/%	加权评分/分
1	1	1	1	7.61	5.30	6.69
2	1	2	2	16.66	19.00	17.60
3	1	3	3	11.19	14.50	12.51
4	2	1	2	14.72	15.60	15.07
5	2	2	3	15.05	16.10	15.47
6	2	3	1	8.69	7.87	8.36
7	3	1	3	7.96	5.80	7.09
8	3	2	1	4.50	3.10	3.94
9	3	3	2	3.45	2.40	3.03
k1	12.267	9.617	6.330			
k2	12.967	12.337	11.900			
k3	4.687	7.967	11.690			
极差 R	8.280	4.370	5.570			

表 3 正交试验方差分析

Table 3 Analysis of orthogonal test variance

因素	偏差平方和	f	F 比	F 临界值
提取溶剂	126.505	2	10.927	19.000
料液比	29.218	2	2.524	19.000
提取时间	59.799	2	5.165	19.000

2.5 验证试验

按确定的最佳提取工艺进行 3 次验证试验, 结果显示 TTROG 提取率可达 42.12 mg/g 生药, 对大鼠离体空肠平滑肌的收缩抑制率可达 41.96%, 证明该方法所得提取工艺合理。

3 讨论

固公果根是我国彝族民间药物, 具有悠久的治疗腹泻的临床应用历史。目前研究确定三萜和鞣质是其主要活性成分, 但是至今尚无固公果根中总三萜提取工艺研究的相关报道。本文利用单因素试验进行考察, 当料液比超过 1:10, 提取时间超过 2 h, 提取温度超过 80 ℃时, 提取率并没有增加反而降低, 提取次数多于 3 次时提取率出现平缓上升, 提取效率下降, 证明提取温度、提取时间和料液比对 TTROG 的提取率都具有很大的影响。因此, 筛选

适宜的工艺参数对 TTROG 的提取是非常必要的。

本实验在考察提取工艺的同时也考察了 TTROG 提取物对大鼠离体肠的十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段的抑制收缩作用。结果显示, TTROG 提取物能够剂量相关性地抑制各肠段平滑肌的收缩, 且对抑制空肠平滑肌收缩的作用更为显著。因此选择体外测定提取物对离体空肠收缩的抑制率, 来快速评价固公果根提取物治疗腹泻的生物活性。

本文在单因素的基础上采用正交试验优化固公果根总三萜的提取工艺参数; 利用抑制离体肠平滑肌收缩活性测定了试验中各组提取物的抑制活性, 将总三萜的提取率和抑制肠蠕动活性相结合共同评价化固公果根总三萜的提取工艺, 确定的最佳工艺参数是: 提取溶剂为体积分数 80%的乙醇、提取温度 80 ℃、料液比 1:10、提取时间 2 h、提取次数 3 次。

本文开发的提取工艺将进一步促进固公果根药材有效成分的提取、开发和利用, 加快该药材有效部位的开发进程, 促进民族药物的发展。

参考文献

- [1] 任洁, 何广新. 苗药一固公果阿江制剂: “肠康胶囊”

- 的质量标准研究 [J]. 中国民族民间医药杂志, 1998, 31: 41-42.
- [2] 马 荣. 固公果根中活性成分及质量控制研究 [M]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2010.
- [3] 刘岱琳, 朱 珊, 马 荣, 等. 固公果根中的三萜类成分 [J]. 中国天然药物, 2010, 8(1):12-15.
- [4] 延慧君, 高 颖, 刘岱琳, 等. 固公果根提取物对肠道致病菌的体外抑菌活性研究 [J]. 武警医学院学报, 2012, 21(1): 5-6, 14.
- [5] 朱 珊. 固公果根活性成分研究 [M]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [6] 吴志勇, 胡 迪. 茯苓总三萜提取工艺研究 [J]. 湖北中医杂志, 2013, 35 (9): 76-77.
- [7] 许海燕, 侯敏娜, 刘 剑. 灵芝总三萜提取工艺研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2007, 30(3): 43-44.
- [8] 胡 娟, 黄 欢, 张 宏, 等. 枇杷花总三萜提取工艺研究 [J]. 中药材, 2011, 34(5): 794-797.
- [9] 崔文燕, 刘素香, 赵艳敏, 等. 响应曲面法优化黄花败酱总皂苷提取工艺及体外促进肠平滑肌收缩活性 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2078-2083.
- [10] 安 瑛. 固公果根提取物对动物实验性肠炎的保护作用 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2015.