

正交设计法优选穿山龙总皂苷的超声提取工艺

刘胜利^a, 黄礼德^a, 郭立强^b, 黄锁义^{c*} (右江民族医学院, a.临床医学院; b.医学检验学院; c.药学系, 广西 百色 533000)

摘要: 目的 确定穿山龙总皂苷的最佳超声提取工艺。方法 采用正交试验设计进行条件优选, 通过分光光度法对提取物进行总皂苷含量的测定。结果 检测波长为 410 nm, 薯蓣皂苷元在 0.004~0.020 mg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$), 最佳超声提取工艺为: 以水饱和正丁醇为提取剂, 料液比 1:30, 超声温度 70℃, 超声功率 180 W。结论 优选出的超声提取工艺合理、经济、可行。

基金项目: 右江民族医学院民族医药协会资助(20100105)

作者简介: 刘胜利, 男 Tel: 13481699365 E-mail: shengli.365@163.com *通信作者: 黄锁义, 男, 教授, 硕导 Tel: (0776)2850590
E-mail: huangsuoyi@163.com

关键词: 穿山龙; 总皂苷; 正交设计; 超声提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)02-0136-04

Orthogonal Design for Optimization of Ultrasonic Extracting Procedure for Total Saponins from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

LIU Shengli^a, HUANG Lide^a, GUO Liqiang^b, HUANG Suoyi^{c*} (*Youjiang Medical College for Nationalities, a.School of Clinical Medicine; b.School of Clinical Laboratory Medicine; c.Department of Pharmacy, Baise 533000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the best ultrasonic extracting procedure for total saponins from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*. **METHODS** Orthogonal experiment was used to optimize the condition. The content of total saponins was determined by spectrophotometric method. **RESULTS** The wavelength of the maximum absorption was 410 nm. Diosgenin showed a good linear relationship at the range of 0.004–0.020 mg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$). The optimum ultrasonic extraction conditions were water-saturated *n*-butanol as extraction agent, solid-liquid ratio 1:30, temperature 70 °C and ultrasonic power 180 W. **CONCLUSION** The ultrasonic extracting procedure is reasonable, economical and feasible.

KEY WORDS: *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*; total saponins; orthogonal design; the ultrasonic extracting procedure

穿山龙为中国药典2010年版收录药材,为薯蓣科薯蓣属多年生藤本植物穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica* Makino)的干燥根茎^[1],气微、味苦涩、性温。具有祛风止痛、舒筋活血、止咳化痰的功效。临床上用于风湿痛、风湿关节痛、筋骨麻木、大骨节病、跌打损伤、咳嗽喘息、气管炎等疾病的治疗^[2]。现代药理研究证明,其总皂苷类成分具有调节免疫、改善心血管功能、祛痰、抗肿瘤、抗炎镇痛等多种药理作用^[2]。因而确定提取总皂苷的合理化工工艺能为工业化生产该类药物提供技术支持。文献报道穿山龙总皂苷的提取方法一般采用水提醇沉法、乙醇浸渍法、酸水解法、正交设计渗滤法、正交试验乙醇浸渍法、双相酸水解法等方法^[2-4],但是,这些方法工艺复杂、周期长、生产强度大。王昌利等^[5]应用超声技术对薯蓣皂苷的提取工艺进行多因素的研究,采用50%乙醇先浸泡36 h后超声提取,提取过程以浸泡为主,并且浸泡周期长,超声频率高,条件较为苛刻,不利于工业化生产。为此,鉴于超声波产生的强烈振动、高的加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等,可加速植物材料中的有效成分进入溶剂,从而增加有效成分的提取率,缩短提取时间,并且还可避免高温对提取成分的影响^[6]。本试验采用以水饱和正丁醇为提取剂浸泡和超声同时进行提取,并用正交试验设计方法对穿山龙总皂苷的超声提取工艺进行优化,确定其最佳工艺参数。

1 仪器与试药

1.1 仪器

722N 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限

公司); KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 电子分析天平 FA1104(上海天平仪器厂); 电热式恒温水浴锅 HHS-21-4(江苏金坛宏凯仪器厂); CASIO fx-100w 计算器。

1.2 试药

穿山龙(购自河北省任丘市),由右江民族医学院民族医学教研室覃道光副教授鉴定为薯蓣科薯蓣属植物穿山龙(*Dioscorea nipponica* Rhizoma); 标准品薯蓣皂苷元(中国药品生物制品检定所,批号: 1539-200001,供含量测定用); 高氯酸、正丁醇、甲醇等化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取薯蓣皂苷元 5 mg 置于 50 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的穿山龙粉末 0.2 g,按一定料液比加入水饱和正丁醇^[7]后置于超声波清洗器中在一定功率、温度下提取 30 min,抽滤,以水饱和正丁醇定容至 50 mL 量瓶中。在提取工艺研究中改变相应参数。

2.1.3 显色条件 在待测管中加入 5 mL 高氯酸,立即密塞,25 °C 水浴 25 min。

2.1.4 检测波长($\lambda_{\max}$)的确定 取薯蓣皂苷元溶液 1.0 mL,显色,随行试剂作空白对照,在 400~520 nm 范围内作波谱扫描。

2.1.5 标准曲线绘制 精密吸取对照品溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 分别置于 10 mL 具塞试管中,挥干溶剂,显色,在 $\lambda_{\max}$ 处测定吸光度(A)值,以 A 值为纵坐标,相应溶液中薯蓣皂苷元含

量为横坐标，绘制标准曲线，计算出一元线性回归方程。

2.1.6 穿山龙总皂苷含量的测定 取供试品溶液 0.5 mL，挥干溶剂，显色，在 $\lambda_{\max}$ 处测定吸光度，由一元线性回归方程推算出总皂苷质量。总皂苷含量即为样品干燥粉末中总皂苷质量与样品干燥粉末质量的百分比。

2.1.7 总皂苷超声提取单因素试验设计

2.1.7.1 料液比影响的测定 分别精密称取穿山龙粉 0.2 g 5 份，按料液比 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 加入水饱和正丁醇，置于超声波清洗器中 60 °C 下以 200 W 功率提取 30 min，制备成供试品溶液，测定其吸光度，计算穿山龙总皂苷含量。

2.1.7.2 提取温度影响的测定 分别精密称取穿山龙粉 0.2 g 5 份，按料液比 1:70 以 200 W 分别在 30, 40, 50, 60, 70 °C 下超声提取 30 min，制备成供试品溶液，测定其吸光度，计算穿山龙总皂苷含量。

2.1.7.3 超声功率影响的测定 分别精密称取穿山龙粉 0.2 g 7 份，按料液比 1:40 在 60 °C 下分别以功率 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 W 提取 30 min，制备成供试品溶液，测定其吸光度，计算穿山龙总皂苷含量。

2.1.8 总皂苷超声提取工艺正交试验设计 根据单因素试验结果，对影响超声提取的主要因素：料液比、提取温度、超声功率进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。

2.1.9 验证试验 取穿山龙 3 份，每份 0.2 g，按优选出的工艺进行提取，即按 1:30 料液比，以 180 W 的超声功率在 70 °C 下进行提取 30 min。

2.1.10 统计学方法 本实验数据根据目的不同用 CASIO fx-100w 计算器、Excel 2007 或统计学软件 SPSS 17.0 处理。

2.2 结果

2.2.1 $\lambda_{\max}$ 与一元线性回归方程的确定 由波谱扫描结果可知， $\lambda_{\max}$ 为 410 nm，故选择此波长为实验测定波长。由标准曲线数据计算出一元线性回归方程为： $Y=8.145X+0.0339$ ， $r=0.9998$ ，表明对照品薯蓣皂苷元含量在 0.004~0.020 g·mL⁻¹ 内与对应吸光度值有良好线性关系。

2.2.2 单因素试验结果

2.2.2.1 料液比对皂苷含量的影响 在 1:10~1:50 内，随着提取剂量的增加，皂苷含量先上升

后下降，最大值出现在 1:40 处。当提取剂量>1:40 时，皂苷含量呈下降趋势，这可能是穿山龙皂苷已基本提取完全，其他杂质进入浸提液，使浸提液黏度升高，扩散速度变慢，导致皂苷不易溶出，结果见表 1。

表 1 料液比对皂苷含量的影响

Tab 1 Effect of solid-liquid ratio on the content of saponins

料液比	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50
皂苷含量/%	1.73	1.86	1.96	2.12	1.88

2.2.2.2 提取温度对皂苷含量的影响 在 30~70 °C 随着温度的升高，皂苷含量总体呈先上升后下降趋势，在 60 °C 达最大值，这可能是超声温度升高增大了皂苷在溶剂中的溶解度，同时提取液黏度减少，扩散系数增加，促使提取速度加快，从而提高了提取物的含量；但温度再升高，活性成分易被破坏，杂质的溶出量增加，致使皂苷含量下降，结果见表 2。

表 2 提取温度对皂苷含量的影响

Tab 2 Effect of extraction temperature on the content of saponins

温度/°C	30	40	50	60	70
皂苷含量/%	1.70	1.75	1.74	1.83	1.78

2.2.2.3 超声功率对皂苷含量的影响 在超声功率 80~200 W 内，皂苷含量呈曲折上升趋势，最大值出现在 180 W 处，而当功率>180 W 时，皂苷含量呈下降趋势，这可能是由于随着功率的增大，产生的热量使溶质扩散加快，当温度达到一定程度时，温度对传质效应的影响变小的缘故，结果见表 3。

表 3 超声功率对皂苷含量的影响

Tab 3 Effect of ultrasonic power on the content of saponins

超声功率/W	80	100	120	140	160	180	200
皂苷含量/%	1.64	1.64	1.73	1.65	1.68	1.78	1.68

2.2.3 正交试验因素水平及结果 根据单因素试验结果选取 3 因素 3 水平作正交设计，结果见表 4 至表 6；由直观分析可知，因素的重要性依次为 B>C>A。方差分析表明，超声温度与超声功率在超声提取穿山龙总皂苷中有显著意义。因此，优选出的工艺为 $A_1B_3C_3$ ，即按 1:30 料液比，以 180 W 的超声功率在 70 °C 下进行提取。

表 4 正交试验因素水平表

Tab 4 Design for factors and levels of orthogonal test L₉(3⁴)

水平	因素		
	A(料液比)	B(提取温度/℃)	C(超声功率/W)
1	1 : 30	50	140
2	1 : 40	60	160
3	1 : 50	70	180

表 5 L₉(3⁴) 正交试验结果

Tab 5 Results of orthogonal test

试验号	A	B	e	C	总皂苷得率/%
1	1	1	1	1	1.93
2	1	2	2	2	2.06
3	1	3	3	3	2.41
4	2	1	2	3	2.04
5	2	2	3	1	2.08
6	2	3	1	2	2.12
7	3	1	3	2	1.95
8	3	2	1	3	2.32
9	3	3	2	1	2.22
K ₁	2.13	1.97	2.12	2.08	
K ₂	2.08	2.15	2.11	2.04	
K ₃	2.16	2.25	2.15	2.26	
R	0.08	0.28	0.04	0.22	

表 6 方差分析表

Tab 6 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	0.011	2	0.005	4.413	0.185
B	0.118	2	0.059	48.835	0.020
C	0.079	2	0.040	32.624	0.030
error	0.002	2	0.001		

注: $F_{0.05(2,2)}=19$

Note: $F_{0.05(2,2)}=19$

2.2.4 验证试验结果 按最佳提取条件进行提取, 总皂苷含量平均为 2.42%, 与正交试验中的 3 号试验的总皂苷含量相近且远高于 9 号试验的总皂苷含量; 考虑到在正交试验中理论最佳条件与实际最佳条件均为 A₁B₃C₃(即 3 号试验), 正交试验得出的结果是可靠的且工艺稳定可行, 结果见表 7。

表 7 验证试验结果

Tab 7 Results of verification test

试验序号	总皂苷得率/%	平均得率/%	RSD/%
1	2.40		
2	2.41	2.42	1.09
3	2.45		

3 讨论

穿山龙的有效成分主要为甾体皂苷类, 包括薯蓣皂苷、纤细皂苷和水溶性皂苷。总皂苷水解产生薯蓣皂苷元^[2]。用水饱和正丁醇为提取剂, 以总皂苷得率为考察指标, 采用正交设计法, 对穿山龙总皂苷进行超声提取工艺优选, 得出最佳超声提取工艺为: 以水饱和正丁醇为提取剂, 料液比 1 : 30, 超声温度 70 ℃, 超声功率 180 W。

本试验采用以水饱和正丁醇为提取剂浸泡和超声同时进行提取, 提取效率高, 极大地缩短了提取周期, 优于文献报道的方法, 起到简化工艺流程, 节省成本, 减少杂质的作用, 具有合理、经济、可行的优点, 为穿山龙总皂苷的提取方法及其工业化生产提供了新手段。

REFERENCES

- [1] Ch.P (2010) Vol I (中国药典 2010 年版.一部)[S]. 2010: 250.
- [2] LIU Y, LIU S M, LIU L, et al. Orthogonal design for optimization of extracting procedure to total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma [J]. Med Inf (医学信息杂志), 2010, 23(5): 1247-1248.
- [3] XU X L, KE Z H, ZHANG Z R. Orthogonal test for optimization of extracting procedure to total saponins from Rhizoma Dioscoreae Nipponicae [J]. West China J of Pharm Sci(华西药科学杂志), 2003, 18(2): 95-98.
- [4] YANG H, YANG K D, CHEN J. The research on two phase acid hydrolysis of extracting diosgenin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(4): 270-272.
- [5] WANG C L, ZHANG Z G, YANG J L, et al. Extracting procedure of multi-factor to total saponins from Rhizoma Dioscoreae Nipponicae by ultrasonic technology [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 1994, 16(4): 7-8.
- [6] HUANG S Y, LI H N, TANG Y L, et al. Extraction of total flavanone from Mango leaves by ultrasonic wave [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2006, 23(6): 455-456.
- [7] QIN F, LIU J, CHEN Y Y, et al. Study on the transonic extraction and content determination methods of total saponins of *Panax Notoginseng* (PNS) [J]. J Anhui Agricultural Sci(安徽农业科学), 2008, 36(8): 3062-3063, 3231.

收稿日期: 2010-05-18