

线性约束的混料设计优化双水相提取红梅消总皂苷工艺

周文杰^{1,2}, 杨荣平², 禹奇男^{1,2}, 柯秀梅^{1,2}, 刘楠^{1,2}, 励娜^{2*}
(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

〔摘要〕 目的:优化双水相提取红梅消总皂苷的工艺条件。方法:以齐墩果酸为指标成分,采用超声耦合乙醇-硫酸铵双水相体系提取红梅消总皂苷,采用线性约束的混料设计,优化双水相体系中硫酸铵、无水乙醇和水的质量分数,运用多元线性回归及二项式拟合建立指标与因素间的数学模型,预测红梅消总皂苷最佳提取条件。结果:最优双水相提取条件为硫酸铵 11%,无水乙醇 37%,水 52%;总皂苷提取率 3.10%,与预测值 3.14% 的相对误差-1.27%。结论:线性约束的混料设计适用于双水相提取红梅消总皂苷工艺的优化,建立的数学模型预测性良好。

〔关键词〕 红梅消; 总皂苷; 双水相体系; 提取工艺; 混料设计

〔中图分类号〕 R283.6;R284.2 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)09-0032-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090032

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000072.html>

〔网络出版时间〕 2014-02-25 13:56

Optimization of Extraction Process for Total Saponins from *Rubus parvifolius* in Aqueous Two-Phase System by Mixture Design

ZHOU Wen-jie^{1,2}, YANG Rong-ping², YU Qi-nan^{1,2}, KE Xiu-mei^{1,2}, LIU Nan^{1,2}, LI Na^{2*}
(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

〔Abstract〕 Objective: To optimize extraction process of total saponins from *Rubus parvifolius* in aqueous two-phase system. Method: Taking oleanolic acid as index component, ultrasound-assisted coupling ethanol-

〔收稿日期〕 20131119(013)

〔基金项目〕 重庆市科技计划项目(cstc2012pt-kyys10004)

〔第一作者〕 周文杰,在读硕士,从事中药药剂学研究,Tel:023-89029068,E-mail:841169954@qq.com

〔通讯作者〕 * 励娜,硕士,助理研究员,从事中药药剂学研究,Tel:023-89029068,E-mail:34725915@qq.com

固体含量达 25%,成膜性好,包衣工艺过程简单方便,且 Surelease 包衣制剂的释药速率不受介质 pH 影响^[9],能够实现较好的脉冲释放效果。

〔参考文献〕

[1] 郑琴,王芳,杨明,等. 中医“择时服药”理论与中药脉冲释药系统的研究[J]. 中药材,2011,34(2):309.

[2] 潘维,刘玉香,郭梅,等. 利用时辰药理学指导合理用药[J]. 中国中医药现代远程教育,2010,8(1):82.

[3] 蒋珍藕,黄明桂,邓丰胤. 舒胸滴丸提取纯化工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(3):29.

[4] 罗晓健,李毅,刘勇. 舒胸滴丸的体外溶出度研究[J]. 中草药,2009,40(9):1408.

[5] 沈岚,冯怡,徐德生,等. 比色法测定三七花中总皂苷的含量[J]. 中成药,2007,29(9):1368.

[6] 魏凤玲,高娟. 三七总皂苷含量测定及提取工艺优选[J]. 中国现代应用药学,2008,25(7):623.

[7] 陈卉,陈燕忠,谢青春,等. 舒胸脉冲控释滴丸的研制[J]. 中药材,2013,36(7):1155.

[8] 余超,邹梅娟,史一杰,等. 酒石酸美托洛尔脉冲控释微丸的制备及 Beagle 犬体内药动学研究[J]. 中国药剂学杂志,2011,9(2):30.

[9] 张瑜,孙茂峰. 乙基纤维素水分散体包衣技术[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(1):49.

〔责任编辑 刘德文〕

ammonium sulfate aqueous two-phase system was adopted to extract total saponins. Mixture design in linear constraints was employed with three independent variables including amounts of ammonium sulfate, ethanol and water, while the content of total saponins as dependent variable, mathematical model between index and factors was established by multi-linear regression and binomial fitting, then optimum process conditions were predicted.

Result: Optimum process conditions were as follows: ammonium sulfate 11%, ethanol 37%, water 52%; Extraction rate of total saponins was 3.10%, which had relative error of -1.27% with the predicted value of 3.14%. **Conclusion:** Mixture design facilitated to optimize extraction technology of total saponins from *R. parvifolius* in aqueous two-phase system, this established model had good predictability.

[**Key words**] *Rubus parvifolius*; total saponins; aqueous two-phase system; extraction technology; mixture design

红梅消具有清热凉血、止血散结、止痛利尿消肿等功效,民间多以茅莓、五月红、草杨梅等别名沿用^[1]。现代药理研究表明红梅消总皂苷为主要有效部位,保护神经元、抗肿瘤、抗脑缺血^[2-5]等作用显著。传统提取技术存在提取率较低、工艺复杂等弊端^[6],故本实验将超声技术和乙醇-硫酸铵双水相萃取分离技术进行耦合,在常温条件下提取红梅消总皂苷,根据设计参数特点,采用线性约束的混料设计优选提取工艺,在 *D*-最优混料设计基础上增加各因素的线性约束,以更全面真实地体现各因素间相互关系,为总皂苷的提取分离技术开发及双水相技术的应用提供参考。

1 材料

UV2800PC 型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司), AEG-45SM 型电子天平(日本岛津公司), BS110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

红梅消药材由重庆市药物种植研究所提供,经重庆市中药研究院秦松云研究员鉴定为蔷薇科悬钩子属植物红梅消 *Rubus parvifolius* L. 的干燥根;齐墩果酸对照品(南通飞宇生物科技有限公司,批号 FY15170920,纯度 $\geq 98\%$),水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 双水相体系的建立 双水相体系的形成受有机溶剂和盐浓度影响,有机溶剂和盐加入量会直接影响体系的性质。双水相体系相图中主要存在单相区、双水相区、固-液三相区、固-液两相区,定义浊点曲线为单相区与双水相相区的分界线,盐析曲线为双水相相区和固液三相区的分界线^[7]。

2.1.1 浊点曲线的测定 将定量的硫酸铵置于 50 mL 烧杯中,加水 5 mL 充分溶解,静置 15 min 至溶液澄清,容器底部无固体存在,用无水乙醇滴定至

溶液刚好浑浊,搅拌均匀,静置 15 min 后体系出现分层现象,反复搅拌分层现象不消失,记录此点各组分的加入量,即为双水相浊点的液-液相平衡数据,见图 1。

2.1.2 盐析曲线的测定 以 2.1.1 项下配制的双水相体系为基础,继续滴加无水乙醇,至体系刚好出现微量硫酸铵的絮状沉淀,静置 15 min 后沉淀不消失,记录此点体系各组分的量,即为双水相盐析点的液-液相平衡数据,见图 1。

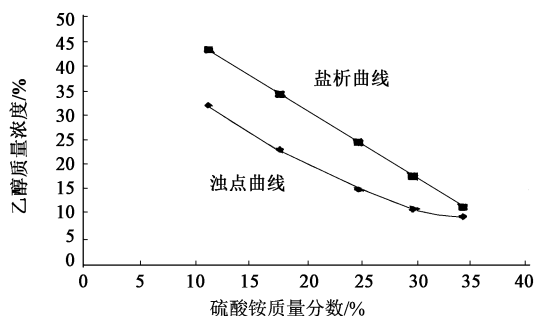


图 1 硫酸铵-乙醇双水相体系中浊点曲线、盐析曲线的绘制

2.2 总皂苷的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 0.015 22 g 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取红梅消药材 10 g,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入乙醇-硫酸铵双水相 100 g,浸泡 1 h,超声 30 min,过滤,取上层滤液适量,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 样品测定 精密移取对照品溶液适量于 20 mL 具塞试管中,水浴挥干溶剂,冷却至室温,依次加入新配制 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,摇匀,于 80 ℃ 水浴反应 15 min 后取出,立即用冰水冷却,加冰醋酸 5 mL 稀释,摇匀,静置 30 min,于 545 nm 处测定吸光度(*A*),以 *A* 为纵

坐标,齐墩果酸质量为横坐标,得回归方程 $Y = 8.161X - 0.014 (r = 0.999\ 5)$,线性范围 $0.015\ 22 \sim 0.243\ 52\ \text{mg}$ 。

2.3 附加线性约束的混料设计 采用 Design Expert 软件,选择混合设计中 User-Defined。根据双水相图确定硫酸铵、无水乙醇和水质量分数的限度范围 ($0.11 \leq \text{硫酸铵} \leq 0.34, 0.10 \leq \text{无水乙醇} \leq 0.43, 0.45 \leq \text{水} \leq 0.57, 0.43 \leq 0.981 \times \text{硫酸铵} + \text{无水乙醇} \leq 0.77, 0.25 \leq 1.389 \times \text{硫酸铵} + \text{无水乙醇} \leq 0.59, 0.46 \leq 0.019 \times \text{硫酸铵} + \text{水} \leq 0.57, 0.41 \leq \text{水} - 0.389 \times \text{硫酸铵} \leq 0.56$),以红梅消总皂苷提取率为考察指标,根据拟合模型回归系数方差最小化及回归模型预测精度最高的原则,选取混料设计在试验因素空间内的候选点,组成 16 个模拟提取条件,试验安排及结果见表 1。

表 1 红梅消总皂苷双水相提取工艺线性约束的混料设计安排

No.	A 硫酸铵	B 无水乙醇	C 水	总皂苷提取率/%
1	34	10	56	0.62
2	25	21	54	1.72
3	29	16	55	1.23
4	23	28	50	2.06
5	29	16	55	1.23
6	34	10	56	0.62
7	34	11	55	0.61
8	11	38	51	3.09
9	34	12	54	0.63
10	29	17	54	1.24
11	11	32	57	2.91
12	18	32	50	2.55
13	23	21	56	1.42
14	11	43	45	2.65
15	34	10	56	0.62
16	18	27	55	2.21

2.4 数据处理 以红梅消总皂苷提取率(Y)为因变量,硫酸铵、无水乙醇和水的质量分数为自变量,应用试验软件分别以 3 种数学模型进行回归拟合与分析,对各项系数进行 t 检验,剔除 $P > 0.05$ 项,以回归模型的标准方差(S)、复相关系数(R^2)、调整复相关系数($\text{adjusted } R^2$)、预测复相关系数($\text{predicted } R^2$)为综合指标^[8],判断并选取 5 种数学模型中最佳回归模型,结果见表 2,表明 5 种数学模型均具有良好的多元线性关系,但二次模型最优,拟合方程为

$$Y = 0.24A + 2.68B - 5.79C - 0.55AB + 10.30AC + 13.41BC (P < 0.05)。$$

表 2 红梅消总皂苷双水相提取工艺线性约束的混料设计回归分析

模型	S	R^2	$\text{adjusted } R^2$	$\text{predicted } R^2$
线性模型	0.19	0.988 2	0.982 2	0.846 9
二次模型	0.12	0.961 8	0.955 9	0.907 9
特殊三次模型	0.10	0.992 2	0.987 0	0.652 7
三次模型	0.041	0.999 1	0.997 9	0.179 4
特殊三次模型	0.058	0.998 0	0.995 7	0.485 9

根据最佳回归方程,应用 Design Expert 软件绘制红梅消总皂苷提取率的二维等高线图,见图 2,结果显示无水乙醇和水用量的变化对红梅消总皂苷提取率影响较大,随无水乙醇用量的增高,红梅消总皂苷提取率相应增大,确定最佳提取工艺条件为硫酸铵 11%,无水乙醇 37%,水 52%。

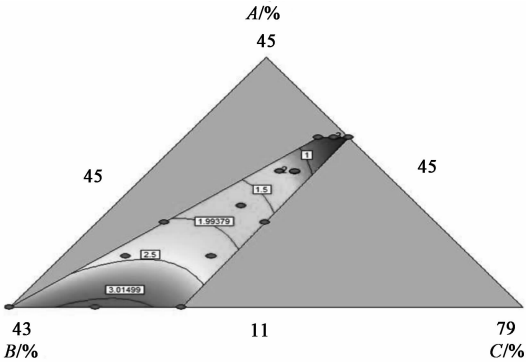


图 2 红梅消总皂苷提取工艺的二维等高线

2.5 验证试验 根据模型预测红梅消总皂苷提取率最高达 3.14%,按最佳提取条件进行 3 组验证试验,结果总皂苷平均提取率 3.10% (RSD 1.18%),与模型预测值非常接近,说明该模型较可靠。

2.6 提取方法考察 将本法与其他 3 种提取方法进行比较,料液比均为 1:10,回流法的提取条件为乙醇体积分数 70%,回流时间 1.5 h;超声法提取条件为乙醇体积分数 70%,常温浸泡时间 1 h,超声时间 0.5 h;双水相浸泡法提取条件为硫酸铵 11%,无水乙醇 37%,水 52%,浸泡时间 1.5 h;超声耦合双水相浸泡法提取条件为硫酸铵 11%,无水乙醇 37%,水 52%,浸泡时间 1 h,超声时间 0.5 h。按 2.2 项下方法测定,结果总皂苷提取率分别为 2.11%,1.82%,0.63%,3.10%,说明超声耦合双水相提取法明显优于其他提取方法。

3 讨论

混料试验是考察产品的某种特性或综合性能与产品中各种混料成分间的关系,以得到最优的配方

组合,优化产品性能^[9];附加线性约束的混料设计除上下界约束外,还对各个分量的线性组合附加一些约束条件,更符合实际工作需要。附加线性约束的混料设计应用于双水相提取试验中,能够保证双水相体系的建立,若采用中心复合设计,没有一定的线性范围约束,会造成双水相中各物质比例范围变大,部分条件不能形成双水相体系^[10]。*D*-最优混料设计虽能保证双水相体系的建立,但模拟试验大多在呈双水相的边界处,很容易造成误差,故本实验采用了 User-Defined,以尽量避免试验在呈双相的边界处。

双水相提取分离技术现多以无机盐代替普通有机物(高聚物)的双水相体系,尤其适用于极性物质的提取和纯化。皂苷类物质在水饱和正丁醇中溶解性能较佳,但正丁醇沸点高,难回收;而低体积分数乙醇对总皂苷也有不错的溶解性,且回收方便,故选择无水乙醇为双水相体系的有机相。通过考察 NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 K_2HPO_4 与无水乙醇的成相能力,发现 NaCl 与无水乙醇无法形成双水相体系; K_2HPO_4 与无水乙醇形成的双水相体系分相能力较弱,相比过大; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与无水乙醇形成的双水相体系成相稳定,而且提取液中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可用甲醇除去,不影响总皂苷的含量测定,故采用乙醇-硫酸铵双水相体系提取红梅消总皂苷。

目前红梅消总皂苷常采用 70% 乙醇回流提取,但耗时较长、提取率较低^[11]。本实验首次运用双水相提取耦合超声提取技术进行红梅消总皂苷的提取,在提取过程中,皂苷类产物转移至乙醇上相,可改变提取过程中化学平衡,有利于更多皂苷类物质溶出^[12]。整个提取工艺常温下即可进行,避免了某些活性成分因高温分解而损失,而且缩短了提取时

间,极大地提高了总皂苷提取率。

[参考文献]

- [1] 俞德浚. 中国植物志. 第 37 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 68.
- [2] 王继生, 邱宗荫, 周成林, 等. 茅莓总皂苷对大鼠海马神经元细胞缺氧损伤后胞内钙超载的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(7): 934.
- [3] 王继生, 李惠芝, 邱宗荫, 等. 茅莓总皂苷的主要药效学研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 34.
- [4] 郑振波, 张玲菊, 黄常新, 等. 茅莓总皂苷体外抗肿瘤作用研究[J]. 浙江临床医学, 2007, 19(5): 611.
- [5] 王继生, 邱宗荫, 夏永鹏, 等. 茅莓抗脑缺血有效部位的药理活性筛选[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 2027.
- [6] 王继生, 邱宗荫, 夏永鹏, 等. 茅莓总皂苷提取分离工艺考察[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(13): 1138.
- [7] 董军芳. 新型双水相的液液相平衡及其萃取分离甘草酸盐初步探讨[D]. 泉州: 华侨大学, 2003.
- [8] 晋兴华, 赵振宇, 肖莉, 等. *D*-最优混料设计优化尼莫地平骨架片的处方[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(7): 516.
- [9] 高丽琼, 舒文娟, 高缘, 等. *D*-最优混料设计优化阿莫罗芬自乳化基质乳膏及乳膏流变学研究[J]. 中南药学, 2010, 8(7): 481.
- [10] 李东东, 放茂良, 刘琼, 等. 星点设计-响应面法优化超声提取青竹标多酚[J]. 中药材, 2011, 34(1): 129.
- [11] 贺红军. 茅莓总皂苷提取及纯化工艺研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [12] 付艳丽, 高云涛, 李竞春, 等. 星点设计-响应面法优化傣药竹叶兰总黄酮超声-双水相提取工艺[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2059.

[责任编辑 刘德文]

欢迎订阅 2014 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管, 中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物, 已成为“中国中文核心期刊”; “中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊; 并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月, 本着提高为主, 提高与普及相结合的办刊方针, 主要设置: 工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、综述、学术交流、信息等栏目, 交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药, 尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者, 以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊, 16 开本, 242 页, 标准刊号: ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期定价 35 元, 全年 840 元。国内外公开发行人, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号: 2-417; 国外由中国国际图书贸易总公司办理发行, 代号: SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 《中国实验方剂学杂志》编辑部, 邮编: 100700, 联系电话: (010) 84076882, 电子邮件: syfjx_2010@188.com, 网址: www.syfjzz.com。