

百合皂苷的提取工艺与抗抑郁作用研究

王 瑛*(哈尔滨医科大学附属第四医院静脉药物调配中心, 哈尔滨 150001)

中图分类号 R285;R749 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0602-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.09

摘要 目的:研究百合皂苷的提取工艺与抗抑郁作用。方法:以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间为考察因素,以百合皂苷提取率为指标,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优选百合皂苷提取工艺。将小鼠分为正常对照(等容生理盐水)组、氟西汀(0.004 g/kg)组与百合皂苷高、中、低剂量(0.100、0.050、0.025 g/kg)组。悬尾实验和强迫游泳实验均记录小鼠4 min内不动时间;拮抗利血平降低小鼠体温实验中记录复制模型4 h后小鼠体温。结果:百合皂苷最佳提取工艺为加入1倍量的70%乙醇,提取3 h。与正常对照组比较,百合皂苷提取物高、中剂量组小鼠4 min内悬尾不动时间、游泳不动时间均缩短,差异均有统计学意义($P<0.05$);复制模型4 h后小鼠体温变化减小,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:百合皂苷具有一定的抗抑郁作用。

关键词 百合皂苷;提取工艺;抗抑郁作用

Extraction Technology and Anti-depression Activity of Saponins from *Lilium brownii*

WANG Ying(PIVAS, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study extraction technology of saponins from *Lilium brownii* and the anti-depressant activity of the saponins. METHODS: The extraction technology of saponins from *L. brownii* was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal design with the volume fraction of ethanol, the amount of ethanol, extraction time as factors, using saponins extract rate as index. Kunming mice were divided into normal control group (constant volume of normal saline), fluoxetine group (0.004 g/kg) and *L. brownii* saponins extract high-dose, medium-dose and low-dose groups (0.1, 0.05, 0.025 g/kg). The duration of immobility within 4 min were recorded in tail suspended experiment and forced swimming experiment. Body temperature of mice were recorded within 4 h after modeling in reserpine-induced hypothermia test. RESULTS: The optimal extraction technology of *L. brownii* saponins was as follows: 1 time of 70% ethanol, lasting for 3 h. Compared with normal control group, the duration of immobility within 4h in tail suspended experiment and force swimming experiment were decreased in *L. brownii* saponins extract medium-dose and low-dose groups; there was statistical significance ($P<0.05$); the gap of body temperature of mice was decreased 4 h after modeling; there was statistical significance ($P<0.05$). CONCLUSIONS: *L. brownii* saponins have certain anti-depressant activity in mice.

KEYWORDS *Lilium brownii* saponins; Extraction technology; Anti-depression effect

百合为百合科植物卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb.)、百合(*L. brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker.)和细叶百合(*L. pumilum* DC.)的干燥肉质鳞叶^[1]。主产于湖南、浙江、江苏、陕西、四川、安徽、河南等省,以湖南所产质量最好,浙江产量最大。百合主要含有皂苷、氨基酸、多糖、磷脂等成分,具有养阴润肺、清心安神等功效,主治“百合病”,即现代医学的抑郁症^[2-4]。笔者拟采用正交试验优化百合皂苷的提取工艺,并通过小鼠悬尾、强迫游泳实验,对百合皂苷抗抑郁作用进行研究,为抗抑郁中药的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-2550型可见-紫外分光光度计(日本岛津公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(河南兄弟仪器设备有限公司);旋转蒸发器(上海一科仪器有限公司);电子天平(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司);MC-3型数字式温度体温计[欧姆龙(中国)有限公司]。

1.2 药材

百合由亳州市宏宇中药饮片有限公司提供,经笔者鉴定

* 主管药师,硕士。研究方向:中药注射液的临床效果。E-mail: wangying197502@163.com

为真品。

1.3 药品与试剂

薯蓣皂苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:1539-201002);盐酸氟西汀片(美国礼来制药有限公司,批号:H20060027,规格:20 mg/片);利血平注射液(广东邦民制药有限公司,批号:111220,规格:1 mg/ml)。

1.4 动物

清洁级KM种小鼠50只,♀♂兼半,体质量18~20 g,由黑龙江中医药大学药物临床前安全评价中心动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(黑)2008004]。

2 方法

2.1 百合皂苷的制备^[5-6]

取百合干燥鳞茎15 g,按试验安排,用不同体积分数的乙醇加热回流提取,并依次用乙醚、水饱和正丁醇萃取浸膏,蒸干萃取液,得到百合皂苷。

2.2 百合皂苷的含量测定^[5-7]

分别量取薯蓣皂苷对照品(质量浓度:0.1 mg/L)溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 ml,在535 nm波长处测定吸光度。以对照品取样量(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=6.548 1x+0.015 2$ ($r=0.998 1$)。结果表

明,薯蓣皂苷进样量在0.02~0.14 mg 范围内与吸光度呈良好线性关系。取提取的百合皂苷样品1 mg、5%香草醛-冰醋酸0.3 ml和高氯酸0.7 ml,混匀,水浴20 min(60 ℃),冷却后加入10 ml冰醋酸,混匀,避光放置30 min,在535 nm波长处测定吸光度,根据回归方程计算样品中百合皂苷的含量,并按下式计算百合皂苷提取率:百合皂苷提取率(%)=样品皂苷含量/百合药材质量×100%。

2.3 正交试验优选百合皂苷提取工艺

以乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)和提取时间(C)为考察因素,以百合皂苷提取率为评价指标,采用 $L_9(3^3)$ 正交表优选工艺。

2.4 抗抑郁实验

2.4.1 分组与给药 实验均随机分为5组,即正常对照(等容生理盐水)组、氟西汀(0.004 g/kg)组与百合皂苷高、中、低剂量(0.100、0.050、0.025 g/kg)组。ig给药,每天1次,连续7 d。

2.4.2 悬尾实验^[8-9] 末次给药1 h后先将小鼠悬于铁架台,将小鼠尾部用胶布粘住,距离桌面15 cm,先预适应2 min,然后记录4 min内不动时间。

2.4.3 强迫游泳实验^[8-9] 小鼠末次给药1 h后先训练游泳5 min,1 d后将小鼠放入水深10 cm、直径20 cm的玻璃缸内,水温保持在25 ℃,先预适应2 min,然后记录小鼠4 min内不动时间。

2.5 拮抗利血平降低小鼠体温实验^[10]

分组与给药同“2.4.1”项下方法。将体温计探头轻插入小鼠肛门内1~2 cm,当温度显示稳定后读数,为基础体温。然后ig给药,1 h后ip利血平2.5 mg/kg,4 h后测定体温,以体温降低值($\Delta T = T_{\text{基础}} - T$)作为指标,进行统计学分析。

2.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0统计软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 正交试验结果

根据极差分析、方差分析结果,影响百合皂苷提取的各因素大小顺序为 $B > C > A$,最佳提取工艺为 $A_2B_3C_3$,即加入1倍量的70%乙醇,提取3 h。因素与水平见表1;正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A, %	B	C, h
1	60	3	1
2	70	2	2
3	80	1	3

3.2 工艺验证试验

取3批百合药材,各20 g,按最佳工艺条件进行提取,并测定百合皂苷提取率。结果显示,百合皂苷平均提取率为1.57%,与正交试验最高值相当,表明所选工艺合理、可行。工

艺验证试验结果见表4。

表2 正交试验结果

Tab 2 Result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(误差)	百合皂苷提取率, %
1	1	1	1	1	0.54
2	1	2	2	2	1.07
3	1	3	3	3	1.57
4	2	1	2	3	0.93
5	2	2	3	1	1.46
6	2	3	1	2	1.09
7	3	1	3	2	0.72
8	3	2	1	3	0.54
9	3	3	2	1	1.34
K_1	3.18	2.19	2.17	3.34	
K_2	3.48	3.08	3.34	2.88	
K_3	3.00	4.00	3.85	3.08	
k_1	1.06	0.73	0.72	1.11	
k_2	1.16	1.03	1.11	0.96	
k_3	1.00	1.33	1.28	1.03	
R	0.16	0.60	0.56	0.15	

表3 方差分析结果

Tab 3 Result of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.031	2	0.016	0.137	>0.05
B	0.757	2	0.379	3.329	>0.05
C	0.059	2	0.03	0.261	>0.05
D(误差)	0.056	2	0.046	0.356	>0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

表4 工艺验证试验结果

Tab 4 Result of verification test

批次	百合皂苷提取率, %	\bar{x} , %
1	1.56	
2	1.60	1.57
3	1.55	

3.3 百合皂苷对小鼠悬尾不动时间的影响

与正常对照组比较,百合皂苷高、中剂量组小鼠不动时间缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$)。百合皂苷对小鼠悬尾不动时间的影响见表5。

表5 百合皂苷对小鼠悬尾不动时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 5 Influence of *L. brownii* saponins immobility time on mice tail suspension test($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, g/kg	4 min内累计不动时间, s
正常对照组		103.60 ± 7.50
百合皂苷高剂量组	0.100	67.86 ± 5.58*
百合皂苷中剂量组	0.050	77.30 ± 10.14*
百合皂苷低剂量组	0.025	87.33 ± 8.40
氟西汀组	0.004	52.33 ± 8.70*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$

3.4 百合皂苷对小鼠强迫游泳不动时间的影响

与正常对照组比较,百合皂苷高、中剂量组小鼠强迫游泳不动时间缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$)。百合皂苷对小鼠强迫游泳不动时间的影响见表6。

表6 百合皂苷对小鼠强迫游泳不动时间的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 Influence of *L. brownii* saponins immobility time on forced swimming test on mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	4 min内累计不动时间,s
正常对照组	-	100.60±7.50
百合皂苷高剂量组	0.100	66.86±11.58*
百合皂苷中剂量组	0.050	75.30±10.14*
百合皂苷低剂量组	0.025	80.33±8.40
氟西汀组	0.004	52.33±9.40**

与正常对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

vs. normal control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.5 百合皂苷对利血平诱发小鼠体温变化的影响

ip 利血平 1 h 后, 各组小鼠体温下降不明显; ip 利血平 4 h 后, 与正常对照组比较, 百合皂苷高、中剂量组小鼠体温变化减小, 差异有统计学意义($P<0.05$)。百合皂苷对利血平诱发的小鼠体温变化的影响见表7。

表7 百合皂苷对利血平诱发的小鼠体温变化的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 7 Influence of *L. brownii* saponins on mice body temperature induced by reserpine($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	体温变化值,℃	
		1 h	4 h
正常对照组	-	0.14±0.21	4.52±0.11
百合皂苷高剂量组	0.100	-0.11±0.07	3.12±0.31*
百合皂苷中剂量组	0.050	0.02±0.14	3.50±0.21*
百合皂苷低剂量组	0.025	-0.33±0.24	4.14±0.41
氟西汀组	0.004	-0.13±0.20	3.34±0.51*

与正常对照组比较: * $P<0.05$

vs. normal control group: * $P<0.05$

4 讨论

有研究发现, 百合的活性成分为皂苷类化合物, 主要为甾体类皂苷, 其种类繁多, 主要是以异螺甾烷型形式存在^[1]。但是在研究中也发现, 各种成分存在大量的同分异构体, 这对进一步分离百合皂苷增加了难度, 因此有必要建立有效的、全面的分析百合中各种甾体皂苷类成分的方法。

百合皂苷具有抗抑郁、抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌作用以及对肠轴的调节作用^[11-13]。郭秋平等^[14-15]研究发现, 百合皂苷能使大鼠抑郁模型脑内多巴胺、5-羟色胺的含量增高, 改善单胺类神经递质功能障碍, 并能使血液皮质醇、促肾上腺皮质激素的含量降低以及下丘脑促皮质素释放因子的表达减少, 同时还能使海马糖皮质激素受体(GR)mRNA 的表达增加, 从而使抑郁模型大鼠亢进的下丘脑垂体肾上腺轴受到抑制。但是, 目前的研究多以百合总皂苷为药效物质基础, 涉及皂苷单体成分的很少, 因此有必要进一步对百合单体皂苷的药效基础进行深入研究。

小鼠悬尾和强迫游泳实验是2个经典的行为绝望模型, 可

模拟人类的抑郁状态。实验表明0.100、0.050 g/kg 百合皂苷可缩短小鼠悬尾不动时间与强迫游泳不动时间, 减小小鼠体温变化, 具有一定的抗抑郁作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 123.
- [2] Mimaki Y, Sashida Y. Steroidal saponins and alkaloids from the bulbs of *Lilium brownii* var. *colchesteri*[J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(11): 197.
- [3] Mimaki Y, Nakaura O, Sashida Y. Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium longiflorum* and their antitumor-promoter activity[J]. *Phytochemistry*, 1994, 31(1): 221.
- [4] Satou T, Mimaki Y, Kuroda M. A pyrrolidine glucoside ester and steroidal saponins from *Lilium martagon*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(4): 225.
- [5] 傅春燕, 刘永辉, 李明娟, 等. 百合总皂苷提取工艺及抗抑郁活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(1): 682.
- [6] 陈吉生, 黄雪莹. 正交试验优选荔枝核总皂苷提取工艺[J]. 中国药房, 2009, 20(27): 2 107.
- [7] 傅春燕, 刘永辉, 李明娟, 等. 紫外-可见分光光度法测定不同产地龙牙百合中皂苷含量[J]. 广东微量元素科学, 2011, 5(18): 55.
- [8] 陈湘, 窦建卫, 胡亚丽. 抑郁症动物模型的应用及研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 28(12): 5 521.
- [9] 刘军莲, 李勇枝, 高建议, 等. 中医药抗抑郁研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(6): 931.
- [10] 任利妍, 乔卫, 刘婧姝, 等. 酸枣仁合欢方抗抑郁有效部位的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 602.
- [11] 段秀君, 马宏伟. 百合有效部位的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 56.
- [12] 周中流, 石任兵, 刘斌, 等. 卷丹乙醇提取物及其不同极性部位抗氧化活性的比较研究[J]. 食品科学, 2011, 23(9): 55.
- [13] 何纯莲, 陈腊生, 任凤莲, 等. 药用百合皂苷对羟自由基清除作用的研究[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2004, 1(1): 56.
- [14] 郭秋平, 李卫民. 百合的质量研究及抗抑郁作用探讨[D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [15] 郭秋平, 高英, 李卫民. 百合有效部位对抑郁症模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响[J]. 中成药, 2009, 31(11): 1 669.

(收稿日期: 2013-10-09 修回日期: 2013-11-20)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅