

七叶皂苷 A~D 体外转化规律研究

覃 勤^{1,2}, 叶利春^{1,3}, 李 群², 石召华^{1,2*}, 刘享平¹

1. 武汉爱民制药股份有限公司, 湖北 鄂州 436070

2. 湖北李时珍药物研究院, 湖北 鄂州 436070

3. 湖北李时珍药物研究公司, 湖北 鄂州 436070

摘要:目的 建立 HPLC 法同时测定七叶皂苷 A~D 量的方法, 考察不同因素水平影响下七叶皂苷 A~D 的体外转化规律, 并优化出最佳转化条件, 为调控生产中七叶皂苷 A~D 的比例提供参考。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05%磷酸水溶液(34:66)为流动相, 柱温为 35 ℃, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 200 nm, 外标法定量; 以七叶皂苷 A~D 的转化率及有关物质的量为指标, 通过单因素实验设计, 考察 pH 值、温度、时间 3 个因素对七叶皂苷 A~D 体外转化的影响趋势, 再采用中心组合设计-响应面法优选转化条件, 利用 Design Expert 8.0.5 软件分析预测最佳转化条件并进行验证试验。结果 七叶皂苷 A~D 分别在 0.39~3.49 mg/mL ($r=0.999\ 5$)、0.28~2.55 mg/mL ($r=0.999\ 5$)、0.19~1.67 mg/mL ($r=0.999\ 7$)、0.07~0.59 mg/mL ($r=0.999\ 7$) 与峰面积呈良好的线性关系; 单因素实验表明, pH 值、温度、时间对七叶皂苷 A 和 B、C 和 D 转化率的影响呈现相似的趋势, 在 pH 值 5.0~10.0, 温度 45~85 ℃, 时间 0.25~8 h 时, 七叶皂苷 A、B 部分转化成七叶皂苷 C、D, 其他条件下七叶皂苷 A~D 均转化为有关物质; 中心组合设计-响应面法研究得到最佳转化条件为 pH 值 6.9, 温度 54 ℃, 时间 7.4 h, 在此条件下, 七叶皂苷 C、D 转化率的综合评分为 11.50%, 与预测值的偏差<5%。结论 不同 pH 值、温度、时间影响下, 七叶皂苷 A~D 的体外转化呈现出一定的规律, 响应面法优选出的最佳转化条件稳定可行, 可为调控生产中七叶皂苷 A~D 的比例提供科学的依据。

关键词: 七叶皂苷 A; 七叶皂苷 B; 七叶皂苷 C; 七叶皂苷 D; 转化规律; 单因素实验; 中心组合设计-响应面法; HPLC

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)11-2212-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.010

Study on isomerization law of aescins A, B, C, and D

QIN Qin^{1,2}, YE Li-chun^{1,3}, LI Qun², SHI Zhao-hua^{1,2}, LIU Xiang-ping¹

1. Wuhan Aimin Pharmaceutical Co., Ltd., Ezhou 436070, China

2. Lishizhen Institute of Natural Medicine, Ezhou 436070, China

3. Lishizhen Pharmaceutical Co., Ltd., Ezhou 436070, China

Abstract: Objective To investigate the isomerization law of aescins A, B, C, and D under different conditions and optimize the isomerization process. **Methods** Using the conversion of aescin C and D, and the content of impurity as index, single factor experiment was applied to evaluate the effect trends of isomerization from three parameters including pH value, reaction temperature and time. Then, central composite design-response surface method was used to estimate the relationship between the dependent and independent variables and to validate the optimal conditions. **Results** According to the single factor experiment, the effect trends of three parameters on conversion of aescins C and D were analogous, and the isomerization happened under the conditions as follows: pH value of 5.0—10.0, reaction temperature of 45—85 ℃, and reaction time of 0.25—8 h. Based on the central composite design, the optimal conditions were predicted as follows: pH value was 6.9, reaction temperature was 54 ℃ and reaction time was 7.4 h. Under such conditions, the experimental values showed on significant difference from the predicted values. **Conclusion** The isomerization of aescins A, B, C, and D could show a certain law under different conditions, and the optimal isomerization process is stable and available, which could provide a scientific basis of regulating the proportion of aescins A, B, C, and D during industrial production.

收稿日期: 2017-01-18

基金项目: 国家“十二五”重大新药创制科技重大专项经费资助项目(2014ZX09201-022-03); 湖北省重大科技创新专项经费资助项目(2013ACC005)

作者简介: 覃 勤(1991—), 女, 硕士, 主要从事中药质量研究。Tel: 15071086133 E-mail: whimyf_qq@163.com

*通信作者 石召华(1978—), 男, 博士, 高级工程师。E-mail: whimyf@163.com

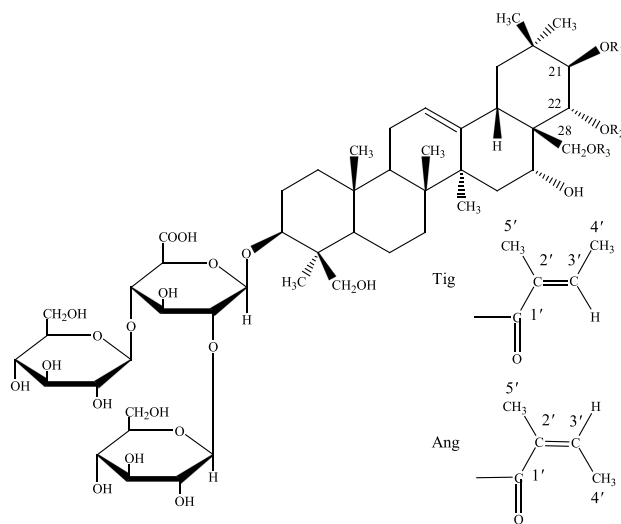
Key words: aescin A; aescin B; aescin C; aescin D; isomerization; single factor experiment; central composite design-response surface method; HPLC

七叶皂苷 (aescin) 是从七叶树科植物欧马栗 *Aesculus hippocastanum* L. 或中药娑罗子 *Aesculus wilsonii* Rehd. 的干燥成熟果实中提取得到的一类有效成分, 属于三萜皂苷类化合物, 其主要成分按 HPLC 出峰前后顺序分别为七叶皂苷 A~D (AA~AD) [1-2], 这 4 种化合物互为同分异构体, 根据乙酰基结合位置的不同, 这 4 种化合物可分为 2 种构型, 即 β 构型 (AA、AB) 和 α 构型 (AC、AD), 结构见图 1。由于七叶皂苷本身不溶于水, 而其钠盐具有很好的水溶性, 因此, 临床上使用的制剂多以七叶皂苷钠的形式存在 [3]。七叶皂苷钠具有显著的抗炎、抗渗出、消除肿胀以及静脉保护作用, 临床上主要用于各种原因引起的脑水肿及创伤、静脉回流障碍性疾病的治疗 [4-8]。在一定的条件下, AA、AB 分别向 AC、AD 转化, 当它们的比例不同时, 其抗炎活性和毒性不同 [9], 因此, 生产中需要控制 AA~AD 的比例, 从而确保产品的质量。已有研究表明, 在 100 °C 水中直接加热 [10], 或用 0.1% NaOH 调节至 pH 值 6.0~6.9 后在 60~90 °C 加热 [11], β -七叶皂苷可以转化成 α -七叶皂苷。另有研究表明, pH 值是导致 β -七叶皂苷向 α -七叶皂苷转化的主要因素 [12]。为了系统地研究 AA~AD 的体外转化规律, 本实验在已有文献报道的基础上 [10-12], 选择 pH 值、温度、时间为考察因素, 通过单因素实验及中心组合设计-响应面法 (CCD-RSM) 试验 [13] 来阐明 AA~AD 的体外转化规律并优化出最佳的转化条件, 为调控生产中 AA~AD 的比例提供参考。

1 仪器与材料

FE20 Five Easy pH 计, 梅特勒托利多仪器公司; Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 戴安公司; AB 265-S 电子分析天平, 梅特勒托利多仪器公司; KQ-500B 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; Design-Expert 8.0.5 试验设计软件, 卡贝信息技术有限公司。

七叶皂苷钠原料药, 含 AA~AD 分别为 27.69%、23.75%、20.15%、14.17%, 批号 140104, 武汉爱民制药有限公司; 七叶皂苷钠对照品, 含 AA~AD 分别为 38.8%、28.3%、18.5%、6.5%, 批号 100346-200402, 中国食品药品检定研究院; 磷酸、盐酸、氢氧化钠, 分析纯, 国药集团化学试剂



化合物	R ₁	R ₂	R ₃
AA	巴豆酰基 (Tig)	-COCH ₃	-H
AB	当归酰基 (Ang)	-COCH ₃	-H
AC	巴豆酰基 (Tig)	-H	-COCH ₃
AD	当归酰基 (Ang)	-H	-COCH ₃

图 1 七叶皂苷 A~D 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of aescins A—D

有限公司; 乙腈, 色谱纯, 美国天地公司; 娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定 AA~AD

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 200 nm; 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液 (34:66)。理论板数按 AA~AD 峰计算均不低于 5 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 取七叶皂苷钠对照品约 250 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶内, 加水超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得含 AA 0.97 mg/mL、AB 0.71 mg/mL、AC 0.46 mg/mL、AD 0.16 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取七叶皂苷钠原料药约 62.5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶内, 加水超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 用孔径为 0.22 μm 的水系微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液 1.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、

9.0 mL, 置 10 mL 量瓶内, 加水稀释至刻度, 摇匀。精密吸取上述系列对照品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y), 以对照品质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得 AA 回归方程 $Y=1\,549.4X+4.056\,2$, $r=0.999\,5$, 线性范围 0.39~3.49 mg/mL; AB 回归方程 $Y=2\,124\,X+4.041\,6$, $r=0.999\,5$, 线性范围 0.28~2.55 mg/mL; AC 回归方程 $Y=5\,732.6X+16.869$, $r=0.999\,7$, 线性范围 0.19~1.67 mg/mL; AD 回归方程 $Y=2\,626.2X+10.493$, $r=0.999\,7$, 线性范围 0.07~0.59 mg/mL。

2.1.5 精密度试验 取同一份对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μ L, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算精密度。AA~AD 峰面积的 RSD 依次为 1.25%、1.34%、1.01%、1.00%, 均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取七叶皂苷钠原料药, 按“2.1.3”项下制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算质量分数。结果 AA~AD 质量分数的 RSD 依次为 1.75%、1.84%、1.11%、1.10%, 均小于 2%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积。结果 AA~AD 峰面积的 RSD 依次为 0.58%、0.65%、0.73%、1.02%, 均小于 2%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取七叶皂苷钠原料药, 加入一定量对照品 (样品中各物质质量的 80%、100%、120%), 按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算加样回收率。结果 AA~AD 的平均回收率分别为 98.30%、97.58%、99.21%、98.69%, RSD 分别为 1.28%、1.30%、1.80%、1.75%, 表明本方法的准确度良好。

2.1.9 AA~AD 转化率的测定 各样品按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算 AA~AD 的量, 并按下式计算 AA~AD 的转化率。

转化率 = (反应后物质的质量 - 反应前物质的质量) / 反应前物质的质量

2.2 单因素实验

以 AA~AD 转化率为指标, 考察 pH 值、温度、时间 3 个因素对 AA~AD 体外转化的影响趋势, 为响应面试验中因素及水平的选择提供依据。

2.2.1 pH 值对 AA~AD 体外转化的影响 取七叶皂苷钠原料药适量加水溶解, 分别调节溶液 pH 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0, 定容至 25 mL, 溶液终质量浓度约 2.5 mg/mL, 在 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴条件下反应, 分别于 6 h 定时取样并用冰水降至室温, 经 0.22 μ m 水系微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 根据“2.1.8”项下方法计算不同 pH 值条件反应后 AA~AD 的转化率, 结果见表 1。如表 1 所示, pH 值对 AA 和 AB、AC 和 AD 转化率的影响呈现相似的趋势, 即随着 pH 值增大, AA、AB 均为负向转化, 且转化率先减小后增大; 而 AC、AD 的转化先由负向变为正向, 再由正向变为负向, 且 $0 \leq \text{pH 值} \leq 5$, 负向转化率减小; $6 \leq \text{pH 值} \leq 9$, 正向转化率增大; $10 \leq \text{pH 值} \leq 14$, 负向转化率增大, 表明 $6 \leq \text{pH 值} \leq 9$ 时, AA 和 AB 部分转化为 AC 和 AD, 而其他 pH 值条件下, AA~AD 均转化为其他有关物质, 故选择 pH 值 5.0~10.0 为进一步优化范围。

2.2.2 温度对 AA~AD 体外转化的影响 取七叶皂苷钠原料药适量加水溶解, 定容至 25 mL, 溶液终质量浓度约 2.5 mg/mL, 分别在 25、35、45、55、65、75、85、95 $^{\circ}$ C 恒温水浴条件下反应, 分别于 6

表 1 pH 值对 AA~AD 转化率的影响

Table 1 Effects of pH value on conversion of aescins A—D

pH 值	转化率/%			
	AA	AB	AC	AD
0	-67.60	-56.08	-48.97	-37.94
1	-17.66	-18.51	-9.24	-9.84
2	-8.03	-8.21	-15.89	-5.71
3	-7.79	-7.68	-0.07	1.74
4	-5.96	-5.08	-2.15	-0.53
5	-2.64	-2.43	-3.01	-2.75
6	-2.78	-2.30	3.45	4.35
7	-24.12	-27.36	5.72	18.81
8	-28.42	-32.57	3.81	18.74
9	-33.57	-37.51	6.61	28.43
10	-59.17	-58.36	-27.30	-12.93
11	-80.31	-77.54	-65.64	-60.22
12	-100.00	-100.00	-100.00	-100.00
13	-100.00	-100.00	-100.00	-100.00
14	-100.00	-100.00	-100.00	-100.00

h 定时取样并用冰水降至室温, 经 0.22 μm 水系微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 根据“2.1.8”项下方法计算不同温度条件反应后 AA~AD 的转化率, 结果见表 2。如表 2 所示, 温度对 AA 和 AB、AC 和 AD 转化率的影响呈现相似的趋势, 即随着温度的升高, AA、AB 均为负向转化, 且转化率递增; 而在 25~45 $^{\circ}\text{C}$ 时, AC、AD 几乎无转化, 但在 45~95 $^{\circ}\text{C}$ 时, 随着温度升高, 正向转化率先增大后减小甚至变为负向转化, 表明在 45~85 $^{\circ}\text{C}$ 时, AA 和 AB 部分转化为 AC 和 AD, 而其他 pH 值条件下, AA~AD 均转化为其他有关物质, 故选择温度 45~85 $^{\circ}\text{C}$ 为进一步优化范围。

表 2 温度对 AA~AD 转化率的影响
Table 2 Effects of temperature on conversion of aescins A—D

温度/ $^{\circ}\text{C}$	转化率/%			
	AA	AB	AC	AD
25	-0.15	0.69	-0.04	-0.51
35	-2.65	-1.98	-1.82	-1.17
45	-2.06	-1.97	-0.35	0.12
55	-2.48	-3.00	0.31	0.98
65	-6.24	-6.30	1.34	3.63
75	-11.82	-7.58	0.98	6.36
85	-19.66	-23.68	2.44	14.91
95	-28.97	-33.24	-3.72	12.90

2.2.3 时间对 AA~AD 体外转化的影响 取七叶皂苷钠原料药适量加水溶解, 定容至 25 mL, 溶液终质量浓度约 2.5 mg/mL, 在 75 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴条件下反应, 分别于 0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 定时取样, 用冰水降至室温, 经 0.22 μm 水系微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 根据“2.1.8”项下方法计算不同时间反应后 AA~AD 的转化率, 结果见表 3。如表 3 所示, 时间对 AA 和 AB、AC 和 AD 转化率的影响呈现相似的趋势, 即随着时间的延长, AA、AB 均为负向转化, 且转化率递增; 而 AC、AD 的转化由正向变为负向, 正向转化率先增大后减小, 减小至最低后变为负向转化, 且负向转化率随着时间的延长而增大, 表明在 0.25~8.0 h 时, AA 和 AB 部分转化为 AC 和 AD, 而超过 8.0 h 时, AA~AD 均转化为其他有关物质, 故选择时间 0.25~8.0 h 为进一步优化范围。

表 3 时间对 AA~AD 转化率的影响
Table 3 Effects of time on conversion of aescins A—D

时间/h	转化率/%			
	AA	AB	AC	AD
0.25	-9.70	-11.26	1.77	6.55
0.5	-14.92	-17.12	0.84	11.30
1.0	-23.94	-27.28	-1.90	10.57
2.0	-32.00	-35.69	-1.34	18.43
4.0	-41.10	-43.70	-8.56	14.77
6.0	-44.71	-46.20	-12.77	13.44
8.0	-50.90	-48.50	-18.49	8.15
12.0	-55.94	-52.57	-25.63	-1.10
24.0	-60.15	-57.54	-31.18	-10.74

2.3 CCD-RSM 优化 AA~AD 体外转化最佳条件

2.3.1 响应面优化试验设计 在单因素实验的基础上, 根据 CCD-RSM 试验设计原理^[13], 选取 pH 值 (X_1)、温度 (X_2)、时间 (X_3) 作为考察因素, 以 AC、AD 转化率的综合评分 (Y_1 值) 和有关物质质量分数 (Y_2 值) 作为评价指标, 采用 Design Expert 8.0.5 统计分析软件的响应面分析法安排试验, 以获取最佳转化条件。采用 3 因素 5 水平的响应面分析法进行试验设计, 试验因素水平编码与结果见表 4。

$$\text{综合评分} = \text{AC 转化率} \times 0.5 + \text{AD 转化率} \times 0.5$$

$$\text{有关物质质量分数} = 1 - (\text{AA 的质量分数} + \text{AB 的质量分数} + \text{AC 的质量分数} + \text{AD 的质量分数})$$

2.3.2 回归模型建立及分析 采用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 4 数据进行分析, 以 Y_1 、 Y_2 2 个评价指标分别对各因素 (自变量) 进行多元二次回归拟合, 得到二次多项回归方程为 $Y_1 = 3.66 - 15.69 X_1 - 2.00 X_2 - 1.19 X_3 - 3.04 X_1 X_2 - 2.64 X_1 X_3 - 0.21 X_2 X_3 - 11.11 X_1^2 - 0.22 X_2^2 + 0.49 X_3^2$; $Y_2 = 35.84 + 15.82 X_1 + 4.38 X_2 + 1.90 X_3 - 0.42 X_1 X_2 - 0.57 X_1 X_3 + 0.43 X_2 X_3 + 2.80 X_1^2 - 1.86 X_2^2 - 0.22 X_3^2$ 。对上述回归模型进行方差分析见表 5。

结果表明 2 个模型方程高度显著 ($P < 0.000 1$), 失拟项不显著 ($P > 0.05$), 说明 2 个模型的拟合情况良好, 代表性强, 可用该回归模型对实验结果进行统计分析; 2 个模型的校正决定系数 (R_{adj}) 分别为 0.978 0 及 0.958 3, 均大于 0.95, 说明该实验模型误差较小, 可较好地描述各因素与响应值之间的真实关系; 另外各因素对指标的影响大小依次为 pH 值 > 温度 > 时间, 各因素及其交互项部分显著 ($P <$

表 4 CCD-RSM 试验设计与结果
Table 4 Design and results of CCD-RSM test

试验号	X_1	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/h	质量分数/%				$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
				AA	AB	AC	AD		
1	9.5 (1)	75 (1)	2.0 (-1)	11.75	9.67	14.26	11.94	-22.50	52.38
2	8.0 (0)	65 (0)	7.4 (1.682)	15.40	14.03	17.54	15.66	1.21	37.37
3	8.0 (0)	82 (1.682)	4.0 (0)	13.55	12.17	16.38	15.67	-4.06	42.23
4	9.5 (1)	55 (-1)	2.0 (-1)	12.72	10.56	15.05	13.64	-14.53	48.04
5	9.5 (1)	55 (-1)	6.0 (1)	11.93	9.99	14.46	12.03	-21.68	51.59
6	8.0 (0)	65 (0)	4.0 (0)	15.29	12.58	17.67	15.96	0.17	38.50
7	8.0 (0)	65 (0)	0.6 (-1.682)	16.25	13.49	19.11	16.78	6.64	34.37
8	8.0 (0)	65 (0)	4.0 (0)	15.33	12.82	17.91	16.34	2.10	37.60
9	9.5 (1)	75 (1)	6.0 (1)	10.52	8.68	13.00	10.84	-29.49	56.96
10	6.5 (-1)	55 (-1)	6.0 (1)	23.55	19.90	21.25	16.05	9.37	19.26
11	8.0 (0)	65 (0)	4.0 (0)	14.97	13.09	18.45	16.95	5.61	36.53
12	8.0 (0)	65 (0)	4.0 (0)	15.44	13.55	18.39	16.24	4.69	35.88
13	5.5 (-1.682)	65 (0)	4.0 (0)	25.71	22.33	19.23	14.12	-2.45	18.61
14	6.5 (-1)	75 (1)	2.0 (-1)	23.45	19.62	21.19	16.31	10.16	19.42
15	8.0 (0)	65 (0)	4.0 (0)	16.86	15.10	18.78	16.82	5.96	32.44
16	8.0 (0)	65 (0)	4.0 (0)	16.56	14.59	18.77	16.23	3.84	33.85
17	8.0 (0)	48 (-1.682)	4.0 (0)	22.64	20.23	21.34	15.57	7.90	20.22
18	6.5 (-1)	75 (1)	6.0 (1)	19.18	15.84	20.41	17.60	12.72	26.98
19	10.5 (1.682)	65 (0)	4.0 (0)	8.63	5.74	9.17	6.22	-55.30	70.24
20	6.5 (-1)	55 (-1)	2.0 (-1)	26.61	23.30	21.04	14.95	4.94	14.10

表 5 模型回归方程方差分析
Table 5 ANOVA for regression equation 1

来源	自由度	Y_1				Y_2			
		均方	离差平方和	F 值	P 值	均方	离差平方和	F 值	P 值
模型	9	5 388.95	598.77	94.99	<0.000 1**	3 915.16	435.02	49.45	<0.000 1**
X_1	1	3 361.89	3 361.89	533.32	<0.000 1**	3 417.60	3 417.60	388.53	<0.000 1*
X_2	1	54.67	54.67	8.67	0.014 7*	261.55	261.55	29.73	0.000 3**
X_3	1	19.41	19.41	3.08	0.109 8	49.10	49.10	5.58	0.039 8*
X_1X_2	1	74.12	74.12	11.76	0.006 5**	1.39	1.39	0.16	0.699 7
X_1X_3	1	55.81	55.81	8.85	0.013 9*	2.63	2.63	0.30	0.596 3
X_2X_3	1	0.37	0.37	0.06	0.814 6	1.47	1.47	0.17	0.691 2
X_1^2	1	1 777.73	1 777.73	282.01	<0.000 1**	113.26	113.26	12.88	0.004 9**
X_2^2	1	0.69	0.69	0.11	0.747 5	50.04	50.04	5.69	0.038 3*
X_3^2	1	3.46	3.46	0.55	0.475 9	0.70	0.70	0.08	0.782 9
残差	10	63.04	6.30			87.96	8.80		
失拟项	5	38.27	7.65	1.54	0.322 4	61.80	12.36	2.36	0.183 6
纯误差	5	24.77	4.95			26.16	5.23		
总和	19	5 451.99				4 003.12			

* $P < 0.05$, 模型或考察因素有显著影响; ** $P < 0.01$, 模型或考察因素有极显著影响

* $P < 0.05$, model or investigation factor with significant effect; ** $P < 0.01$, model or investigation factor with extremely significant effect

0.05), 说明各因素与指标之间不是简单的线性关系, 而是存在一定的交互作用。

2.3.3 响应曲面分析及优化 根据二次多项式模型方程拟合结果, 作出 Y_1 、 Y_2 值的效应面三维图, 结果见图 2。通过 Design-Expert 8.0.5 软件分析得到各因素的最优条件为 $X_1=6.84$, $X_2=53.6$, $X_3=7.36$, 即 pH 值为 6.84, 反应温度为 53.6 °C, 反应时间为

7.36 h。在此条件下 Y_1 的预测值为 11.69%, Y_2 的预测值为 20.00%。另外, 通过 Design-Expert 8.0.5 软件分析得到 Y_1 的最佳范围为 8.60%~11.69%, Y_2 的最佳范围为 15.01%~20.00%; 对应的 X_1 最佳范围为 6.49~7.59, X_2 最佳范围为 48.2~81.8 °C, X_3 最佳范围为 0.64~7.36 h。

2.3.4 验证试验 为验证模型的可靠性及有效性,

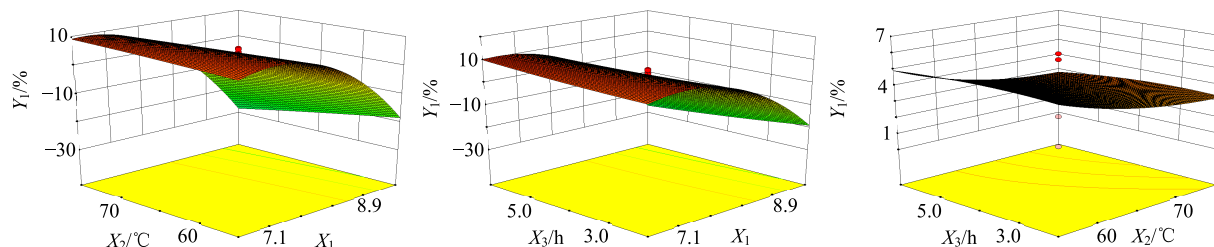


图 2 各因素对响应值 Y_1 影响的三维效应面图

Fig. 2 3D Response surface plot for effects of each factor on response value

需对预测的最佳转化条件进行验证。考虑实际操作的可性, 将验证条件修正为 pH 值 6.9, 反应温度 54 °C, 反应时间 7.4 h。按此条件进行反应, 平行操作 3 次, 结果转化后 AA、AB、AC、AD 的质量分数分别为 (22.31±0.12) %、(18.85±0.25) %、(21.43±0.07) %、(16.53±0.04) %, 计算得到 Y_1 和 Y_2 的实测值分别为 (11.50±0.08) %、(20.88±0.30) %, 与预测值的偏差 [偏差=(预测值-实测值)/预测值] 绝对值低于 5%, 如表 6 所示, 说明验证值与回归方程预测值吻合较好, 且该工艺稳定可行, 对实际工业生产中 AA、AB、AC、AD 的比例调控具有一定的指导意义。

3 讨论

3.1 AA~AD 之间的转化

AA~AD 互为同分异构体, 分子结构极其相似, 根据乙酰基结合位置的不同, 这 4 种化合物可

分为 2 种构型, 即 β 构型(AA、AB)和 α 构型(AC、AD)。 β -七叶皂苷与 α -七叶皂苷之间的转化属于异构化过程, 即分子内乙酰基从 C-22 (或 C-28) 位转移至 C-28 (或 C-22) 位上。这种转化的机制可能是因为 C-22 (或 C-28) 位的羟基受到酯羰基的亲核攻击, 从而使 C-28 (或 C-22) 位上的乙酰基转移到 C-22 (或 C-28) 位羟基上, 留下的阴离子基团质子化, 从而完成 β -七叶皂苷与 α -七叶皂苷之间的转化。吴秀君^[12]研究发现, β -七叶皂苷向 α -七叶皂苷转化的程度远高于反向转化的程度, 原因可能是 α -七叶皂苷中存在巴豆酰基或当归酰基, 使得 C-22 位羟基的空间位阻增大, 从而不易受到亲核攻击, 因而使得乙酰基的转移较难发生。故在七叶皂苷钠混合物中, 仅仅表现出 β -七叶皂苷向 α -七叶皂苷的转化。

3.2 不同组成比例的七叶皂苷钠与其生物活性之间的关系

薛云丽等^[9]通过比较 4 组不同比例的七叶皂苷钠样品的抗炎及毒性作用, 发现当 AA、AB、AC、AD 的比例不同时, 其活性和毒性不同; AA 和 AB 的质量分数越高, 活性越好, 但毒性越大; 综合活性与毒性实验, 4 组样品中最佳批次的七叶皂苷钠中 AA~AD 的质量分数分别是 33.3%、21.9%、24.2%、12.4%。此研究仅考察了 4 组不同比例的七叶皂苷钠样品, 并未得到最佳的比例范围, 因此后期研究可在本研究的基础上, 通过稳定转化得到一系列不同比例的七叶皂苷钠, 并进行活性及毒性实验, 从而系统研究不同组成比例的七叶皂苷钠与其

表 6 验证试验结果 ($n=3$)

Table 6 Results of verification test ($n=3$)

项目	质量分数/%				Y_1 /%	Y_2 /%
	AA	AB	AC	AD		
实测值 1	22.27	18.95	21.49	16.49	11.50	20.80
实测值 2	22.43	18.99	21.36	16.56	11.44	20.66
实测值 3	22.22	18.60	21.45	16.54	11.58	21.18
实测值均值	22.31	18.85	21.43	16.53	11.50	20.88
预测值/%					11.69	20.00
偏差/%					1.62	-4.41

生物活性之间的关系, 得到 AA~AD 的最佳比例范围。

3.3 优化设计方法的选择

在工业生产七叶皂苷钠的过程中, 很多因素会影响 AA~AD 的转化, 本实验选择影响较为显著的 3 个因素, 即 pH 值、温度、时间, 通过单因素实验及 CCD-RSM 试验来阐明 AA~AD 的体外转化规律并优化出最佳的转化条件。考虑到这 3 个因素皆为连续性变量, 对于变量为连续性的多因素试验分析, 响应面法已被广泛应用^[14-15]。CCD-RSM 能够克服正交设计、均匀设计试验次数多、精确度不高且预测性较差的缺点, 通过非线性模型拟合来预测最佳实验条件, 它既能考察各个自变量对因变量的影响, 又能考察各自变量之间的交互作用, 同时还能做出相应的三维因变量曲面图, 对自变量与因变量的关系进行直观的量化分析, 因此 CCD-RSM 相比其他优化设计具有准确性高, 优选条件预测性好的优点, 是解决实际问题的有效手段^[16-17]。

3.4 优化设计中评价指标的选择

由于 AA~AD 在相互转化的过程中, AA 和 AB 部分转化成 AC 和 AD, 亦有部分转化成 AA~AD 之外的化合物, 即有关物质, 因此选择 AC、AD 的转化率为考察指标足以反映四者的转化规律; 另外, AC、AD 的转化具有相同的趋势, 为了简化考察指标, 将 AC、AD 的转化率进行综合评分, 二者的权重系数均为 0.5, 即综合评分=AC 转化率 $\times$ 0.5+AD 转化率 $\times$ 0.5。

考虑到 AA~AD 在相互转化的过程中, 有部分会转化成有关物质, 而有关物质的质量分数增加会导致药物的安全性和有效性发生变化, 故在转化过程中需控制有关物质的质量分数; 另外, 不同批次的七叶皂苷钠原料药中有关物质的质量分数存在差异, 无法定其范围, 故本研究选择控制其质量分数在转化后不超过 5%为宜。综上所述, 选择 Y_1 值为主要效应值, 以其最大值为优, 并以 Y_2 值为非主要效应值, 控制其不超过 5%, 最终以二者的交叉结果确定最佳条件。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [2] 刘立东. 七叶皂苷主要活性成分的药代动力学研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [3] 胡霞敏, 曾繁典. β -七叶皂苷钠在脑缺血再灌注大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(7): 828-831.
- [4] 万贵平, 张真真, 蔡雪婷, 等. 七叶皂苷钠抑制人白血病 Jurkat 细胞增殖的机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 106-110.
- [5] 侯广平. 七叶皂苷钠的主要临床应用研究现状 [J]. 中国药师, 2006, 9(1): 57-58.
- [6] 梅珊珊, 宋海庆, 丁建平, 等. 七叶皂苷钠的不良反应及防治 [J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(24): 8289-8291.
- [7] 刘超群. β -七叶皂苷钠对 SSST 大鼠脑水肿、血脑屏障及 AQP-4 的影响 [D]. 嘉义: 南华大学, 2014.
- [8] 王永峰. 七叶皂苷钠联合尿激酶和地塞米松治疗结核性脑膜炎的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(10): 1644-1647.
- [9] 薛云丽, 侯金玲, 王 芑, 等. 不同组成比例的七叶皂苷钠抗炎作用及急性毒性研究 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(5): 305-307.
- [10] Sirtori C R. Aescine: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 44(3): 183-193.
- [11] Wolfgang S, Josef W. Process of producing a water soluble horse chestnut saponin of low hemolytic activity and product: USA, US3.450.691 [P]. 1969-06-17.
- [12] 吴秀君. 七叶皂苷四种异构体的药代动力学及相互转化研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [13] 姜 雯, 何承辉, 薛桂蓬, 等. Box-Behnken 中心组合设计优化复方一枝蒿滴丸成型工艺 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1134-1140.
- [14] 张南生, 郭 虹, 孙卫军, 等. Box-Behnken 试验设计法优化人参皂苷 Rg_3 自乳化释药系统和质量评价 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3500-3506.
- [15] 陈 敬, 温庆果, 刘 韶, 等. 正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2183-2188.
- [16] 赵 磊, 张启丽, 汪 洁, 等. 中心组合设计-响应面法优化新大黄牡丹汤提取工艺 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1265-1268.
- [17] 李劲薇, 刘中兵, 钟志容, 等. 中心组合设计在阿司匹林软膏处方优化中的应用 [J]. 中国药学杂志, 2012, 49(7): 578-582.