

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

崔文燕^{1,3}, 刘素香², 赵艳敏¹, 张铁军², 宋晓凯³, 刘岱琳^{1*}, 孙乃强¹, 郑雅婷¹

1. 中国人民武装警察部队后勤学院, 天津 300162

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 淮海工学院, 江苏 连云港 222005

摘要: 目的 响应曲面法优化黄花败酱总皂苷(TSPS)的提取工艺及研究 TSPS 促进大鼠离体肠平滑肌收缩活性。方法 以齐墩果酸为对照品, 采用香草醛-冰醋酸显色, 利用紫外分光光度计在 550 nm 处测定 TSPS 的量。以 TSPS 提取率作为响应值, 在单因素试验的基础上采用响应曲面法考察提取溶剂、料液比、提取时间及其交互作用对 TSPS 提取效果的影响。并且测定了优化提取工艺过程中获取的不同 TSPS 提取物的促肠平滑肌收缩活性, 结合生物活性全面评价 TSPS 提取工艺。结果 TSPS 的最佳提取工艺条件为提取溶剂 75%乙醇, 料液比 1:12, 提取时间为 1.5 h, 提取温度 90 ℃、提取 2 次。在此工艺条件下 TSPS 的提取率达到 10.96 mg/g, 其对大鼠离体肠平滑肌的收缩作用强弱表现为结肠>回肠>空肠>十二指肠, 质量浓度达 0.32 mg/mL 时促进离体肠收缩效果最佳。结论 经优化后的 TSPS 提取工艺条件具有提取率高, 提取工艺高效、稳定等特点, 且 TSPS 具有显著的促进大鼠离体肠平滑肌收缩功能, 其功效与提取率呈正相关。

关键词: 响应曲面分析法; 黄花败酱; 总皂苷; 提取工艺; 离体肠平滑肌收缩

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)12-2078-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.010

Optimization of extraction technology of total saponins from *Patrinia scabiosaeifolia* by response surface method and its contraction effect on isolated rat intestinal smooth muscle

CUI Wen-yan^{1,3}, LIU Su-xiang², ZHAO Yan-min¹, ZHANG Tie-jun², SONG Xiao-kai³, LIU Dai-lin¹, SUN Nai-qiang¹, ZHENG Ya-ting¹

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

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology for total saponins from *Patrinia scabiosaeifolia* (TSPS) by response surface method. At the same time, the function of promoting intestinal peristalsis by total saponins was investigated. **Methods** UV spectrophotometric method was used to determine the contents of total saponins in *P. scabiosaeifolia* at the wavelength of 510 nm by taking oleanolic acid as standard substance, and vanillin acetic acid as chromogenic reagent. The extraction rate of total saponins was used as index to evaluate the technology based on single factor test, in which three factors were considered the concentration of extraction solvent, solid-liquid ratio, extraction time, and their interaction on extraction were studied by response surface method. The contraction effect and signal changes of total saponins extract of *P. scabiosaeifolia* on intestinal smooth muscle were recorded by tension transducer to the BL-420 biological experimental multi-channel physiological signal acquisition and processing system. **Results** The best extraction conditions were as follows: ethanol concentration of 75% alcohol, solid-liquid ratio of 1:12, extraction time for 1.5 h, twice and extraction temperature of 90 ℃. The optimized extraction rate could reach 10.96 mg/g. *P. scabiosaeifolia* extracts obtained using the optimized method showed significantly contraction effect on rat intestinal smooth muscle and the results were displayed as: colon > colon > jejunum > duodenum. The concentration at 0.32 mg/mL has the best effect of gastrointestinal contraction. **Conclusion** The optimized extraction technology is stable and effective, and with higher extraction rate. The extract of *P.*

收稿日期: 2016-02-18

作者简介: 崔文燕 (1992—), 女, 硕士, 研究方向为天然产物活性成分研究。Tel: 1333790258 E-mail: cuiwenyan234@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

scabiosaefolia has a significant promotion effect on intestinal smooth muscle of rat, which shows positive correlation with the rate of extract.

Key words: design-response surface method; *Patrina scabiosaefolia* Fisch. ex Trev.; total saponins; extraction technology; contraction of isolated intestinal smooth muscle

作为疏风解毒胶囊的原料药材之一, 黄花败酱最早收载于《神农本草经》, 系败酱科败酱属植物黄花败酱 *Patrina scabiosaefolia* Fisch. ex Trev. 的全草, 为我国传统中药, 其性微寒, 味苦、辛, 归肺、大肠、肝经, 具有清热解毒、排脓破瘀之功效^[1]。近年来对黄花败酱化学成分的研究也在不断深入, 据文献报道其主要成分为三萜皂苷类化合物, 其次为环烯醚萜类、香豆素和黄酮类化合物, 此外也含有少量挥发油和有机酸等^[2-4]。其中三萜皂苷类成分是黄花败酱草中主要活性成分, 现代药理学研究表明其具有抗肿瘤、镇静催眠、抗炎、利尿等^[5-6]活性。目前只有潘涛等^[7]利用正交设计法以总皂苷浸出量和浸膏得率为评价指标考察了黄花败酱总皂苷(TSPS)的提取工艺, 且有黄花败酱甲醇提取物治疗溃疡性结肠炎的报道^[8], 而未见其他关于优化TSPS的提取工艺及其对胃肠道功效的研究报道。因此, 本实验以总皂苷的提取率为评价指标, 采用响应曲面法优化TSPS的提取工艺; 同时也首次探讨了TSPS提取物大鼠离体肠平滑肌的收缩功效, 并利用该体外实验模型进一步评价提取工艺, 旨在从工艺参数和体外活性两方面综合评价, 以便于获得高提取收率和高活性的TSPS提取工艺条件, 确定最佳提取工艺参数, 为黄花败酱药材的后续开发利用奠定基础。

1 仪器与材料

MT5 百万分之一电子天平, 梅特勒-托利多(中国)公司; KQ5200E 型超声波清洗器、KQ-500E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; FA1204B 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; SZ-93 自动双重纯水蒸馏器, 上海亚荣生化仪器厂; BL-410 生物机能实验系统, 四川成都泰盟科技电子有限公司; 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。

黄花败酱 2015 年 9 月采自辽宁省丹东市凤城通远堡镇大黑山村, 经辽宁省药品检验所王维宁研究员鉴定为败酱科败酱属植物黄花败酱 *Patrina scabiosaefolia* Fisch. ex Trev. 的全草。其标本保存于

武警后勤学院生药学教研室。齐墩果酸(KMST-Q016, 质量分数 $\geq 98\%$)、芦丁(KMST-L020, 质量分数 $\geq 98\%$)对照品, 天津科曼思特天然产物研究开发有限公司; 香草醛、冰醋酸、高氯酸等试剂均为分析纯, 天津百赛斯生物科技有限公司; 乙醇、甲醇均为国产 AR 级试剂, 娃哈哈纯净水。氯化乙酰胆碱, 批号 Lot. No.20150323, 质量分数 $\geq 98\%$, 天津熙拓精组化工科技; 硫酸阿托品, 批号: 1509051, 质量浓度 0.5 mg/mL, 天津金耀药业有限公司。

昆明种 SD 雄鼠 63 只, 体质量为 (200 ± 20) g, 随机分为 21 组, 每组 3 只。其中有 4 组进行 TSPS 对十二指肠、空肠、回肠、结肠作用的离体实验研究, 另外 17 组进行响应面工艺提取获取的 17 组不同提取率的 TSPS 的离体动物实验研究。实验动物由军事医学科学院实验动物中心提供; 许可证号: SCXK-2007-004, 实验用大鼠于 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度 $(60 \pm 5)\%$ 条件下适应性饲养 1 周以后进行实验。

2 方法与结果

2.1 定量测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备^[9-10] 精密称取齐墩果酸对照品 116.38 mg, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 80%乙醇定溶, 摇匀, 即得 2.327 6 mg/mL 齐墩果酸对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 准确称取 100 g 干燥粉碎后的黄花败酱药材(过 20 目筛), 置于 3 L 圆底烧瓶中, 加入体积分数为 80%乙醇 1 200 mL 于 90°C 下回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并提取液, 备用。

2.1.3 显色方法 取待测溶液 1 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 依次加入 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, 流水冷却后加 5 mL 冰醋酸, 80%乙醇(色谱纯)定溶至 10 mL。用 1 mL 80%乙醇代替对照品溶液按上述方法配制空白溶液。

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, 结果如图 1 所示。反应液在 550 nm 处有明显特征峰。因此选取可见区域 550

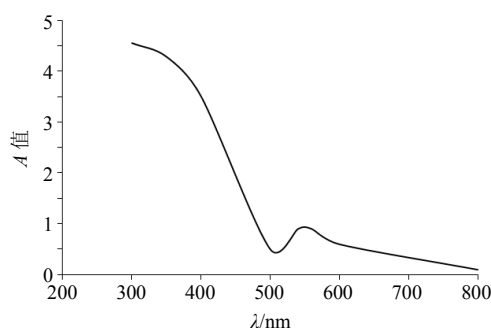


图 1 对照品紫外吸收光谱图

Fig. 1 UV absorption spectrum of reference substance

nm 的特征吸收峰位作为检测波长。

2.1.5 干扰试验 由于黄花败酱中还含有黄酮类成分, 为避免其干扰总皂苷的定量测定, 使定量测定结果更为准确。因此, 进行 1 组干扰试验。精密称取芦丁对照品 14.31 mg, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 80%乙醇定溶, 摇匀, 即得 286.2 $\mu\text{g/mL}$ 芦丁对照品溶液。精密移取芦丁对照品溶液 1 mL, 按“2.1.3”项下方法显色后, 在 550 nm 处平行测定 3 次, 测得吸光度 (A) 值为 0.002, 因此, 可以确定黄花败酱中黄酮类成分未干扰到三萜类成分的定量测定。

2.1.6 线性范围考察 精密吸取齐墩果酸对照品溶液 0.03、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18 mL 置于 10 mL 量瓶中加入色谱甲醇定容至刻度, 摇匀, 按“2.1.3”项下方法显色后, 在 550 nm 下测定 A 值。每个质量浓度平行测定 3 次, 取平均值。以齐墩果酸质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 计算回归方程。实验结果显示齐墩果酸在 6.928 2~41.896 8 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈现良好的线性关系, 所得回归方程为 $Y=0.022\ 3\ X+0.076\ 1$, $R^2=0.999\ 4$ 。

2.1.7 精密度试验 精密移取对照品溶液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 按“2.1.3”项下方法显色后, 在 550 nm 处平行测定 A 值 5 次, 计算 RSD 值为 1.26%, 表明在该条件下仪器精密度良好。

2.1.8 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 1.08%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一份样品 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, 计算质量分数的 RSD 值为 0.97%, 表明该方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 称取已知总皂苷量的黄花败酱药材 1 g, 分别加入相当于样品中总皂苷量 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”项下显色, 在 550 nm 处平行测定其 A 值 3 次, 计算得加样回收率均在 95%~105%, 平均回收率为 98.65%, RSD 值为 1.58%, 回收率良好。

2.2 单因素考察

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%、95%乙醇及甲醇对 TSPS 提取效果的影响, 结果 TSPS 提取率分别为 6.03、8.33、8.81、5.86、4.35 mg/g。实验结果显示单因素考察提取溶剂时 80%乙醇对总皂苷的提取效果最佳。

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 1:8、1:10、1:12、1:16、1:20 对 TSPS 提取效果的影响, 结果 TSPS 提取率分别为 4.47、6.87、10.52、9.32、8.56 mg/g。实验结果显示当料液比低于 1:12 时, 总皂苷的提取效果随着料液比升高而增加, 而当提料液比大于 1:12 时, 总皂苷提取效果变化略有下降。因此初步确定 1:12 为最佳料液比。

2.2.3 提取时间考察 按照“2.1.2”项下方法分别考察提取时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 对 TSPS 提取效果的影响, 结果 TSPS 提取率分别为 6.29、8.18、10.84、9.08、6.58 mg/g。实验结果显示当提取时间低于 1.5 h 时, 总皂苷的提取效果随着提取时间升高而增加, 而当提取时间长于 1.5 h 时, 总皂苷提取效果随着提取时间的增加而略有降低。故确定 1.5 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 $^{\circ}\text{C}$ 对 TSPS 提取效果的影响, 结果 TSPS 提取率分别为 8.09、9.54、9.89、8.67 mg/g。实验结果显示当提取温度低于 90 $^{\circ}\text{C}$ 时, 总皂苷的提取效果随着提取温度升高而增加, 而当提取温度高于 90 $^{\circ}\text{C}$ 时, 总皂苷提取效果随着提取温度的增加而降低。故确定 90 $^{\circ}\text{C}$ 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 次对 TSPS 提取效果的影响, 结果 TSPS 提取率分别为 8.39、5.32、2.58 mg/g。实验结果显示当提取 1 次时, 总皂苷的提取率相对较多, 而当提取第 2 次时, 总皂苷提取已较为完全, 故确定提取 2 次为最佳提取次数。

2.3 动物实验

2.3.1 标本制备 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, 迅速剪取十二指肠、空肠、回肠、结肠, 将其剪成约 2 cm 的肠段, 置于盛有 0 ℃ Tyrode's 液 (Tyrode's 生理溶液: 氯化钠 136.9 mmol/L, 氯化钾 2.7 mmol/L, 磷酸二氢钠 0.4 mmol/L, 碳酸氢钠 11.9 mmol/L, 氯化镁 1.1 mmol/L, 氯化钙 1.8 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) ℃ 水浴, 通气钩以每秒 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, 获得的提取液中取 1 200 mL, 旋转蒸发至干, 得 TSPS 提取物干燥粉末。待实验时, 用去离子水配制成 TSPS 提取物为 6.4 mg/mL 样品溶液, 备用。

2.3.3 TSPS 提取物对大鼠不同肠段平滑肌收缩功能的影响 标本张力稳定后, 在不同肠段的浴槽中依次加入 0.04、0.08、0.16、0.32、0.64 mg/mL 的 TSPS 提取物, 观察其在不同质量浓度下对 4 个肠段平滑肌收缩幅度, 记录 10 min。结果如表 1 显示, TSPS 提取物对十二指肠、空肠、回肠、结肠都具有显著的促进其收缩的作用, 且在 0.32 mg/mL 时促进离体肠收缩效果最佳; 当 TSPS 质量浓度达到 0.64 mg/mL 时, 因溶解度, 出现混悬, 各肠段促进率明显下降。TSPS 提取物对大鼠离体肠平滑肌的收缩作用强弱表现为结肠>回肠>空肠>十二指肠。TSPS 提取物对大鼠结肠收缩作用最显著, 其最佳有效质量浓度为 0.32 mg/mL。因此, 选用大鼠结肠, 样品中总皂苷的质量浓度为 0.32 mg/mL, 考察响应面筛查最佳工艺试验中不同实验方案下获得不同提取率的 TSPS 的体外促进离体肠收缩作用, 进一步评价提取工艺。

肠管促进率=给药后平均张力/空白平均张力-1

质量分数=样品质量浓度×定容体积/称样量

提取率=浸膏总量×质量分数/药材量

2.4 响应曲面试验结果与分析

2.4.1 响应曲面试验设计、统计及结果分析 利用 Design-Expert 软件进行数据分析, 该软件具有使用简单、功能完整、统计效率高等优点。通过单因素

表 1 TSPS 提取物对大鼠不同肠段收缩功能的影响

Table 1 Contraction effects of TSPS on different isolated intestinal segments

剂量/(mg·mL ⁻¹)	肠管促进率/%			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
0.04	6.48	9.33	14.42	18.83
0.08	9.48	10.67	22.41	25.96
0.16	13.11	14.67	26.72	37.57
0.32	134.96	16.32	33.62	52.57
0.64	9.26	10.67	22.41	36.88

试验, 选择了提取溶剂 (以乙醇体积分数表示, A)、料液比 (B)、提取时间 (C) 3 个因素, 以 TSPS 提取率 (Y) 为响应值。采用 Design Expert 8.05 软件 Box-Behnken 试验设计的 3 因素 3 水平试验方案进行研究。通过 Design-Expert 8.05 软件进行数据拟合, 利用响应面优化 Y。同时将不同试验组获取的 TSPS 提取物配制成 0.3 mg/mL 水溶物, 依据“2.3.3”项下测试其对大鼠离体结肠平滑肌的收缩作用, 考察 Y 的高低与活性之间的关系, 以便于综合评价最佳的提取工艺。实验结果显示, Y 越高, 其对结肠平滑肌收缩率效果越显著, 因此通过响应面法优化确定的最佳提取工艺获得的 TSPS 提取物也具有很好的促进离体肠平滑肌的收缩作用。具体的试验设计方案及结果如表 2 所示。

2.4.2 方差分析 采用 ANOVA 分析响应面回归参数。由表 3 可知, 1 次项 C>A>B, 各因素与 Y 的线性关系显著; 2 次项 C² 对 Y 的曲面效应显著。经 Design-Expert 8.05 软件对数据进行方差分析, 得到回归方程为 $Y=10.91+0.54 A-0.35 B+0.76 C+0.93 AB+0.32 AC-0.79 BC-3.27 A^2-1.51 B^2-0.71 C^2$, 该方程相关系数 $R^2=0.996$ 。回归方程中各变量对响应值影响的显著性由 F 检验来判定, 概率 P (Prob>F) 值越小, 则相应变量的显著程度越高。

从表 3 方差分析结果可知, 实验中选用的模型差异极显著 ($P<0.001$), 表明该 2 次方程比较显著; 失拟项为 0.081 6>0.05, 表明失拟不显著; 该方程 $R^2=0.996$ 对试验拟合程度良好, 试验误差较小, 可以用该模型对不同条件下的试验结果进行预测。

2.4.3 响应面分析 利用 Design-Expert 8.05 软件对表 2 的数据进行 2 次多元回归拟合, 通过固定 3 个变量中的 2 个为中值, 把应变量与另 2 个因素拟合为三维曲面图, 以拟合目标函数为数学模型, 绘

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果
Table 2 Box-Behnken design and results

试验号	A/%	B	C/h	提取率/ (mg·g ⁻¹)	结肠促 进率/%
1	95 (-1)	1 : 12 (0)	2.0 (-1)	8.94	36.34
2	70 (1)	1 : 10 (1)	1.5 (0)	9.36	37.62
3	80 (0)	1 : 10 (1)	2.0 (-1)	8.68	35.74
4	80 (0)	1 : 16 (-1)	2.0 (-1)	9.63	38.55
5	80 (0)	1 : 12 (0)	1.5 (0)	10.86	41.32
6	70 (1)	1 : 12 (0)	2.0 (-1)	7.00	32.68
7	80 (0)	1 : 12 (0)	1.5 (0)	10.87	43.96
8	70 (1)	1 : 16 (-1)	1.5 (0)	6.36	29.42
9	80 (0)	1 : 12 (0)	1.5 (0)	11.54	50.66
10	80 (0)	1 : 12 (0)	1.5 (0)	10.67	40.97
11	80 (0)	1 : 12 (0)	1.5 (0)	10.59	39.89
12	80 (0)	1 : 16 (-1)	1.0 (1)	10.26	39.53
13	95 (-1)	1 : 10 (1)	1.5 (0)	4.02	23.35
14	80 (0)	1 : 10 (1)	1.0 (1)	6.16	28.72
15	95 (-1)	1 : 16 (-1)	1.5 (0)	4.76	24.62
16	70 (1)	1 : 12 (0)	1.0 (1)	5.54	28.22
17	95 (-1)	1 : 12 (0)	1.0 (1)	6.20	28.68

制因变量曲面图, 所得到的 2 次回归方程的响应面及其等高线图如图 2 所示。确定最佳提取工艺条件提取溶剂为体积分散为 74.96% 的乙醇, 料液比 1 :

表 3 响应面 2 次模型方差分析

Table 3 Variance analysis for established regression model

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	75.43	9	3.04	0.000 1	$P < 0.001$
A	2.35	1	0.85	0.386 0	
B	0.97	1	0.35	0.571 0	
C	4.64	1	1.68	0.023 5	
AB	3.50	1	1.27	0.297 0	
AC	0.41	1	0.15	0.711 2	
BC	2.48	1	0.90	0.374 3	
A ²	45.07	1	16.36	0.004 9	$P < 0.05$
B ²	9.59	1	3.48	0.104 3	
C ²	2.15	1	0.78	0.000 6	$P < 0.01$
残差	19.28	7			
失拟项	18.72	3	44.51	0.081 6	
纯误差	0.56	4			
总离差	94.71	16			

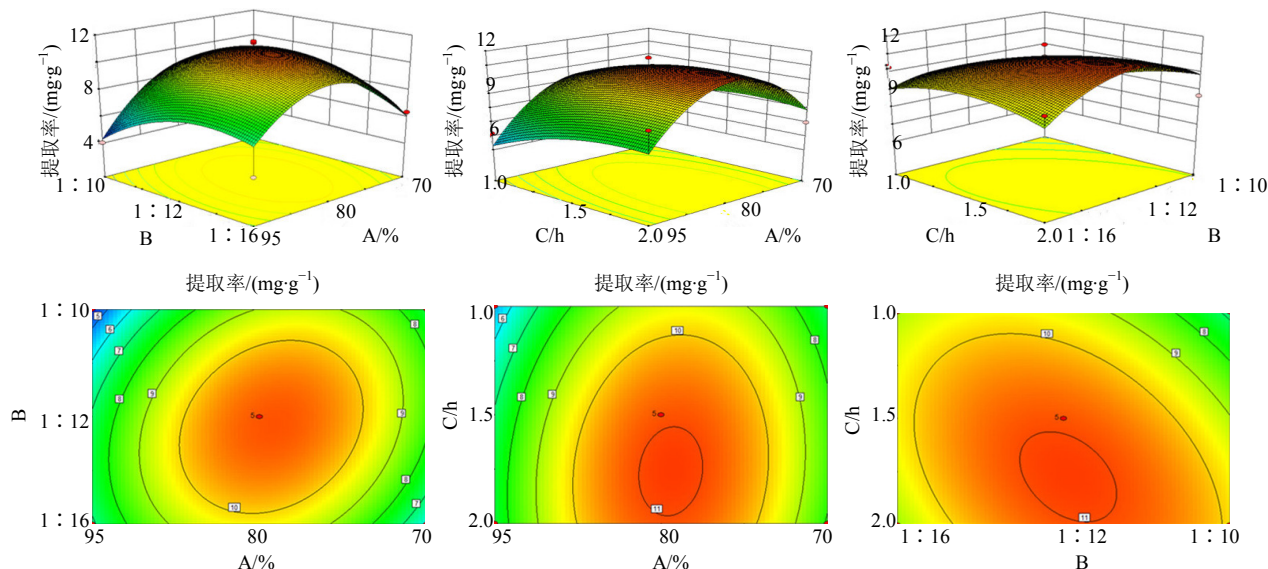


图 2 各因素间的交互作用

Fig. 2 Interaction among each factor

11.95, 提取时间为 1.535 h, 在此工艺条件下 TSPS 提取率的预测值为 11.122 2 mg/g。

2.5 验证试验

通过对实验数据的综合分析, 将 TSPS 的提取工艺确定为提取溶剂为体积浓度为 75% 的乙醇, 料

液比 1 : 12, 提取时间为 1.5 h, 提取温度 90 ℃、提取 2 次。利用确定的最佳工艺进行 3 次验证试验, TSPS 的提取率可达 10.96 mg/g, 对大鼠离体肠平滑肌的收缩促进率可达 48.52%, 模型预测值降低了 0.58 mg/g, RSD 值为 0.86%, 实验值与理论值偏差

较小。说明本实验利用响应曲面法优化得到的数学模型可靠,具有良好的预测性,所得的工艺参数准确可靠,具有实际应用价值。

3 讨论

本实验首次采用响应曲面法对 TSPS 的提取工艺参数进行优化,利用 Design-Expert 8.05 软件对提取率进行预测分析,并通过验证实验确定了高提取率的 TSPS 提取工艺。该提取工艺稳定,可靠,为后续 TSPS 的提取开发奠定了基础。

实验中由于黄花败酱中还含有以芦丁为代表的系列黄酮类成分,为了使三萜总皂苷的定量测定结果更为准确,尽量消除方法学中假阳性结果,因此在方法学考察中测定了黄花败酱中黄酮类成分的干扰实验测定,以芦丁为代表化合物测定了其在三萜总皂苷定量测定方法下的显色情况,结果显示以芦丁为代表的黄酮类成分并未干扰到总皂苷的定量测定,使得三萜总皂苷的测定结果更为可信。

在单因素试验中发现,当料液比超过 1:12,提取时间超过 1.5 h,提取温度超过 90 ℃时,提取率并没有增加反而降低,证明提取温度过高,提取时间延长,料液比过大并不利于 TSPS 的提取。因此,筛选适宜的工艺参数对 TSPS 的提取是非常必要的。由于响应曲面法建立的是复杂的多维空间曲面比较接近实际情况,更为全面地考察了提取工艺的最佳参数,其与单因素考察结果会有一定的差异,但可以通过验证实验进行确认,最终确定最佳提取工艺条件。

本实验在确定最优工艺的同时,也首次考察了 TSPS 提取物对大鼠离体肠平滑肌的收缩作用。研究结果发现 TSPS 提取物对十二指肠、空肠、回肠及结肠均具有一定促进肠平滑肌收缩的作用,且对结肠的促收缩作用最为显著,同时该作用与 TSPS 的量呈现显著的量效关系。因此利用体外离体肠平

滑肌收缩实验评价了不同提取工艺下获得的不同提取率样品的功效,结果显示随着提取率的增加,TSPS 的量越高,其促进结肠平滑肌的收缩效果也越好。也利用这种体外离体组织的活性测定试验评价和验证了 TSPS 的提取工艺,用工艺参数和活性评价相结合共同考察了最佳的 TSPS 提取工艺,为黄花败酱的临床用药及其综合开发提供参考。

参考文献

- [1] 卢寅熹. 败酱草的本草考证 [J]. 时珍国药研究, 1996, 7(3): 129-130.
- [2] 高亮, 张琳, 刘江云, 等. 黄花败酱化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1478-1480.
- [3] Choi J S, Woo W S. Coumarins and triterpenoid glycosides from the roots of *Patrinia scabiosaeifolia* [J]. *Acrh Pharm Res*, 1984, 7(2): 121-126.
- [4] Woo W S, Choi J S, Seligmann O, *et al.* Sterol and triterpenoid glycosides from the roots of *Patrinia scabiosaeifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(4): 1045-1047.
- [5] 沈德凤, 杨波, 李进京. 黄花败酱总皂苷提取物抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(3): 35.
- [6] 徐泽民, 黄朝辉, 朱波, 等. 黄花败酱镇静作用活性部位的研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2007, 17(6): 347-348.
- [7] 潘涛, 欧阳波. 正交设计法优选黄花败酱总皂苷提取工艺 [J]. 中国医学导报, 2009, 6(33): 49-50.
- [8] 叶志雄, 苏俊芳, 黄旭东, 等. 黄花败酱甲醇提取物对小鼠溃疡性结肠炎影响的药效学研究 [J]. 新中医, 2013, 45(9): 157-159.
- [9] 张启兴, 陈静, 闻雅芝, 等. 黄花败酱中齐墩果酸的含量测定 [J]. 中医药信息, 2001, 18(4): 54-55.
- [10] 杨波, 徐丽云, 沈德凤. 黄花败酱总皂苷胶囊中齐墩果酸的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1618-1619.