

正交试验优选酸枣仁总皂苷提取工艺

林海成¹, 祝洪艳¹, 何忠梅^{1*}, 王国丽¹, 张连学^{2*}

(1. 吉林农业大学 中药材学院, 长春 130118; 2. 吉林省人参工程技术创新中心, 长春 130118)

[摘要] 目的: 优选酸枣仁总皂苷的提取工艺, 为该成分的工业化生产提供参考。方法: 采用 HPLC-UV 检测酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量, 流动相乙腈-水 (34:66), 检测波长 204 nm。在单因素试验基础上, 通过正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数对酸枣仁总皂苷提取工艺的影响。结果: 酸枣仁皂苷 A、B 的线性范围分别为 0.24~2.40, 0.12~1.20 μg, 平均加样回收率分别为 100.39%, 99.40%。酸枣仁总皂苷最佳提取工艺为加 12 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h; 酸枣仁皂苷 A、B 的平均质量分数分别为 0.606, 0.228 mg·g⁻¹。结论: 建立的 HPLC 检测酸枣仁皂苷 A、B 含量方法准确可靠, 优选的酸枣仁总皂苷提取工艺稳定可行, 具有节约成本、省时等特点, 适用于工业化生产。

[关键词] 酸枣仁; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B; 总皂苷

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903 (2015) 05-0042-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050042

[网络出版地址] http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1451.006.html

[网络出版时间] 2015-01-12 14:51

Optimization of Extraction Technology for Total Saponins from Ziziphi Spinosae Semen by Orthogonal Test
LIN Hai-cheng¹, ZHU Hong-yan¹, HE Zhong-mei^{1*}, WANG Guo-li¹, ZHANG Lian-xue^{2*} (1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin Provincial Ginseng Engineering and Technology Innovation Centre, Changchun 130118, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total saponins from Ziziphi Spinosae Semen and provide a reference for industrial production of this component. **Method:** HPLC-UV method was employed to detect contents of jujuboside A and jujuboside B with mobile phase of acetonitrile-water (34:66) and detection wavelength at 204 nm. On the basis of single factor tests, effects of ethanol concentration, liquid-solid ratio, extraction time and extraction times on extraction process were investigated by orthogonal test. **Result:** Linear ranges of jujuboside A and jujuboside B were 0.24-2.40, 0.12-1.20 μg, average recovery of them were 100.39% and 99.40%. The best extraction technology of total saponins from Ziziphi Spinosae Semen was as following: extracted 2 times with 12 times the amount of 70% ethanol for 1.5 h per time; average contents of jujuboside A and jujuboside B were 0.606, 0.228 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This established HPLC method is accurate and reliable to detect contents of jujuboside A and jujuboside B. At the same time, this optimized extraction technology of total saponins from Ziziphi Spinosae Semen is stable and feasible with advantages of energy-saving, time-saving and so on, so it is suitable for industrial production.

[Key words] Ziziphi Spinosae Semen; jujuboside A; jujuboside B; total saponins

酸枣仁始载于《神农本草经》, 列为上品, 具有养心补肝、宁心安神、敛汗生津等功效^[1], 主要化学成分包括皂苷类、黄酮类、脂肪油等。皂苷类成分为酸枣仁的主要药效成分, 具有镇静、催眠、安定等作

[收稿日期] 20140612(019)
[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI03B010602); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304006); 国家公益性行业(农业)科研专项(201303111)
[第一作者] 林海成, 在读硕士, 从事中药新药研究与开发, Tel:13843008281, E-mail:charleshaicheng@163.com
[通讯作者] * 张连学, 博士, 教授, 从事药用植物栽培、育种与资源保护和利用, Tel:13844847715, E-mail:zlxbooksea@163.com;
* 何忠梅, 博士, 副教授, 从事中药有效成分及作用机制研究, Tel:13331662387, E-mail:435398002@qq.com

用^[2-3],用于治疗中枢神经系统、心血管系统等疾病^[4]。目前,研究报道多采用紫外分光光度法检测酸枣仁总皂苷含量为指标进行酸枣仁提取工艺的优选^[5-6],提取方法常采用溶剂法,包括热回流法、复合酶法^[7]、超声法^[8-9],考察因素一般选择提取方法、提取溶剂浓度、提取时间、提取次数^[10]。本实验以酸枣仁皂苷 A,B 为评价指标,通过单因素试验和正交试验考察提取方法、提取时间、提取次数、溶剂浓度和用量对酸枣仁总皂苷提取工艺的影响,为酸枣仁皂苷类成分的开发应用提供参考。

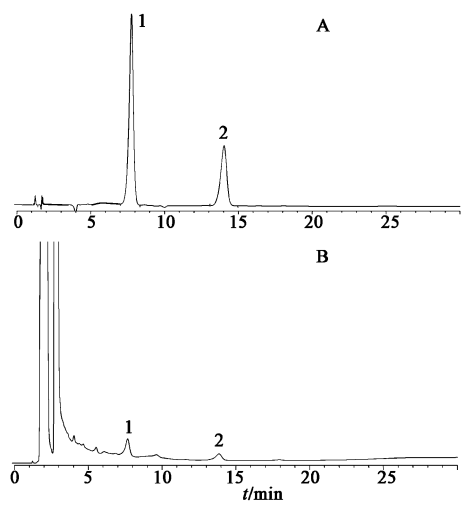
1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),BS210S 型 1/1 万电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司)。酸枣仁购于当地药店,产地河北,经吉林农业大学中药学院包海鹰教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* 的干燥成熟种子;酸枣仁皂苷 A,B 对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20120423,20120522),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 酸枣仁皂苷 A,B 的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(34:66)^[11],柱温 25℃,检测波长 204 nm,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。酸枣仁皂苷 A,B 的理论塔板数均>5 000,分离度均>1.5,拖尾因子均符合测定需求,见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 酸枣仁皂苷 A;2. 酸枣仁皂苷 B

图 1 酸枣仁 HPLC

Fig.1 HPLC of Ziziphi Spinosae Semen

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取酸枣仁皂苷

A 及酸枣仁皂苷 B 2.4,1.2 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。精密量取各对照品溶液 5.0 mL 置同一 10 mL 量瓶中,摇匀,得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取酸枣仁粗粉(40 目筛)约 5.0 g 至索氏提取器中,加石油醚脱脂 6 h,药渣挥干石油醚,加 70% 乙醇 50 mL 回流提取 2 h,减压回收乙醇至无醇味,加水 50 mL 使溶解并转移至分液漏斗中,用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 50 mL,合并正丁醇层,回收正丁醇^[5],得酸枣仁总皂苷提取物,加甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线绘制 精密量取混合对照品溶液 2,4,6,10,16,20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得酸枣仁皂苷 A 及酸枣仁皂苷 B 的回归方程为 $Y = 324.96X + 18.229$ ($r = 0.999\ 3$), $Y = 295.68X + 2.510$ ($r = 0.999\ 0$),线性范围分别为 0.24~2.40,0.12~1.20 μg。

2.1.5 精密度试验 精密吸取 2.1.2 项下混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件下连续进样 6 次,计算酸枣仁皂苷 A,B 峰面积的 RSD 分别为 1.9% 和 2.1%。

2.1.6 重复性试验 取总皂苷提取物,按 2.1.3 项下方法平行制备 6 份溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算酸枣仁皂苷 A,B 含量的 RSD 分别为 2.8% 和 3.0%。

2.1.7 稳定性试验 取供试品溶液室温放置,分别于 0,2,4,8,12,24,48 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算酸枣仁皂苷 A,B 峰面积的 RSD 分别为 1.8%,1.9%。表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取酸枣仁药材粗粉 5.0 g,共 6 份(酸枣仁皂苷 A,B 的质量分数依次为 0.68,0.28 mg·g⁻¹),分别置于圆底烧瓶中,各加入酸枣仁皂苷 A,B 对照品 3.40,1.38 mg,按 2.1.3 项下方法制备 6 份样品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取方法 取酸枣仁干粉 5.0 g,分别采用 6 种不同方法提取。酶法中纤维素酶-果胶酶(1:1),pH 4.5,温度 45℃,酶解时间 5 h^[7];超声法、浸渍法、渗漉法、水煮法、回流法分别加 10 倍量 70% 乙醇或水提取 2,24,24,2,1 h。结果超声法、酶法、回流法、浸渍法、渗漉法、水煮法的浸膏得率分别

表 1 酸枣仁皂苷 A,B 含量测定的加样回收率试验
Table 1 Recovery test for determination of jujuboside A and jujuboside B

成分	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
酸枣仁皂苷 A	3.40	3.40	6.83	100.88	100.39	1.9
	3.38	3.40	6.73	98.53		
	3.42	3.40	6.87	101.47		
	3.44	3.40	6.76	97.65		
	3.46	3.40	6.94	102.35		
	3.43	3.40	6.88	101.47		
酸枣仁皂苷 B	1.38	1.38	2.77	100.72	99.40	2.4
	1.41	1.38	2.73	95.65		
	1.44	1.38	2.85	102.17		
	1.45	1.38	2.82	99.28		
	1.39	1.38	2.74	97.83		
	1.42	1.38	2.81	100.72		

为 3.97% ,3.66% ,4.11% ,2.41% ,3.23% ,2.40% ; 酸枣仁皂苷 A 质量分数依次为 0.168, 0.196, 0.204,0.128,0.142,0.154 mg·g⁻¹,酸枣仁皂苷 B 依次为 0.068, 0.078, 0.074, 0.056, 0.064, 0.048 mg·g⁻¹.说明回流法和复合酶法皂苷类成分含量相近。文献报道复合酶法提取酸枣仁皂苷类成分含量较回流法高^[7],但考虑到复合酶反应将酸枣仁细胞壁破坏,有效成分随之溶出,但可能会将酸枣仁皂苷类成分水解为皂苷元,导致含量反而减少,故采用回流法。

2.2.2 提取溶剂 取酸枣仁干粉 5.0 g,固定料液比 1:10,提取时间 1 h,分别选择水及 40% ,60% ,70% ,80% ,95% 的乙醇溶液为提取溶剂,计算浸膏率依次为 2.17% ,2.49% ,4.09% ,5.02% ,5.04% ,3.82% ,酸枣仁皂苷 A 质量分数分别为 0.154, 0.210,0.226,0.288,0.268,0.232 mg·g⁻¹,酸枣仁皂苷 B 质量分数分别为 0.064, 0.068, 0.084, 0.100,0.094,0.082 mg·g⁻¹,故选择 70% 乙醇为宜。

2.2.3 料液比 取酸枣仁干粉 5.0 g,分别加 8, 10,12,15,20 倍量 70% 乙醇提取 1 h,结果浸膏得率依次为 4.53% ,5.12% ,5.26% ,5.39% ,5.42% ,酸枣仁皂苷 A 分别为 0.238, 0.276, 0.422, 0.302, 0.340 mg·g⁻¹,酸枣仁皂苷 B 依次为 0.094,0.122, 0.148,0.130,0.134 mg·g⁻¹,故料液比选择 1:12。

2.2.4 回流时间 取酸枣仁干粉 5.0 g,分别加 12

倍量 70% 乙醇回流提取 1,1.5,2,2.5,3 h,结果浸膏得率依次为 4.04% ,4.47% ,4.93% ,4.98% ,5.03% ,酸枣仁皂苷 A 分别为 0.118,0.132,0.142, 0.150,0.148 mg·g⁻¹,酸枣仁皂苷 B 依次为 0.034, 0.060,0.074,0.054,0.044 mg·g⁻¹,故回流提取时间选取 2 h。

2.2.5 提取次数 取酸枣仁干粉 5.0 g,加 12 倍量 70% 乙醇分别回流提取 1,2,3,4 次,每次 1 h,结果浸膏得率依次为 1.91% ,5.15% ,5.40% ,5.51% ,酸枣仁皂苷 A 分别为 0.202,0.250,0.288,0.280 mg·g⁻¹,酸枣仁皂苷 B 依次为 0.078,0.094,0.102, 0.096 mg·g⁻¹,说明当提取次数过多时,会导致皂苷类成分部分水解,含量降低。

2.3 正交试验 在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、回流次数为考察因素,以酸枣仁皂苷 A,B 提取量为评价指标,称取酸枣仁干粉 9 份,每份 5.0 g,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验设计,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

由直观分析可知,影响酸枣仁皂苷 A,B 总量的因素大小顺序为 A>D>B>C。以极差最小的 C 为误差项进行方差分析,结果表明因素 A 具有显著性影响,其他因素则无显著性影响,结合生产实际考虑,确定最优工艺条件为 A₂B₂C₁D₁,即乙醇体积分数 70% ,提取数 2 次,提取时间 1.5 h,料液比 1:12。

2.4 验证试验 称取酸枣仁粗粉 3 份,每份 50 g,按优选的提取工艺条件进行验证试验,结果酸枣仁皂苷 A 质量分数依次为 0.613,0.597,0.609 mg·g⁻¹,酸枣仁皂苷 B 质量分数依次为 0.232,0.224, 0.229 mg·g⁻¹,表明该提取工艺稳定可行。

3 讨论

预试验考察了色谱条件,比较了 Dikma Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)和 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),结果显示后者分离效果较好,色谱峰对称性更好,故选用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱。流动相考察了 2010 年版《中国药典》中酸枣仁皂苷 A 含量测定项下的洗脱条件^[11],发现以乙腈-水(34:66)等度洗脱时,酸枣仁皂苷 A 和 B 的保留时间较短且分离度较好,故选用乙腈-水(34:66)为流动相。采用 HPLC-UV 检测酸枣仁皂苷 A,B 含量进行酸枣仁提取工艺优选,较文献[5]中运用比色法检测酸枣仁总皂苷含量更为准确。预试验采用比色法检测酸枣仁总皂苷含量为指标对酸枣仁提取工艺进行优选,结果得最优提取工艺条件为加 15 倍量 70% 乙醇回流提取 3

表 2 酸枣仁总皂苷回流提取工艺正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of reflux extraction process of total saponins from Ziziphi Spinosae Semen

No.	A 乙醇体积分数 /%	B 乙醇用量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	酸枣仁皂苷 A /mg·g ⁻¹	酸枣仁皂苷 B /mg·g ⁻¹	酸枣仁皂苷 A + B /mg·g ⁻¹
1	60	10	1.5	2	0.478	0.160	0.638
2	60	12	2.0	3	0.466	0.224	0.690
3	60	15	2.5	4	0.300	0.138	0.438
4	70	10	2.0	4	0.520	0.194	0.714
5	70	12	2.5	2	0.686	0.270	0.956
6	70	15	1.5	3	0.576	0.256	0.832
7	80	10	2.5	3	0.520	0.168	0.688
8	80	12	1.5	4	0.542	0.214	0.756
9	80	15	2.0	2	0.510	0.232	0.742

表 3 酸枣仁皂苷 A,B 总量方差分析

Table 3 Variance analysis of total content of jujuboside A and jujuboside B

方差来源	SS	MS	F	P
A	4.663	2.332	22.015	<0.05
B	0.334	0.167	1.575	>0.05
C(误差)	0.528	0.264	2.491	
D	1.101	0.550	5.195	>0.05

注： $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

次,每次 1.5 h。说明通过 HPLC 检测酸枣仁皂苷 A,B 含量的方法更省时、更节能,且高效、精确。采用 HPLC 检测 3 批药材中酸枣仁皂苷 A,B 的平均质量分数分别为 0.606,0.228 mg·g⁻¹,与文献[12-13]报道相比,含量测定值偏低,原因可能与酸枣仁的产地、采收时间、贮藏条件等因素有关。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:343-344.

[2] 王旭峰,何计国,陈阳,等. 酸枣仁皂苷的提取及改善睡眠功效的研究[J]. 食品科学,2006,27(4):226-229.

[3] 陈百泉,杜钢军,许启泰. 酸枣仁皂苷的镇静催眠作用[J]. 中药材,2002,25(6):429-430.

[4] 梁柱华,杨建设,杨艺虹,等. 酸枣仁中总黄酮的含量测定研究[J]. 分析测试技术与仪器,2008,14(1):34-37.

[5] 程小丽,张伟. 酸枣仁总皂苷的提取分离及含量测定[J]. 陕西中医,2012,33(5):607-609.

[6] 赵启铎,舒乐新. 酸枣仁总皂苷的含量测定[J]. 天津中医药大学学报,2013,32(4):229-231.

[7] 张明春,解军波,张巾英,等. 复合酶法提取酸枣仁皂苷的工艺条件优化[J]. 上海中医药杂志,2008,42(9):76-78.

[8] 武传芹,陈冠华,郭东山,等. 超声回流法提取酸枣仁皂苷 A 和 B 工艺[J]. 江苏农业科学,2012,40(9):253-255.

[9] 丁轲,茅琪婧,卢文静,等. 酸枣仁皂苷 A、B 提取纯化工艺的研究[J]. 中国食品学报,2010,10(3):40-46.

[10] 叶振梅. 响应面优化酸枣仁皂苷提取工艺研究[J]. 食品工业,2013,34(10):87-89.

[11] 路丹,王菲,李清,等. 酸枣仁皂苷提取物的制备与酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(7):535-539.

[12] 闫艳,杜晨晖,李小菊,等. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(1):30-33.

[13] 杜丽峰,梁宗锁. 不同产地酸枣仁皂苷含量的测定[J]. 陕西中医学院学报,2006,29(5):65-66.

[责任编辑 刘德文]