

均匀设计法优选白花刺参的提取工艺研究

吴春蕾, 刘 圆, 张志锋*, 徐 彦

西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041

摘要: 目的 优选白花刺参的最佳回流提取工艺条件。方法 采用 UV 法和 HPLC 法测定总皂苷及刺参苷 J 的量, 以总皂苷提取率、刺参苷 J 提取率和干浸膏收率为综合评价指标, 采用 $U_8(8^4)$ 均匀设计表设计试验, 考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取次数、提取时间 4 种因素对总皂苷提取的影响。结果 白花刺参的最佳提取工艺参数: 80%乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h。结论 均匀设计法优选出的白花刺参总皂苷的提取工艺合理可行, 为白花刺参总皂苷的进一步研究提供参考。

关键词: 白花刺参; 均匀设计; 总皂苷; 刺参苷 J; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2447-04

Optimization of extracting condition for *Morina nepalensis* by uniform design

WU Chun-lei, LIU Yuan, ZHANG Zhi-feng, XU Yan

Ethnic Pharmaceutical Institute of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To optimize the extractive condition of *Morina nepalensis* by hot refluxing. **Methods** HPLC and UV were established to determine the monopaloside J and total saponins. $U_8(8^4)$ Uniform design form was selected as the experiments' schedule, the total saponins, monopaloside J and the yield was used as evaluation indicator to and the ethanol concentration, amount of extraction solvent added, extractive time and times of extraction was used as the 4 influencing factors. **Results** The optimum condition was the extraction in 80% ethanol, two times and 1 h. **Conclusion** The optimal extracting method of the total saponins of *M. nepalensis* is suitable and feasible by uniform design. The study could provide scientific references for further investigation of *M. nepalensis*.

Key words: *Morina nepalensis* D. Don var. *alba* (Hand. -Mazz.) Y. C. Tang; uniform design; total saponins; monopaloside J; extracting technology

白花刺参是川续断科刺参属植物白花刺参 *Morina nepalensis* D. Don var. *alba* (Hand. -Mazz.) Y. C. Tang 的全草, 是著名的传统藏药^[1-2], 主要分布于西藏、青海、甘肃、云南、四川等省区。藏族以全草入药, 性味辛、甘、微苦、温; 具有健胃、催吐之功效; 可用于关节疼痛、小便失禁、腰痛、眩晕及口眼歪斜; 外用治疗疮、化脓性创伤、肿瘤^[3-5]。《中国药典》中尚未收载本属药用植物, 在《藏药标准·部颁》收载本属植物白花刺参、圆萼刺参或青海刺参 3 种, 白花刺参是其中收载的第 1 个种^[6]。已有研究表明, 白花刺参中含有多种皂苷类成分, 总皂苷是其主要的活性部位^[7-10], 但是目前对白花刺参总皂苷类成分的工艺研究尚未见报道。为进一步优化白花刺参有效部位的提取工艺, 本研究采用均匀设

计法, 以各提取物中总皂苷的量、刺参苷 J 的量和干浸膏收率作为指标, 考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数 4 个因素对白花刺参有效部位提取工艺的影响, 为进一步开发白花刺参提供科学依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 含 Eclipse XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, DAD 检测器 (美国 Agilent 公司); TU—1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用股份有限公司); Mettler AE240 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); Millipore Milli—Q 超纯水机 (美国 Millipore 公司); W201B 恒温水浴锅 (上海申顺生物科技有限公司)。

收稿日期: 2011-03-15

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目 (2009JY0017); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助 (09NZYZJ01)

作者简介: 吴春蕾 (1983—), 女, 在读研究生。Tel: 15842551223 E-mail: hainanlei@yahoo.com.cn

*通讯作者 张志锋 Tel: 13882291149 E-mail: zhangzhf99@gmail.com

齐墩果酸(批号 110709-200304, 中国药品生物制品检定所); 刺参苷 J(自制, HPLC 测定质量分数为 98.36%)。乙腈为色谱纯(上海陆忠试剂厂), 香草醛(广东汕头市西陇化工厂)、高氯酸、冰醋酸、无水乙醇、甲醇等(成都化学试剂有限公司)均为分析纯。

白花刺参药材于 2008 年 7 月采自四川省甘孜藏族自治州康定县境内, 由四川大学华西药学院张浩教授鉴定为川续断科刺参属植物白花刺参 *Morina nepalensis* D. Don var. *alba* (Hand. -Mazz.) Y. C. Tang 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 总皂苷的提取

分别取白花刺参药材粗粉 200 g, 8 份, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 按均匀试验设计, 进行 8 组实验条件下的总皂苷的回流提取, 滤过, 作为储备液待测。

2.2 UV 法测定白花刺参总皂苷

2.2.1 对照品溶液的制备 取齐墩果酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别精密吸取 1~8 号储备液各 5 mL 于 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液, 备用。

2.2.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.2、0.6、1.0、1.4、1.6、1.8、2.0 mL 分别置于具塞试管中, 挥去甲醇。精密加入临时配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 混匀, 密塞, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴加热 15 min, 立即取出, 冰水浴冷却 2 min 后加冰醋酸 5 mL, 混匀。以 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL 显色后加入 5 mL 冰醋酸溶液为空白对照, 在 400~600 nm 扫描, 对照品溶液在 545 nm 处有最大吸收, 而空白对照无吸收。将上述对照品溶液在波长 545 nm 处测定吸光度 (A) 值, 试剂随行空白对照。以对照品齐墩果酸的质量为横坐标, A 值为纵坐标, 得回归方程为 $Y=6.5003X+0.0071$, $r=0.9992$; 结果表明齐墩果酸在 12.4~124 μg 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 吸取对照品溶液 6 份, 每份 1 mL, 按照线性关系考察项下操作, 分别测定 A 值, 计算得 A 值的 RSD 为 1.25%。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(2 号) 0.5 mL, 按照线性关系考察项下操作, 每隔 10 min 测定一次 A 值, 连续 2 h, 计算得 A 值的 RSD

为 1.32%, 表明 A 值在 2 h 内稳定性良好。

2.2.6 重现性试验 按供试品溶液制备方法, 处理同一批样品(2 号) 6 份, 依线性关系考察项下操作, 分别测定 A 值, 计算得总皂苷质量浓度的 RSD 为 1.64%。

2.2.7 加样回收率试验 精密吸取 2 号样品储备液 6 份, 每份 1.0 mL, 分别精密加入一定量的齐墩果酸对照品溶液, 按上述方法制备供试品溶液, 依线性关系考察项下操作, 分别测定 A 值, 计算得总皂苷平均回收率为 98.68%, RSD 为 1.51%。

2.2.8 样品中总皂苷的测定 精密量取 1~8 号供试品溶液 0.5 mL 置具塞试管中, 挥干。按照线性关系考察项下操作, 在波长 545 nm 处测定 A 值, 重复 3 次, 外标法计算总皂苷的质量。

$$\text{总皂苷提取率} = \frac{\text{提取液中总皂苷质量}}{\text{投药量}}$$

2.3 HPLC 法测定刺参苷 J

2.3.1 对照品溶液的制备 称取刺参苷 J 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 97.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密吸取 1~8 号储备液各 5 mL, 水浴蒸干, 加甲醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.3.3 色谱条件及专属性考察 色谱柱为 Eclipse XDB C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(29:71), 检测波长 210 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.0 mL/min。

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 刺参苷 J 与其相邻组分达到完全分离。色谱图见图 1。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取 2、4、8、10、12、15、20 μL 对照品溶液, 按上述色谱条件测定峰面积。以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=141.98X+17.841$,

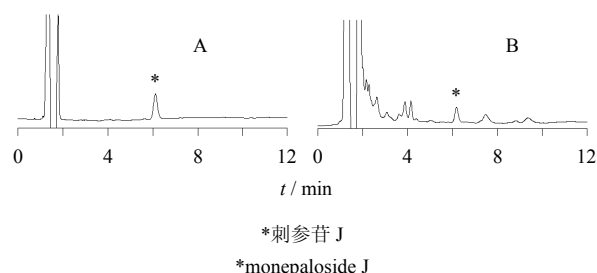


图 1 刺参苷 J 对照品(A)与样品(B)的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of monepaloside J (A) and sample (B)

$r=0.9999$, 表明刺参苷 J 在 195.2~1952.0 ng 线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 精密吸取刺参苷 J 对照品溶液 10 μ L, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 测定刺参苷 J 的峰面积值, 计算得峰面积的 RSD 为 1.26%。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (2 号), 按上述色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定, 记录刺参苷 J 的峰面积值, 计算得峰面积的 RSD 为 1.05%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重现性试验 精密吸取同一储备液 6 份 (2 号), 按上述方法制备供试品溶液, 依上述色谱条件测定刺参苷 J 的峰面积值, 计算得刺参苷质量浓度的 RSD 为 1.41%。

2.3.8 加样回收率试验 精密吸取同一储备液 (2 号) 5 mL, 平行 6 份, 分别精密加入刺参苷 J 对照品溶液 (0.125 mg/mL) 10、13、16 mL, 按上述方法制备供试品溶液, 依上述色谱条件测定刺参苷 J 的峰面积值, 计算回收率, 结果刺参苷 J 的平均回

收率为 98.85%, RSD 为 1.76%。

2.3.9 样品测定 分别精密吸取 1~8 号供试品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 依上述色谱条件测定刺参苷 J 的峰面积值, 外标法计算刺参苷 J 的质量, 并计算其提取率。

$$\text{刺参苷 J 提取率} = \frac{\text{提取液中刺参苷 J 质量}}{\text{投药量}}$$

2.4 干浸膏收率的测定

精密吸取 1~8 号提取液 5 mL, 分别置于干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 置 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒定质量后于干燥器中冷却 30 min, 称定质量并计算干浸膏收率。

$$\text{干浸膏收率} = \frac{\text{干浸膏质量}}{\text{投药量}}$$

2.5 因素水平的确定

根据预试验结果及文献方法^[11-12], 选取乙醇体积分数 (A)、乙醇用量 (B)、提取次数 (C) 和提取时间 (D) 为考察因素, 以总皂苷提取率、刺参苷 J 提取率及干浸膏收率为指标, 采用 $U_8(8^4)$ 均匀设计表安排试验^[13], 试验设计及结果见表 1。

表 1 $U_8(8^4)$ 均匀试验设计及结果 ($n=3$)
Table 1 Design and results of $U_8(8^4)$ uniform test ($n=3$)

试验号	因素				总皂苷提取率/%	刺参苷 J 提取率/%	干浸膏收率/%	综合评分
	A/%	B/倍	C/次	D/h				
1	50 (4)	6 (1)	4 (7)	2.5 (6)	5.45	0.39	21.82	7.21
2	30 (2)	8 (3)	1 (1)	2.0 (5)	4.51	0.17	18.28	5.96
3	80 (7)	10 (6)	4 (8)	2.0 (4)	8.28	0.66	27.53	9.84
4	40 (3)	12 (7)	3 (5)	2.5 (8)	4.77	0.44	19.95	6.51
5	95 (8)	8 (4)	2 (3)	1.0 (7)	7.16	0.45	24.05	8.53
6	20 (1)	10 (5)	3 (6)	1.5 (2)	6.29	0.36	21.54	7.56
7	70 (6)	6 (2)	2 (4)	1.0 (1)	8.68	0.51	23.17	9.12
8	60 (5)	12 (8)	1 (2)	1.5 (3)	6.52	0.41	24.45	8.27

2.6 工艺条件的优化

为消除各指标量纲及各指标变量范围相差悬殊造成的影响, 将总皂苷提取率、刺参苷 J 提取率和干浸膏收率 3 个指标的数据进行多指标综合评分。根据各指标在提取工艺选择中的主次地位, 确定三者的权重系数, 对 3 项指标进行加权求和, 通过公式可得到综合评分 (Y)。将 Y 值作为综合评价指标进行统计分析。结果见表 1。

$$Y = \text{总皂苷提取率} \times 0.5 + \text{刺参苷 J 提取率} \times 0.3 + \text{干浸膏收率} \times 0.2$$

对表 1 数据进行方差分析, 结果见表 2。将最终结果经过 DPS 统计软件处理数据^[14], 采用多元线

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
回归分析	11.975 4	4	2.993 8	86.88	0.001 9
残差	0.103 38	3	0.034 4		
总和	12.078 7	7	1.725 5		

性回归法, 根据各回归方程的回归系数、F 值及其显著性检验, 结合实验原理和经验, 选出优化方程为 $Y=6.0454+0.4246A+0.0934B+0.1705C-0.2825D$, 其复相关系数 $r=0.9957$, 剩余标准差 $s=0.1856$, 显著性水平 $\alpha=0.05$, 检测值 $F=86.88$,

临界值 $F_{(0.05, 4, 3)} = 6.59$ 。检测值 $F > F_{(0.05, 4, 3)}$, $P < 0.05$, 说明回归方程具有显著性意义。多元回归方程中标准偏差回归系数显示, 对白花刺参提取的影响效应依次为乙醇体积分数 > 提取时间 > 提取次数 > 乙醇用量, 其中乙醇用量对白花刺参苷类成分提取率的影响很小, 可以忽略。因此, 根据回归方程和实际经验, 保证总皂苷和刺参苷 J 提取率的前提下, 拟定白花刺参的最佳提取工艺条件为: 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h。

2.7 验证试验

取白花刺参原药材粗粉 3 份, 每份 1 kg, 精密称定, 按优选出的最佳提取工艺条件, 即以 6 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 制备 3 批样品, 测定白花刺参总皂苷和刺参苷 J 的提取率, 结果见表 3, 说明工艺稳定可行。

表 3 验证试验
Table 3 Tests of verification

试验号	投药量/kg	提取率/%		干浸膏收率/%
		总皂苷	刺参苷 J	
1	1.07	7.15	0.53	24.13
2	1.05	7.06	0.54	24.76
3	1.03	6.95	0.56	25.10

3 讨论

本实验在使用 HPLC 法测定刺参苷 J 的量时, 对流动相进行了筛选, 发现以乙腈-水 (29:71) 为流动相进行洗脱, 刺参苷 J 与周围其他各成分分离度良好。

采用 UV 法在波长 545 nm 处测定白花刺参中的总皂苷, HPLC 法测定刺参苷 J 的量, 并以此为评价指标, 采用加热回流法提取, 选取乙醇溶液为提取剂, 通过均匀设计试验结果分析及 3 次重复性试验表明, 最佳提取工艺条件为: 以 6 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 在该工艺条件下, 总皂苷 (以齐墩果酸计) 的提取率为 7.05%, 刺参苷 J 的提取率为 0.531%。验证试验结果与均匀设计试验预测结果比较接近, 表明该提取工艺稳定、可行。

本实验采用均匀设计法, 让试验点在实验范围内充分地“均匀分散”, 使每个试验点有更好的代表性, 试验点的数目可大幅度地减少。该实验考察了 4 个因素、8 个水平对白花刺参总皂苷和刺参苷 J

提取率的影响, 在均匀设计中选择了 $U_8(8^4)$ 均匀设计表安排试验, 采用 DPS 软件对试验结果进行回归分析, 得到回归方程, 来判断所考察因素对试验结果影响的显著性与趋势, 同正交设计方法相比, 均匀设计法更能达到以较小的实验成本获取更好的实验效果, 具有方便、适用、预测性好的特点。本研究采用均匀设计法优选出白花刺参有效部位总皂苷的提取工艺, 为进一步开发利用白花刺参提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 73 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [2] 吴春蕾, 刘圆, 张志锋, 等. 大孔吸附树脂富集纯化白花刺参总皂苷的工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1130-1134.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草·藏药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [4] 青海省药品检验所, 青海省藏医药研究所. 中国藏药 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [5] 杨竞生, 初称江措. 迪庆藏药 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1989.
- [6] 中华人民共和国卫生部药品标准——藏药标准 [S]. 1995.
- [7] 滕荣伟, 谢鸿妍, 李海舟, 等. 白花刺参中两个新三萜皂苷 [J]. 有机化学, 2002, 22(8): 560-564.
- [8] Teng R W, Xie H Y, Wang D Z, et al. Four new ursane-type saponins from *Morina nepalensis* var. *alba* [J]. *Magn Reson Chem*, 2002, 40(9): 603-608.
- [9] Teng R W, Xie H Y, Liu X K, et al. Four New Oleanane type saponins from *Morina nepalensis* var. *alba* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(2): 75-82.
- [10] Teng R W, Wang D Z, Yang C R. Monepaloside K, a new triterpenoid saponin from *Morina nepalensis* var. *alba* Hand. -Mazz. [J]. *Chin Chem Lett*, 2002, 13(3): 251-252.
- [11] 李文兰, 任晓蕾, 赵稷, 等. 均匀设计法优选金匱肾气丸中苷类成分的提取工艺 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 109-202.
- [12] 崔红花, 赵英日, 尹永芹, 等. 正交试验优化黄芪的乙醇提取工艺 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 909-911.
- [13] 刘明芝, 周仁郁. 中医药统计学与软件应用 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006.
- [14] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统——实验设计、统计分析及模型优化 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.