

应用 Box-Behnken 设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究

苏柘僮¹, 刘英¹, 徐佳丽¹, 杨胜², 杨明^{1,3*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

2. 成都医学院, 四川 成都 610083

3. 江西中医学院 中药现代制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 采用 Box-Behnken 设计进行工艺优化, 研究地榆皂苷的闪式提取工艺。方法 采用闪式提取法, 以溶媒用量、乙醇体积分数、提取时间 3 个因素为主要影响因素, 以总皂苷转移率、地榆皂苷 I 转移率、总评归一值 (OD) 为评价指标进行 Box-Behnken 设计试验, 考察最佳工艺。结果 最佳工艺为溶媒用量 9 倍、乙醇体积分数 75%、提取时间 2 min, 对最佳工艺进行验证, 结果实测平均值为总皂苷转移率 82.20%、地榆皂苷 I 转移率 88.73%, RSD 分别为 1.59%、2.72%, 与模型预测值非常接近, 说明该模型比较可靠。结论 本方法科学、合理、可行, 为进一步地榆制剂研究奠定基础。

关键词: 地榆; 闪式提取; Box-Behnken 设计; 地榆总皂苷; 地榆皂苷 I

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0501-04

Optimization of flash extraction of burnet saponins by Box-Behnken design

SU Zhe-tong¹, LIU Ying¹, XU Jia-li¹, YANG Sheng², YANG Ming^{1,3}

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

3. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, china

Key words: *Sanguisorbae Radix*; flash extraction; Box-Behnken design; burnet saponins; burnet saponin I

地榆为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *Sanguisorba officinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li 的干燥根, 广布于我国黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、四川、贵州、云南、西藏等地, 具有凉血止血, 解毒敛疮之功效^[1-3]。地榆主要含鞣质类 (17%)、三萜皂苷类 (2.4%~4.0%) 等成分^[4]。据报道, 地榆所含皂苷类成分具有升高白细胞的药理作用, 但是, 关于地榆皂苷提取工艺的研究较少^[5]。闪式提取是利用高速剪切力和搅拌力将药材粉碎至细微颗粒, 并在局部负压渗透的作用下使组织内有效成分迅速达到溶解平衡, 实现高效提取的目的, 具有不加热、快速 (一般只需 1~3 min)、精确度高等优点^[6]。本研究首次将闪式提取法应用于地榆皂苷的提取, 拟采用此法快速提取地榆皂苷, 并采用 Box-Behnken 设计对提取工艺进行优化, 为进一步开发地榆制剂奠定基础。

1 仪器与材料

LC-10A 液相色谱仪 (日本岛津), UV-1700 紫外分光光度计 (日本岛津), JHBE-50T 闪式提取器 (河南金鼎科技发展有限公司), BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), KQ-400DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂), DZF-1B 型真空干燥箱 (上海跃进医疗器械厂)。

地榆 (批号 101102, 四川科伦天然药业有限公司), 地榆皂苷 I (批号 101209, 成都瑞芬思生物科技有限公司); 乙腈 (色谱纯, Fisher 公司), 水 (重蒸水, 自制); 微孔滤头 (0.45 μm, Millipore 公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定量测定方法的建立

2.1.1 地榆总皂苷的测定^[7]

收稿日期: 2011-08-16

作者简介: 苏柘僮 (1984—), 男, 博士, 从事中药生产新技术和新剂型研究。Tel: (028)61800127 E-mail: 175415299@qq.com

*通讯作者 杨明 Tel: (028)61800127 E-mail: yangming16@126.com

(1) 对照品溶液配制: 取 4.85 mg 地榆皂苷 I 于 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇约 9 mL, 超声溶解, 放冷, 加无水乙醇定容至刻度, 即得。

(2) 供试品溶液配制: 取地榆提取液 10 mL, 氮气吹干溶剂, 加无水乙醇约 90 mL 超声溶解, 转移置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容至刻度, 混匀, 0.45 μm 微孔滤头滤过, 即得。

(3) 线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 (0.485 mg/mL) 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 分别加乙醇补足至 1 mL, 精密加入新配制的 8% 香草醛乙醇溶液 (取香草醛 8 g, 用无水乙醇定容至 100 mL) 1 mL, 70% 硫酸 10 mL (取 70 mL 硫酸, 缓缓注入 30 mL 水中, 即得), 摇匀, 密塞, 置 60 °C 水浴 15 min, 冷却 2 min, 摇匀, 以未加对照品的比色液为空白, 照分光光度法 (《中国药典》2010 年版附录 VI B), 在 530 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 以 A 值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程: $A=0.03 C+0.109 7$, $r=0.999 2$, 表明地榆皂苷在 8.08~40.42 μg/mL 线性关系良好。

(4) 样品测定: 精密吸取供试品溶液 1 mL, 置于 10 mL 具塞试管中, 以未加样品的比色液为空白, 照线性关系考察项下方法依法测定 A 值, 代入回归方程计算, 即得。

2.1.2 地榆皂苷 I 的测定^[8]

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (32:68), 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL; 理论塔板数按地榆皂苷 I 峰计不低于 8 000。

(2) 对照品溶液配制: 取 5.25 mg 地榆皂苷 I 于 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇约 9 mL, 超声溶解, 放冷, 加无水乙醇定容至刻度, 即得。

(3) 供试品溶液配制: 同“2.1.1”项。

(4) 专属性: 分别配制空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液, 以上述色谱条件进行试验, 结果表明该方法专属性良好, 各成分和溶剂之间无干扰。

(5) 线性关系考察: 精密吸取上述对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容至刻度, 精密吸取各溶液 10 μL, 照上述色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程: $Y=693 235 X-2 179.1$, $r=0.999 8$, 表明地

榆皂苷 I 在 1.05~5.25 μg 线性关系良好。

2.1.3 药材中地榆总皂苷和地榆皂苷 I 的测定 取地榆药材粉末 0.1 g, 置于 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇约 90 mL 超声提取 30 min, 放冷, 加无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤头滤过, 即得。

按照上述定量测定方法分别对地榆药材进行总皂苷和地榆皂苷 I 测定。

2.2 数据处理

采用 Design Expert 7.1 软件对数据进行分析, 总评归一值 (OD) 采用 Hassan 方法^[9]计算, 转移率采用下列公式计算。

$$\text{转移率} = \frac{\text{提取液中成分量}}{\text{药材中成分量}}$$

2.3 Box-Behnken 设计^[10]

综合相关文献报道以及前期预试结果, 影响提取工艺的因素主要有溶媒用量 (X₁)、乙醇体积分数 (X₂)、提取时间 (X₃)。因此, 以这 3 个因素为主要影响因素, 以总皂苷转移率 (Y₁)、地榆皂苷 I 转移率 (Y₂)、OD (Y₃) 为评价指标进行试验设计, 因素水平见表 1。

分别取 17 份地榆药材饮片 (直径小于 2 cm) 各 30 g, 置于闪式提取器中, 电动调节闪式提取器

表 1 Box-Behnken 设计及结果
Table 1 Box-Behnken design and results

编号	因素			Y ₁ / %	Y ₂ / %	Y ₃
	X ₁ / 倍	X ₂ / %	X ₃ / min			
1	8 (0)	60 (0)	2 (0)	75.16	82.39	0.79
2	8 (0)	40 (-1)	3 (1)	65.78	69.47	0.47
3	6 (-1)	80 (1)	2 (0)	70.69	78.29	0.67
4	10 (1)	80 (1)	2 (0)	80.16	85.38	0.90
5	8 (0)	60 (0)	2 (0)	72.57	78.36	0.69
6	8 (0)	80 (1)	3 (1)	82.94	90.11	1.00
7	8 (0)	60 (0)	2 (0)	77.45	80.14	0.78
8	8 (0)	40 (-1)	1 (-1)	53.47	60.17	0.18
9	6 (-1)	60 (0)	3 (1)	60.22	66.28	0.36
10	6 (-1)	60 (0)	1 (-1)	47.81	57.46	0.06
11	10 (1)	40 (-1)	2 (0)	55.25	63.58	0.25
12	6 (-1)	40 (-1)	2 (0)	46.58	54.17	0.00
13	8 (0)	80 (1)	1 (-1)	68.84	75.11	0.60
14	10 (1)	60 (0)	1 (-1)	62.17	68.33	0.41
15	8 (0)	60 (0)	2 (0)	71.28	80.59	0.71
16	10 (1)	60 (0)	3 (1)	80.21	87.14	0.92
17	8 (0)	60 (0)	2 (0)	76.89	85.45	0.85

高度以及各种参数以适应本实验要求,按上述 Box-Behnken 设计因素水平表进行试验,结果见表 1。

2.4 模型拟合

按照 Box-Behnken 设计要求,实验模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程可以表达为 $Y=A_0+\sum A_i X_i+\sum A_{ii} X_i^2+\sum A_{ij} X_i X_j$, 其中 Y 为效应值, A_0 、 A_i 、 A_{ii} 、 A_{ij} 为方程系数, X_i 、 X_j ($i=1, 2, 3, i \neq j$) 为自变量真实值。二次多项式模型方程拟合的性质由确定系数 (R^2) 表达,其统计学上的显著性由 F 值检验。以 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 3 个评价指标分别对各因素(自变量)进行二次多项式模型方程拟合。

$Y_1=74.6+6.56 X_1+10.19 X_2+7.11 X_3+0.20 X_1 X_2+1.41 X_1 X_3+0.45 X_2 X_3-8.33 X_1^2-3.17 X_2^2-3.74 X_3^2$ ($R^2=0.953 8$, $P<0.01$, 失拟度=0.146 0>0.05)

$Y_2=81.39+6.03 X_1+10.19 X_2+6.49 X_3-0.58 X_1 X_2+2.50 X_1 X_3+1.43 X_2 X_3-7.47 X_1^2-3.56 X_2^2-4.11 X_3^2$ ($R^2=$

0.963 0, $P<0.01$, 失拟度=0.2535>0.05)

$Y_3=0.76+0.17 X_1+0.28 X_2+0.19 X_3-0.01 X_1 X_2+0.05 X_1 X_3+0.03 X_2 X_3-0.22 X_1^2-0.09 X_2^2-0.11 X_3^2$ ($R^2=0.962 1$, $P<0.01$, 失拟度=0.136 6>0.05)

结果显示,3 个模型方程高度显著 ($P<0.01$),与实际试验拟合较好,且各方程 $R^2>0.95$,模型预测值与实测值之间具有高度的相关性,模型失拟度没有显著性差异,说明该方程能充分反映实际情况。

2.5 效应面优化预测及验证

2.5.1 提取工艺预测 根据二次多项式模型方程拟合结果,作出 OD 值的效应曲面图,由图 1 可知, X_1 对转移率影响更大, X_1 和 X_3 有一定交互作用, X_1 和 X_2 交互作用微弱。根据效应面预测 3 个因素较佳范围为 $X_1: 8 \sim 10$ 、 $X_2: 70 \sim 80$ 、 $X_3: 2 \sim 3$ 。以 OD 值对最佳工艺进行预测,结果 $X_1=8.66$ 、 $X_2=76.19$ 、 $X_3=2.16$, 求其总评归一值为 0.999。

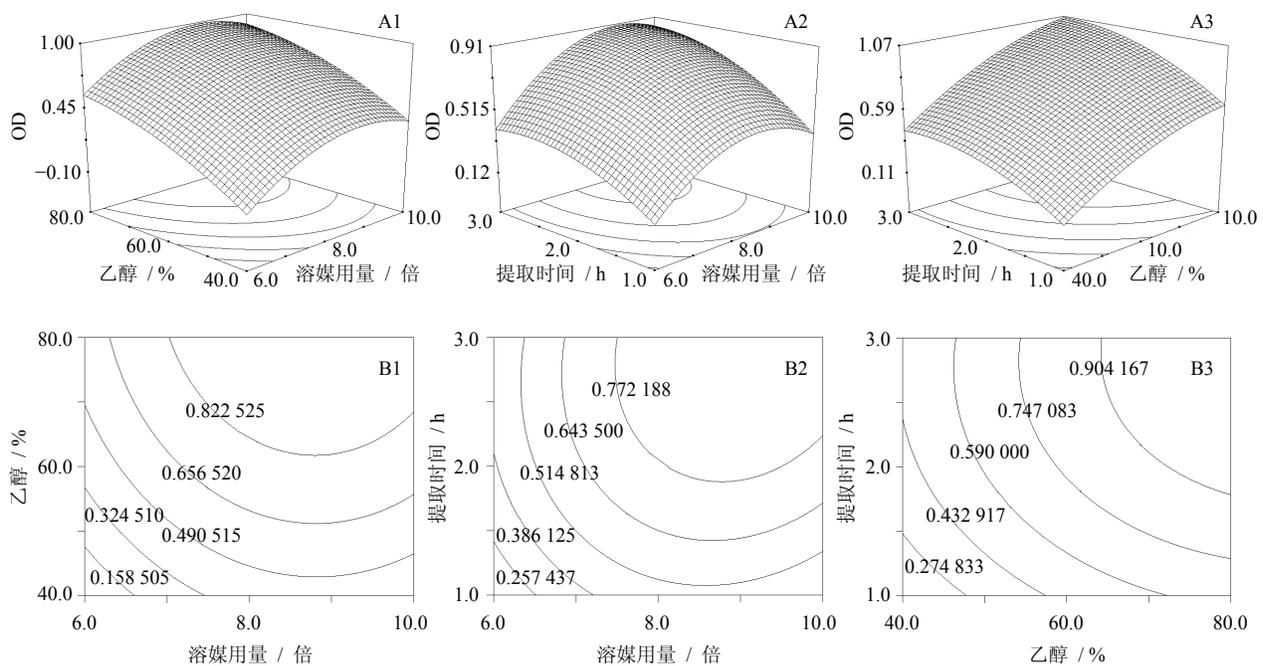


图 1 (X_1 和 X_2 , 1)、(X_1 和 X_3 , 2)、(X_2 和 X_3 , 3) 对 OD 值影响的效应面图 (A) 和等高线 (B)

Fig. 1 Response surface figure (A) and contour figure (B) of (X_1 and X_2 , 1), (X_1 and X_3 , 2), and (X_2 and X_3 , 3) influence on OD

2.5.2 提取工艺验证 为了验证模型与试验结果是否相符,通过进一步试验对模型的可靠性进行验证,在验证试验中,考虑到操作可行性,各因素取整数值,溶媒用量 9 倍、乙醇体积分数 75%、提取时间 2 min,根据模型计算出转移率 $Y_1=81.81\%$ 、 $Y_2=87.96\%$,以此因素组合进行 3 组验证试验,结果实测平均值为:转移率 $Y_1=82.20\%$ 、 $Y_2=88.73\%$,RSD 为 1.59%、2.72%,与模型预测值非常接近,说明该

模型比较可靠,故最佳提取工艺为溶媒用量 9 倍、乙醇体积分数 75%、提取时间 2 min。

3 讨论

本实验采用闪式提取法制备地榆皂苷,其有效成分的转移率可达 88%,提取基本完全,且提取时间缩短至 2 min。这是因为闪式提取技术具有快速、高效、不加热等特点,其刀头在电机带动下高速旋转,使整个提取液和药材处在一个高速动态的环境

之中, 内外刀之间不仅产生产生强大的剪切作用使药材组织粉碎, 同时外刀腔内产生强大的负压, 在这种负压的作用下, 外刀腔内外发生分子渗透现象, 既通过破碎而充分暴露的物质分子(被提取成分)在负压, 剪切, 高速碰撞等各种外力作用下被溶剂分子包围, 解析、溶解, 然后迅速进入溶剂中, 瞬间达到溶剂浓度的平衡, 在数秒内快速完成提取过程^[6]。因此, 与传统加热回流提取、煎煮提取等方法相比, 闪式提取可有效保证地榆皂苷类成分从药材中转移完全, 不会由于长时间受热而损失。

此外, 本实验采用 Box-Behnken 设计, 其充分考虑到各因素的交互作用, 设计方法简单, 试验次数少, 在中心点进行重复试验以提高试验精度, 同时采用非线性模型拟合, 可信度较好, 预测值更接近真实值。与正交及均匀设计相比, 此方法所得结果更加直观, 便于分析。研究结果表明, 最佳提取工艺为: 溶媒用量 9 倍、乙醇体积分数 75%、提取时间 2 min, 转移率可达 $Y_1=82.20\%$ 、 $Y_2=88.73\%$, 其快速(2 min)、高效(基本转移完全)的提取效能进一步揭示地榆皂苷的闪式提取工艺的科学、合理、可行。综上, 本研究为地榆皂苷提取工艺提供了参考, 为下一步地榆制剂研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 夏红旻, 孙立立, 孙敬勇, 等. 地榆化学成分及药理活性研究进展 [J]. 食品与药品, 2009, 11(7): 67-69.
- [2] 黎俊民. 地榆临证应用分析 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2842.
- [3] 姜贵全, 方桂珍, 李 密. 吉林地区地榆的化学成分分析及评价 [J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(3): 22-23.
- [4] 袁振海, 孙立立. 地榆现代研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(3): 90-92.
- [5] 高小平, 吴建明, 邹文俊, 等. 地榆促造血作用的有效部位筛选 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 137-140.
- [6] 刘振洋, 刘延泽, 刘改岚, 等. 绞股蓝总皂苷的闪式提取和纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1071-1073.
- [7] 王淑敏, 高英霞, 张 英, 等. 妇科止血灵中间体中地榆总皂苷含量测定 [J]. 长春中医学院学报, 2004, 20(4): 42-43.
- [8] 张东方, 袁长季, 祝 峥, 等. HPLC 法测定不同地区地榆中地榆苷-I 的含量 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(1): 37-49.
- [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): 530-533.
- [10] 谢 捷, 李红娟, 郑兴宗, 等. 响应面法优化厚朴酚及厚朴酚的闪式提取工艺的研究 [J]. 林产化学与工业, 2010, 30(4): 20-24.