

盾叶薯蓣中薯蓣皂甙元不同提取方法的比较

谢彩侠¹, 高山林^{1,①}, 朱丹妮¹, 秦慧贞²

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210038; 2. 江苏省·中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为提高盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)中薯蓣皂甙元得率, 在实验室条件下, 以薯蓣皂甙元含量为评价指标, 采用4因素4水平的正交试验, 用高效液相色谱法对16种提取方法所得的薯蓣皂甙元含量进行了比较分析。结果表明, 硫酸的浓度对薯蓣皂甙元含量有极显著影响, 在实验室条件下, 可采用10 g样品加2.0 mol·L⁻¹硫酸200 mL水解4 h, 水解物用石油醚回流提取5 h, 能快速准确提取盾叶薯蓣中的薯蓣皂甙元。

关键词: RP-HPLC; 盾叶薯蓣; 薯蓣皂甙元; 提取方法

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2005)01-0023-03

Comparison of different methods of diosgenin extraction from *Dioscorea zingiberensis* XIE Cai-xia¹, GAO Shan-lin^{1,①}, ZHU Dan-ni¹, QIN Hui-zhen² (1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(1): 23-25

Abstract: To increase the extract rate of diosgenin in rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, several important factors were analyzed in the orthogonal study of four factors and four levels, the content of diosgenin was valued as an evaluation index using RP-HPLC. The results indicate that the concentration of sulphuric acid has an obvious effect on the content of diosgenin extracted. So in the condition of laboratory, 10 g sample is added in 200 mL 2.0 mol·L⁻¹ H₂SO₄ and is hydrolyzed for 4 h, then is refluxed for 5 h with petroleum ether, which can be used as a rapidly extraction way.

Key words: RP-HPLC; *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; diosgenin; extraction method

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)为薯蓣属(*Dioscorea* L.)植物, 其根状茎入药, 又名黄姜、火头根, 具有清肺止咳、利湿痛淋、通络止痛、解毒消肿的功能, 可治肺热咳嗽、湿热淋痛、风湿腰痛、痈肿恶疮、跌打扭伤、蜂螫虫咬; 其水溶性甙体皂甙成分对心肌缺血、胸痹、高脂血症等有明显治疗作用。其根茎内薯蓣皂甙元的含量一般为2%左右, 是目前世界上最好的激素类药源植物之一。作为提取原料, 只有保证薯蓣皂甙元含量在一定的范围内, 原料才有提取价值, 因此工业提取前实验室测定原料皂甙元含量是必要的。不同的提取方法所测薯蓣皂甙元含量也不尽相同。基于这一点, 在前人研究^[1-5]的基础上, 同时考虑预处理方法、硫酸浓度、硫酸用量及回流时间4个因素, 采用4因素4水平的正交试验, 在实验室条件下, 采用RP-HPLC对16种提取方法的薯蓣皂甙元含量进行了分析, 以期能筛选出快速、准确提取和检测薯蓣皂甙元含量的方

法; 以指导工业生产。

1 材料和方法

1.1 实验材料

取安徽产盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)1年生的地下根茎, 于2003年4月种植于中国药科大学实验田, 2003年11月采收地下根茎, 清除杂质, 60℃烘干, 粉碎过20目筛, 供分析用。

1.2 实验方法

1.2.1 方案设计 采用4因素4水平的正交试验。4个因素分别为预处理方法、硫酸浓度、硫酸用量和

收稿日期: 2004-09-30

作者简介: 谢彩侠(1977-), 女, 河南内乡人, 博士研究生, 主要从事中药生物技术研究。

① 通讯作者

回流时间。预处理采用的4个方法为:超声波提取20 min;40℃下水解48 h;用纤维素酶水解1 h;不经任何处理(对照)。硫酸的浓度分别为0.5、1.0、1.5和2.0 mol·L⁻¹。硫酸用量为50、100、150和200 mL。回流时间设定为4、5、6和7 h。

1.2.2 薯蓣皂甙元粗提物的提取 称取盾叶薯蓣根茎粉末10 g左右,置于三角瓶中,采用不同方法对其进行预处理后加入不同浓度和不同体积硫酸后,在100℃水浴中水解4 h,冷却后过滤,滤渣用蒸馏水洗至中性,60℃干燥后,用石油醚(60℃~90℃)100 mL在90℃水浴中用索氏提取器提取不同时间,提取液回收至一定体积,转入已知质量的蒸发皿中,60℃下烘干得薯蓣皂甙元粗提物。

1.2.3 薯蓣皂甙元测定方法

1.2.3.1 供试品溶液制备 用无水乙醇将薯蓣皂甙元粗提物溶解,过滤至一定体积的容量瓶中,用无水乙醇定容待测定。

1.2.3.2 对照品溶液制备 准确称取薯蓣皂甙元标样0.002 g,置2 mL容量瓶中,用无水乙醇溶解,稀释至刻度,得1 μg·μL⁻¹的标准溶液,备用。

1.2.3.3 HPLC 色谱条件选择 按照已知的方法^[6-8],并经反复实验确定色谱分析条件为: Econobase C₁₈柱(5 μm, 4.6 mm×150 mm);流动相为无水乙醇;进样量5 μL;流速0.5 mL·min⁻¹;检测波长203 nm;柱温为室温。

1.2.3.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液1、2、4、6、8和10 μL,按上述HPLC色谱条件测定峰面积,以峰面积分值为纵坐标,进样量为横坐标进行回归处理,得回归方程为 $Y = -3.5241 + 64.87X$, $r = 0.9978$ 。

1.2.3.5 精密密度试验 精密吸取对照品溶液5 μL,重复进样5次,得出RSD=1.5%。

1.2.3.6 重现性试验 取盾叶薯蓣样品粉按上述方法进行供试样品液的制备和测定,重复进样5次,得出薯蓣皂甙元平均含量为1.86%,RSD=0.98%。

1.2.3.7 稳定性试验 薯蓣皂甙元化学结构较稳定,将待测供试品溶液室温下放置7 d,再测定,色谱图上未出现异常峰,表明薯蓣皂甙元含量较稳定。

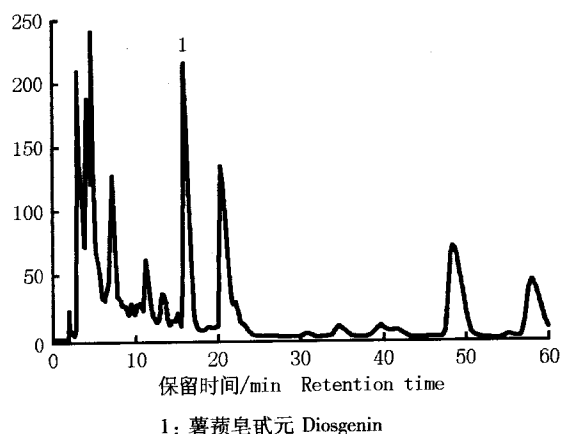
1.2.3.8 回收率试验 采用加样回收法,取一定量已知含量的盾叶薯蓣样品,分别添加不同量的薯蓣

皂甙元对照品,按上述方法进行供试品溶液的制备和测定。得到薯蓣皂甙元的平均回收率为105.2%,RSD=4.2%(n=5)。

2 结果和分析

2.1 薯蓣皂甙元 RP-HPLC 测定

按上述色谱条件进行RP-HPLC分析,盾叶薯蓣样品中薯蓣皂甙元与其他成分达到良好分离(图1)。



1: 薯蓣皂甙元 Diosgenin
图1 盾叶薯蓣样品的RP-HPLC图谱
Fig. 1 RP-HPLC chromatogram of the sample of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

2.2 薯蓣皂甙元不同提取方法的比较

薯蓣皂甙元不同提取方法的正交试验设计及结果见表1。由表1可以看出,16种提取方法所得薯蓣皂甙元含量差异较大,最低为10.59 mg,最高为92.61 mg,含量较高的为第4、第8、第11、第12和第16种方法,含量分别为85.80、80.14、85.80、92.61和87.86 mg;采用相同的预处理方法,用最低浓度(0.5 mol·L⁻¹)的硫酸水解所得的薯蓣皂甙元含量均为最低,而用最高浓度(2.0 mol·L⁻¹)的硫酸水解所得的薯蓣皂甙元含量均为最高;利用不同预处理方法所提取的薯蓣皂甙元的含量整体差异不明显。由R值分析可以看出,4个因素对薯蓣皂甙元含量的影响从大至小依次为硫酸浓度、回流时间、预处理方法、硫酸用量。方差分析结果也显示只有硫酸浓度对薯蓣皂甙元含量影响较大($P < 0.01$),其他3个因素均无显著影响。

表1 盾叶薯蓣中薯蓣皂甙元提取方法的正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal test and experimental results for extraction method of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright rhizome

方法 Method	A 预处理方法 ¹⁾ Pretreatment ¹⁾	B 硫酸浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration of H_2SO_4	E 误差 Error	C 硫酸用量/mL Volume of H_2SO_4	D 回流时间/h Time of reflux	皂甙元提取量/mg Content of diosgenin
1	1	0.5	1	50	4	10.59
2	1	1.0	2	100	5	62.70
3	1	1.5	3	150	6	72.60
4	1	2.0	4	200	7	85.80
5	2	0.5	2	150	7	15.61
6	2	1.0	1	200	6	54.76
7	2	1.5	4	50	5	50.42
8	2	2.0	3	100	4	80.14
9	3	0.5	3	200	5	18.15
10	3	1.0	4	150	4	50.32
11	3	1.5	1	100	7	85.80
12	3	2.0	2	50	6	92.61
13	4	0.5	4	100	6	23.10
14	4	1.0	3	50	7	72.60
15	4	1.5	2	200	4	56.92
16	4	2.0	1	150	5	87.86
K1	231.69	67.45	239.01	226.22	197.97	
K2	200.93	240.38	227.84	251.74	219.13	
K3	246.88	265.74	243.49	226.39	243.07	$\sum_{i=1}^{16} = 919.98$
K4	240.48	346.41	209.64	215.63	259.81	
R	45.95	278.96		36.11	61.84	CT = 52 897
F	2.35	60.62		1.04	3.23	$F(0.10)(3,3) = 5.39$
P	$P > 0.1$	$P < 0.01$			$P > 0.1$	$F(0.01)(3,3) = 29.50$

¹⁾ 1: 超声波提取 20 min Extraction for 20 min by supersonic; 2: 自然水解 48 小时(40℃)Hydrolysis for 48 h at 40℃; 3: 纤维素酶水解 1 h Hydrolysis for 1 h by fibrin enzyme; 4: 对照 Control.

3 讨 论

采用 4 因素 4 水平的正交试验,以薯蓣皂甙元含量为评价指标,用 RP-HPLC 对 16 种提取方法所得的薯蓣皂甙元含量进行分析,能够在传统的单因子比较的基础上容纳更多的因素和水平,同时大大减少试验次数,提高准确率。结果表明,只有硫酸浓度对薯蓣皂甙元含量有极显著影响。

研究结果表明,加一定量的纤维素酶或用超声波预处理样品,均可提高薯蓣皂甙元的提取量,但酶成本较高,也难以保存,故推广使用有一定难度。由于本实验的主要目的是为工业化提取前的药材品质检测提供 1 种相对准确、可靠的方法,因此应简便、可行。由实验结果可知,在实验室条件下,可称取约 10 g 样品粉末,加 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 200 mL 于 100℃ 水浴中水解 4 h,冷却过滤,滤渣用蒸馏水洗至中性,60℃ 干燥后,用石油醚(60℃ ~ 90℃)100 mL

在 90℃ 水浴中用索氏提取器提取 5 h,粗提物采用 RP-HPLC 快速测定薯蓣皂甙元含量,以指导生产。

参考文献:

- [1] 王昌利,张振光,杨景亮,等. 超声提高薯蓣皂甙得率的实验研究[J]. 中成药, 1994, 16(4): 7-8.
- [2] 王元兰,李水芳,杨志. 盾叶薯蓣皂甙元提取工艺研究[J]. 经济林研究, 2002(6): 20-21.
- [3] 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.
- [4] 王元兰. 快速提高盾叶薯蓣皂甙元提取率的研究[J]. 株洲师范高等专科学校学报, 2002, 7(2): 5-7.
- [5] 王俊,杨克迪,陈钧. 均匀设计法优选穿山龙的水解工艺条件[J]. 中药材, 2002, 25(9): 659-660.
- [6] 达世禄,唐祥怡,达晖宁,等. 盾叶薯蓣中薯蓣皂甙元的反相高压液相色谱测定[J]. 色谱, 1992, 10(2): 98.
- [7] 赵景婵,郭治安,成小飞,等. 穿龙薯蓣中薯蓣皂甙元的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(1): 27-28.
- [8] 李忠琼,傅文,林瑞超,等. 高效液相色谱法测定闭鞘姜属 3 种植物中总薯蓣皂甙元的含量[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(4): 312-313.

(责任编辑:惠红)