

# 三叶木通中常春藤皂苷的提取工艺

成晓霞, 孙蓉蓉, 欧阳浩楠, 肖娅萍<sup>2\*</sup>

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西西安 710062; 2. 教育部药用植物资源与天然药物重点实验室, 陕西西安 710062)

**摘要** [目的] 确定三叶木通中常春藤皂苷的最佳提取工艺条件。[方法] 比较了超声提取、索氏提取、沸水回流提取和常温浸提法时常春藤皂苷的得率, 优选出超声提取方法, 接着采用正交设计 $L_9(3^4)$ 方法, 考察甲醇浓度、甲醇体积、超声时间、提取次数及酸解条件时的盐酸体积、水解时间、水解温度等因素对提取率的影响, 采用HPLC法测定含量。[结果] 所考察的因素对三叶木通中常春藤皂苷提取的影响程度的顺序为提取时间(C) > 甲醇浓度(A) > 甲醇体积(B) > 提取次数(D), 水解时间对常春藤皂苷元得率影响明显。[结论] 三叶木通中常春藤皂苷的最佳提取工艺为: 70% 甲醇溶液80 min 超声提取90 min, 水饱和正丁醇萃取3次, 36% 盐酸4 h, 70℃ 水浴回流水解4 h, 氯仿萃取2次, 合并氯仿层, 旋转蒸干后甲醇溶解定容。

**关键词** 三叶木通; 常春藤皂苷; 正交设计

中图分类号 S567.1<sup>+</sup>5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06792-03

## Extraction Process of Saponins PD in *Akebia trifoliata*

CHENG Xiao-xia et al (Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xian, Shaanxi 710062)

**Abstract** [Objective] The extraction condition of saponins PD in *Akebia trifoliata* was studied. [Method] Ultrasonic extraction, Soxhlet extraction, heat reflux extraction and water extraction techniques were respectively used for extraction of saponins PD. According to the orthogonal design  $L_9(3^4)$ , the optimal ultrasonic extraction was sought through experimental investigation. The contents of saponins were determined by HPLC. [Result] The order of factors to affect the saponins PD was ultrasonic action duration (C) > methanol concentration (A) > methanol volume (B) > extraction number of times (D). And hydrolysis time had an important influence on the extraction of saponins PD. [Conclusion] The optimal conditions for extraction of saponins PD from *Akebia trifoliata* were as follows: 80 min of 70% ethanol, 90 min action duration, then extracted by n-butyl alcohol for 3 times, hydrolyzed with 36% hydrochloric acid for 4 h at 70℃, and extracted by chloroform.

**Key words** *Akebia trifoliata*; Saponins PD; Orthogonal design

三叶木通 [*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.] 为木通科木通属缠绕藤本植物, 其干燥藤茎可作木通入药, 味微辛性寒, 具有清热利尿、通经活络、镇痛、通乳的功效<sup>[1-2]</sup>。对三叶木通化学成分的研究国内外已有很多报道<sup>[3-5]</sup>。三叶木通的主要成分是以齐墩果酸和常春藤皂苷元为主的三萜和三萜皂苷。临床药理活性证明, 齐墩果酸和常春藤皂苷都具有利尿抗水肿、抗菌消炎、抑制肿瘤细胞生长、保肝、降酶、提高机体免疫力的作用<sup>[6-9]</sup>。笔者首次以常春藤皂苷元为考察指标, 采用高效液相色谱法测定其含量, 对三叶木通的有效成分提取工艺进行了研究, 旨在为三叶木通中有效成分的开发提供新的思路。

## 1 材料与方法

试验仪器有日本岛津 LC-2010 型高效液相色谱仪, LC-solution 色谱数据工作站, 万分之一电子天平(塞多利斯科学仪器北京有限公司), KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), HH-6B 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。常春藤皂苷元标准品购自中国药品生物制品检定所, 批号 111733-200502。供试三叶木通于 2006 年 8 月采自陕西镇安, 并经陕西师范大学田先华教授鉴定为 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.。水为超纯水, 甲醇、乙腈、冰醋酸、三乙胺为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 结果与分析

**2.1 样品的提取** 对三叶木通中常春藤皂苷的提取方法采用超声提取、索氏提取、沸水回流提取和常温浸提法<sup>[10-13]</sup>。

参照对比结果(表1), 采用正交试验法对三叶木通的提取条件进行优选, 利用正交表 $L_9(3^4)$ 进行设计, 首先考察超声提取条件, 正交试验以甲醇体积分数(A)、甲醇体积(B)、超声提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素; 然后, 考察水解条件, 正交试验以盐酸体积、回流水解的时间、回流水解的温度为考察因素。以常春藤皂苷元的含量作为考察指标, 见表2、3。

表1 不同提取法对比试验结果

Table 1 Comparison of different extraction methods

提取方法 Extraction method	提取条件 Extraction process	常春藤皂苷元含量 Content ofhederagerin %
超声提取法 Ultrasonic extraction	70% 甲醇80 min, 功率300 W, 超声提取90 min	0.261
索氏提取法 Soxhlet extraction	70% 甲醇80 min, 置索氏提取器中, 90 min 提取12 h	0.139
沸水回流法 Boiled water refluxing	70% 甲醇80 min, 置恒温水浴锅中, 100℃ 提取4 h	0.155
常温浸提法 Room temperature extraction	70% 甲醇80 min, 常温条件下浸提2次, 每次12 h	0.156

表2 超声提取因素水平

Table 2 Levels and factors of ultrasonic extraction

水平 Level	甲醇浓度 Methyl alcohol concentration A %	甲醇体积 Methyl alcohol volume B ml	提取时间 Extraction time C min	提取次数 Extraction frequency D
1	50	50	30	1
2	70	80	60	2
3	100	100	90	3

## 2.2 常春藤皂苷元的测定

**2.2.1 色谱条件。**日本岛津 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150.0 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为按照水、冰醋酸、三乙胺 1.00 0.04 0.02) 配制成的缓冲溶液, 流动相 B 为乙腈梯

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI06A13-06)。

作者简介 成晓霞(1982-), 女, 新疆吐鲁番人, 硕士研究生, 研究方向: 中药材成分提取、分离、分析。\* 通讯作者。

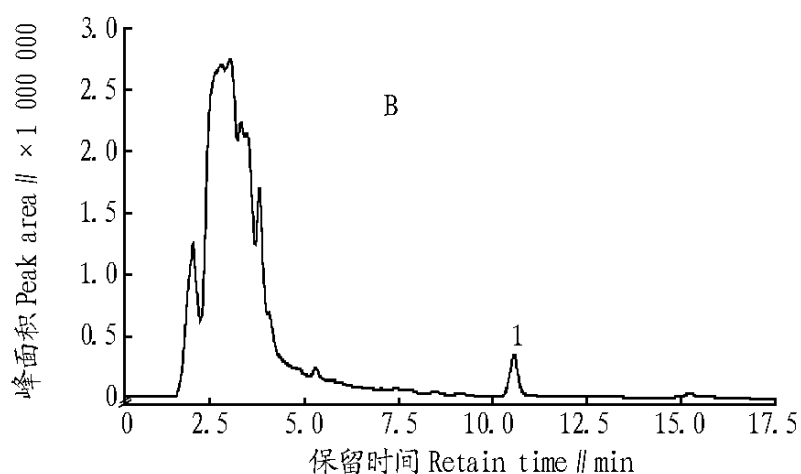
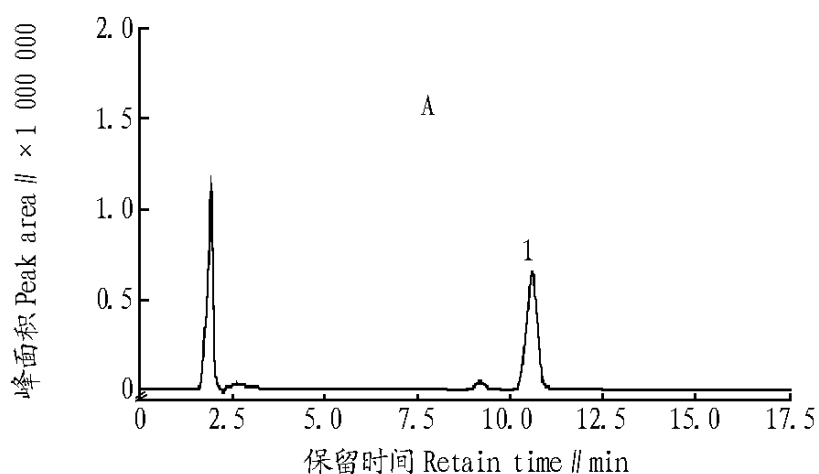
收稿日期 2008-04-07

度洗脱,即采用起始浓度为60%乙腈进行洗脱,10 min后乙腈浓度增加至70%,再经过10 min乙腈浓度变为76%;检测波长210 nm;流速0.8 ml/min;柱温25℃。

表3 盐酸水解因素水平

Table 3 Levels and factors of hydrochloric acid hydrolysis

水平 Level	盐酸体积 Hydrochloric acid volume A ml	水解时间 Hydrolysis time B min	水解温度 Hydrolysis temperature C
1	1	2	70
2	2	4	80
3	4	6	90



注:A为对照品;B为样品;1为常春藤皂苷元。

Nte: A, control; B, sample; 1, hederagerin.

图1 三叶木通 HPLC

Fig. 1 HPLC figure of *A. trifoliata*

**2.2.5 线性关系考察。**分别精密吸取常春藤皂苷元对照品溶液2.5、10、15、20、25 μl,按照上述色谱条件连续进样,测定峰面积,以常春藤皂苷元对照品溶液的进样量 X (ng) 为横坐标,色谱峰峰面积值 Y 为纵坐标,回归方程为:  $Y = 1.037 \times 10^9 X + 2.151 \times 10^5$ ,  $r = 0.9998$ ,线性范围为0.98 ~ 12.25 μg。

**2.2.6 精密度试验。**精密吸取对照品溶液20 μl,连续进样5次,测得常春藤皂苷元的峰面积积分值,计算 RSD 值为2.2%,小于3.0%,表明精密度良好。

**2.2.7 稳定性试验。**精密吸取供试品溶液20 μl,分别在距定容时间2、4、8、24、32、48、72 h 进样,测得常春藤皂苷元的峰面积积分值,计算 RSD 值为2.7%,小于3.0%,说明常春藤皂苷元在72 h 内稳定。

**2.2.8 重复性试验。**精密称取三叶木通藤茎粉末5份,用上述方法制备样品溶液,再分别精密吸取20 μl,进样,测定常春藤皂苷元的含量。RSD 值为1.2%,小于3.0%,说明该方法重复性良好。

**2.2.9 加样回收率试验。**取已知常春藤皂苷元含量的同一样品,分别加入常春藤皂苷元对照品适量,依法测定,重复3次,结果常春藤皂苷元的平均回收率为99.2%,RSD 值为2.3%,表明该方法回收率较好,方法可行。

**2.3 样品含量测定** 色谱条件及对照品、供试品溶液制备同“2.2”。

**2.4 正交试验及结果** 按  $L_9(3^4)$  正交试验设计表对三叶木通进行超声提取,并且测定含量,平行测定3组。由表4.5可知,采用超声法对三叶木通中常春藤皂苷提取率的影响依次为  $C > A > B > D$ ;对水解条件进行的正交试验结果显示,水解

**2.2.2 系统适用性试验。**分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液20 μl 注入色谱仪,理论塔板数以常春藤皂苷元峰计算不低于1万,常春藤皂苷元的保留时间为10.5 min,阴性样品在相应的位置无干扰,见图1。

**2.2.3 对照品溶液配制。**精密称取常春藤皂苷元对照品4.9 ng,甲醇定容于10 ml 容量瓶,配成0.490 ng/ml 对照品溶液。

**2.2.4 供试品溶液的制备。**按照正交试验方法对三叶木通藤茎粉末进行提取,水解完毕后,向水解液中加入10 ml 水,用氯仿萃取2次,每次20 ml,冷却后分液,合并氯仿层,减压回收至干,用甲醇溶解,定容于10 ml 容量瓶中。精密吸取一定量,以0.45 μm 滤膜过滤,弃去初滤液,留续滤液备用。

时间对结果的影响最为显著,筛选出的最佳工艺为超声提取条件  $A_2B_2C_3D_1$ ,酸解条件为  $A_3B_2C_1$ 。

表4 超声提取正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results of ultrasonic extraction

试验号 Test order	A	B	C	D	常春藤皂苷元平均含量 Content of hederagerin %
1	1	1	1	1	0.141 2
2	1	2	2	2	0.142 2
3	1	3	3	3	0.217 5
4	2	1	2	3	0.177 0
5	2	2	3	1	0.273 3
6	2	3	1	2	0.192 2
7	3	1	3	2	0.174 1
8	3	2	1	3	0.130 8
9	3	3	2	1	0.125 4
$X_1$	0.167 0	0.164 1	0.154 7	0.180 0	
$X_2$	0.214 2	0.182 1	0.148 2	0.169 5	
$X_3$	0.143 4	0.178 4	0.221 6	0.175 1	
R	0.070 8	0.018 0	0.073 4	0.010 5	

### 3 讨论

(1) 提取方法的选择。该试验比较了超声提取、索氏提取、沸水回流提取和常温浸提法,结果显示采用超声提取法对三叶木通进行提取,常春藤皂苷的得率最大。超声提取是通过声空化过程中空化泡崩溃瞬间释放出来的能量产生的力量,使物质中的细胞壁破裂,有利于细胞中有机成分很快溶于溶剂,加速化学成分的提取,具有安全可靠、方便快捷、耗能少、提取率高等特点。

(2) 提取条件的确定。该试验对三叶木通的提取条件采用正交设计,优化筛选出最佳工艺。精密称取三叶木通藤茎粉末2.0 g,用70% 甲醇溶液80 ml 超声提取90 min,过滤并旋转蒸干,加入10 ml 水溶解,用水饱和正丁醇萃取3次,每次20 ml,合并正丁醇萃取液旋转蒸干,加入20 ml 甲醇、4 ml 36% 盐酸,70℃ 水浴回流水解4 h,加10 ml 水,用 $\text{CHCl}_3$  萃取2次,每次20 ml,合并氯仿层,旋转蒸干后甲醇溶解,定容于10 ml 容量瓶中。其中,甲醇溶液的浓度、提取时间及酸解时间对常春藤皂苷元的得率影响最大,说明常春藤皂苷在稀醇溶液中溶解度较大,酸解时间过长会抑制其解离。

表5 盐酸水解正交试验结果

Table 5 Orthogonal test results of hydrochloric acid hydrolysis

试验号 Test order	A	B	C	常春藤皂苷元平均含量 Content of hedraegerin %
1	1	1	1	0.158 1
2	1	2	2	0.182 2
3	1	3	3	0.189 0
4	2	1	2	0.166 8
5	2	2	3	0.185 3
6	2	3	1	0.188 6
7	3	1	3	0.155 7
8	3	2	1	0.203 1
9	3	3	2	0.184 1
$X_1$	0.176 4	0.160 2	0.183 3	
$X_2$	0.180 2	0.190 2	0.177 7	
$X_3$	0.181 0	0.187 2	0.176 7	
R	0.004 6	0.030 0	0.006 6	

(3) 色谱条件的确定。对常春藤皂苷元的紫外吸收进行全波长扫描,结果显示常春藤皂苷元的特征  $\lambda_{\text{max}}$  为199.8 nm。为了降低干扰、提高信噪比,确定选用210 nm 作为检测波长。

(上接第6748页)

**2.4.3 影响加拿大红叶紫荆嫁接成活的环境因素分析。**其一,用加拿大紫荆做砧木,其亲和力强,接口愈合快,嫁接苗生长健壮,而用中国紫荆嫁接成活率极低。其二,由于红叶紫荆韧皮部薄,枝条水分少,使嫁接成活率提高极为困难(从上海、南京的信息中得知成活率一般都在40%~50%)。其三,合肥每年在4月20日前后都有干热季风,致使刚刚发芽的红叶紫荆初接苗供水不及时而死亡。其四,秋季嫁接,雨水过多会烂芽,秋旱也会使成活率降低。

**2.4.4 提高成活率的途径。**选择优质接穗;选择可以挡住干热风的小气候圃地;选择合理的种植密度;秋旱时适当灌溉。

**2.5 加拿大红叶紫荆的整形修剪及其在景观中的应用**由于红叶紫荆的萌芽率很高,因此耐修剪,可以修整成各类树形。是用作绿篱,把干高定在1.5~2.0 m,修成纺锤形树形,数株栽植后形成篱墙(图7)。与大乔木配植,形成组团小乔木或散落式小乔木,将其修剪成单干或多干的自然圆头形树冠。列植于道路两旁,可作为多排列植物的前排,增强感观,将其树干培养到1.5~2.0 m,树成自然

对于流动相的选择,比较了不同比例的甲醇和乙腈,发现采用乙腈作为流动相的分离效果较好。考虑到溶液中杂质与被检测物质极性相似,为了提高检测效率,该试验采用梯度洗脱方法,确定流动相A为水、冰醋酸、三乙胺(1.00 0.04 0.02)配制成的缓冲溶液,B为乙腈,梯度洗脱。在该条件下分离得到的常春藤皂苷元的保留时间为10.5 min,且峰形最好,与其他杂质的分离效果最佳;在流动相中添加适量的冰醋酸和三乙胺,可以改善峰形并减少拖尾,有利于常春藤皂苷元的分离。

#### 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: 化学工业出版社, 2005: 25.
- [2] 中华本草编委会. 中华本草 第3册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 330-335.
- [3] MIMAKI Y, KUROD M, YOKOSUKA A, et al. Triterpenes and triterpene saponins from the stems of *Akebia trifoliata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(8): 960-965.
- [4] MIHARA F, HIDEI I, YOSHIMIZO K, et al. The study on the constituents of *Akebia* spp. . On the saponins isolated from the stem of *Akebia quinata* Decr [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1974, 94(2): 194-198.
- [5] 王晔, 鲁静, 林瑞超. 三叶木通藤茎的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(5): 495-498.
- [6] 刘桂艳, 王晔, 马双成, 等. 木通属植物木通化学成分及药理活性研究概况 [J]. *中国药学杂志*, 2004, 39(5): 330-332.
- [7] 田丽婷, 马龙, 堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况 [J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(12): 884.
- [8] 王立新, 韩广轩, 刘文庸, 等. 齐墩果酸的化学及药理研究 [J]. *药学实践杂志*, 2001, 19(2): 104.
- [9] 孙燕. 齐墩果酸的促进免疫作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 1988(1): 26.
- [10] 王海荣, 吕本莲. 正交试验法研究决明子提取工艺 [J]. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(2): 141-142.
- [11] 刘卫国, 杨文钰, 肖启银. 三叶木通齐墩果酸的超声提取工艺研究 [J]. *中药材*, 2005, 28(2): 140-141.
- [12] SWAMY S. 家黑种草种子中-常春藤皂苷的提取、分离和抗肿瘤特性 [J]. *Harta Med*, 2001, 67(1): 29-32.
- [13] 王家明, 高慧敏, 王智民, 等. 预知子中-常春藤皂苷的 HPLC 分析 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(16): 1212-1214.

圆头形。片植作为灌木色块,培养成多干低干圆头形,数株组团就可以形成色块中较高的一组。

#### 3 结论与讨论

加拿大红叶紫荆在该试验区,具有生长健壮、成形快、花期早、红叶期长、耐修剪、移栽成活率高等特点,是气候相似地区值得推广的一种彩叶小乔木或大灌木。

加拿大红叶紫荆推广应用的关键是提高繁殖成活率。试验结果表明:选择避风地块,确定合理的砧木密度,选择合适的嫁接时期是影响成活率的重要因素。加拿大红叶紫荆宜选用加拿大紫荆做砧木,用中国紫荆做砧木亲和力不好,成活率极低。加拿大红叶紫荆可在景观中列植、组团栽植、与大乔木组成混合林带、篱墙栽植,要根据不同的用途,采用不同的整形修剪手法。关于加拿大红叶紫荆的结实性状有待于进一步研究观察。

#### 参考文献

- [1] 张春英, 陈淑筠. 加拿大紫荆容器育苗研究 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(32): 10285-10286.
- [2] 郭洪启. 加拿大红叶紫荆引种繁育试验 [J]. *山东林业科技*, 2005(4): 21-22.