

收,故选择此波长为检测波长。

References:

[1] Li M, Li Z. Study on quality standard for Yanqingsong Granule [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26 (1):

23-24.
[2] Institute of Pharmacy, Chinese Academy of Medical Science. *Researches on Effective Components of Chinese Traditional Herbal Drugs* (中草药有效成分研究) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1972.

均匀设计法优选菝葜总皂苷的超声提取工艺

舒孝顺¹, 吕金海², 高中洪³, 杨祥良³

(1. 长沙理工大学 生物与食品工程系, 湖南 长沙 410076; 2. 怀化学院 生物系, 湖南 怀化 418000; 3. 华中科技大学药物研究所, 湖北 武汉 430074)

菝葜为百合科菝葜属植物 *Smilax china* L. 的根茎, 又名金刚藤, 具有消肿止痛、祛风利湿、活血化痰及抗肿瘤等作用^[1~3], 临床单用或与其他药物配伍用于各种炎症性疾病, 如妇科盆腔炎症及炎症性包块、前列腺炎、类风湿性关节炎及各种肿瘤等, 均取得满意疗效。菝葜属植物主要分布于全球热带地区, 共有 300 种左右, 我国有 60 种和一些变种, 大多数分布于长江以南各省区, 菝葜属植物资源丰富。皂苷类成分是菝葜属植物的主要成分, 其中主要是甾体皂苷元及其苷。药理研究发现其具有抗炎、抗肿瘤、抗凝血等重要药理活性^[3~5], 主治妇科盆腔炎症及炎症性包块的金刚藤糖浆及胶囊, 其用于制剂的提取物浸膏就是用水煮醇沉工艺制备而来, 但存在着服用量大等缺点, 而且目前也主要以薯蓣皂苷元或其苷作为控制制剂质量的指标。为了提高其制剂水平, 进一步提高其疗效, 有必要对其有效部位的提取工艺进行进一步的研究。总皂苷的传统提取方法多采用水煮和有机溶剂回流或浸取法, 皂苷容易被水解破坏, 得率往往较低, 而且生产周期长, 能耗高。超声波提取技术与传统方法相比, 具有收率高、生产周期短、不用加热、有效成分不被破坏等优点。为了更好地利用菝葜, 提高菝葜总皂苷的收率, 本研究采用了均匀设计法进行菝葜总皂苷超声提取工艺研究。以筛选菝葜总皂苷超声提取的最佳工艺条件。

1 仪器与试剂、材料

JY98—Ⅲ 型超声细胞粉碎机(上海新芝生物技术研究所、宁波新芝科器研究所, 功率为 0~2 000 W); BS300S 型电子分析天平; 7500 紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。菝葜根茎产于湖南邵阳地区, 粉碎干燥备用; 香草醛、高氯酸、冰

醋酸均为分析纯; 甾体总皂苷对照品购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 总皂苷的测定

2.1.1 总皂苷标准曲线的制备: 精密称取甾体总皂苷对照品, 用甲醇配成 248 μg/mL 的对照品溶液。分别精密吸取 0.1、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mL 对照品溶液及 0.40 mL 甲醇于 8 支 10 mL 试管中, 于 70 °C 恒温水浴锅上蒸干, 各试管再分别加入 0.20 mL 5% 香草醛冰醋酸溶液及 0.80 mL 高氯酸, 摇匀后置于 70 °C 恒温水浴锅中保温 15 min, 取出迅速加入 4 mL 冰醋酸摇匀, 在 462 nm 处测定吸光度(A)。以加甲醇管为空白对照, 以质量浓度(C)对 A 回归, 得方程 $A = 0.0181C - 0.0043$, $r = 0.999$, 表明甾体总皂苷在 5~20 μg/mL 与吸光度线性良好。

2.1.2 测定: 超声提取结束后提取液滤过, 滤渣用 50 mL 相应溶剂洗涤、滤过, 合并滤液, 回收至干, 再加 20 mL 热水溶解, 以正丁醇 120 mL 分 3 次萃取, 合并正丁醇萃取液, 回收至干, 再用甲醇定容到 50 mL, 从中取 1 mL 用甲醇稀释定容到 10 mL, 吸取 0.20 mL, 按总皂苷标准曲线的制备项下测其吸光度, 根据回归方程计算出相应的总皂苷量, 计算总皂苷的收率。

2.2 均匀设计法进行工艺条件的筛选: 用均匀设计法, 考察 3 个因素即溶剂体积与菝葜根粉质量比(液固比)(X_1)、超声提取时间(X_2)和超声功率(X_3)对菝葜总皂苷超声提取率的影响。做 7 个样本, 每个样本精确称取预先处理好的菝葜根茎粉末(过 100 目筛) 5.00 g, 放入 250 mL 具塞锥形瓶中, 以相应溶

收稿日期: 2005-06-20

作者简介: 舒孝顺(1964—), 湖南溆浦人, 副教授, 长沙理工大学生物工程教研室主任, 现攻读中南大学药学院药学专业博士后, 现主要从事中药、天然药物的提取、药理和新药开发研究, 发表科研论文 30 余篇。E-mail: sxs732@yahoo.com.cn

剂浸泡 2 h, 再进行超声萃取, 超声萃取方式为每次超声 4 s、间隔 6 s, 每 60 次摇匀 1 次, 并间隔 10 s, 每一试验重复 3 次。均设 7 个水平, 按 $U_7(7^3)$ 表进行试验, 见表 1。

表 1 $U_7(7^3)$ 均匀设计方案

Table 1 Design of $U_7(7^3)$ uniform design

样本	X_1 液固比/ (mL · g ⁻¹)	X_2 超声提取 时间/min	X_3 超声功率/ (×100 W)	总皂苷 收率/%
1	2	10	8	1.91
2	4	15	8	2.06
3	6	20	12	2.45
4	8	25	12	2.50
5	10	30	16	2.60
6	12	35	16	2.67
7	14	40	16	2.72

实验结果经多元线性回归统计处理^[6], 得回归方程 $Y = 1.5226 + 0.0164 X_1 + 0.0041 X_2 + 0.0525 X_3$; 复相关系数 R 为 0.9618, 剩余标准偏差 0.1207, F 值为 12.46, 具有良好的线性关系。多元回归中标准偏差回归系数显示, 对菝葜总皂苷超声提取的影响效应依次为超声频率、溶剂用量和超声时间, 其中超声时间对菝葜总皂苷提取率的影响很小, 几乎可忽略。依据回归方程和实际经验, 选择菝葜总皂苷的最佳超声提取条件为 70% 乙醇的体积与菝葜根粉的质量比为 8~10, 超声提取时间 10~20 min, 超声功率为 1.6 kW。

2.3 验证试验: 按上述优化的超声提取条件, 进行 3 次菝葜总皂苷的超声提取, 结果得到优化条件下的菝葜总皂苷提取率为 2.58%, 与回归方程的预测值 2.61% 很接近, 且重复试验相对偏差不超过 2.5%, 说明超声优化条件重现性良好。

2.4 超声法与常规法提取的比较: 分别精密称取处理好的菝葜根粉样品 10.00 g, 常规 70% 乙醇提取法采用 10 倍体积的 70% 乙醇于 100 °C 回流两次, 每次 2 h, 滤过后合并滤液, 静置过夜, 再滤过, 滤液回收至干, 再加热水溶解并定容到 2 mL, 以正丁醇 120 mL, 分 3 次萃取, 合并正丁醇液, 回收至干, 再

用甲醇定容到 50 mL; 常规水煮醇沉提取法用 10 倍体积的水于 100 °C 煎煮回流两次, 每次 2 h, 趁热滤过合并滤液, 加工业乙醇至乙醇体积分数为 40%, 静置过夜, 滤过, 滤液回收至干, 加热水溶解并定容到 20 mL, 以正丁醇 120 mL, 分 3 次萃取, 合并正丁醇液, 回收至干, 再用甲醇定容到 50 mL。经分析测定, 两种常规法提取的菝葜总皂苷收率分别为 2.53% 和 1.48%, 均低于超声提取的总皂苷收率。

3 讨论

菝葜总皂苷的超声提取, 方法简便, 提取率高达 2.72%, 比常规提取方法的操作时间缩短 10 到 20 倍, 而且总皂苷得率高。超声提取很适用于对热敏感、在较高温度易被酶水解破坏的有效成分加皂苷等成分的提取。超声波破碎细胞过程是一个物理过程, 浸提过程中无化学反应, 也无需加热, 被浸提的生物活性物质其生物活性保持不变, 同时提高了破碎速度, 缩短了破碎时间, 提取效率大大提高, 超声提取天然药物有效成分具有周期短、成本低、不破坏活性成分等显著优点, 具有很好的应用前景。

References:

- [1] Wang X J, Feng P, Wen Z Y, et al. Study on *in vitro* and *in vivo* anti-cancer action of compound *Smilax China* L. [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1996, 12 (6): 614-614.
- [2] Lu Y N, Chen D S, Xu C H. Study on the pharmacological action of *Smilax China* L. on promoting blood circulation to remove blood stasis [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2002, 22 (9): 538-540.
- [3] Chen D S, Lü Y N, Wang Q. Anti-inflammatory action of *Smilax china* L. [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2000, 20 (9): 544-545.
- [4] Li J, Chen J Q, Ju Y. Anti-cancer activities of natural steroidal saponins [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1997, 11 (1): 14-17.
- [5] Chen D S, Lü Y N, Fu L. Study on the pharmacological action of the extracts from *Smilax china* L. on promoting blood circulation of remove blood stasis [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 21(6): 448-450.
- [6] Li L Y, Wang X L. *Statistics Principle* (统计学原理) [M]. Beijing: Law Press, 1995.

欢迎订阅《中草药》杂志 2004 年增刊

为了加速中药现代化进程, 促进中药产业的技术创新, 我部编辑出版了以“新技术在中药现代化中的应用”为主要内容的增刊。该增刊共收载论文 120 篇, 总字数约 50 万字, 每本定价 60 元, 另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅, 款到寄刊。

编辑部地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编: 300193 网址: www.tjpr.com
电话: (022) 27474913 23006821 传真: (022) 23006821 E-mail: zcyzbbj@tjpr.com