

水浴回流与超声波辅助回流提取百合皂苷工艺比较研究

何郁菲¹, 曾斌¹, 向阳¹, 蔡翔¹, 李恒彪¹, 傅冬和^{1,2*}

¹湖南农业大学园艺园林学院; ²国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 长沙 410128

摘要: 分别采用单因素试验法和正交试验法对水浴和超声波辅助回流提取法对百合总皂苷的提取工艺进行比较, 获得最佳水浴回流提取工艺为: 乙醇浓度为 50%、温度为 90 °C、提取时间为 3 h、固液比为 1:18。在该工艺条件下百合皂苷的提取率为 1.98%; 超声波辅助回流提取最佳工艺为: 温度为 90 °C、乙醇浓度为 70%、提取时间为 25 min、固液比为 1:30、提取功率为 105 W。在该工艺条件下百合皂苷的提取率为 2.33%, 超声波辅助回流提取法的百合皂苷提取率和稳定性、重复性都优于传统的水浴回流提取法。

关键词: 百合; 皂苷; 回流提取; 超声辅助提取; 提取工艺

中图分类号: O629.13; Q946.91

文献标识码: A

Comparison of Water Bath Reflux Extraction and Ultrasonic-assisted Reflux Extraction of Saponins from *Lilium brownii*

HE Yu-fei¹, ZENG Bin¹, XIANG Yang¹, CAI Xiang¹, LI Heng-biao¹, FU Dong-he^{1,2*}

¹College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University; ²National Research Center of Engineering & Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Natural Products, Hunan Changsha 410128, China

Abstract: In this study, single factor and orthogonal tests were carried out for the optimization of water bath reflux extraction and ultrasonic-assisted reflux extraction of saponins from *Lilium brownii* separately. The optimal water bath reflux extraction conditions were: 50% ethanol as extraction solvent, 90 °C as extraction temperature, 3 h as extraction time and 1:18 as solid-liquid ratio. Under these conditions, the extraction yield of saponins from *L. brownii* was 1.98%. The optimal ultrasonic-assisted reflux extraction conditions were: 70% ethanol as extraction solvent, 90 °C as extraction temperature, 25 min as extraction time, 1:30 as solid-liquid ratio and 105 W as ultrasonic power. Under these conditions, the extraction yield of saponins from *L. brownii* was 2.33%. Compared with traditional water bath reflux extraction method, the stability, repeatability as well as the extraction yield of ultrasonic-assisted reflux extraction was better.

Key words: *Lilium brownii*; saponins; reflux extraction; ultrasonic-assisted reflux extraction; extraction process

百合 (*Lilium brownii* var. *viridulum*) 为百合科百合属常见的药食同源植物之一, 据医药典籍《本草纲目》记载, 百合味甘、微苦、性平, 具有补益心肺、固肾、补脑、清心、安神、镇静、清润肺燥等多种功效, 可用于治疗阴虚久咳、虚烦、失眠等症, 主要含有酚酸甘油酯、皂苷类、生物碱及多糖等生物活性成分, 其中皂苷主要为甾体皂苷^[1,2]。

随着现代分离技术的进步, 提纯和分离高浓度的百合皂苷已成现实^[3,4], 但是要大规模生产高浓度的百合皂苷仍然需要较高的成本, 而且使用有毒或危险试剂, 如三氯甲烷及甲苯等, 对环境和人员极

其不利。目前, 关于百合皂苷提取方法的研究, 主要采用了最传统的回流提取法^[5-9], 该方法的溶剂用量大、提取时间长、不易操作, 在工业生产中成本太高, 无法实现百合皂苷的大规模生产。本试验基于解决此问题开展研究, 以期探索一条更优的百合皂苷提取方法。在传统的回流提取法的基础上, 采用超声波对百合皂苷进行辅助提取, 由此得到更优的提取方法与最佳提取工艺参数, 为大规模生产提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

百合干片(由湖南龙山县现代中药材开发有限责任公司提供), 薯蓣皂苷标准品(成都曼思特生物科技有限公司), 高氯酸, 乙醇, 甲醇, 以上试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2013-12-27 接受日期: 2014-03-18

基金项目: 科技部支撑计划项目(2011BAD10801); 湖南省教育厅重点项目(11A049)

* 通讯作者 Tel: 86-731-84673760; E-mail: fu7879@aliyun.com

1.2 仪器与设备

HH 数显恒温水浴锅(金坛市金城国胜实验仪器厂);SHZ-D(111)型循环水真空泵(天津华鑫仪器厂);R-1001 旋转蒸发器(郑州长城科工贸易有限公司);FA2104S 电子天平(上海精科天平);FY177 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);UV-2600 紫外/可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);KQ3200DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 样品前处理及提取液的制备

百合干片 60 °C 烘 3 h, 粉碎过 40 目筛备用。准确称取 5.0 g 百合粉于圆底烧瓶中, 在一定的乙醇浓度、温度及料液比等条件下, 分 2 次提取一定的时间, 取出过滤, 合并两次滤液, 即得百合皂苷提取液。

2.2 标准曲线的制作

准确称取 5.0 mg 薯蓣皂苷, 置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解, 定容, 摇匀, 即得到浓度为 0.1 mg/mL 的标准品溶液。参照参考文献^[9], 以吸光度为纵坐标, 皂苷浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

2.3 样品测定

移取 1.0 mL 百合皂苷提取液置于具塞试管内, 同标准曲线方法处理, 根据标准曲线计算百合皂苷浓度及提取率。

2.4 水浴回流提取工艺研究

2.4.1 水浴回流提取单因素试验

2.4.1.1 乙醇浓度单因素试验

称取 5 份百合干粉各 5.0 g, 乙醇浓度分别设定为 50%、60%、70%、80%、90%, 按料液比 1:18、水浴温度 70 °C、提取时间 1.5 h 的条件提取百合皂苷, 提取 2 次, 合并滤液, 以百合皂苷的提取率为指标考察乙醇浓度对提取率的影响。

2.4.1.2 提取时间单因素试验

称取 5 份百合干粉各 5.0 g, 提取时间分别设定为 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h, 其他处理同 2.4.1.1。

2.4.1.3 提取温度单因素试验

称取 4 份百合干粉各 5.0 g, 提取温度分别设定为 60、70、80、90 °C, 其他处理同 2.4.1.1。

2.4.1.4 提取固液比单因素试验

称取 4 份百合干粉各 5.0 g, 提取固液比分别设定为 1:12、1:15、1:18、1:21, 其他处理同 2.4.1.1。

2.4.2 正交试验

在水浴回流单因素试验的基础上, 选取乙醇浓度、提取温度、提取时间、固液比进行 4 因素 3 水平的正交试验, 根据 2.4.1 单因素试验结果设计 $L_9(3^4)$ 正交试验水平表如表 1 所示, 利用正交试验获得不同因素影响百合皂苷提取率的主次顺序以及最佳提取工艺参数组合。

表 1 $L_9(3^4)$ 水浴回流提取正交试验水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal design for water bath reflux extraction [$L_9(3^4)$]

水平 Levels	因素 Factors			
	A 乙醇浓度 Concentration of ethanol (%)	B 温度 Temperature(°C)	C 时间 Reflux time(h)	D 固液比 Solid/liquid ratio(g/mL)
1	50	70	1.0	1:15
2	60	80	2.0	1:18
3	70	90	3.0	1:21

2.4.3 最佳工艺验证性试验

对水浴回流提取试验最佳工艺进行三次验证性试验, 以考察其稳定性和重复性。

2.5 超声辅助回流提取工艺研究

2.5.1 超声辅助回流提取工艺单因素试验

2.5.1.1 提取温度单因素试验

分别称取 4 份百合干粉各 5.0 g 于圆底烧瓶中, 利用回流提取装置, 分别选取温度为 60、70、80、90 °C, 按固液比 1:18、70% 的乙醇、超声功率 90 W

提取 15 min, 分 2 次提取, 合并滤液, 以百合皂苷提取率为指标考察温度对提取率的影响。

2.5.1.2 乙醇浓度单因素试验

分别称取 4 份百合干粉各 5.0 g 于圆底烧瓶中, 分别选取浓度乙醇为 60%、70%、80%、90%, 其他处理同 2.5.1.1。

2.5.1.3 固液比单因素试验

分别称取 4 份百合干粉各 5.0 g 于圆底烧瓶中, 将固液比设定为 1:10、1:15、1:20、1:25, 其他处

理同 2.5.1.1。

2.5.1.4 提取时间单因素试验

分别称取 4 份百合干粉各 5.0 g 于圆底烧瓶中,提取时间设定为 15、25、35、45 min,其他处理同

2.5.1.1。

2.5.1.5 超声功率单因素试验

分别称取 4 份百合干粉各 5.0 g 于圆底烧瓶中,超声功率设定为 60、90、120、150 W,其他处理同

2.5.1.1。

2.5.2 正交试验

在超声辅助回流提取单因素试验的基础上,以提取温度、乙醇浓度、固液比、超声时间、超声功率进行 5 因素 4 水平的正交试验,根据 2.5.1 中单因素试验结果设计 $L_{16}(4^5)$ 正交试验水平表见表 2,利用正交试验获得不同因素影响百合皂苷提取率的主要顺序以及最佳提取工艺参数组合。

表 2 $L_{16}(4^5)$ 超声波辅助回流提取正交试验水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal design for ultrasonic-assisted reflux extraction [$L_{16}(4^5)$]

水平 Levels	因素 Factors				
	A 温度 Temperature(°C)	B 乙醇浓度 Concentration of ethanol(%)	C 固液比 Solid/liquid ratio(g/mL)	D 时间 Ultrasonic time(min)	E 提取功率 Ultrasonic power(W)
1	60	50	1:15	15	90
2	70	60	1:20	25	105
3	80	70	1:25	35	120
4	90	80	1:30	45	135

2.5.3 最佳工艺验证性试验

对超声波辅助回流提取试验最佳工艺进行 3 次验证性试验,以考察其稳定性和重复性。

2.6 水浴回流提取与超声辅助回流提取效果比较研究

根据水浴回流提取及超声辅助回流提取的正交试验及验证性试验结果,比较两种方法的优越性,确定最佳提取工艺。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的制作

按方法 2.2 绘制标准曲线方程为: $Y=0.0048X-0.1039$, $R^2=0.9990$,薯蓣皂苷在 40~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

3.2 水浴回流提取工艺研究

3.2.1 水浴回流提取单因素试验

按 2.4.1 进行水浴回流的乙醇浓度、提取时间、提取温度、固液比单因素试验,不同乙醇浓度对百合皂苷提取率的影响结果如图 1(A)。从图分析可知:在一定范围内百合皂苷的总提取率随着乙醇浓度的升高而升高,当乙醇浓度为 60% 时,百合皂苷提取率达到最高值,故选择 60% 的乙醇为最佳提取浓度。

不同提取时间对百合皂苷提取率的影响结果如图 1(B)。由图可见:当提取时间从 1.5 h 增加到 2.0 h 时,提取率上升十分明显,但提取时间由 2.0 h

提高到 2.5 h 后,提取率虽有增加,但上升趋势很平缓。因此考虑到提取效率,本试验选择 2.0 h 为最佳提取时间进行考察。

图 1(C) 显示了不同提取温度对百合皂苷提取率的影响。在一定范围内,随着温度的升高,百合总皂苷提取率呈现上升趋势,温度越高百合皂苷提取率的增加趋势逐渐减小,并且温度过高会破坏一些热敏性成分,同时杂质溶出量也随之增多。考虑的到成本问题,提取温度 80 $^{\circ}\text{C}$ 较为适宜。

不同固液比对百合皂苷提取率的影响结果如图 1(D)。由图分析可知:百合总皂苷提取率随着固液比的增加而增加,随着固液比的不断增加,提取率的增加幅度明显放缓,固液比由 1:18 增加到 1:21 时增加不明显,考虑到溶剂用量过多则成本较高,在实际生产和试验中应选择适宜的固液比,综合考虑,本试验选择 1:18 作为最佳固液比。

3.2.2 水浴回流提取正交试验结果

水浴回流提取正交试验结果如表 3 所示,方差分析见表 4。由于各因素对提取率的影响均不显著(见表 4),不必再进行各因素水平间的多重比较。因此,直接通过表 3 的极差结果分析可以看出,影响百合总皂苷提取率的因素顺序为: $C > D > A > B$,即提取时间 > 固液比 > 乙醇浓度 > 提取温度。最佳工艺组合为: $A_1 B_3 C_3 D_2$,即乙醇浓度为 50%,温度为 90 $^{\circ}\text{C}$,时间为 3.0 h,固液比为 1:18。

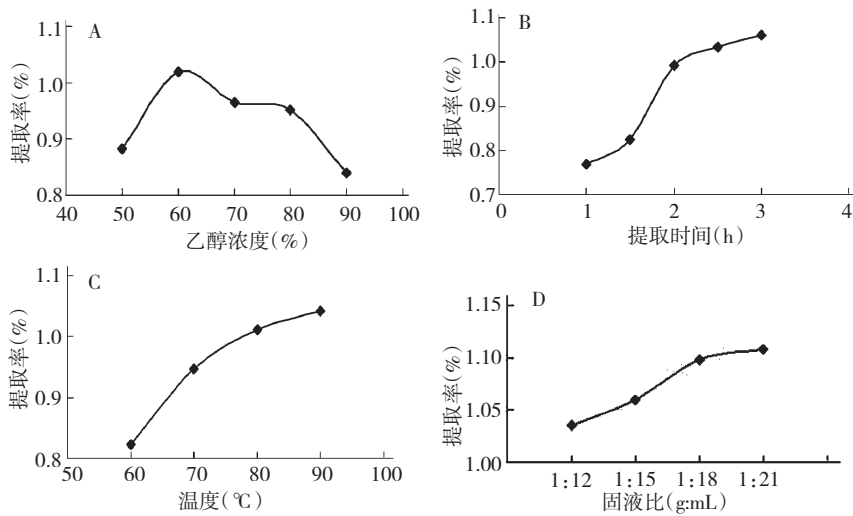


图1 水浴加热回流乙醇浓度(A)、提取时间(B)、提取温度(C)和固液比(D)对百合总皂苷得率的影响

Fig. 1 The effect of ethanol concentration (A), extraction time (B), extraction temperature (C) and solid-liquid ratio (D) on water bath reflux extraction yield of saponins from *L. Brownii*

表3 水浴回流提取正交实验结果

Table 3 Result analysis of orthogonal test of water bath reflux extraction

实验号 No.	A	B	C	D	皂苷提取率 Extraction yield (%)
1	50	70	1.0	1 : 15	1.46
2	50	80	2.0	1 : 18	1.88
3	50	90	3.0	1 : 21	1.96
4	60	70	2.0	1 : 21	1.63
5	60	80	3.0	1 : 15	1.75
6	60	90	1.0	1 : 18	1.62
7	70	70	3.0	1 : 18	1.84
8	70	80	1.0	1 : 21	1.49
9	70	90	2.0	1 : 15	1.63
K1	1.767	1.643	1.523	1.613	
K2	1.667	1.707	1.713	1.780	
K3	1.653	1.737	1.850	1.693	
R	0.114	0.094	0.327	0.167	

表4 水浴回流提取正交实验方差分析表

Table 4 Variance analysis of orthogonal design of water bath reflux extraction

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
A	0.023	2	0.012	0.383	4.460	不显著
B	0.014	2	0.007	0.233	4.460	不显著
C	0.161	2	0.081	2.683	4.460	不显著
D	0.042	2	0.021	0.700	4.460	不显著
误差	0.240	8				

3.2.3 最佳工艺验证性试验

根据3.2.2中得出最佳工艺条件提取,3次的提取率分别为2.05%、1.98%和1.92%,平均提取率为1.98%,且百合皂苷提取率均高于其他各正交试验值,说明正交试验结果可靠。验证性试验的相对偏差为RSD=3.281%,则说明该最佳工艺的稳定性 and 重复性良好。

3.3 超声波辅助回流提取工艺研究

3.3.1 超声波辅助回流提取单因素试验

按2.5.1方法,对超声波辅助回流提取的提取温度、乙醇浓度、固液比、超声时间、超声功率分别进行单因素试验。其中,不同提取温度对百合皂苷提取率的影响结果如图2(A)。从图分析可知:随着温度的升高,百合皂苷提取率逐渐上升,但当温度达到80℃以后,百合皂苷提取率随着温度的升高上升幅度不大。因此,选取80℃为最佳超声温度。

不同乙醇浓度对百合皂苷提取率的影响结果如图2(B)。由图分析可得:在一定范围内百合皂苷的提取率随着乙醇浓度的升高而升高,当乙醇浓度为

70%时,百合皂苷提取率达到最高,而继续增加乙醇浓度,百合皂苷总提取率反而明显下降,因此本试验选择70%的乙醇为最佳浓度。

图2(C)显示了不同固液比对百合皂苷提取率的影响。随着固液比的增大百合皂苷的提取率逐渐增加,当固液比大于1:25时,百合皂苷提取率虽然继续增加,但增加趋势明显放缓,并且溶剂量用量太大,综合考虑成本等问题,选择1:25为最佳固液比。

不同超声提取时间对百合皂苷提取率的影响结果如图2(D)。由图可得:随着超声时间的延长百合皂苷提取率显著增加,但在超声时间35 min之后百合皂苷提取率的增加幅度明显降低。因此,为获得较好的提取效率并考虑节约能源,确定最佳超声时间为35 min。

不同超声功率对百合皂苷提取率的影响结果如图2(E)。从图分析可得:在一定范围内,随着提取功率的增大,百合皂苷的提取率不断上升,但当提取功率上升到120 W时,皂苷提取率达到最高值,因此选择120 W为最佳提取功率。

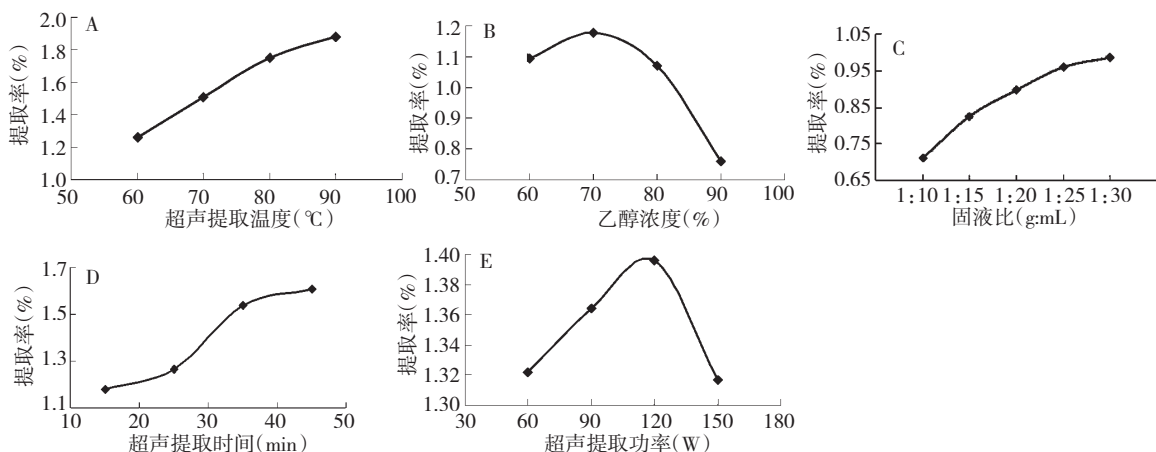


图2 超声辅助回流提取温度(A)、乙醇浓度(B)、固液比(C)、提取时间(D)和超声功率(E)对百合总皂苷得率的影响

Fig. 2 The effect of extraction temperature (A), ethanol concentration (B), solid-liquid ratio (C), extraction time (D), ultrasonic power (E) on ultrasonic-assisted reflux extraction yield of saponins from *L. brownie*

3.3.2 超声波辅助回流提取正交试验结果

超声波辅助回流提取正交试验结果如表5所示,方差分析结果见表6。综合表5的极差及表6的方差分析可以看出,影响百合皂苷提取率的因素顺序为:A>B>C>D>E,即提取温度>乙醇浓度>固液比>提取时间>提取功率,其中提取温度对百合皂苷的提取率具有显著的影响。综合直观分析和方差分析,最终确定最佳超声提取工艺为

$A_4B_3C_4D_2E_2$,即温度为90℃,乙醇浓度为70%,固液比为1:30,提取时间为25 min,功率为105 W。

3.3.3 最佳工艺验证性试验

超声波辅助回流提取最佳工艺下3次的提取率分别为2.32%、2.27%和2.40%,平均提取率达2.33%,均超过所有正交试验提取量,说明正交试验结果可靠。验证性试验的相对偏差RSD=2.814%,说明该最佳工艺的稳定性 and 重复性较好。

表5 超声波辅助回流提取正交实验结果

Table 5 Result analysis of orthogonal test of ultrasonic-assisted reflux extraction

实验号 No.	A	B	C	D	E	提取率 Extraction yield(%)
1	60	50	1:15	15	90	1.30
2	60	60	1:20	25	105	1.56
3	60	70	1:25	30	120	1.54
4	60	80	1:30	45	135	1.44
5	70	50	1:20	35	135	1.60
6	70	60	1:15	45	120	1.56
7	70	70	1:30	15	105	1.75
8	70	80	1:25	25	90	1.44
9	80	50	1:25	45	105	1.91
10	80	60	1:30	35	90	1.97
11	80	70	1:15	25	135	1.81
12	80	80	1:20	15	120	1.56
13	90	50	1:30	25	120	2.21
14	90	60	1:25	15	135	1.97
15	90	70	1:20	45	90	2.08
16	90	80	1:15	35	105	1.79
K1	1.460	1.755	1.615	1.645	1.698	
K2	1.587	1.765	1.700	1.755	1.752	
K3	1.813	1.795	1.715	1.725	1.718	
K4	2.013	1.557	1.843	1.748	1.705	
R	0.553	0.238	0.228	0.110	0.054	

表6 超声波辅助回流提取正交实验方差分析表

Table 6 Variance analysis of orthogonal design of ultrasonic-assisted reflux extraction

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
A	0.717	3	0.239	3.581	3.290	显著
B	0.141	3	0.047	0.704	3.290	不显著
C	0.106	3	0.035	0.529	3.290	不显著
D	0.030	3	0.010	0.150	3.290	不显著
E	0.007	3	0.002	0.035	3.290	不显著
误差	1.00	15				

3.4 水浴回流提取与超声辅助回流提取效果的比较

根据水浴回流提取及超声辅助回流提取的正交试验及验证性试验结果可知,三次最佳工艺验证性试验中,回流提取百合皂苷的平均提取率为

1.98%,相对偏差 RSD = 3.281%。超声波辅助回流提取百合皂苷平均提取率为 2.33%,相对偏差 RSD = 2.814%。可以看出超声波辅助回流提取的提取率和稳定性、重复性都要高于水浴回流提取法。

4 讨论

目前关于百合皂苷提取,鲜有对不同方法提取效果的对比研究。通过正交试验设计可以从多因素多水平明确提取条件对提取效率的影响,特别是条件之间有互作效应时,从而获得最佳工艺。不同批次的材料和试验过程可能影响结果的有效性,通过设计平行对比的正交试验进行筛选更具有重要意义。本文就水浴直接加热回流提取与超声波辅助回流提取两种不同方法的对比研究,筛选出百合皂苷较优的提取方法及工艺,为大规模生产提供参考。

从试验结果可以看出,超声波辅助回流提取法的提取率和稳定性、重复性都要明显优于传统的水浴直接加热回流提取法,超声波特有的机械效应、空化效应及热效应,可以快速的破坏植物细胞的细胞壁和细胞膜,使溶剂迅速的进入细胞,加快有效成分的溶解和增大溶解量,使有效成分快速的扩散到细胞外从而提高有效成分的提取速度和提取率。另外,超声波辅助提取的提取时间短,约为水浴加热回流提取时间的 1/9,避免了长时间的加热对有效成分的不良影响,并且时间短可以减少杂质的溶解量,降低了生产成本。总的来说,超声波辅助回流提取百合总皂苷相对于传统的水浴加热回流提取法具有耗能少、时间短、操作简便、提取效率高等优点,可适合于放大生产。

本文仅对传统水浴加热回流提取与超声辅助回流提取两种典型的提取方法做了比较,对与其他提取方法的比较仍有待进一步探索。

参考文献

1 Pharmacopoeia of People's Republic of China(中国药典).

(上接第 882 页)

- 9 Takahira M, Kondo Y, Kusano G, et al. Studies on the constituents of "senshokushichikon". 2. Isolation and structural elucidation of spirostane derivatives. *J Pharm Soc Jpn*, 1979, 99:528-532.
- 10 Pan WB, Chang FR, Wu YC. Spirostanol saponin from the underground parts of *Tupistra chinensis*. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48:1350-1353.
- 11 Shen P(沈平), Wang SL(王三龙), Yang CR(杨崇仁), et

GD Sci & Tech Press, LTD (广东科技出版社), 1995:107.

- 2 Yang LS(杨林莎), Sun YH(孙艳红), Fang XY(方晓艳), et al. The research progress of *Lilium brownii*. *Henan J TCM* (河南中医药学刊), 2002, 17:74-76.
- 3 Zhang L(张璐), Shi W(时伟), Zhang JL(张金玲). Study on extraction of total saponins from *Lilium brownii* with combined ultrasonic and enzymolysis. *Bever Ind* (饮料工业), 2012, 15(6):20-22.
- 4 Ji HW(吉宏武), Ding XL(丁霄霖), Tao GJ(陶冠军). Screening of steroidal saponins from bulbs of *Lilium brownii* var. *colchesteri* by combination of high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and electron impact mass spectrometry. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2001, 19:403-406.
- 5 Wu XB(吴晓斌), Ren FL(任凤莲), Qiu CG(邱昌桂), et al. Extraction, purification and characterization of *Lilium brownii*. *Guangzhou Chem* (广州化学), 2005, 30(2):36-40.
- 6 Wu XB(吴晓斌), Ren FL(任凤莲), Qiu CG(邱昌桂), et al. Extraction of saponins from *Lilium brownii* and its scavenging effect on hydroxyl radical. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17:777-780.
- 7 Fu CY(傅春燕), Liu YH(刘永辉), Li MJ(李明娟), et al. Extraction and purification techniques and antidepressant activity of total saponins from bulbs of *Lilium brownii*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:682-686.
- 8 Ji HW(吉宏武), Ding XL(丁霄霖). Quantitative determination of saponins from bulbs of Lily. *Chem Ind For Prod* (林业化学与工业), 2003, 23(4):54-58.
- 9 GaoYN(高彦宁), Zhou RB(周日宝), Tong QZ(童巧珍), et al. Content comparison of total saponins from different Lily. *J TCM Univ Hunan* (湖南中医药大学学报), 2007, 27(3):16-17.

al. Polyhydroxylated steroidal saponin from *Tupistra watii*. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2003, 45:626-629.

- 12 Pan WB, Chang FR, Wei LM, et al. New flavans spirostanol saponin, and a pregnane genin from *Tupistra chinensis* and their cytotoxicity. *J Nat Prod*, 2003, 66:161-168.
- 13 Pan WB, Chang FR, Wu YC. Tupichigenin A, a new steroidal saponin from *Tupistra chinensis*. *J Nat prod*, 2000, 63:861-863.