

Box-Behnken 响应面法优化通关藤总皂苷的超声提取工艺及其纯化工艺研究[△]

徐东伟^{1*}, 王绍辉², 刘同祥^{2#}(1. 中央民族大学医院药剂科, 北京 100081; 2. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081)

中图分类号 R285.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3535-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.24

摘要 目的: 优化通关藤中总皂苷的超声提取工艺及纯化工艺, 制备纯化的通关藤总皂苷。方法: 以通关藤总皂苷提取率为指标, 以乙醇体积分数、液料比和提取温度等为因素, 采用单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化通关藤总皂苷的超声提取工艺; 以洗脱液中总皂苷含量为指标, 考察乙醇洗脱体积分数对总皂苷经 D101 型大孔吸附树脂吸附纯化工艺的影响。结果: 最优超声提取工艺条件为乙醇体积分数 85%、液料比 18.5:1 (ml/g)、提取温度 80 °C; 验证试验中通关藤总皂苷平均提取率为 4.80% (RSD=1.06%, n=3), 与预测值 4.89% 接近, 偏差为 1.84%。最优纯化工艺条件为以 45% 乙醇为洗脱溶剂除杂, 再用 90% 乙醇进行纯化; 验证试验表明通关藤总皂苷含量实测平均值为 62.45% (RSD=0.88%, n=3)。结论: 优化后的工艺可较好地提取、纯化通关藤中的总皂苷, 且工艺稳定、可靠。

关键词 通关藤; 总皂苷; 提取工艺; Box-behnken 响应面法; 大孔吸附树脂; 纯化

Optimization of Ultrasonic Extraction of Total Saponins from *Marsdenia tenacissima* by Box-Behnken Response Surface Method and Its Purification Technology

XU Dongwei¹, WANG Shaohui², LIU Tongxiang²(1. Dept. of Pharmacy, Hospital of Minzu University of China, Beijing 100081, China; 2. Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction and purification technology of total saponins from *Marsdenia tenacissima*, and to prepare purified total saponins from *M. tenacissima*. METHODS: Using the extraction rate of total saponins from *M. tenacissima* as index, ethanol volume fraction, solvent-solid ratio and extraction temperature as factors, ultrasonic extraction technology of total saponins from *M. tenacissima* was optimized by single factor test and Box-Behnken response surface design. Using the content of total saponins in elution, the effects of ethanol elution volume fraction on purification technology of total saponins by D101 type macroporous adsorption resin was investigated. RESULTS: The optimal ultrasonic extraction technology was as follows as ethanol volume fraction of 85%, solvent-solid ratio of 18.5:1 (ml/g), extraction temperature of 80 °C. In verification test, the average extraction rate of total saponins from *M. tenacissima* was 4.80% (RSD=1.06%, n=3); it was close to predicted value 4.89%, and the deviation was 1.84%. The optimal purification technology was as follows as 45% ethanol as eluant, 90% ethanol for purification. Verification test showed that the average content of total saponins from *M. tenacissima* was 62.45% (RSD=0.88%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized technology can be used for the extraction and purification of total saponins from *M. tenacissima*. The technology is stable and reliable.

KEYWORDS *Marsdenia tenacissima*; Total saponins; Extraction technology; Box-Behnken response surface method; Macroporous adsorption resin; Purification

通关藤为萝藦科植物通关藤 [*Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn.] 的干燥藤茎^[1], 亦称乌骨藤、通光藤、奶浆藤等, 主要分布于云南、贵州、广西和四川等地^[2]。通关藤始载于《滇南本草》^[3], 为我国传统民族药材, 其味苦, 性甘、凉, 入肺、胃、膀胱经; 具有清热解毒、止咳平喘、调节免疫作用, 在云南、贵州

民间广泛用于治疗癌症。现代药理研究表明, 通关藤含有的独特化学成分, 具有明显的抗肿瘤、免疫调节、保肝利尿、败毒抗癌等作用, 对胃癌、肝癌、肺癌等疗效确切, 以其为主要原料制备而成的消癌平制剂, 在临幊上用于治疗各种恶性肿瘤, 疗效良好^[4-6]。通关藤含有甾体皂苷、多糖、生物碱、有机酸、树脂及色素等多种化学成分, 其中 C21 甾体皂苷类是其主要的化学成分。迄今为止, 从中分离鉴定的 C21 甾体皂苷类化合物已达到 50 多种^[7]。皂苷类成分被认为是具有抗肿瘤作用的主要活性物质。目前国内外对通关藤总皂苷的提取、纯化工艺鲜有文

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81073151)

* 主管药师, 博士研究生。研究方向: 医院药学、天然药物研发。电话: 010-68932277。E-mail: xudongwei@muc.edu.cn

通信作者: 研究员, 博士生导师, 博士。研究方向: 民族医药研发。电话: 010-68933254。E-mail: binghe6665_cn@sina.com

献报道,笔者采用响应面法对通关藤总皂苷的提取工艺进行优化,并考察大孔吸附树脂纯化通关藤总皂苷的工艺条件,优化其提取、纯化的工艺流程,为通关藤总皂苷的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-4802H型紫外-可见分光光度计(美国Unic公司);JM-B10001型电子分析天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司);AL404型万分之一电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);KQ-500B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);101-1AB型电热恒温鼓风干燥箱、DK-98-1型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);Heidolph 4000型旋转蒸发器(德国Heidolph公司)。

1.2 树脂、药材、对照品与试剂

D-101型大孔吸附树脂(天津海光化工有限公司,非极性,批号:110512);通关藤药材(广州市华宇药业有限公司,批号:201310,经中央民族大学刘同祥教授鉴定为真品);对照药材通关藤(批号:121522-201202)、通关藤苷H对照品(批号:111913-201202,纯度:99.8%)均来源于中国食品药品检定研究院;甲醇、香草醛、浓硫酸、冰醋酸等化学试剂均为分析纯,购自北京化工厂。

2 方法与结果

2.1 通关藤总皂苷含量测定(香草醛-高氯酸法)^[8]

2.1.1 最大波长的确定 准确称取干燥至恒质量的通关藤苷H对照品2.0 mg,加甲醇超声溶解,定容至10 ml量瓶中,摇匀,即为对照品溶液。精密吸取对照品溶液0.5 ml置于试管中,水浴加热挥干除去溶剂,加入新配制的5%香草醛-冰乙酸溶液0.4 ml、高氯酸0.6 ml,摇匀;待溶液呈玫瑰红色后,在70 °C水浴中加热15 min,冰水浴5 min冷却;加冰乙酸10 ml,摇匀,放置20 min,在400~600 nm波长下扫描,确定最大吸收波长。结果通关藤苷H在可见光区域内最大吸收波长为462 nm。

2.1.2 标准曲线的绘制 分别精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 ml,置于试管中,自“2.1.1”项下“水浴加热挥干除去溶剂”起操作,在462 nm波长处测定吸光度(A),以甲醇作为空白对照。以通关藤苷H质量浓度(c)为横坐标、A为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=31.01c+0.003(R^2=0.998)$ 。结果表明,通关藤苷H检测质量浓度线性范围为1.83~29.18 μg/ml。

2.1.3 精密度、重复性和稳定性试验 按相关方法操作,结果精密度试验中吸光度的RSD=1.24%(n=6),重复性试验中样品含量的RSD=1.52%(n=6),稳定性试验中样品含量的RSD=1.72%(n=6,120 min内)。

2.1.4 加样回收率试验 准确称取已知总皂苷含量(4.05%)的通关藤粉末6份,分别加入通关藤苷H对照品约1 mg,80%乙醇超声提取20 min。按“2.1.2”项下方法操作后测定各供试品溶液的吸光度,代入回归方程,计算样品中总皂苷含量及回收率。结果平均回收率为98.85%(RSD=1.57%,n=6)。

2.1.5 总皂苷含量测定 准确称取通关藤总皂苷样品100 mg置于20 ml量瓶中,加甲醇超声溶解,定容至刻度。准确吸取

0.2 ml置于试管中,按“2.1.2”项下方法操作后测定吸光度,代入回归方程,根据样品质量浓度计算样品中总皂苷含量。

2.2 单因素试验

在预试验的基础上选择超声提取中的乙醇体积分数、液料比、提取温度、提取时间为试验因素,通过考察各因素对通关藤总皂苷提取率的影响,确定相关因素及其范围。试验中超声功率为500 W、超声频率为40 kHz。总皂苷提取率计算公式为:样品中通关藤皂苷的质量/通关藤药材质量×100%。

2.2.1 乙醇体积分数对提取率的影响 精确称取通关藤粉末5 g共5份,分别置于250 ml锥形瓶中,提取温度为40 °C,液料比为15:1,分别在50%、60%、70%、80%、90%乙醇条件下超声提取25 min。过滤,将滤液蒸干,干燥得通关藤粗皂苷,按“2.1.5”项下方法操作并测定,考察乙醇体积分数对通关藤总皂苷提取率的影响。每次试验重复3次。结果,以80%乙醇为提取溶剂时通关藤总皂苷提取率最优,详见图1A。

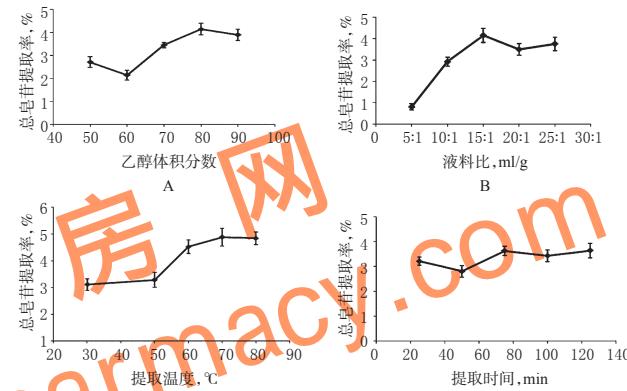


图1 各因素对通关藤总皂苷提取率的影响

Fig 1 Effects of each factor on the yield of total saponins

2.2.2 液料比对提取率的影响 准确称取通关藤粉末5 g共5份,分别置于250 ml锥形瓶中,提取溶剂为80%乙醇溶剂,提取温度为40 °C,分别在液料比5:1、10:1、15:1、20:1、25:1条件下超声提取25 min。过滤,将滤液蒸干,干燥得通关藤粗皂苷,按“2.1.5”项下方法操作并测定。每次试验重复3次。结果,以液料比为15:1时通关藤总皂苷提取率最优,详见图1B。

2.2.3 提取温度对提取率的影响 准确称取通关藤粉末5 g共5份,分别置于250 ml锥形瓶中,提取溶剂为80%乙醇溶剂,液料比为15:1,分别在30、50、60、70、80 °C条件下超声提取25 min。过滤,将滤液蒸干,干燥得通关藤粗皂苷,按“2.1.5”项下方法操作并测定。每次试验重复3次。结果,提取温度为70 °C时通关藤总皂苷提取率最高,详见图1C。

2.2.4 提取时间对提取率的影响 精确称取通关藤粉末5 g共5份,分别置于250 ml锥形瓶中,提取溶剂为80%乙醇溶剂,提取温度为40 °C,液料比为15:1,分别超声提取25、50、75、100、125 min。过滤,滤液蒸干,干燥得通关藤粗皂苷,按“2.1.5”项下方法操作并测定。每次试验重复3次。结果,提取时间与通关藤总皂苷提取率关系不明显,详见图1D,故在响应面试验中剔除该因素。

2.3 响应面试验

2.3.1 试验设计 准确称取通关藤药材17份,每份5 g,参考文献[9-10]中方法,根据Box-Behnken中心组合试验设计原

理,在单因素试验基础上,以乙醇体积分数(A)、液料比(B)和提取温度(C)3个因素为自变量,每个自变量的低、中、高水平分别以-1、0、1进行编码,以通关藤总皂苷提取率(Y)为响应值。应用Design-Expert 8.0.6软件设计3因素3水平(共17个试验点、5个中心点)的响应面试验,利用响应面试验结果,确定通关藤总皂苷的最优提取条件。试验因素与水平见表1,试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(乙醇体积分数), %	B(液料比), ml/g	C(提取温度), ℃
-1	70	10:1	60
0	80	15:1	70
1	90	20:1	80

表2 Box-Behnken 中心组合试验设计与结果

Tab 2 Design and results of Box-Behnken central composite design

样品编号	A	B	C	提取率, %
1	80	20	80	4.79
2	80	15	70	4.64
3	70	10	70	3.05
4	80	15	70	4.32
5	70	20	70	3.27
6	80	10	60	3.11
7	90	15	60	3.93
8	70	15	60	3.49
9	80	15	70	4.35
10	90	10	70	3.08
11	80	15	70	4.64
12	80	20	60	4.43
13	80	15	70	4.48
14	90	15	80	4.45
15	70	15	80	3.87
16	80	10	80	3.29
17	90	20	70	4.48

2.3.2 多元二次回归模型的建立 采用Design-Expert 8.0.6软件对表2中数据进行多项式拟合回归。结果发现,其中BC、AC、C²项的P值均>0.05,为不显著项,故将其剔除,手动优化。最终建立多元二次响应面回归模型为Y=4.46+0.28A+0.56B+0.18C+0.29AB-0.5A²-0.53B²(R²=0.9493)。由R²值表明该方程拟合性良好,可以用该方程代替真实试验进行分析。各因素的方差分析结果见表3。

表3 回归模型的方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F	P
总模型	6.047	6	1.008	31.21	<0.0001
A	0.638	1	0.638	19.77	0.0012
B	2.464	1	2.464	76.31	<0.0001
C	0.259	1	0.259	8.03	0.0178
AB	0.348	1	0.348	10.78	0.0082
A ²	1.039	1	1.039	32.17	0.0002
B ²	1.168	1	1.168	36.18	0.0001
残差	0.323	10	0.032		
失拟项	0.229	6	0.038	1.64	0.3300
纯误差	0.094	4	0.023		
总变异	6.370	16			

采用Design-Expert 8.0.6软件的ANOVA分析响应面的回归参数,回归方程中各自变量对响应值的显著性由F检验来判定。模型项P<0.01,说明Y与A、B、C回归方程的关系是显著的;失拟项P>0.05,说明方程与实际拟合中非正常误差所占比例小,可以通过该模型预测试验结果。各因素对通关藤总皂苷提取率的影响由大到小依次为液料比(B)、乙醇体积分数(A)、提取温度(C)。

2.3.3 效应面分析 由“2.3.2”项分析可知,交互项只有AB项具有显著性。通过Design-Expert 8.0.6软件分析可以得出A、B因素交互影响超声提取总皂苷的响应曲面和等高线图,直观地反映AB因素交互作用对响应值的影响,结果见图2。

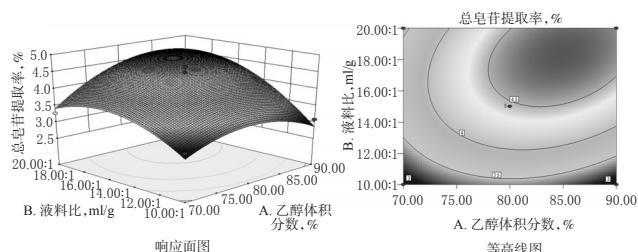


图2 乙醇体积分数与液料比对总皂苷提取率影响的响应面和等高线图

Fig 2 Response surface and contour plots for the effects of ethanol volume fraction and solvent-solid ratio on the extraction rate of total saponins

由图2可知,当提取温度一定时,总皂苷提取率随乙醇体积分数和液料比的升高均呈先上升后下降的趋势,在乙醇体积分数约为85%、液料比约为18:1时,达到最大值。

2.3.4 提取工艺验证试验 通过回归模型预测的通关藤总皂苷提取的最优工艺条件为乙醇体积分数84.82%、液料比18.31:1、提取温度80℃;通关藤总皂苷提取率理论值为4.89%。实际试验中对上述工艺参数修正为乙醇体积分数85%、液料比18.5:1、提取温度为80℃进行验证试验。

准确称取通关藤粉末3份,每份100g,置于3000ml烧杯中,按照上述修正的最优工艺进行3组平行试验,验证通关藤总皂苷的提取工艺。结果测得通关藤总皂苷提取率平均值为4.80%(RSD=1.06%,n=3),与预测值相比偏差为1.84%,二者比较接近,说明采用响应面法得到的工艺参数准确、可靠。

2.4 纯化工艺的优选

2.4.1 大孔吸附树脂预处理 根据预试验结果选择D101大孔吸附树脂。称取D101大孔吸附树脂30g(干质量),95%乙醇浸泡24h,湿法装柱(26cm×2.8cm),用95%乙醇洗至流出液与水(1:3)混合无白色混浊现象,再用蒸馏水反复洗脱至洗脱液无明显乙醇气味并且树脂柱不再下降时即可。

2.4.2 洗脱溶剂的选择 准确称取100g通关藤药材,按最优提取工艺提取3次;合并提取液并浓缩到一定量,加至预先处理好的D101柱预吸附1h,用蒸馏水洗至流出液不显Molish反应,弃去水洗脱液;然后依次用30%、45%、60%、75%、90%、95%的乙醇梯度洗脱,控制流速为1倍柱体积(BV)/h左右,每个体积分数的乙醇洗脱5BV。每1BV收集1次洗脱液,共收集30份。将每份样品液制成干浸膏称量,并测定通关藤总皂苷的含量,绘制洗脱曲线,考察不同体积分数乙醇的洗脱效

果,结果见表4和图3(图中乙醇体积分数:1~5号为30%,6~10号为45%,11~15号为60%,16~20号为75%,21~25号为90%,26~30号为95%)。

表4 不同体积分数乙醇的洗脱效率

Tab 4 Elution effects of different volume fraction of ethanol

乙醇体积分数,%	干浸膏质量,mg	占总干浸膏率,%	总皂苷质量,mg	浸膏中皂苷含量,%	占总皂苷率,%
30	1912.85	15.62	302.67	15.82	5.37
45	2543.07	20.76	635.96	25.01	11.28
60	2467.65	20.15	1535.63	62.23	27.24
75	2653.54	21.67	1958.74	73.82	34.74
90	1912.04	15.61	1054.23	55.14	18.70
95	758.27	6.19	150.87	19.90	2.68
合计	12247.42	100	5638.10	46.04	100

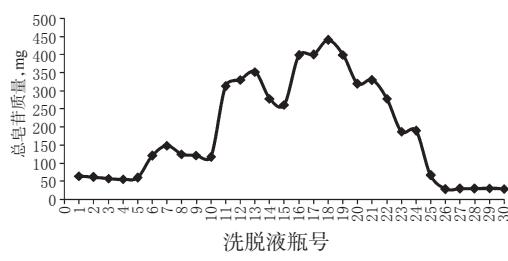


Fig 3 Gradient elution curve

从表4和图3可以看出,通关藤总皂苷主要集中在60%、75%和90%乙醇洗脱液中,占全部洗脱液中通关藤总皂苷的80%以上。为了得到含量较高的通关藤总皂苷,可以选择用45%乙醇洗去杂质,然后再用90%乙醇洗脱进行纯化。

2.4.3 精制皂苷的含量测定 精确称取100 g通关藤药材3份,按“2.4.2”项下方法提取操作后上D101柱,用5 BV的45%乙醇洗脱后,用90%乙醇洗脱5 BV。收集90%乙醇洗脱液,回收溶剂,蒸干可得纯化的通关藤总皂苷。经测定,纯化后的皂苷含量平均值为62.45%(RSD=0.88%,n=3),说明纯化工艺可制得纯度较高的通关藤总皂苷,且工艺操作简单、重现性良好。

综上所述,本研究得出通关藤总皂苷的最优超声提取工艺:提取溶剂为85%乙醇,液料比为18.5:1,提取温度为80 °C。最优纯化工艺:提取液浓缩后上D101柱,用45%乙醇洗脱除杂后,再用90%乙醇洗脱进行纯化。在此条件下可制得含量较高的通关藤总皂苷,且方法简单易行,可扩大生产。

3 讨论

本研究通过单因素试验和响应面分析,确定了超声提取通关藤总皂苷3个因素的主次关系并得到了提取效果最优的理论工艺条件。通过验证试验表明通关藤总皂苷提取率实测值与理论值基本吻合,提取率较高,说明采用响应面法得到的工艺参数是准确可靠的。

预试验中通过比较不同种类大孔吸附树脂,发现D101型大孔吸附树脂吸附快、吸附量大、洗脱率高、洗脱速度较快、洗脱时间短,对通关藤总皂苷有较好的富集纯化效果,且价格便

宜,适合规模化生产。

使用D101型大孔吸附树脂以45%乙醇洗去杂质,再用90%乙醇纯化可得到含量较高的通关藤总皂苷。目前以通关藤原料制备而成的中药制剂有消癌平片、消癌平糖浆、消癌平胶囊和消癌平注射液,临床广泛用于治疗肝癌、胃癌、肺癌等各种晚期恶性肿瘤^[11~13],然而这些制剂多为通关藤药材的水提物。在本试验进行过程中,笔者发现通关藤药材的主要活性物质皂苷类极性较小、水溶性较差,水提物中的皂苷含量很低;而以本试验方法得到的皂苷含量较高。后期可通过临床前研究对其药理活性进行进一步深入探索,研究其作为原料药用于抗肿瘤药物开发的可能性。下一步拟以消癌平口服液为阳性对照,研究通关藤总皂苷对Lewis肺癌裸鼠的肿瘤抑制作用,为开发研究以通关藤总皂苷为原料药的抗癌新药提供科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:296.
- [2] 张贵君.现代中药材商品通鉴[M].北京:中国中医出版社,2001:1 200.
- [3] 周海钧,曾育麟.中国民族药志[M].北京:人民卫生出版社,1984:29.
- [4] 于绍帅,陈明苍,李志雄,等.通关藤的化学成分与药理活性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):279.
- [5] Zhang H, Tan A, Zhang A, et al. Five new C21 steroid glycosides from the stems of Marsdenia tenacissima[J]. Steroids, 2010, 75(2):176.
- [6] 钱军,华海清,秦叔達.通关藤制剂抗肿瘤作用研究进展[J].中国中药杂志,2009,34(1):11.
- [7] 魏文静,刘同祥.民族药乌骨藤抗肿瘤药理活性及机制研究进展[J].时珍国医国药,2013,24(7):1 717.
- [8] 杨安平,柯俊东.响应曲面法优选粪箕笃总皂苷的提取工艺[J].天津药学,2015,27(2):5.
- [9] 韦丽文,陈振建.响应面Box-Behnken设计优化超声提取桑椹多酚条件[J].中国民族民间医药杂志,2015,24(10):25.
- [10] 杨小军,丁永辉.响应面法优化藏药绿萝花总黄酮的超声波辅助提取工艺[J].中国药房,2015,26(25):3 566.
- [11] 李延芳,廖文斌,马丽芳,等.通光散化学成分和药理活性的研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(7):1 761.
- [12] 周艳艳,李玉云,李良,等.乌骨藤提取物抑制裸小鼠胃癌模型肿瘤生长的实验研究[J].实验动物科学,2012,29(5):13.
- [13] 姚小燕.消癌平注射液治疗晚期恶性肿瘤机制研究进展[J].亚太传统医药,2014,10(18):41.

(收稿日期:2016-02-16 修回日期:2016-03-27)

(编辑:刘萍)