

# 正交试验优选白花延龄草薯蓣皂苷元提取工艺研究

李小沛, 张亚玉, 赵立春, 张春阁, 刘继永\*

(中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

**摘要:**以白花延龄草干燥的根茎为试验材料,用正交试验优化白花延龄草根和根茎中薯蓣皂苷元的提取工艺,采用UPLC法测定白花延龄草中薯蓣皂苷元的含量。采用回流法考察料液比、提取时间、提取温度3个因素对白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元提取含量的影响,用正交试验法优化提取工艺。影响白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元提取含量的主次因素为:提取温度>料液比>提取时间;白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元的最佳提取工艺条件为:料液比为1:8,提取时间为4 h,提取温度为80℃。提取温度是影响薯蓣皂苷元提取含量的主要因素,在最佳提取工艺条件下,白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元的提取含量为0.0791%。

**关键词:**白花延龄草;薯蓣皂苷元;正交设计;提取工艺

中图分类号:TQ464

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2018)03-0056-05

## Optimize Extraction Process of Diosgenin in *Trillium kamtschaticum* with Orthogonal Test method

LI Xiaopei, ZHANG Yayu, ZHAO Lichun, ZHANG Chungu, LIU Jiyong\*

(Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

**Abstract:** With the dry rhizomes of *Trillium kamtschaticum* as materials, this experiment was to optimize the extraction process of diosgenin in *Trillium kamtschaticum* using UPLC method to determinate diosgenin. The influence of solid-liquid ratio, time and temperature on extraction contents of the diosgenin in dry rhizomes of *Trillium kamtschaticum* were discussed with orthogonal test method. Results showed that the impact sequence of the factors on the extraction contents of the diosgenin in dry rhizomes of *Trillium kamtschaticum* was as follows: extraction temperature > solid-liquid ratio > extraction time. The optimal extraction condition was solid-liquid ratio of 1:8, extraction time of 4 h, and extraction temperature of 80℃. In conclusion, extraction temperature is the main factor affecting the extracting contents of diosgenin. Under these optimal conditions, the extracting contents of diosgenin in dry rhizomes of *Trillium kamtschaticum* is 0.0791%.

**Key words:** *Trillium kamtschaticum*; Diosgenin; Orthogonal design; Extraction technology

延龄草为百合科延龄草属植物,全世界约有50种,我国有3种,即延龄草(*Trillium tschonoskii* Maxim.)、白花延龄草(*T. kamtschaticum* Pall.)和西藏延龄草(*T. govanianum* Wall.)<sup>[1-2]</sup>。延龄草生于海拔1 600~3 200 m的林下、山谷阴湿处、山坡或路旁岩石下,主产于我国西北、东北和西南地区<sup>[3]</sup>,为珍稀濒危物种,目前,主要采取迁地保护、

建立自然保护区、恢复和保护延龄草生长的生态环境、组织培养、遗传多样性研究等手段加以保护<sup>[4-8]</sup>。

延龄草为国家医药管理局管理的二类药材,化学成分复杂、次生代谢产物结构新颖、活性多样,在免疫调节、抗氧化、抗癌和抗炎、抗肿瘤等多方面表现出较强的药理活性,其化学成分以皂苷类为主,薯蓣皂苷为其中一种。薯蓣皂苷元是生产甾体激素类药物的重要基础原料,甾体激素具有很强的抗过敏、抗感染、抗休克和抗病毒的药理作用,是皮肤病、治疗风湿、淋巴白血病、心血管、抗肿瘤、细胞性脑炎和抢救危重病人的重

收稿日期:2018-01-25

基金项目:吉林省科技发展规划项目(20120909)

作者简介:李小沛(1990-),女,在读硕士,研究方向:药用植物资源学。

通讯作者:刘继永,男,博士,研究员,E-mail: ljy1107@126.com

要用药<sup>[9]</sup>。关于薯蓣皂苷元的植物源生产工艺,主要以穿山龙为原料,通过提取水解工艺生产,已有大量文献报道<sup>[10]</sup>。但以白花延龄草为原料的薯蓣皂苷元提取工艺研究相对较少,本实验采用正交试验对白花延龄草根和根茎中薯蓣皂苷元的提取工艺进行优化。

## 1 仪器、材料与试剂

### 1.1 仪器

Acquity UPLC H-Class 配置光电二极管阵列检测器 PDA(美国 Waters 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水器(美国 Millipore 公司); XS205 电子天平(瑞士 Mettler toledo 公司)。

### 1.2 材料与试剂

#### 1.2.1 材料

白花延龄草采自中国农业科学院特产研究所的白花延龄草驯化栽培实验田,由中国农业科学院特产研究所刘继永研究员鉴定确认为白花延龄草根茎。

#### 1.2.2 试剂

薯蓣皂苷元(Sigma 公司,纯度 $\geq 98\%$ );乙腈(色谱纯,Fisher 公司);无水甲醇、浓硫酸、石油醚(60~90℃)(分析纯,北京化工厂);超纯水(自制)。

## 2 方法

对白花延龄草药材粉末采用回流法提取,选用料液比、提取时间、提取温度 3 个考察因子,每个因子选取 3 个水平,用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验设计(见表 1)。

表 1 正交试验因素水平表

| 水平 | 因素  |         |         |    |
|----|-----|---------|---------|----|
|    | 料液比 | 提取时间(h) | 提取温度(℃) | 空白 |
|    | A   | B       | C       | D  |
| 1  | 1:6 | 4       | 60      | 0  |
| 2  | 1:7 | 5       | 70      | 0  |
| 3  | 1:8 | 6       | 80      | 0  |

注:料液比为延龄草粉末取样量与所加无水甲醇溶液的体积比

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Waters BEH  $C_{18}$  (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 $\mu$ m); 检测器: PDA。流速: 0.5 mL/min; 柱温: 35℃; 检测波长 203 nm。流动相: 乙腈(A)-水(B), 线性梯度洗脱, 比例见表 2。

表 2 流动相比比例

| 时间(min) | 乙腈(%) | 水(%) |
|---------|-------|------|
| 0       | 60    | 40   |
| 1       | 60    | 40   |
| 6       | 95    | 5    |
| 8       | 95    | 5    |
| 8.5     | 60    | 40   |
| 10      | 60    | 40   |

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取 1.05 mg 薯蓣皂苷元对照品粉末, 用无水甲醇定容于 10 mL 容量瓶中, 配制成 0.105 mg/mL 的对照品溶液。

### 2.3 供试样品溶液的制备

取白花延龄草干燥根茎, 粉碎, 过 60 目筛。

称取白花延龄草药材粉末 2 g, 共 9 份, 置 250 mL 的圆底烧瓶中, 按照  $L_9(3^4)$  正交表试验设计的方案, 用无水甲醇浸泡过夜, 回流提取, 过滤, 将溶液蒸干, 各加入 2 mol/L 的硫酸溶液 50 mL 和石油醚(60~90℃) 50 mL, 于 80℃ 水浴中回流水解 4 h<sup>[10]</sup>, 水解液冷却至室温, 倒入 250 mL 分液漏斗中静置分层, 分取上层石油醚液, 再以等体积石油醚萃取 3 次<sup>[11]</sup>, 合并石油醚层, 回收溶剂蒸干, 残渣加无水甲醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中定容至刻度, 摇匀, 用 0.22 $\mu$ m 的微孔滤膜过滤, 备用。

### 2.4 检出限、定量限、线性关系考察

精密吸取对照品溶液加无水甲醇配制成浓度分别为 20.16 $\mu$ g/mL、10.08 $\mu$ g/mL、4.032 $\mu$ g/mL、2.016 $\mu$ g/mL、1.008 $\mu$ g/mL 的溶液进样, 按照“2.1”的色谱条件进行测定, 进样量为 10 $\mu$ L, 以对照品溶液的浓度( $\mu$ g/mL)为横坐标(x), 以峰面积的积分值为纵坐标(y), 绘制标准曲线, 得出薯蓣皂苷元标准曲线的回归方程为:  $y=1543.5x+338.65$ ,  $R^2=0.9998$  ( $n=5$ ), 在 0.01008 $\mu$ g~0.2016 $\mu$ g 范围内呈良好的线性关系, 结果对应的峰面积分别为 31 340、

16 096、6 748、3 291、1 784。按信噪比 S/N=3 计,测得检出限为 2.035 $\mu$ g/g,信噪比 S/N=10 时,测得定量限为 5.01 $\mu$ g/g。结果见表 3、图 1。

表 3 标准曲线原始数据

| 浓度( $\mu$ g/mL) | 峰面积积分值 |
|-----------------|--------|
| 1.008           | 1 784  |
| 2.016           | 3 291  |
| 4.032           | 6 748  |
| 10.08           | 16 096 |
| 20.16           | 31 340 |

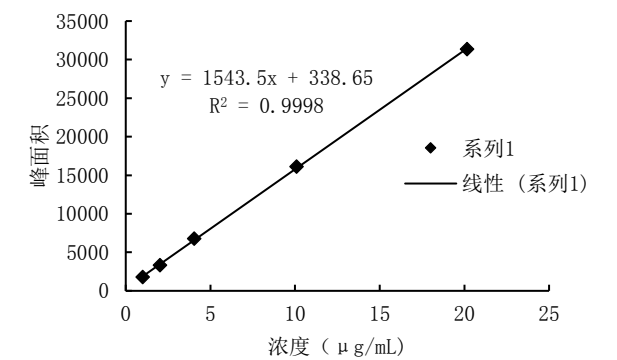


图 1 薯蓣皂苷元标准曲线

2.5 精密度

按正交表中序号 1 供试品溶液制备方法制备样品并且按“2.1”中色谱条件重复进样 5 次,进样量为 1 $\mu$ L,分别记录峰面积,计算其峰面积 RSD 值

表 4 精密度实验

| 序号 | 峰面积    | 平均值    | RSD (%) |
|----|--------|--------|---------|
| 1  | 64 484 | 64 399 | 0.38    |
| 2  | 64 595 |        |         |
| 3  | 64 242 |        |         |
| 4  | 64 056 |        |         |
| 5  | 64 618 |        |         |

为 0.38%,说明仪器精密度良好。结果见表 4。

2.6 重复性

精密称取白花延龄草根茎粉末 2.0 g,按照正交表中序号 1 供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”中色谱条件分别进样,进样量为 1 $\mu$ L,测得峰面积,代入薯蓣皂苷元标准曲线的回归方程,计算得到白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元的平均含量为 0.02069%,RSD 为 0.88%。说明该方法重复性良好。结果见表 5。

表 5 重复性实验

| 样品编号 | 含量       | 平均值      | RSD  |
|------|----------|----------|------|
| 1    | 0.020 81 | 0.020 69 | 0.88 |
| 2    | 0.020 43 |          |      |
| 3    | 0.020 77 |          |      |
| 4    | 0.020 58 |          |      |
| 5    | 0.020 87 |          |      |

2.7 稳定性

精密称取白花延龄草根茎粉末 2.0 g,按照正交表中序号 1 供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按“2.1”中色谱条件每隔 4 h 进一次样,进样量为 1 $\mu$ L,结果显示,峰面积 RSD 为 0.64%。说明样品在 24 h 内性质稳定。结果见表 6。

表 6 稳定性实验

| 放置时间(h) | 峰面积    | 平均值    | RSD (%) |
|---------|--------|--------|---------|
| 0       | 64 754 | 64 299 | 0.64    |
| 4       | 64 579 |        |         |
| 8       | 64 397 |        |         |
| 12      | 64 023 |        |         |
| 16      | 63 742 |        |         |

2.8 回收率

采用加标回收法,精密称取 9 份已知含量的白花延龄草根茎粉末,分别精密加入薯蓣皂苷元

表 7 加标回收率实验

| 样品 | 取样量(g)  | 原有含量(mg) | 标准加入量(mg) | 实测量(mg) | 回收率(%) | 平均值(%) | RSD (%) |
|----|---------|----------|-----------|---------|--------|--------|---------|
| 1  | 0.992 4 | 0.785    | 1.580     | 2.329   | 97.72  | 97.75  | 1.03    |
| 2  | 1.006 3 | 0.796    | 1.580     | 2.365   | 99.30  |        |         |
| 3  | 1.002 5 | 0.793    | 1.580     | 2.347   | 98.35  |        |         |
| 4  | 1.007 6 | 0.797    | 0.790     | 1.562   | 96.84  |        |         |
| 5  | 0.994 9 | 0.787    | 0.790     | 1.558   | 97.59  |        |         |
| 6  | 0.993 7 | 0.786    | 0.790     | 1.566   | 98.73  |        |         |
| 7  | 0.997 5 | 0.789    | 0.400     | 1.174   | 96.25  |        |         |
| 8  | 1.003 8 | 0.794    | 0.400     | 1.181   | 96.75  |        |         |
| 9  | 1.001 3 | 0.792    | 0.400     | 1.185   | 98.25  |        |         |

对照品溶液适量(浓度为 0.105 mg/mL),按照正交表中序号 7 供试品溶液制备方法分别制备 9 份供试品溶液,按“2.1”中色谱条件分别进样,进样量为 1 $\mu$ L,测得峰面积,计算得到白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元的平均回收率为 97.75%,RSD=1.03%。结果见表 7。

3 结 果

分别取“2.2”和“2.3”项下制备的对照品溶液和样品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行上机检测,进样量为 1 $\mu$ L,结果见表 8、表 9、图 2、图 3。

表 8 正交试验设计及结果

| 序号             | A     | B     | C     | D     | 薯蓣皂苷元含量(%) |
|----------------|-------|-------|-------|-------|------------|
| 1              | 1     | 1     | 1     | 1     | 0.020 7    |
| 2              | 1     | 2     | 2     | 2     | 0.019 1    |
| 3              | 1     | 3     | 3     | 3     | 0.022 0    |
| 4              | 2     | 1     | 2     | 3     | 0.013 8    |
| 5              | 2     | 2     | 3     | 1     | 0.060 7    |
| 6              | 2     | 3     | 1     | 2     | 0.023 7    |
| 7              | 3     | 1     | 3     | 2     | 0.079 1    |
| 8              | 3     | 2     | 1     | 3     | 0.016 0    |
| 9              | 3     | 3     | 2     | 1     | 0.017 4    |
| K <sub>1</sub> | 0.062 | 0.114 | 0.060 | 0.099 |            |
| K <sub>2</sub> | 0.098 | 0.096 | 0.050 | 0.122 |            |
| K <sub>3</sub> | 0.113 | 0.063 | 0.162 | 0.052 |            |
| R              | 0.051 | 0.051 | 0.111 | 0.070 |            |

表 9 薯蓣皂苷元得率方差分析

| 因素 | 偏差平方和     | 自由度 | 均方和 MS    | F 比   | F 临界值 | 显著性 |
|----|-----------|-----|-----------|-------|-------|-----|
| A  | 0.000 456 | 2   | 0.000 228 | 1.607 | 5.140 |     |
| B  | 0.000 437 | 2   | 0.000 219 | 1.543 | 5.140 |     |
| C  | 0.002 535 | 2   | 0.001 268 | 8.943 | 5.140 | *   |
| 误差 | 0.000 850 | 6   | 0.000 142 |       |       |     |

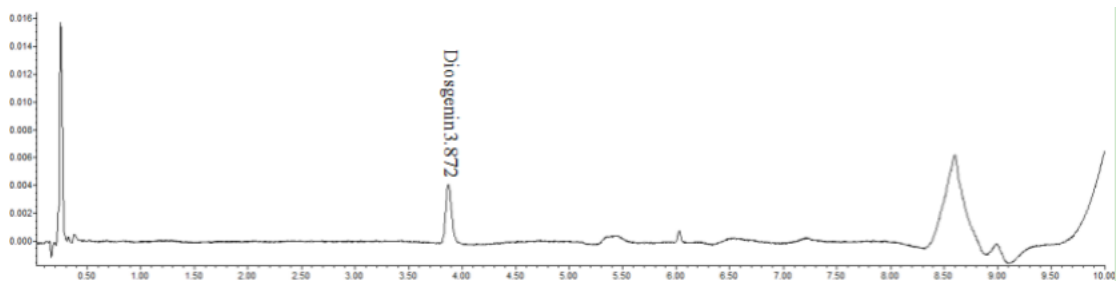


图 2 薯蓣皂苷元对照品 UPLC 色谱图

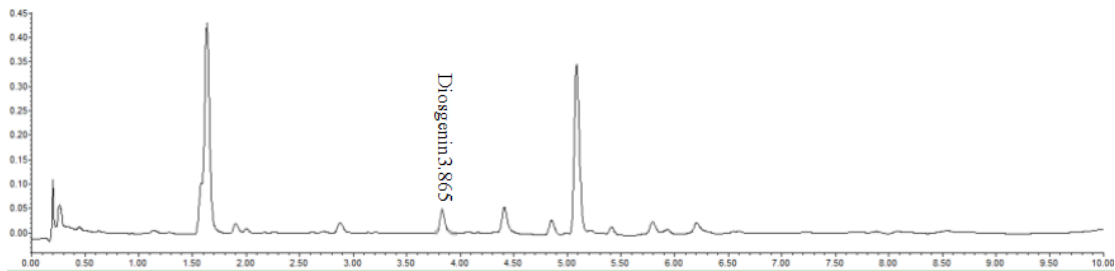


图 3 白花延龄草根茎水解物 UPLC 色谱图

由以上正交试验及方差分析结果可得:C因素是影响薯蓣皂苷元得率的主要因素,即提取的温度;其次是料液比A,提取时间B在4 h以上对薯蓣皂苷元的得率影响不大,说明回流提取4 h已达平衡状态。同时根据正交试验结果,得到白花延龄草根和根茎中薯蓣皂苷元的最佳提取工艺组合条件为:A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>。

4 验证实验

由试验结果可得,白花延龄草中薯蓣皂苷元提取的最佳工艺条件为序号7的实验条件。为验证此最佳工艺条件的稳定性,精密称取白花延龄草根茎粉末2.0 g,按照正交表中序号7供试品溶液制备方法平行制备3份供试品溶液,按“2.1”中色谱条件分别进样,进样量为1 μL,测得峰面积,代入薯蓣皂苷元标准曲线的回归方程,对优化工艺进行验证。计算得到白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元的平均含量为0.0790%,RSD为0.55%,所以白花延龄草中薯蓣皂苷元的最佳提取工艺得到验证。结果见表10。

| 表 10 验证实验 |        |        | %    |
|-----------|--------|--------|------|
| 样品溶液编号    | 含量     | 平均值    | RSD  |
| 1         | 0.0793 |        |      |
| 2         | 0.0785 | 0.0790 | 0.55 |
| 3         | 0.0792 |        |      |

5 结 论

通过正交试验对白花延龄草薯蓣皂苷元的提取工艺进行优化,得到其最佳提取工艺组合条件为:A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>,即料液比为1:8,提取时间为4 h,提取温度为80℃。在此工艺条件下,白花延龄草根茎中薯蓣皂苷元的含量为0.0791%。

实验结果与文献中比较,白花延龄草中薯蓣皂苷元的含量显著少于百合科的其他属(薯蓣属、重楼属等)药用植物<sup>[12-14]</sup>,有文献采用分光光度法测皂苷含量<sup>[15]</sup>,但根据UPLC分析速度快、效率高、灵敏度高等优点,本实验中薯蓣皂苷元的

测定采用了UPLC法;有文献中多以超声法提取,试验表明回流法提取工艺重复性良好、稳定性强,可在最佳提取工艺条件下继续研究水解工艺,从而进一步提高白花延龄草中薯蓣皂苷元的提取率。

参考文献:

[1] 谢宗万.全国中草药汇编(上册)[M].北京:人民卫生出版社,2000:225-226.

[2] 宋立人,洪 恂,丁绪亮,等.现代中药学大词典[M].北京:人民卫生出版社,2001:787-788.

[3] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1978:97-98.

[4] 胡天印,钱丽华,张宏伟.濒危植物延龄草种群空间分布格局的研究[J].金华职业技术学院学报,2005,5(4):87-89,112.

[5] 林先明,廖朝林.延龄草生物学特性研究[J].中国现代医药,2006,8(7):38-41.

[6] 陈吉裕,张文玲.延龄草无菌培养体系的建立及防褐变措施[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(5):40-44.

[7] 柳 俊.延龄草组织培养研究[J].中国中药杂志,1998,23(9):522-524.

[8] 胡天印,钱丽华,刘汉卿.濒危植物延龄草愈伤组织诱导研究[J].浙江师范大学学报(自然科学版),2006,29(3):326-329.

[9] 岳 蕾,陈 玲,寇俊萍,等.薯蓣皂苷元药理活性及其机制研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(2):233-237.

[10] 都述虎,夏重道,付铁军,等.穿龙薯蓣总皂甙水解条件的优化[J].中成药,2000,22(9):608-610.

[11] 邹节明,周艳林,雷肖琳,等.《中国药典》菝葜中薯蓣皂苷元测定的前处理方法的改进[J].中成药,2008,30(1):154-155.

[12] 高国新,郑元锁,刘 艺,等.黄姜根中薯蓣皂甙元的提取及研究[J].陕西农业科学,2005(1):22-24,91.

[13] 刘 影,史姗姗,汪财生.浙江紫山药营养成分及薯蓣皂苷元含量测定[J].安徽农业科学,2010,38(9):4563-4564,4567.

[14] 张 烨,赵 倩,高科江,等.HPLC测定不同生长年限滇重楼中薯蓣皂苷元含量[J].安徽农业科学,2011,39(6):3280-3281,3285.

[15] 李向群,宋 冰,王丕武,等.大豆皂苷提取工艺的优化[J].吉林农业科学,2014,39(2):93-96.

(责任编辑:王 昱)