

失效模式分析和星点设计-效应面法优化熟三七皂苷类成分纯化工艺

胡玉飘¹, 崔秀明^{1,2,3}, 张泽君¹, 陈丽娟¹, 于未博¹, 熊吟^{1,2,3*}

1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

2. 昆明理工大学 云南省三七重点实验室, 云南 昆明 650500

3. 昆明理工大学 国家中医药管理局三七资源可持续利用实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 优化熟三七中皂苷类成分的大孔吸附树脂纯化工艺。方法 通过失效模式分析(FMEA)筛选纯化工艺的主要影响因素, 采用星点设计-效应面法(CCD-RSM), 以皂苷类成分的回收率和质量分数为评价指标, 对大孔吸附树脂纯化工艺进行优选。实验中以5个主要影响因素(上柱液质量浓度、上样体积、水洗体积、乙醇体积分数、乙醇洗脱体积)考察了熟三七皂苷类成分的纯化工艺。结果 以大孔吸附树脂为纯化工艺, 优化工艺为当上柱液质量浓度为11.22 mg/mL, 上样体积为4.97 BV, 水洗体积为2 BV, 乙醇体积分数为70%, 乙醇洗脱体积为3.31 BV时, 可获得最大的皂苷回收率(82.81%)和皂苷质量分数(77.24%)。结论 优化的纯化工艺简单、稳定, 熟三七皂苷类成分回收率和质量分数均较高, 具有一定的实用价值。

关键词: 熟三七; 皂苷类成分; 大孔吸附树脂; 失效模式分析; 星点设计-效应面法; 纯化工艺; 回收率

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-3009-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.009

Optimization of purification process of saponins in steamed *Panax notoginseng* by failure mode and effects analysis and central composite design-response surface methodology

HU Yu-piao¹, CUI Xiu-ming^{1,2,3}, ZHANG Ze-jun¹, CHEN Li-juan¹, YU Wei-bo¹, XIONG Yin^{1,2,3}

1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

2. Yunnan Key Laboratory of Panax Notoginseng, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

3. Laboratory of Sustainable Utilization of Panax Notoginseng Resources State Administration of Traditional Chinese Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To optimize the purification technology of saponins in steamed *Panax notoginseng* with macroporous resin. **Methods** The main factors affecting the purification process were screened by failure mode and effects analysis (FMEA). The purification method with macroporous resin was optimized by central combination design-response surface method (CCD-RSM) based on the recovery and purity of saponins. In this experiment, the concentration of sample solution, loading volume, washing volume, ethanol concentration, and ethanol elution volume were used to investigate the purification of saponins in steamed *P. notoginseng*. **Results** The optimized purification process with macroporous resin was as follows: maximum recovery (82.81%) and purity (77.24%) of saponins were obtained with the concentration of saponin solution of 11.22 mg/mL, loading volume of 4.97 BV, washing volume of 2 BV, ethanol concentration of 70%, and ethanol elution volume of 3.31 BV. **Conclusion** The optimized purification process based on FMEA and CCD-RSM is convenient and stable, with high recovery and purity of saponins, which has a certain practical value.

Key words: steamed *Panax notoginseng*; saponins; macroporous resin; failure mode and effects analysis; central combination design-response surface method (CCD-RSM); purification process; recovery rate

收稿日期: 2018-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 三七“生打熟补”效用关联的物质基础及个体化质控方法研究(81660661)

作者简介: 胡玉飘(1992—), 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及质量评价研究。Tel: 13064220717 E-mail: 951079823@qq.com

*通信作者 熊吟, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础及质量评价研究。E-mail: yhsiung@163.com

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎^[1]。其素有“生打熟补”之说,“生打”是指生三七具有活血化瘀、消炎镇痛、止血的功效,而“熟补”是指熟三七具有理气补血、强身健体之功^[2]。已有研究表明,皂苷类成分是三七的主要活性成分,其在炮制过程中种类和含量的变化是导致生、熟三七药效差异的主要原因^[3-6]。当前对于三七皂苷类成分的制备工艺研究主要集中在生三七这一来源^[7-9],对熟三七皂苷类成分的纯化工艺研究目前还未见报道。本课题组前期研究发现,生三七经蒸制后,其原有的三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Re 等成分含量会出现不同程度的降低,而其他成分如人参皂苷 Rh₁、Rk₃、Rh₄、20(R)-Rg₃、20(S)-Rg₃ 含量会随着蒸制温度的升高及时间延长而上升^[10],且这些新生成分与熟三七补血、抗氧化等药理活性密切相关^[11]。因此,区分生、熟三七皂苷类成分的应用及活性成分评价指标,采用特异性、适宜的提取纯化技术获取关联熟三七功效的皂苷类成分,对熟三七皂苷类成分及其产品的开发利用具有重要意义。

目前,常用的皂苷类成分纯化技术主要有大孔吸附树脂纯化方法^[12-13],强极性大孔吸附树脂纯化方法^[14]等,具有简单、操作性强的优点,但同时也受到许多因素的影响与制约,包括环境因素、色谱柱因素、上样因素等等,筛选出对纯化过程起关键影响作用的因素有利于高效、节能地制备熟三七皂苷类成分。失效模式分析(failure mode and effects analysis, FMEA)是一种用来确定潜在失效模式及其原因的分析方法,可以对各种可能的风险进行分析与评估,并根据风险的大小改进产品设计以及生产过程,将其应用到纯化工艺的优化中,能大大节约实验成本,提高生产效率^[15]。星点设计-效应面法(central composite design-response surface methodology, CCD-RSM)^[16]具有实验次数少、精度高、预测性较好的优势,在中药提取、纯化方面具有较广的应用。Zhao 等^[17]和 Yolmeh 等^[18]应用 CCD-RSM 法分别优化了香菇中提取多糖以及胭脂树种子中提取天然色素的提取工艺,但尚未在熟三七皂苷类成分纯化工艺中有应用。本研究首次以《中国药典》2015 年版中三七指标性成分三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁、Rb₁, 活性成分人参皂苷 Re、Rd, 以及熟三七新生成的人参皂苷 Rh₁、Rk₃、Rh₄、20(R)-Rg₃、20(S)-Rg₃ 10 个成分作为指标来优化熟

三七皂苷类成分纯化工艺,采用 FMEA 筛选影响纯化工艺的主要因素,以皂苷类成分的回收率和质量分数为评价指标,通过 CCD-RSM 考察了大孔吸附树脂纯化工艺中的上柱液质量浓度、上样体积、水洗体积、乙醇体积分数、乙醇洗脱体积这 5 个影响因素,优选熟三七皂苷类成分的纯化工艺,以期为熟三七皂苷类成分的开发应用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司; C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),月旭科技(上海)股份有限公司; AL-104 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; DFY-500 型摇摆式高速万能粉碎机,温岭市林大机械有限公司; KQ 5200E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; N-1100 型旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司。

1.2 材料

三七药材购自云南文山,经昆明理工大学崔秀明教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎,依照《中国药典》2015 年版一部相关项下进行检验,全部符合要求。对照品三七皂苷 R₁(批号 wkq16080802),人参皂苷 Rg₁(批号 wkq17030805)、Rb₁(批号 wkq16060402)、Re(批号 wkq16081605)、Rd(批号 wkq16020803)、Rh₁(批号 wkq16081802)、Rk₃(批号 wkq16021803)、Rh₄(批号 wkq17030702)、20(R)-Rg₃(批号 wkqwkq17052403)、20(S)-Rg₃(批号 wkq16081502),购自四川省维克奇生物科技有限公司;各对照品质量分数≥98%;乙腈为色谱纯;其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 FMEA 筛选熟三七皂苷类成分纯化工艺的影响因素

FMEA 对纯化过程中影响因素(图 1)的严重程度、失败概率以及可检测性进行综合评价,三者乘积的计算风险优先数确定纯化工艺影响因素见表 1^[15]。由表 1 可知,计算风险优先数最大数值为 36,因此在对影响因素和实验条件综合考虑的基础上,选择分数大于或等于最大风险优先数一半的 5 个影响因素作为本实验的研究目标,包括上柱液质量浓度(36)、上样体积(24)、水洗体积(18)、乙醇体积分数(24)、乙醇洗脱体积(24)。

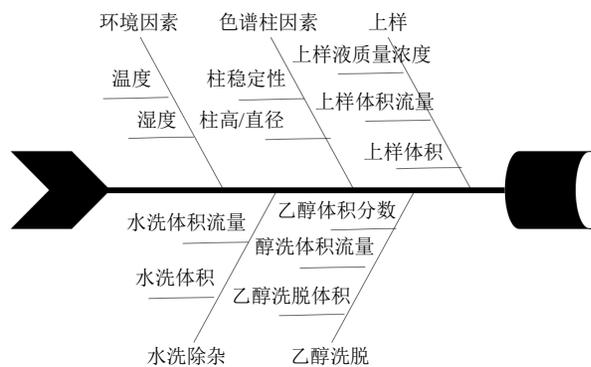


图 1 熟三七皂苷类成分纯化工艺的影响因素

Fig. 1 Influence factors of purification technology of saponins in steamed *P. notoginseng*

表 1 FMEA 对纯化过程中影响因素的分析

Table 1 Analysis of factors affecting purification process by FMEA

类别	影响因素	严重程度	失败概率	可检测性	计算风险优先数
环境	温度	1	2	1	2
	湿度	1	1	1	1
色谱柱	柱稳定性	3	1	2	6
	柱高/直径	2	3	2	12
上样	上柱液质量浓度	4	3	3	36
	上样体积流量	3	2	2	12
	上样体积	4	2	3	24
水洗除杂	水洗体积流量	1	1	2	2
	水洗体积	3	2	3	18
乙醇洗脱	乙醇体积分数	4	3	2	24
	醇洗体积流量	3	2	2	12
	乙醇洗脱体积	4	2	3	24

2.2 评价指标的筛选与计算

本实验拟采用皂苷质量分数和皂苷回收率作为评价指标。

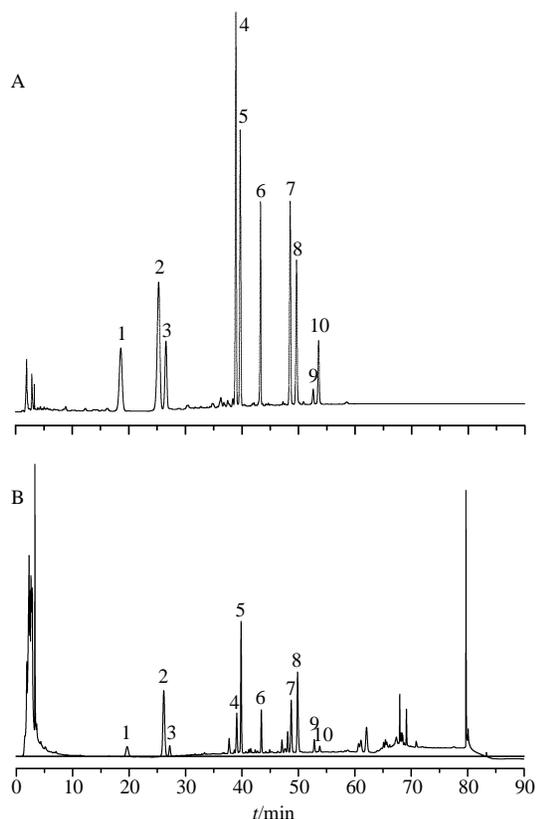
皂苷回收率 = 洗脱液中皂苷质量 / 上柱液皂苷质量

皂苷质量分数 = 洗脱液中皂苷质量 / 洗脱液干物质质量

2.3 熟三七皂苷类成分的定量测定

测定方法参考文献报道^[10], 混合对照品 HPLC 色谱图见图 2-A, 样品 HPLC 色谱图见图 2-B。

2.3.1 色谱条件 Agilent 1260 HPLC 系统 (Agilent Technologies)、C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水-乙腈, 线性梯度洗脱: 0~20 min, 80% 水; 20~45 min, 80%~54% 水; 45~55 min, 54%~45% 水; 55~60 min, 45% 水; 60~65 min, 45%~100% 水; 65~70 min, 100%~80% 水; 70~90 min,



1-三七皂苷 R₁ 2-人参皂苷 R_{g1} 3-人参皂苷 R_e 4-人参皂苷 R_{h1} 5-人参皂苷 R_{b1} 6-人参皂苷 R_d 7-人参皂苷 R_{k3} 8-人参皂苷 R_{h4} 9-人参皂苷 20(S)-R_{g3} 10-人参皂苷 20(R)-R_{g3}
1-notoginsenoside R₁ 2-ginsenosides R_{g1} 3-ginsenosides R_e 4-ginsenosides R_{h1} 5-ginsenosides R_{b1} 6-ginsenosides R_d 7-ginsenosides R_{k3} 8-ginsenosides R_{h4} 9-ginsenosides 20(S)-R_{g3} 10-ginsenosides 20(R)-R_{g3}

图 2 混合对照品 (A) 和样品 (B) 溶液的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substance (A) and sample (B) solution

80% 水; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 203 nm; 进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别精密称取三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g1}、R_{b1}、R_e、R_d、R_{h1}、R_{k3}、R_{h4}、20(R)-R_{g3}、20(S)-R_{g3} 对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成分别含三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g1}、R_{b1}、R_e、R_d、R_{h1}、R_{k3}、R_{h4}、20(R)-R_{g3}、20(S)-R_{g3} 对照品 1 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 供试品溶液为上柱液溶液和乙醇洗脱液, 制备方法见“2.5”项。

2.4 DPH-100 大孔吸附树脂柱的制备

准确称量 DPH-100 大孔吸附树脂 12 g, 湿法装入色谱柱 (1.5 cm × 40 cm) 中, 浸泡 24 h 后, 用 3

BV 的 95%乙醇以 2~3 BV/h 的体积流量洗涤, 随后, 用 5 BV 超纯水以 2~3 BV/h 的体积流量洗涤至流出液无醇味, 备用。

2.5 上柱液的制备及上柱液质量浓度的考察

2.5.1 熟三七提取物浸膏的制备 取三七干燥根及根茎磨成粉末, 过 40 目筛, 取适量生三七粉末放置于高压灭菌锅中, 120 °C 蒸制 2 h。将蒸好的粉末放置于 45 °C 左右的热风干燥箱中干燥至恒定质量。准确称量熟三七粉末若干, 加其质量 10 倍量的 60% 乙醇, 浸泡 0.5 h 后, 在 85 °C 水浴锅中回流提取 3 次, 每次提取 1.5 h, 合并提取液, 减压浓缩成浸膏。

2.5.2 上柱液的制备 将制得的熟三七总皂苷提取物浸膏加纯水分别稀释至皂苷质量浓度分别为 2.12、4.24、10.60、16.96、22.32、28.26 g/L, 离心, 分别取 3 BV 的上柱液, 以 1.5 BV/h 的体积流量上 DPH-100 大孔吸附树脂柱, 然后用 4 BV 的纯水, 以 2 BV/h 的体积流量冲洗, 把糖类水溶性物质洗脱下来, 水洗液弃去, 再用 60% 乙醇以 3.5 BV/h 体积流量洗脱, 收集洗脱液, 分别测定皂苷质量分数和皂苷回收率。如表 2 所示, 当上柱液质量浓度分别为 4.24、10.60、16.96 g/L 时, 皂苷质量分数和皂苷回收率较高, 因此拟选择 4.24、10.60、16.96 g/L 质量浓度的上柱液进行下一步的 CCD-RSM 试验设计。

表 2 上柱液质量浓度单因素考察

Table 2 Single factor study on concentration of sample solution

上柱液质量浓度/(g·L ⁻¹)	皂苷回收率/%	皂苷质量分数/%
1.06	6.15	20.37
2.12	6.42	21.68
4.24	8.35	22.31
10.60	32.50	41.23
16.96	7.36	25.69
22.32	6.28	21.26
28.26	5.16	20.14

2.6 CCD-RSM 效应面法优化试验

2.6.1 模型建立及显著性检验 基于 FMEA 对熟三七皂苷类成分纯化工艺的影响因素的评价, 选择 5 个影响因素作为研究目标, 包括上柱液质量浓度、上样体积、水洗体积、乙醇体积分数、乙醇洗脱体积。以皂苷类成分质量分数和回收率为评价指标。因素与水平及试验安排和结果见表 3。方差分析结果见表 4、5。

以皂苷质量分数和皂苷回收率为因变量, 利用 Design-Expert version 8.6.0 软件对各因素进行二次多元回归拟合, 得到皂苷质量分数和皂苷回收率对上柱液质量浓度 (X_1)、上样体积 (X_2)、水洗体积 (X_3)、乙醇体积分数 (X_4)、乙醇洗脱体积 (X_5) 的二项多次回归模型方程分别为皂苷质量分数 = $41.93 + 6.01 X_1 + 6.62 X_2 - 2.41 X_3 + 6.65 X_4 - 1.97 X_5 - 3.96 X_2 X_5 - 14.90 X_1^2 + 10.00 X_3^2 - 8.90 X_5^2$; 皂苷回收率 = $36.05 - 5.84 X_3 + 11.11 X_4 - 3.19 X_1 X_2 - 26.23 X_1^2 + 15.61 X_3^2$ 。

从表 4 可知, 回归模型 $P < 0.000 1$, 差异达到极显著水平; 失拟项水平不显著 ($P > 0.05$), 表示方程拟合度良好; 回归模型确定系数 $R^2 = 0.895 4$, 回归模型的确定调整系数 $R_{adj}^2 = 0.823 3$, 表示该方程能解释 82.33% 实验数据的变异性; 变异系数 = 13.76, 精密度数值达到 14.649 表示该方程可以很好地反映真实情况。所以可以用数学模型进行分析。从表 4 可知, 上柱液质量浓度、上样体积、乙醇体积分数对皂苷质量分数有着极显著影响 ($P < 0.01$), 水洗体积和乙醇洗脱体积对皂苷质量分数有着显著影响 ($P < 0.05$), 同时上样体积和乙醇洗脱体积的交互作用对皂苷质量分数亦有极显著影响 ($P < 0.01$)。结果提示各因素对皂苷质量分数的影响不是单一的线性关系, 而是呈二次关系。以皂苷质量分数为评价指标的响应面模型见图 3。

从表 5 可知, 回归模型 $P < 0.000 1$, 差异达到极显著水平; 失拟项水平不显著 ($P > 0.05$), 表示方程拟合度良好; 回归模型确定系数 $R^2 = 0.851 8$, 回归模型的确定调整系数 $R_{adj}^2 = 0.749 5$, 表示该方程能解释 74.95% 实验数据的变异性; 变异系数 = 23.33, 精密度数值达到 12.809 表示该方程可以很好地反映真实情况。所以可以用数学模型进行分析。从表 5 可知, 水洗体积和乙醇体积分数对皂苷回收率有着极显著影响 ($P < 0.01$), 且上样体积分别和上柱液质量浓度交互作用对皂苷回收率亦有显著影响 ($P < 0.05$)。结果提示各因素对皂苷回收率的影响不是单一的线性关系, 而是呈二次关系。以皂苷回收率为评价指标的响应面模型见图 4。

2.6.2 CCD-RSM 优化熟三七皂苷类成分纯化条件 由图 3、4 可知, 若分别以皂苷质量分数和皂苷回收率为评价指标, 得到优化后的纯化条件也不相同。因此, 需要将皂苷质量分数和皂苷回收率综合考虑, 在获得较优的皂苷质量分数时, 也需获得相对较优

表 3 CCD-RSM 试验设计及结果

Table 3 Experimental design and results of CCD-RSM

编号	$X_1/(g \cdot L^{-1})$	X_2/BV	X_3/BV	$X_4/\%$	X_5/BV	皂苷回		编号	$X_1/(g \cdot L^{-1})$	X_2/BV	X_3/BV	$X_4/\%$	X_5/BV	皂苷回	
						收率/%	皂苷质量 分数/%							收率/%	皂苷质量 分数/%
1	16.96 (1)	1.0 (-1)	2.0 (-1)	50.0 (-1)	5.0 (1)	41.18	33.56	26	4.24	5.0	2.0	50.0	2.0	26.28	32.64
2	16.96	5.0 (1)	6.0 (1)	70.0 (1)	2.0 (-1)	52.20	63.80	27	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	43.94	49.02
3	4.24 (-1)	1.0	2.0	70.0	2.0	48.46	24.02	28	16.96	1.0	2.0	50.0	2.0	23.18	26.69
4	4.24	5.0	2.0	70.0	2.0	41.15	53.52	29	16.96	3.0	4.0	60.0	3.5	7.36	25.69
5	16.96	1.0	6.0	50.0	5.0	25.43	34.37	30	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	42.61	44.68
6	4.24	3.0 (0)	4.0 (0)	60.0 (0)	3.5 (0)	8.35	22.31	31	4.24	1.0	2.0	50.0	2.0	24.91	20.61
7	16.96	1.0	6.0	70.0	2.0	54.79	44.02	32	4.24	1.0	6.0	50.0	5.0	13.31	15.17
8	10.60 (0)	5.0	4.0	60.0	3.5	42.92	48.96	33	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	32.84	42.06
9	10.60	3.0	6.0	60.0	3.5	49.16	47.19	34	4.24	5.0	6.0	50.0	5.0	2.53	10.36
10	16.96	1.0	6.0	50.0	2.0	25.34	29.46	35	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	33.12	47.24
11	10.60	3.0	4.0	60.0	5.0	27.29	30.40	36	10.60	1.0	4.0	60.0	3.5	44.89	37.35
12	10.60	3.0	4.0	60.0	2.0	20.80	29.61	37	16.96	5.0	6.0	50.0	2.0	26.62	45.20
13	16.96	5.0	2.0	50.0	5.0	36.40	47.80	38	4.24	5.0	6.0	50.0	2.0	46.81	41.99
14	16.96	5.0	2.0	70.0	2.0	45.56	56.90	39	10.60	3.0	4.0	50.0	3.5	23.53	32.14
15	4.24	1.0	6.0	70.0	2.0	39.96	30.72	40	16.96	5.0	2.0	70.0	5.0	46.79	60.99
16	16.96	1.0	6.0	70.0	5.0	53.63	44.98	41	10.60	3.0	2.0	60.0	3.5	50.23	50.61
17	4.24	1.0	2.0	70.0	5.0	52.26	36.44	42	10.60	3.0	4.0	70.0	3.5	65.87	53.25
18	16.96	1.0	2.0	70.0	5.0	69.41	44.67	43	16.96	1.0	2.0	70.0	2.0	61.85	36.58
19	16.96	5.0	6.0	50.0	5.0	4.93	24.86	44	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	32.84	42.34
20	16.96	5.0	6.0	70.0	5.0	7.57	39.70	45	16.96	5.0	2.0	50.0	2.0	39.35	48.64
21	4.24	1.0	2.0	50.0	5.0	25.48	22.32	46	4.24	5.0	6.0	70.0	5.0	10.34	36.29
22	4.24	5.0	6.0	70.0	2.0	52.53	50.23	47	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	45.33	50.36
23	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	31.83	39.28	48	4.24	1.0	6.0	70.0	5.0	51.77	20.64
24	10.60	3.0	4.0	60.0	3.5	41.70	44.60	49	4.24	1.0	6.0	50.0	2.0	8.99	10.62
25	4.24	5.0	2.0	50.0	5.0	37.13	34.95	50	4.24	5.0	2.0	70.0	5.0	54.92	40.61

表 4 以皂苷质量分数为响应值的方差分析结果

Table 4 Variance analysis with purity of saponins as respond value

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.680	20	0.034	12.41	<0.000 1	X_5^2	0.020	1	0.020	7.16	0.012 1
X_1	0.120	1	0.120	44.95	<0.000 1	残差	0.079	29	2.736×10^{-3}		
X_2	0.150	1	0.150	54.53	<0.000 1	失拟项	0.069	22	3.15×10^{-3}	2.24	0.137 8
X_3	0.020	1	0.020	7.22	0.011 8	净误差	9.859×10^{-3}	7	1.408×10^{-3}		
X_4	0.150	1	0.150	54.90	<0.000 1	总离差	0.760	49			
X_5	0.013	1	0.013	4.85	0.035 8	R^2	0.895 4				
X_2X_5	0.050	1	0.050	18.36	0.000 2	R^2_{adj}	0.823 3				
X_1^2	0.055	1	0.055	20.08	0.000 1	变异系数	13.76				
X_3^2	0.025	1	0.025	9.04	0.005 4	精密度	14.649				

表 5 以皂苷回收率为响应值的方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis with response to saponin recovery

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.170	20	0.058	8.33	<0.000 1	失拟项	0.180	22	8.167×10^{-3}	2.39	0.119 5
X_3	0.120	1	0.120	16.53	0.000 3	净误差	0.024	7	3.415×10^{-3}		
X_4	0.420	1	0.420	59.76	<0.000 1	总离差	1.370	49			
X_1X_2	0.032	1	0.032	4.63	0.040 0	R^2	0.851 8				
X_1^2	0.170	1	0.170	24.23	<0.000 1	R^2_{adj}	0.749 5				
X_3^2	0.060	1	0.060	8.59	0.006 5	变异系数	23.33				
残差	0.200	29	7.020×10^{-3}			精密度	12.809				

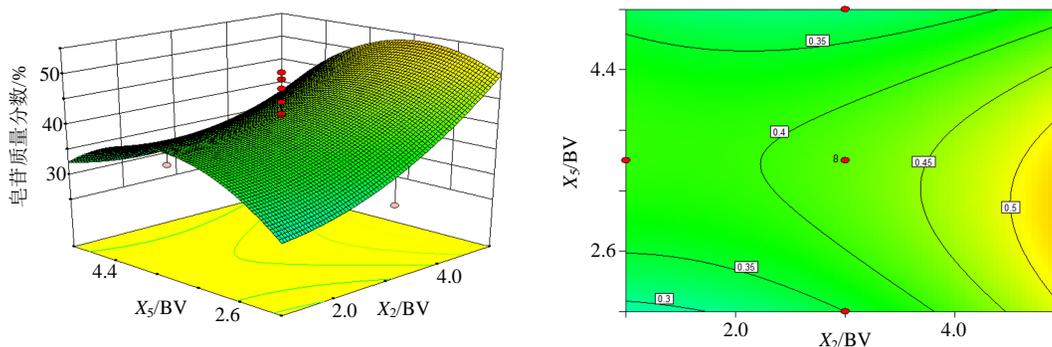


图 3 上样体积和乙醇洗脱体积交互作用对皂苷质量分数影响的响应面图

Fig. 3 Response surface and contour plots showing significant interaction effects of concentration of sample solution with elution volume on saponin purity

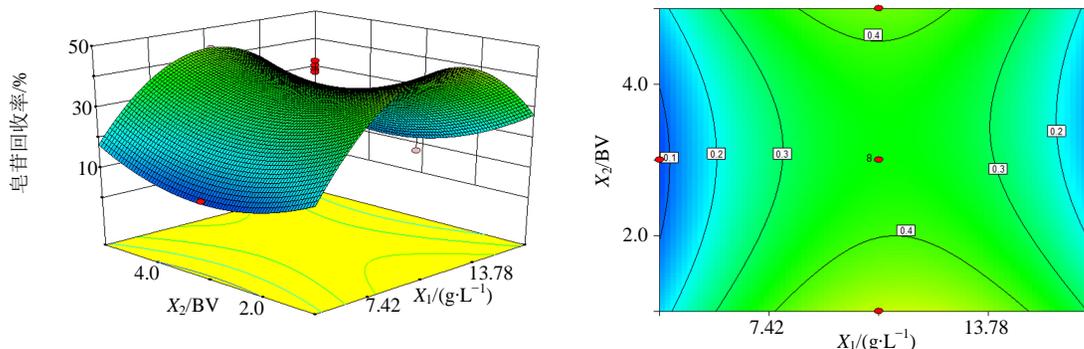


图 4 上样体积和上柱液质量浓度交互作用对皂苷回收率影响的响应面图

Fig. 4 Response surface and contour plots showing significant interaction effects of concentration of sample solution with loading volume on saponin purity

的皂苷回收率。

利用 Design-Expert version 8.6.0 软件对上述所建立的数学模型, 进行综合优化分析, 优化后的纯化条件为上柱液质量浓度为 11.22 g/L, 上样体积为 4.97 BV, 水洗体积为 2 BV, 乙醇体积分数为 70%, 乙醇洗脱体积为 3.31 BV。预测结果为皂苷质量分数为 77.24%, 皂苷回收率为 82.81%。对优化所得的工艺进行验证试验, 皂苷质量分数与皂苷回收率的实测值分别为 76.69%、77.43%、76.85% 和 81.66%、82.25%、81.84%。实测结果(76.99±0.38)%

和(81.92±0.30)%与预测结果 77.24%和 82.81%较为接近, 说明应用 CCD 试验设计所得最佳工艺参数具有可行性和可靠性。

3 讨论

研究表明皂苷类成分是熟三七的主要活性成分, 其具有抗血小板聚集、抗氧化、补血以及补益强身的作用^[19-20]。由于熟三七及其提取物除了含有皂苷类成分以外, 还含有非皂苷成分, 如挥发油、黄酮类、糖类等成分。因此, 如何有效去除熟三七提取物中的非皂苷类成分, 并得到回收率和质量分

数较高且关联熟三七功效的皂苷类成分,是本研究的主要目的。为此,本实验采用 FMEA 结合 CCD-RSM 法优化熟三七皂苷类成分的纯化工艺,其中大孔吸附树脂纯化过程主要考察了上样、水洗除杂、乙醇洗脱 3 个步骤。

上样过程中上柱液质量浓度、上样体积、上样体积流量均对皂苷的吸附效率存在影响。DPH-100 大孔吸附树脂对皂苷的吸附量在一定范围内随上柱液质量浓度和上样体积的增大而增大,但到一定条件时,由于树脂饱和,吸附率随上柱液质量浓度和上样体积的增加反而下降,此时较高质量浓度的上柱液和较大体积的上样体积反而会造成原料的浪费。故在设计响应面实验时,将上柱液的质量浓度水平设计为 4.24、10.60、16.96 g/L,上样体积水平设计为 1、3、5 BV。

水洗除杂过程中,水洗体积、水洗体积流量对皂苷的质量分数和回收率有着较大的影响。当水洗体积较低时,杂质不能充分的除去,影响皂苷的质量分数。但是当水洗体积过大时,又会将一部分皂苷除去,影响皂苷的回收率。所以,综合考虑质量分数和回收率的影响,将水洗体积水平设计为 2、4、6 BV。

乙醇洗脱过程中,乙醇体积分数、乙醇洗脱体积、醇洗体积流量均对皂苷的解吸效率存在影响。当乙醇体积分数较大时,样品溶解性较大,易于洗脱,而当洗脱液中乙醇量不断增加时,所洗脱出的杂质也在增多,导致皂苷洗脱率下降,因此将乙醇体积分数水平设计为 50%、60%、70%。同时,解吸时解吸率随乙醇洗脱体积的增大而增大,但过大的乙醇洗脱体积会使解吸成本增加,过小的乙醇洗脱体积又会导致皂苷洗脱不充分。因此,综合考虑经济效率等因素考虑,将乙醇洗脱体积水平设计为 2.0、3.5、5.0 BV。

在大孔吸附树脂纯化过程中,虽然上样体积流量、水洗体积流量、醇洗体积流量也对纯化效率以及皂苷的质量分数和回收率有着一定的影响,但是相比以上几个因素而言,适当的体积流量对纯化的影响不显著,因此将上样体积流量、水洗体积流量、醇洗体积流量分别设置为 1.5、2.0、3.5 BV/h。

本实验将 FMEA 和 CCD-RSM 应用于大孔吸附树脂纯化熟三七皂苷类成分工艺,采用合理试验设计对纯化工艺进行研究,以 10 个指标性及活性成分 [三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_e 、 R_d 、 R_{h_1} 、

R_{k_3} 、 R_{h_4} 、20(R)- R_{g_3} 、20(S)- R_{g_3}] 含量作为熟三七皂苷类成分的考察指标,以皂苷类成分的质量分数和皂苷回收率为评价指标,得到大孔吸附树脂纯化的最佳工艺为上柱液质量浓度 11.22 g/L,上样体积 4.97 BV,水洗体积 2 BV,乙醇体积分数 70%,乙醇洗脱体积 3.31 BV。在此条件下的皂苷质量分数和皂苷回收率分别可达到 77.24% 和 82.81%。经验证本纯化工艺具有可操作性强、工艺简单、产品稳定可靠的优点,这不仅对其他中药活性成分的纯化和获得提供一定借鉴意义,也为下一步对比研究熟三七提取物与药材生物活性差异、以及相应产品的开发应用提供了技术参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 武 双, 崔秀明, 郭从亮, 等. 三七“生打熟补”物质基础及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(8): 50-53.
- [3] 陈 斌, 许慧琳, 贾晓斌. 三七炮制的研究进展与研究思路 [J]. 中草药, 2013, 44(4): 482-487.
- [4] Xiong Y, Chen L J, Hu Y P, et al. Uncovering active constituents responsible for different activities of raw and steamed *Panax notoginseng* roots [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 1-11.
- [5] 狄亚维, 康 安, 狄留庆, 等. 三七蒸制前后主要活性成分体内药理学及其抗血小板聚集活性比较研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 95-100.
- [6] Toh D F, Patel D N, Chan C Y, et al. Anti-proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax notoginseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells [J]. *Chin Med*, 2011, 6(1): 4-12.
- [7] Chen T, Gong X C, Chen H L, et al. Chromatographic elution process design space development for the purification of saponins in *Panax notoginseng* extract using a probability-based approach [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(2): 306-315.
- [8] 刘中秋, 蔡 雄, 赖小平, 等. 大孔吸附树脂富集纯化三七总皂苷工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3): 4-6.
- [9] 郑 明. 三七总皂苷分离纯化工艺研究 [J]. 中国现代应用药学, 2007, 22(2): 15-17.
- [10] 武 双, 郭从亮, 崔秀明, 等. HPLC 法同时测定生三七和蒸制三七中 10 种皂苷类成分的含量 [J]. 中药材, 2015, 38(8): 1622-1625.
- [11] Xiong Y, Chen L J, Man J H, et al. Chemical and bioactive comparison of *Panax notoginseng* root and rhizome in raw and steamed forms [J]. *J Gins Res*, 2017,

- 7-9.
- [12] 崔翰明, 张秋燕, 林海, 等. 三七总皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺和质量分析研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2177-2182.
- [13] 石召华, 熊富良, 李崇明, 等. 大孔吸附树脂分离纯化三七总皂苷工艺研究 [J]. 中成药, 2004, 26(1): 10-12.
- [14] 欧来良, 史作清, 施荣富, 等. 强极性大孔吸附树脂对三七皂苷的分离纯化研究 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 905-907.
- [15] Chen T, Gong X C, Zhang Y, *et al.* Optimization of a chromatographic process for the purification of saponins in *Panax notoginseng* extract using a design space approach [J]. *Sep Purif Technol*, 2015, 154(2): 309-319.
- [16] 汤涛, 袁其红, 董伟, 等. 星点设计-效应面优化欧前胡素脂质微球的处方工艺研究及质量评价 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 109-114.
- [17] Zhao Y M, Yang J M, Liu H, *et al.* Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from *Lentinus edodes* and its anti-hepatitis B activity *in vitro* [J]. *Int J Biol Macr*, 2018, 107 (Pt B): 2217-2223.
- [18] Yolmeh M, Najafi M B H, Farhoosh R. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM) [J]. *Food Chem*, 2014, 155(2): 319-324.
- [19] Shi S, Wang C Z, Tong R, *et al.* Effects of steaming the root of *Panax notoginseng* on chemical composition and anticancer activities [J]. *Food Chem*, 2010, 118(2): 307-314.
- [20] 何宜航. 熟三七粉的炮制及“熟补”的药理作用研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.