

白花败酱草总皂苷提取纯化工艺的优化

宋珊珊¹, 包永睿¹, 赵焕君¹, 吴健², 项峥^{1,2}, 孟宪生¹, 王帅¹, 赵琳^{1*}
(1. 辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600; 2. 哈尔滨商业大学, 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江哈尔滨 150076)

摘要: 目的 优化白花败酱草 *Patrinia villosa* Juss. 的提取纯化工艺。方法 以总皂苷含量为评价指标, 乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间、提取次数为影响因素, 正交试验优化提取工艺。通过静、动态吸附与解吸实验, 优化纯化工艺。通过 MTT 法, 比较纯化前后提取物对人肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用。结果 最佳提取条件为加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h; 最佳纯化条件为采用 D101 型大孔树脂, 0.25 g/mL 提取液, 药材量-树脂比例 0.75:1, 体积流量 2 BV/h, 2.5 BV 水除杂后, 5 BV 75% 乙醇洗脱, 总皂苷纯度为 84.51%, 回收率为 40.86%。纯化后, 总皂苷体外抑制 SMMC-7721 细胞的作用显著提高, IC₅₀ 比纯化前降低 58%。结论 该方法简便、快速、准确, 可用于白花败酱草总皂苷的提取纯化。

关键词: 白花败酱草总皂苷; 提取; 纯化; 正交试验; 抗肝癌活性; SMMC-7721; MTT

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)01-0093-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.017

Extraction and purification optimization for total saponins from *Patrinia villosa*

SONG Shan-shan¹, BAO Yong-rui¹, ZHAO Huan-jun¹, WU Jian², XIANG Zheng^{1,2},
MENG Xian-sheng¹, WANG Shuai¹, ZHAO Lin^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Research Center for Environmental and Life Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

KEY WORDS: total saponins from *Patrinia villosa* Juss.; extraction; purification; orthogonal test; anti-hepatoma activity; SMMC-7721; MTT

白花败酱草为败酱科植物白花败酱 *Patrinia villosa* Juss. 的干燥全草^[1], 为我国常用中草药, 具有清热解毒、排脓破淤、祛瘀止痛的功效^[2], 其化学成分比较复杂, 主要含有皂苷、黄酮、多酚等^[3-4], 其中皂苷是其抗肿瘤药效成分之一^[5]。随着对白花败酱草化学成分研究的不断深入, 如何分离纯化得到更多、更纯的有效物质具有广泛的经济和社会效益。本实验在前期研究的基础上^[6], 对白花败酱草总皂苷提取纯化工艺进行优化, 克服了由于纯度不够导致物质基础相对不清晰的问题, 可为该药材的合理利用及开发奠定实验基础。

1 材料

HPD-100、HPD-300、D101、X-5、AB-8 大孔树脂 (沧州宝恩化工有限公司)。胎牛血清、RP-MI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 齐墩果酸 (中国食品药品检定研究院, 批号 110709-200505)。白花败酱草购自亳州市远光中药饮片厂 (批号 20140501), 经辽宁中医药大学许亮教授鉴定为白花败酱 *Patrinia villosa* Juss. 的干燥全草。肝癌细胞株 SMMC-7721 购自上海复蒙生物有限公司。硫酸、香草醛、冰乙酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总皂苷提取

2.1.1 对照品溶液制备 根据前期实验及相关文

收稿日期: 2017-04-13

基金项目: 国家自然科学基金 (81303211); 中国博士后科学基金 (2013M540301); 辽宁省教育厅科学技术研究项目 (L201609)

作者简介: 宋珊珊 (1993—), 女, 硕士生, 从事中药药效物质基础研究。Tel: 18840859804, E-mail: 1805509366@qq.com

* 通信作者: 赵琳 (1972—), 男 (满族), 硕士, 从事中药药效物质基础及质量评价研究。Tel: (0411) 85890159, 13478781603, E-mail: zhao3lin@126.com

献调研, 确定以齐墩果酸为考察指标^[7-8]。精密称取齐墩果酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.291 2 mg 该成分的对照品溶液。

2.1.2 检测波长选择 精密吸取 0.5 mL 齐墩果酸对照品溶液于试管中, 水浴蒸干, 采用香草醛-冰乙酸-硫酸显色法, 在 400 ~ 800 nm 波长范围内扫描, 同法制得空白溶液。结果, 对照品溶液在 550 nm 波长处有最大吸收, 故选择其作为检测波长。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取齐墩果酸对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL 于试管中, 水浴蒸干, 按“2.1.2”项下方法操作。以齐墩果酸质量为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (A) 进行线性回归, 得方程为 $A = 0.002 45X + 0.046 14 (r = 0.999 5)$, 在 0.029 12 ~ 0.203 84 mg 范围内呈良好的线性关系。

2.1.4 正交试验优化 通过预实验及相关文献调研, 选择乙醇体积分数 (A)、溶剂用量 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 作为影响因素^[9], 总皂苷含量 (Y) 作为评价指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验进行优化。因素水平见表 1, 试验设计及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	A 乙醇/%	B 溶剂用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次
1	50	6	1	1
2	70	8	1.5	2
3	90	10	3	3

表 2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	Y/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	7.401
2	1	2	2	2	9.695
3	1	3	3	3	11.932
4	2	1	2	3	18.464
5	2	2	3	1	12.726
6	2	3	1	2	20.392
7	3	1	3	2	17.315
8	3	2	1	3	19.342
9	3	3	2	1	15.109
均值 1	9.676	14.393	15.712	11.745	—
均值 2	17.194	13.921	14.423	15.801	—
均值 3	17.255	15.811	13.991	16.579	—
极差	7.579	1.890	1.721	4.834	—

由此可知, 各因素影响程度依次为 $A > D > B > C$, 即 A (乙醇体积分数) 影响最显著 ($P < 0.05$), 故对其进行单因素考察, 结果见表 4, 可知乙醇体积分数为 70% 时, 总皂苷含量最高。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	113.970	2	23.699	19.000	<0.05
B	5.805	2	1.207	19.000	>0.05
C	4.809	2	1.000	19.000	>0.05
D	40.420	2	8.405	19.000	>0.05
误差	4.810	2	—	—	—

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

因此, 最优提取工艺为 $A_2B_3C_1D_3$, 即 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h。

表 4 乙醇体积分数考察结果

Tab. 4 Results of ethanol concentration investigation

乙醇/%	总皂苷/(mg·g ⁻¹)
60	14.75
70	16.86
80	15.34
90	15.03

2.1.5 验证试验 按上述优化条件重复 3 次, 测得总皂苷纯度分别为 19.03%、20.12%、19.36%, 平均 19.52%, RSD 2.87%, 表明该方法稳定可行。

2.2 总皂苷纯化

2.2.1 上样液制备 精密称取药材约 300 g, 按“2.1.4”项下最优提取工艺制备, 即得。

2.2.2 静态吸附与解吸实验^[10] 取预处理好的 5 种大孔树脂 (HPD-100、HPD-300、D101、X-5、AB-8), 抽滤至干, 各精密称取 4 g, 置于 100 mL 具塞三角瓶中, 加入 0.25 g/mL 样品溶液 50 mL, 每隔 10 min 振摇 20 s, 持续 2 h 后静置 22 h 以使其充分吸附, 过滤, 测定总皂苷含量, 计算静态吸附率及解吸率, 结果见表 5。由表可知, D101 树脂的吸附率和解吸率最高, 故选择其作为最佳树脂。

表 5 各大孔树脂的静态吸附和解吸性能

Tab. 5 Static adsorption and desorption capacities of various macroporous resins

树脂类型	极性	孔径/ nm	总皂苷/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/ %	解吸率/ %
AB-8	弱极性	130 ~ 140	28.402 2	64.83	69.37
HPD-100	非极性	85 ~ 90	26.713 5	62.14	75.18
HPD-300	非极性	50 ~ 55	23.846 9	55.30	80.47
D101	非极性	100 ~ 110	29.912 2	69.71	86.23
X-5	弱极性	29 ~ 30	22.890 5	53.50	81.59

2.2.3 上样量考察 取树脂 20 mL, 湿法上柱, 将 0.25 g/mL 提取液以 2 BV/h 体积流量上样, 收集流出液, 每份 5 mL, 计算总皂苷含量, 结果见图 1。由图可知, 当上样至第 11 份时, 总皂苷含

有量显著提高,表明此时该成分开始明显泄漏,故确定最大上样量为第12份,即60 mL (0.75 g/mL,药材量/树脂体积)。

2.2.4 上样质量浓度考察 取树脂20 mL,以及0.20、0.25、0.33、0.50、1.00 g/mL提取液,按0.75 g/mL (药材量/树脂体积)比例以2 BV/h体积流量上样,收集流出液,计算比吸附量,结果见图1。由图可知,在上样质量浓度为0.25 g/mL时,比吸附量最高。

2.2.5 上样体积流量考察 取树脂20 mL,以及0.25 g/mL提取液,按0.75 g/mL (药材量/树脂体积)比例以1、2、3、4 BV/h体积流量上样,结果见图1。由图可知,当上样体积流量为2 BV/h时,比吸附量最高。

2.2.6 除杂用水量考察 按上述条件动态吸附后,以30、40、50、60、70 mL水洗脱,收集洗脱液,

计算总皂苷含有量,结果见图1。由图可知,当除杂用水量为50 mL (2.5 BV)时,总皂苷含有量最高。

2.2.7 洗脱剂(乙醇)体积分数考察 按上述条件动态吸附、除杂后,以15%、35%、55%、75%、95%乙醇洗脱,体积流量2 BV/h (Salkowski反应呈阴性),收集洗脱液,计算总皂苷含有量,结果见图1。由图可知,乙醇体积分数为75%时,总皂苷含有量最高。

2.2.8 洗脱剂(乙醇)用量考察 按“2.2.7”项下方法上样和除杂后,75%乙醇洗脱,体积流量2 BV/h,每10 mL收集1份洗脱液,共12份 (Salkowski反应呈阴性),计算总皂苷含有量,结果见图1。由图可知,第10份洗脱液(即洗脱剂用量100 mL)中总皂苷含有量很低,表明已基本解吸完全。

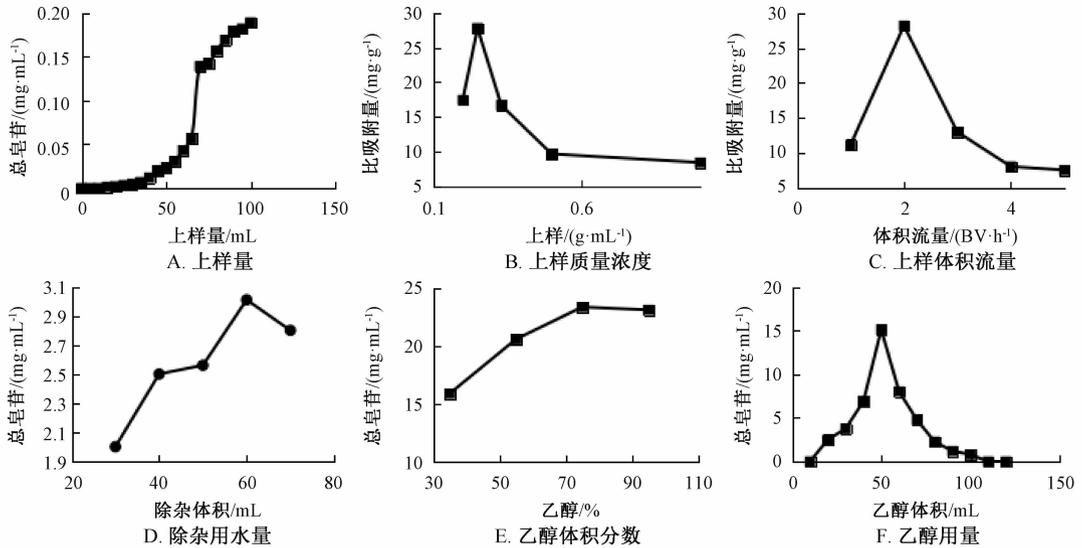


图1 动态吸附和解吸试验结果

Fig. 1 Results of dynamic adsorption and desorption tests

2.3 工艺重复性试验 最优提取工艺为10倍量70%乙醇回流提取3次,每次1 h;最优纯化工艺为采用D101树脂,0.25 g/mL提取液按0.75 g/mL (药材量/树脂体积)比例、2 BV/h体积流量上样,2.5 BV水除杂,5 BV 75%乙醇洗脱。精密称取3份药材,按以上优化工艺进行提取纯化,计算总皂苷纯度、回收率,结果见表6,可知该工艺稳定可靠。

2.4 总皂苷对细胞抑制率的影响 精密称取20.0 mg纯化前后粉末置于10 mL具塞试管中,加5 mL RPMI-1640培养液,0.22 μm微孔滤膜过滤,配制成4 mg/mL溶液,依次加培养液稀释,使其质量

表6 工艺重复性试验结果 (n=3)
Tab. 6 Results of process reproducibility tests (n=3)

试验号	总皂苷纯度/%	回收率/%
1	84.01	40.78
2	83.92	40.29
3	84.61	41.51
平均值	84.51	40.86
RSD/%	1.13	1.50

浓度分别为2.00、1.00、0.50、0.25 mg/mL,备用。

取培养2~3 d、处于对数生长期、生长状态良好的人肝癌SMMC-7721细胞,PBS缓冲液清洗,0.25%胰蛋白酶消化,培养液制备成 5×10^4 /mL

细胞悬液，接种于96孔培养板中，每孔100 μL，培养24 h。再分别加入提取物和纯化物，每组设5个复孔，将正常肝癌细胞组作为空白对照组，对照组加等量培养液，继续培养36 h后，每孔加入180 μL培养液和20 μL MTT，培养4 h后，吸弃上清液，加入150 μL DMSO，摇床上振摇10 min后，酶标仪于492 nm波长处测定吸光度A，取5孔平均值计算抑制率^[11-13]，计算公式为细胞抑制率 = (1 - 实验组A/对照组A) × 100%，再应用SPSS 19.0软件计算IC₅₀值^[14]，结果见表7。由表可知，总皂苷可抑制SMMC-7721细胞生长，而且纯化后IC₅₀值比纯化前降低了58%，表明总皂苷纯度越高，抗肝癌作用越显著。

表7 总皂苷对SMMC-7721细胞的抑制作用

Tab.7 Inhibition effect of total saponins on SMMC-7721 cells

给药量/ (mg·mL ⁻¹)	纯化前抑制 率/%	IC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)	纯化后抑制 率/%	IC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)
0.00	-		-	
0.25	9.81		5.67	
0.50	16.67	2.15	43.27	0.91
1.00	21.60		61.08	
2.00	48.75		90.74	
4.00	86.34		95.96	

3 讨论

本实验首先通过静态实验，比较了5种大孔树脂对白花败酱草总皂苷吸附和解吸性能的影响，发现D101型性能最佳。然后，考察了上样质量浓度、上样体积流量、除杂量、洗脱剂体积分数、洗脱用量对其的影响，发现经D101大孔树脂处理后，总皂苷纯度和回收率均达到较高水平，而且该方法简便、稳定、可靠。

文献表明，白花败酱草总皂苷通过复杂的提取纯化操作后，其纯度仅为60%^[15]。本实验对其进行优化，得到纯度84.51%、收率40.86%的提取物，而且所用工艺具有操作简便、节约溶剂等优

点，有利于扩大该药材工业化生产，也可为其开发和利用提供实验依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 421.
- [2] 刘素香, 刘毅, 白雪, 等. 败酱草指纹图谱研究[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2074-2077.
- [3] Kouno I, Yasuda I, Mizoshiri H, et al. Two new iridolactones and their glycosides from the roots of *Patrinia scabra* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(2): 467-472.
- [4] Kouno I, Koyama I, Jiang Z H, et al. Patrinoside, an esterified monocyclic iridoid glucoside from *Patrinia scabra* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(5): 1567-1568.
- [5] 宋婷, 孙晖, 路娟, 等. 白花败酱草体外抗肿瘤活性部位筛选[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2411-2412.
- [6] 张兴, 佟继铭. 皂苷类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. 承德医学院学报, 2011, 28(1): 73.
- [7] 毛红梅, 平欲晖, 宗星星, 等. HPLC同时测定败酱草中常春藤皂苷元、齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 89-90.
- [8] 徐洁昕, 周方钦, 江放明, 等. 均匀设计法优选白花败酱草总皂苷的提取工艺[J]. 中成药, 2006, 28(4): 483-484.
- [9] 潘涛, 欧阳波. 正交设计优选黄花败酱总皂苷提取工艺[J]. 制剂与技术, 2009, 33(6): 49-50.
- [10] 祁艳, 陈军, 蔡宝昌, 等. 马钱子总生物碱提取纯化工艺及抗肿瘤研究[J]. 中成药, 2010, 32(3): 405-408.
- [11] 姚楠, 顾晓洁, 李友宾, 等. 白首乌中C₂₁甾体皂苷类成分的抗肿瘤活性研究[J]. 中成药, 2010, 32(11): 1975-1978.
- [12] 郑阳阳, 陈宇, 孟宪生, 等. 双莲方抗肝癌细胞SMMC-7721有效组分配伍研究[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2144-2145.
- [13] 黄一凡, 王帅, 孟宪生, 等. 基于HepG2体外细胞培养的旋覆花抗肿瘤有效组分的提取工艺[J]. 中成药, 2016, 38(2): 450-451.
- [14] 张涛, 田黎明, 朱贵明, 等. Caspase-3参与白花败酱草皂苷诱导Hela细胞凋亡[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(11): 2321-2322.
- [15] 李娜. 白花败酱草化学成份、抗炎作用以及总皂苷提取纯化工艺研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2006.