

星点设计-效应面法优化重楼皂苷类成分的提取工艺^Δ

鞠建峰*, 朱宗敏, 杜忠科(山东中医药大学附属医院药剂科, 济南 250014)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3967-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.26

摘要 目的:优化重楼皂苷类成分的提取工艺。方法:以重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 及重楼总皂苷的提取率为因变量,以乙醇体积分数、提取时间、溶剂倍量为自变量,进行多元线性回归及二项式拟合,用效应面法优选最佳工艺,并进行预测。结果:重楼皂苷类成分最优提取工艺为加入 80% 乙醇 10 倍量,回流提取 2 次,每次 100 min。采用该提取工艺,重楼皂苷 I 提取率分别为 85.4%、82.7%、87.1%,重楼皂苷 II 提取率分别为 85.9%、81.3%、83.6%,重楼总皂苷提取率分别为 89.5%、92.1%、90.3% (RSD 均小于 2.0%);总评价指标实测值为 0.964 9,预测值为 0.986 0,偏差率为 2.14%。结论:星点设计-效应面法优选重楼皂苷类成分提取工艺,方法简单,结果可靠。

关键词 星点设计;效应面法;重楼;重楼皂苷 I;重楼皂苷 II;重楼总皂苷;提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Saponins from *Paris polyphylla* with Central Composite Design-response Surface Method

JU Jian-feng, ZHU Zong-min, DU Zhong-ke (Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize extraction technology of saponins from *Paris polyphylla*. METHODS: Using paris saponin I, paris saponin II and *Paridis* total saponin as dependent variables, using ethanol volume fraction, extraction time and solvent amount as independent variables, through multiple linear regression and binomial fitting, the extraction technology was optimized with response surface method and predicted. RESULTS: The optimized extraction technology of saponins from *P. polyphylla* was as follows as 10-fold of 80% ethanol, 2 times reflux extraction, 100 min each time. Under the extraction technology, the extraction rates of paris saponin I were 85.4%, 82.7% and 87.1%; those of paris saponin II were 85.9%, 81.3% and 83.6%; and those of *Paridis* total saponin were 89.5%, 92.1% and 90.3% (all RSD < 2.0%). Measured value was 0.964 9, predicted value was 0.986 0 and deviation rate was 2.14%. CONCLUSIONS: The central composite design-response surface method is simple and reliable for the optimization of extraction technology of saponins from *P. polyphylla*.

KEYWORDS Central composite design; Response surface method; *Paridis polyphylla*; Paris saponin I; Paris saponin II; *Paridis* total saponin; Extraction technology

重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* var. *chinensis* 的干燥根茎,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效,临床主要用于疮痍肿痛、咽喉肿痛、跌扑伤痛、惊风抽搐^[1]。现代研究表明,重楼具有止血、抗肿瘤、抗菌、抗炎等作用^[2-3],其主要活性成分为甾体皂苷类成分^[4]。

目前对重楼皂苷类成分的提取工艺主要是采用正交试验设计法进行工艺参数优选,但正交试验设计法试验精度不够,建立的数学模型预测性较差^[5]。故本研究采用试验精密度较高、预测值更接近真实值的星点设计-效应面法优选重楼总皂苷的提取工艺,以重楼皂苷 I、II 及重楼总皂苷的提取率为考察指标,在单因素试验的基础上,优化重楼皂苷的提取工艺参数,为重楼药材的深入研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱(HPLC)仪(美国安捷伦公司);TG-

Δ 基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(No.2013-082)

* 主管中药师,硕士。研究方向:中药制剂工艺及质量标准。E-mail:zhoufang997@163.com

16 型离心机(上海安亭科学仪器厂);AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);UV2600 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 药材、药品与试剂

重楼皂苷 I 对照品(批号:111590-201103,纯度:92.1%)、重楼皂苷 II 对照品(批号:111591-201103,纯度:93.4%),均购自中国食品药品检定研究院;重楼药材(山东中医药大学附属医院,经山东中医药大学药学院生药系李峰教授鉴定为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* 干燥根茎);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 重楼皂苷 I、II 和重楼总皂苷的含量测定

2.1.1 重楼皂苷 I、II 的含量测定^[6-7] 采用 HPLC 法。色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(48:52),流速为 1.0 ml/min;检测波长为 203 nm;柱温为 40 °C;进样量为 10 μl。经方法学考察,精密度、准确度、线性关系、专属性和灵敏度均符合要求。

2.1.2 重楼总皂苷的含量测定^[8] 采用可见分光光度法。以重楼皂苷 I 为对照品,高氯酸为显色剂,水浴 65 °C 加热 15

min, 在 408 nm 波长下测定吸光度, 用标准曲线法计算供试品中重楼总皂苷的含量。经方法学考察, 精密性、准确性、线性关系均符合要求。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数的选择 取重楼药材 6 份, 每份 50 g, 称定, 分别加 6 倍量(体积质量比, ml/g)的水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、95%乙醇回流提取 60 min, 提取 1 次, 滤过, 测定提取液中重楼皂苷 I、II 及重楼总皂苷的含量, 并计算其提取率(提取率=提取所得浸膏质量×浸膏中所测成分的含量/原药材中所测成分的含量×100%), 结果见表 1。

表 1 不同乙醇体积分数下重楼皂苷类成分的提取率(%)

Tab 1 The extraction rate of saponins from *P. polyphylla* under the condition of different volume fractions of ethanol(%)

乙醇体积分数, %	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼总皂苷
0(水)	10.3	8.5	8.1
20	15.7	13.6	12.3
40	34.2	30.6	32.1
60	46.8	42.5	44.2
80	55.1	56.1	54.8
95	56.2	57.2	55.2

由表 1 可知, 不同体积分数乙醇对重楼皂苷类成分提取影响较大, 因此确定乙醇体积分数为 20%~80% 进行星点设计筛选。

2.2.2 提取时间的选择 取重楼药材 6 份, 每份 50 g, 称定, 加 6 倍量 60%乙醇, 分别回流提取 20、40、60、80、100、120 min, 滤过, 测定提取液中重楼皂苷 I、II 及重楼总皂苷的含量, 并计算其提取率, 结果见表 2。

表 2 不同提取时间下重楼皂苷类成分的提取率(%)

Tab 2 The extraction rate of saponins from *P. polyphylla* under the condition of different extraction time(%)

提取时间, min	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼总皂苷
20	30.1	28.3	33.2
40	36.7	37.8	37.3
60	46.4	43.6	45.7
80	63.9	62.9	64.2
100	65.1	66.8	65.8
120	66.8	67.3	66.2

由表 2 可知, 各提取时间对提取效果影响较大, 故确定对所有提取时间范围(20~120 min)进行星点设计筛选。

2.2.3 溶剂倍量的选择 取重楼药材 6 份, 每份 50 g, 称定, 分别加 4、6、8、10、12 倍量的 60%乙醇回流提取 60 min, 滤过, 测定提取液中重楼皂苷 I、II 及重楼总皂苷的含量, 并计算其提取率, 结果见表 3。

表 3 不同溶剂倍量下重楼皂苷类成分的提取率(%)

Tab 3 The extraction rate of saponins from *P. polyphylla* under the condition of different amount of solvent(%)

溶剂倍量, ml/g	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼总皂苷
4	37.8	38.1	40.2
6	47.3	44.8	44.9
8	56.4	55.1	52.4
10	59.9	61.9	64.7
12	60.8	62.4	65.1

由表 3 可知, 各溶剂倍量均对提取效果有影响, 确定选取

4~12 倍量进行星点设计筛选。

2.3 星点设计-效应面法优选重楼皂苷提取工艺

2.3.1 星点设计 为了更精确地考察最优因素水平值, 选取乙醇体积分数(X_1)、提取时间(X_2)和溶剂倍量(X_3)为自变量, 以重楼皂苷 I、II 及重楼总皂苷的提取率作为评价指标。由于提取次数为非连续变量, 回归处理较困难, 并从节约成本和工业生产的实际考虑, 将提取次数定为 2 次。同时为了将所有指标综合成一个能反映总体效应结果的值, 试验中以“总评归一值”(Overall desirability, OD)来考察指标的综合效果, 根据文献[9-10]的方法对各个指标进行归一化处理。各指标由公式(1)计算 d_i 值: $d_i = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$, 其中 Y_i 为实测值, Y_{min} 和 Y_{max} 系指每一指标在不同次试验中测得的所有值中的最小和最大值。计算出各指标的 d_i 值后, 由公式(2)计算 OD 值: $OD = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/n}$, n 为指标数。根据 Central-Composite 的中心组合试验设计原理对各因素进行 5 水平设计, 用代码值 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α 来表示, 见表 4; 试验设计方案及结果见表 5。

表 4 Central-Composite 试验设计因素与水平

Tab 4 Factors and levels of Central-Composite design

水平	因素		
	X_1 (乙醇体积分数), %	X_2 (提取时间), min	X_3 (溶剂倍量), ml/g
-1.682(α)	20	20	4
-1	32.16	40.27	5.62
0	50	70	8
1	67.84	99.73	10.38
1.682(α)	80	120	12

表 5 Central-Composite 试验设计与结果

Tab 5 Arrangement and results of Central-Composite design

试验号	X_1	X_2	X_3	重楼皂苷 I 提取率, %	重楼皂苷 II 提取率, %	重楼总皂苷 提取率, %	OD
1	-1	-1	-1	41.86	41.04	40.57	0.000
2	-1	-1	-1	46.83	46.76	46.89	0.137
3	-1	1	-1	44.55	44.35	44.78	0.086 5
4	-1	1	-1	67.41	67.47	66.71	0.589
5	-1	-1	1	42.03	41.72	40.92	0.017 0
6	1	-1	1	60.32	60.54	58.44	0.423
7	-1	1	1	47.72	47.58	49.10	0.165
8	1	1	1	69.70	69.26	70.21	0.654
9	-1.682	0	0	40.52	41.53	40.68	0.000
10	1.682	0	0	85.43	85.20	86.56	1.000
11	0	-1.682	0	41.37	40.86	40.59	0.000
12	0	-1.682	0	59.45	60.37	58.57	0.417
13	0	0	-1.682	56.72	57.24	56.57	0.359
14	0	0	1.682	57.72	57.54	58.21	0.381
15	0	0	0	59.23	59.36	60.21	0.420
16	0	0	0	58.85	58.47	59.68	0.407
17	0	0	0	60.21	58.64	58.39	0.408
18	0	0	0	58.93	59.72	60.01	0.419
19	0	0	0	58.63	58.91	60.72	0.416
20	0	0	0	59.77	58.79	58.94	0.419

2.3.2 模型拟合及方差分析 将所得数据用 Design-Expert 8.0 软件进行效应面试验分析, 以 OD 值分别对各因素 X (自变量)进行多元线性回归和二项式拟合。结果, 多元线性回归方程的相关系数($r=0.654 2$)较低, 变量之间线性相关性较差, 拟合度不佳, 预测性较差。其中, 二项式方程拟合回归方程为 $OD =$

0.42+0.23X₁+0.12X₂+0.035X₃+0.055X₁X₂+0.031X₁X₃-0.021X₂X₃+9.8×10⁻³X₁²-0.093X₂²-0.036X₃²(r=0.924 0),相关系数较高,拟合度较好,预测性较好。方差分析结果见表6。

表6 效应面拟合回归方程的方差分析结果

Tab 6 Results of variance analysis of the fitting regression equation with the response surface

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1.14	9	0.13	14.43	0.000 1
X ₁	0.75	1	0.75	86.06	0.000 1
X ₂	0.19	1	0.19	21.66	0.000 9
X ₃	0.017	1	0.017	1.89	0.199 7
X ₁ X ₂	0.024	1	0.024	2.75	0.128 4
X ₁ X ₃	7.621×10 ⁻³	1	7.621×10 ⁻³	0.87	0.372 8
X ₂ X ₃	3.572×10 ⁻³	1	3.572×10 ⁻³	0.41	0.537 3
X ₁ ²	1.384×10 ⁻³	1	1.384×10 ⁻³	0.16	0.699 3
X ₂ ²	0.13	1	0.13	14.31	0.003 6
X ₃ ²	0.019	1	0.019	2.15	0.173 4
残差	0.088	10	8.754×10 ⁻³		
失拟性	0.020	3	6.808×10 ⁻³	6.54	0.050 8
纯误差	1.629×10 ⁻⁴	5	3.258×10 ⁻⁵		
总差	1.22	19			

由表6可知,二项式回归方程失拟检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰较小;模型拟合检验显著,说明方程与实际情况拟合良好,为成功模型;乙醇体积分数、提取时间对OD值的影响具有极显著意义,所有交互项未达显著性。

2.3.3 效应面优化与预测 应用Design-Expert 8.0软件进行三维效应面图,详见图1。

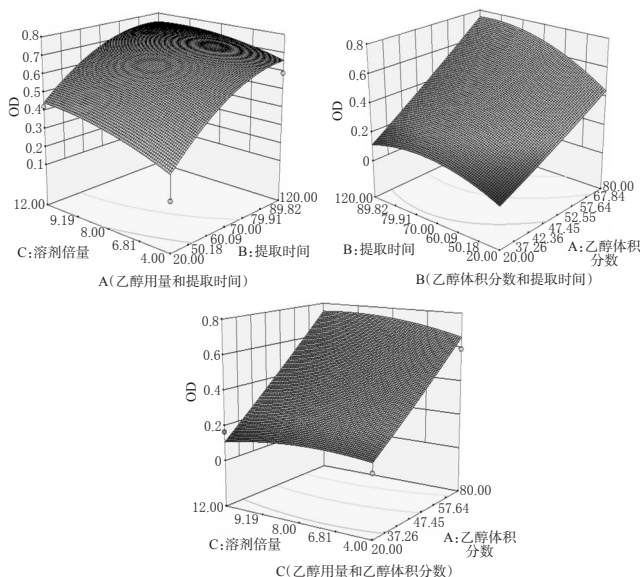


图1 各因素对OD值的效应面图

Fig 1 Response surface of factors to OD value

由OD值较高的水平确定最优提取条件:X₁为80%,X₂为100.91 min,X₃为10.18倍(ml/g),OD最大预测值为0.986 0。根据拟合的二项式回归方程,得出优化条件。鉴于试验操作的可行性,确定最优工艺条件为加入80%乙醇10倍量(ml/g),回流提取2次,每次100 min。

2.3.4 验证试验 依据最优工艺条件,取重楼药材3份,每份50 g,进行验证试验,将测定的平均结果与拟合方程的预测值

进行比较,并计算偏差率[偏差率=(预测值-实测值)/预测值×100%]。结果,重楼皂苷I提取率分别为85.4%、82.7%、87.1%;重楼皂苷II提取率分别为85.9%、81.3%、83.6%;重楼总皂苷提取率分别为89.5%、92.1%、90.3%;OD实测平均值0.964 9。预测重楼皂苷I、重楼皂苷II及重楼总皂苷提取率分别为86.2%、84.7%、90.9%,OD预测值为0.986 0,偏差率为2.14%,说明二项式拟合效果良好,所建立的数学模型具有良好的预测性,所选工艺条件重现性较好。

3 讨论

重楼药材中含有多种皂苷成分,有重楼皂苷I、II、VI、VII等^[3]。本研究选用含量较高的重楼皂苷I、II作为指标,采用HPLC法进行含量测定,同时采用分光光度法测定总皂苷含量,评价指标全面,试验结果可靠。

参考2010年版《中国药典》重楼药材项下重楼皂苷含量测定方法^[1],对重楼皂苷I、II含量测定方法进行了考察,确定了其最优流动相比例:乙腈-水(48:52)。在此条件下重楼皂苷I、II峰形良好,达到基线分离,保留时间适中,检测方便。

通过单因素试验考察了提取时间、乙醇体积分数、溶剂倍数等因素的影响,为星点设计试验奠定了基础。结合生产实际和成本,将提取次数定为2次,结果皂苷类成分基本提取完全。由于提取次数为非连续变量,因此未在星点设计-效应面法中对其进行优化。

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,2010:243.
- [2] 张亚茹,彭献娜,王彩虹,等.重楼活性化学成分与药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2015,11(2):39.
- [3] 赵保胜,朱寅荻,马勇,等.中药重楼研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):267.
- [4] 汤海峰,赵越平,蒋永培.重楼属植物的研究概况[J].中草药,1998,29(12):839.
- [5] 吴伟,崔光华.星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J].国外医学药学分册,2000,27(5):292.
- [6] 杨培民,倪健,曹广尚. HPLC法测定重楼克感滴丸中重楼皂苷I和重楼皂苷II的含量[J].中华中医药杂志,2012,27(3):678.
- [7] 张焯,吕霜霜,周浓,等.不同生长年限滇重楼中4种重楼皂苷的含量比较[J].中国药房,2011,22(43):4 081.
- [8] 徐学民,钟焯昌,熊治平.重楼皂苷成分的含量测定研究[J].中草药,1986,17(11):13.
- [9] 吴伟,崔光华,陆彬.实验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J].中国药学杂志,2000,35(8):530.
- [10] Abu-Izza K, Garcia-Contreras L, Lu DR. Preparation and evaluation of sustained release zidovudine-loaded micro-spheres.2.Optimization of multiple response variables [J]. J Pharm Sci, 1996, 85(6):572.

(收稿日期:2015-01-27 修回日期:2015-04-20)

(编辑:刘 萍)