

响应面法优化雷公藤中雷公藤甲素的超声提取工艺

朱锡龙, 王兵, 杨光毅, 魏梨霞, 纪晓玲, 蔡慧真, 褚克丹*

(福建中医药大学, 福州 350108)

[摘要] 目的: 优选雷公藤中雷公藤甲素的超声提取工艺。方法: 以雷公藤甲素得率为指标, 采用响应面设计考察料液比、乙醇体积分数、超声时间及超声温度对雷公藤甲素提取工艺的影响。采用 HPLC 测定雷公藤甲素含量, 流动相乙腈-水(33:67), 检测波长 218 nm。结果: 最佳提取工艺为料液比 1:12, 乙醇体积分数 70%, 提取温度 35 ℃, 提取时间 30 min; 雷公藤甲素得率达 0.037 9 mg·g⁻¹, 与模型预测值(0.038 6 mg·g⁻¹) 较为接近。结论: 优选的超声提取工艺稳定可靠, 与常规回流提取法相比优势明显。

[关键词] 雷公藤; 雷公藤甲素; 超声提取工艺; 响应面设计

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0008-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070008

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000013.html>

[网络出版时间] 2014-01-21 9:10

Optimization of Ultrasonic Extraction Process for Triptolide from *Tripterygium wilfordii* by Response Surface Methodology

ZHU Xi-long, WANG Bing, YANG Guang-yi, WEI Li-xia, JI Xiao-ling, CAI Hui-zhen, CHU Ke-dan*
(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[收稿日期] 20131107(019)

[基金项目] “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAI01B05);福建省科技厅重大专项(2009YZ0001-1-1);国家级大学生创新创业训练计划项目(201310393018)

[第一作者] 朱锡龙,在读硕士,从事中药炮制及质量控制研究,Tel:13799395036,E-mail:121767305@qq.com

[通讯作者] *褚克丹,主任中医师,教授,博士生导师,从事中药制剂及质量控制研究,Tel:0591-22861661,E-mail:chukd5917@163.com

考察丹酚酸 B 的含量测定时^[10],流动相条件均采用 2010 年版《中国药典》“丹参”项下方法中甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:59:1),但为方便起见,将流动相调为甲醇-乙腈-2%甲酸(30:10:60),显示色谱峰分离效果较好。

[参考文献]

[1] 林渊,周良良,吴水生.对中药汤剂剂型改革研究的思考[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):264.
[2] 罗彩莲.传统中药汤剂与免煎中药饮片的对比[J].中国现代药物应用,2012,6(1):24.
[3] 文荣学,秦德明.中药汤剂改革刍议[J].中国保健营养,2013,23(2):943.
[4] 王东青,张亚丽.浅议中药汤剂制备过程中存在的问题[J].国医论坛,2013,28(2):57.

[5] 徐忠坤,郭传宝,殷洪梅,等.正交试验优化羌黄祛痹颗粒处方药材醇提工艺[J].中草药,2012,43(9):1764.
[6] 欧阳春华.芪丹颗粒提取最佳工艺的研究[J].中国现代药物应用,2009,3(16):23.
[7] 唐安福,崔恩忠,汤湜.气血双补口服液的提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):51.
[8] 于百青,杨敏,孙鹏云.高效液相色谱法测定心舒丸中丹参酮 II_A含量[J].中国药业,2012,21(13):36.
[9] 侯广杰.HPLC法测定丹参舒心胶囊中丹参酮 II_A的含量[J].安徽医药,2012,16(4):469.
[10] 程月发,蓝建芳,张珺,等.参胶囊中丹参酮 II_A及丹酚酸 B 含量测定方法研究[J].齐鲁药事,2012,31(7):397.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] Objective: To optimize ultrasonic extraction process of triptolide from *Tripterygium wilfordii*.

Method: With yield of triptolide as index, response surface methodology was adopted to optimize extraction technology by taking material-liquid ratio, ethanol concentration, extraction time and ultrasonic temperature as factors. HPLC was adopted to determine the content of triptolide with mobile phase of acetonitrile-water (33:67) and detection wavelength at 218 nm. **Result:** Optimal extraction conditions were as follows: solid-liquid ratio of 1:12, ethanol concentration 70%, extraction temperature at 35 °C, extraction time 30 min; under these conditions, yield of triptolide was 0.037 9 mg · g⁻¹, which was close to the predicted value(0.038 6 mg · g⁻¹).

Conclusion: This optimized extraction process was stable and reliable, which had obvious advantages by comparing with conventional reflux extraction method.

[Key words] *Tripterygium wilfordii*; triptolide; ultrasound extraction technology; response surface methodolog

雷公藤别名黄藤、黄腊藤、断肠草等,主产于福建、浙江等地,功效祛风除湿、通络止痛、消肿散结、解毒杀虫等^[1]。其主要有效成分雷公藤甲素是一种环氧二萜内酯化合物,具有抗炎^[2-3]、抗肿瘤^[4]、免疫调节及抗生育^[5]等药理作用,常用于治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎、肾小球肾炎、红斑狼疮等病症,对器官移植的排斥反应、肾病综合征等疗效显著^[6]。但雷公藤甲素在雷公藤药材中含量很低,得率仅0.001%^[7-8],常用的提取方法主要有乙醇回流提取-三氯甲烷萃取^[9-11]、索氏提取-乙酸乙酯萃取^[12]等,均存在溶剂用量大、提取时间长、操作繁琐等缺点。超声提取是利用超声波所产生的空化等特殊作用,将药物中所含成分快速高效地提取出来的一项新技术。本实验选择乙醇为提取溶剂,在单因素试验基础上,通过响应面法优选雷公藤中雷公藤甲素的超声提取工艺。

1 材料

XS-105型电子分析天平(梅特勒-托利多国际股份有限公司),HSE-12D型固相萃取仪(天津恒奥科技有限公司),LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津)。雷公藤药材采自福建泰宁雷公藤GAP基地,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室杨成梓副教授鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根及根茎;雷公藤甲素对照品(中国食品药品检定研究院,批号111567-200502),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 雷公藤甲素的含量测定

2.1.1 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(33:67),检测波长218 nm,柱温30 °C,流速1 mL · min⁻¹,进样量20 μL。

2.1.2 标准曲线的绘制 准确称取雷公藤甲素对照品适量,加甲醇制成0.1 g · L⁻¹的储备液。依次吸取该储备液0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按2.1.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,相对峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.074 \times 10^6 X - 745.8$ ($R^2 = 0.9993$),线性范围0.001 4 ~ 0.097 μg。

2.1.3 供试品溶液的制备 将雷公藤饮片切片干燥后,用粉碎机粉碎,过40目筛,备用。精密称取雷公藤粉末2.0 g置于150 mL具塞锥形瓶中,加入一定体积分数的乙醇溶液适量,采用超声辅助法提取,样品提取一定时间后过滤,滤液挥干后残渣加乙酸乙酯溶解,上中性氧化铝固相萃取小柱,加乙酸乙酯洗脱,洗脱液回收溶剂,残渣用甲醇定容至10 mL量瓶中,即得。

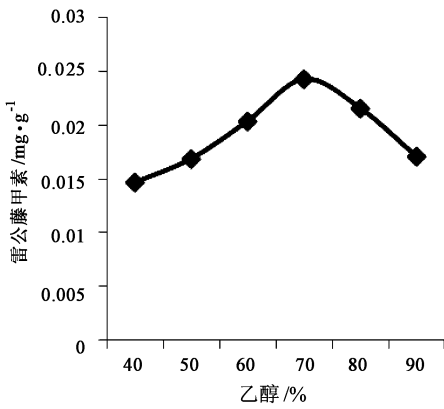
2.1.4 加样回收率试验 精密吸取已知含量的雷公藤样品提取液6份,各加入一定量雷公藤甲素对照品,按2.1.1项下色谱条件测定,结果见表1。

表1 雷公藤甲素含量测定的加样回收率试验

No.	样品中 质量/μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.262	0.232	0.476	92.24	93.79	2.96
2	0.248	0.232	0.471	96.12		
3	0.283	0.232	0.494	90.95		
4	0.247	0.464	0.693	96.12		
5	0.256	0.464	0.706	96.98		
6	0.279	0.464	0.698	90.30		

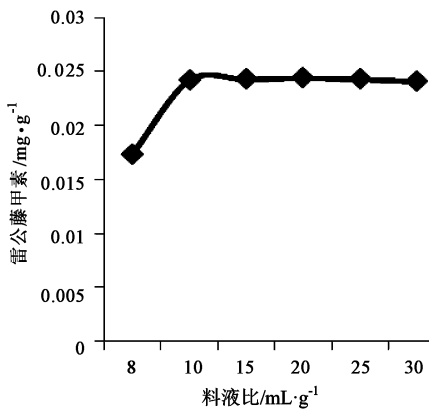
2.2 单因素试验考察 精密称取雷公藤粉末(过40目筛)2.0 g,共6份,分别置于具塞锥形瓶中,加入一定体积分数的乙醇溶液适量,密封后超声提取,考察料液比(1:8,1:10,1:15,1:20,1:25,1:30)、乙

醇体积分数(40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%)、提取温度(20, 30, 40, 50, 60, 80 °C)、提取时间(20, 30, 40, 50, 60, 90 min)对雷公藤甲素提取率的影响, 结果见图1~4。



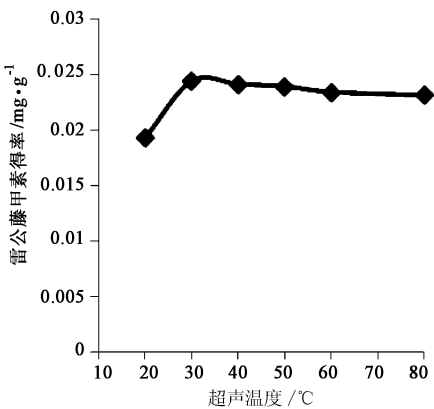
(料液比 1:10, 超声 30 min, 30 °C)

图1 乙醇体积分数对雷公藤甲素得率的影响



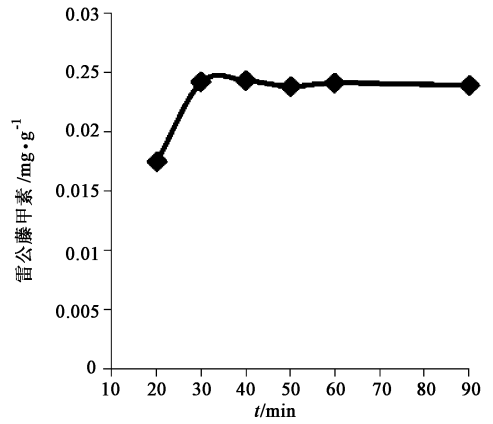
(70% 乙醇, 超声 30 min, 30 °C)

图2 料液比对雷公藤甲素得率的影响



(70% 乙醇, 料液比 1:10, 超声 30 min)

图3 超声温度对雷公藤甲素得率的影响



(70% 乙醇, 料液比 1:10, 30 °C)

图4 超声时间对雷公藤甲素得率的影响

数、提取温度和提取时间为自变量, 采用四因素三水平的响应面分析法进行试验设计, 因素水平见表2, 以雷公藤甲素得率的平均值为响应值, 试验安排及结果见表3。

表2 雷公藤超声提取工艺响应面试验因素水平

水平	A 料液比	B 乙醇体积分数/%	C 提取温度 / °C	D 提取时间 /min
-1	1:10	60	30	30
0	1:15	70	40	40
1	1:20	80	50	50

应用 Design-Expert 8.0.7 软件对表2中数据进行二次多元回归拟合, 得二次多项回归方程 $Y = 0.037 - 1.042 \times 10^{-3}A - 5.500 \times 10^{-4}B - 2.500 \times 10^{-5}C - 6.500 \times 10^{-4}D + 2.750 \times 10^{-4}AB - 7.500 \times 10^{-5}AC + 4.250 \times 10^{-4}AD + 5.250 \times 10^{-4}BC - 3.000 \times 10^{-4}BD + 6.250 \times 10^{-4}CD - 1.080 \times 10^{-3}A^2 - 8.943 \times 10^{-3}B^2 - 6.050 \times 10^{-4}C^2 + 2.825 \times 10^{-4}D^2$, 对上述回归模型进行显著性检验, 结果见表4。

由表4可知, 一次项中A因素对雷公藤甲素得率的线性效应极显著, 因素B, D对雷公藤甲素得率的线性效应显著; 二次项中A²对雷公藤甲素得率的线性效应显著, B²对雷公藤甲素得率的线性效应极显著; 各因素间交互作用的影响无显著性意义。在本试验设计范围内, 回归方程显著性检验极显著, 模型确定系数为0.9839, 说明该模型能解释98.39%响应值的变化, 即该模型与实际试验拟合良好, 试验误差小。

根据回归方程作响应面和等高线, 考察拟合响应面的形状, 考察各自变量对雷公藤甲素提取率的

2.3 响应面分析 根据中心组合试验设计原理, 综合单因素影响试验结果, 选取料液比、乙醇体积分

表3 雷公藤超声提取工艺响应面试验安排

No.	A	B	C	D	雷公藤甲素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	0	-1	0	1	0.029 1
2	0	0	-1	1	0.034 5
3	1	0	0	1	0.035 2
4	0	0	0	0	0.036 4
5	-1	1	0	0	0.027 7
6	0	1	1	0	0.027 3
7	0	0	1	1	0.035 8
8	1	0	0	-1	0.034 7
9	0	1	-1	0	0.025 5
10	0	0	-1	-1	0.038 9
11	-1	-1	0	0	0.028 9
12	0	0	0	0	0.036 9
13	1	0	1	0	0.034 3
14	-1	0	0	-1	0.037 8
15	0	0	0	0	0.037 5
16	0	-1	0	-1	0.028 9
17	0	0	0	0	0.037 3
18	0	-1	-1	0	0.028 4
19	0	0	1	-1	0.037 7
20	-1	0	1	0	0.035 9
21	1	1	0	0	0.025 7
22	1	0	-1	0	0.035 4
23	0	1	0	1	0.027 7
24	-1	0	-1	0	0.036 7
25	0	-1	1	0	0.028 1
26	1	-1	0	0	0.025 8
27	-1	0	0	1	0.036 6
28	0	0	0	0	0.037 2

影响,结果见图5~7。表明因素A,B,D对雷公藤甲素提取率的影响显著,其中A因素的影响最为显著,固定其他因素在一定水平,发现雷公藤甲素得率随料液比的增加而增大,表现为等高线变化最为陡峭;乙醇体积分数和超声提取时间次之,表现为等高线较为平滑。

2.4 验证试验 为确定各因素的最佳取值,利用Design-Expert软件中Optimization的Numerical功能,在模拟范围内选择最低点为出发点,使用最大值优化,即4个主要因素的最佳水平值分别为 $A = -0.67$, $B = -0.04$, $C = -0.51$, $D = -1.00$,转化后得雷公藤甲素的最佳提取工艺为料液比1:11.65,乙醇体积分数69.6%,温度34.9℃,提取30min,预测雷公藤甲素得率 $0.0386\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,调整试验方案,确定料液比1:12,乙醇体积分数70%,提取30min,提取温度35℃。称取雷公藤粉末3份,每

表4 雷公藤提取工艺条件响应面拟合回归模型的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	5.751×10^{-4}	14	4.108×10^{-5}	60.98	<0.000 1
A	1.302×10^{-5}	1	1.302×10^{-5}	19.33	0.000 6
B	3.630×10^{-6}	1	3.630×10^{-6}	5.39	0.035 9
C	7.500×10^{-9}	1	7.500×10^{-9}	0.011	0.917 5
D	5.070×10^{-6}	1	5.070×10^{-6}	7.53	0.015 8
AB	3.025×10^{-7}	1	3.025×10^{-7}	0.45	0.513 7
AC	2.250×10^{-8}	1	2.250×10^{-8}	0.033	0.857 6
AD	7.225×10^{-7}	1	7.225×10^{-7}	1.07	0.317 9
BC	1.103×10^{-6}	1	1.103×10^{-6}	1.64	0.221 6
BD	3.600×10^{-7}	1	3.600×10^{-7}	0.53	0.476 8
CD	1.563×10^{-6}	1	1.563×10^{-6}	2.32	0.150 0
A^2	7.566×10^{-6}	1	7.566×10^{-6}	11.23	0.004 8
B^2	5.187×10^{-4}	1	5.187×10^{-4}	770.00	<0.000 1
C^2	2.374×10^{-6}	1	2.374×10^{-6}	3.52	0.081 5
D^2	5.177×10^{-7}	1	5.177×10^{-7}	0.77	0.395 5
残差	9.431×10^{-6}	14	6.737×10^{-7}		
失拟态	8.699×10^{-6}	10	8.699×10^{-7}	4.75	0.073 2
绝对误差	7.320×10^{-7}	4	1.830×10^{-7}		
总离差	5.845×10^{-4}	28			

注:模型确定系数0.983 9,模型调整确定系数0.967 7。

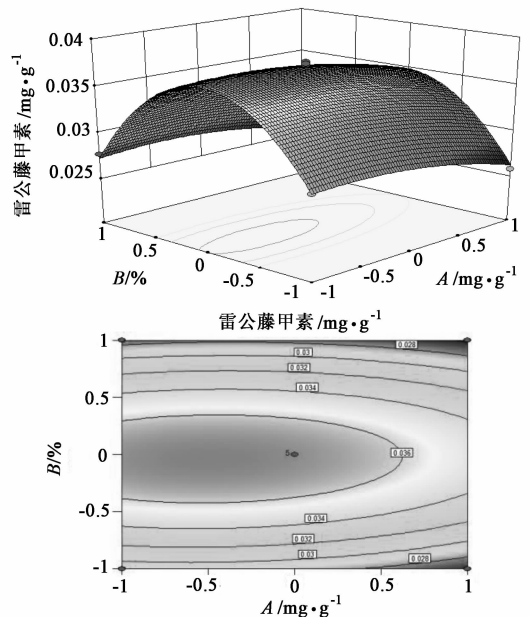


图5 料液比与乙醇体积分数对雷公藤甲素得率影响的响应面和等高线

份约2.0g,按最佳工艺条件进行验证试验,按2.1.1项下色谱条件测定,计算雷公藤甲素得率分

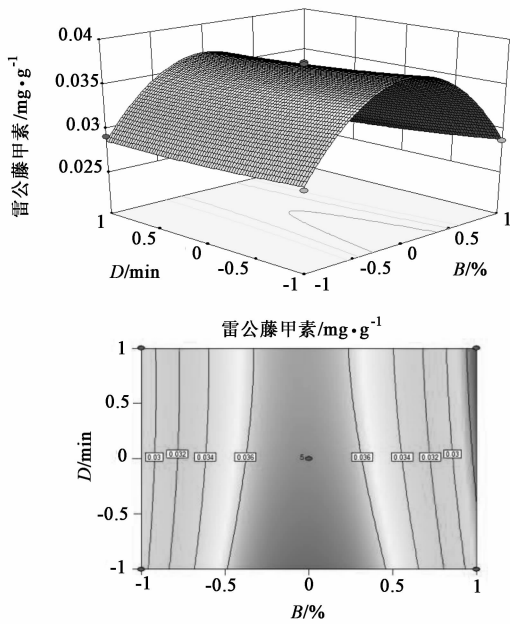


图6 乙醇体积分数与提取时间对雷公藤甲素得率影响的响应面和等高线

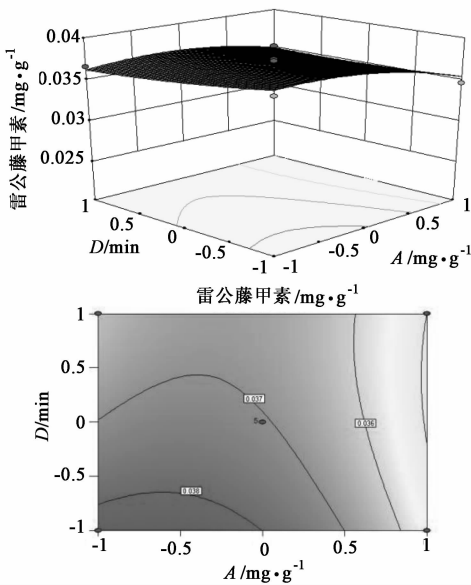


图7 料液比与提取时间对雷公藤甲素得率影响的响应面和等高线

别为 $0.0377 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $0.0382 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $0.0378 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 与预测值较为接近, 说明建立的模型可靠。

3 讨论

本文采用响应面法优化雷公藤中雷公藤甲素的

超声提取工艺, 超声辅助提取技术相比传统回流提取, 可节省大量时间、降低消耗、提高效率, 从而降低生产成本、提高经济效益。考虑到超声过程中乙醇容易挥发而导致乙醇体积分数发生改变, 故使用具塞磨口锥形瓶盛装乙醇溶液与药材进行超声, 并用封口膜封口, 以减少乙醇的挥发。

[参考文献]

[1] 马伟光, 张滔, 张超, 等. 有毒药物雷公藤的研究及展望[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(2): 117.

[2] Tao X, Younger J, Fan F Z, et al. Benefit of an extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F in patients with rheumatoid arthritis; a double-blind, placebo-controlled study[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(7): 1735.

[3] Wang B, Ma L, Tao X, et al. Triptolide, an active component of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F, inhibits production of nitric oxide by decreasing inducible nitric oxide synthase gene transcription[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(9): 2995.

[4] Yang S M, Chen J G, Guo Z, et al. Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(1): 65.

[5] Zhen Q S, Ye X, Wei Z J. Recent progress in research on *Tripterygium*: A male antifertility plant [J]. Contraception, 1995, 51(2): 121.

[6] 张季, 严春临. 中药雷公藤甲素药理学和毒理学研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2006, 25(6): 55.

[7] 程敬丽, 朱烈, 朱国念, 等. 雷公藤甲素的提取工艺[J]. 农药, 2005, 44(7): 316.

[8] 郭舜民, 夏志林. 雷公藤甲素的半合成研究[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(1): 13.

[9] 罗兴旺, 夏志林. 从雷公藤茎叶中提取雷公藤内酯醇工艺研究[J]. 抗感染药学, 2003(3): 20.

[10] 汪达兴. 对雷公藤多甙粗品提取工艺的改进[J]. 医药工程设计, 1989(5): 1.

[11] 朱烈, 程敬丽, 朱国念. 雷公藤甲素提取方法研究[J]. 浙江农业科学, 2005(6): 485.

[12] 孙乙铭, 徐建中, 王志安, 等. HPLC 测定不同采收年限雷公藤根及不同部位雷公藤甲素含量[J]. 中国现代医药, 2009, 26(11): 904.

[责任编辑 全燕]