

星点设计-效应面法优化升麻提取工艺

王秋红, 苏阳, 吴伦, 王知斌, 杨炳友, 匡海学*

(黑龙江中医药大学北药基础与应用研究省部共建重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 采用星点设计-效应面法优选升麻中总皂苷的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、提取时间、溶媒比为自变量, 以升麻总皂苷得率为因变量, 通过对自变量各水平的多元线性回归及二项式拟合, 用效应面法选取最佳工艺, 同时进行预测分析。结果: 确定最优提取工艺为15倍量65%乙醇提取3次, 每次170 min, 提取预测值与理论值偏差0.4%, 二项式拟合复相关系数 $r=0.9884$ 。结论: 星点设计-效应面法优化的升麻总皂苷提取工艺, 方法简单, 精密度高, 可预测性较优。

[关键词] 升麻; 星点设计; 效应面优化法; 总皂苷; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0024-04

Optimization of Extraction Technology for *Cimicifuga dahurica* by Central Composite Design/Response Surface Methodology

WANG Qiu-hong, SU Yang, WU Lun, WANG Zhi-bin, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Base, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total saponins from *Cimicifuga dahurica* by central composite design/response surface methodology. **Method:** Independent variables were ethanol concentration, reflux time and solvent fold, dependent variable was extraction rate of total saponins from *C. dahurica*. Level of independent variables were regressed by multiple linear and fitted by binomial. Response surface methodology was used to optimize extraction process. Prediction was carried out by comparing observed and predicted values. **Result:** Optimal extraction technology was: extracted 3 times by 15 times the amount of 65% ethanol with 170 min each time, deviation between observed and predicted values was 0.4%. Regression coefficients of binomial fitting complex model was as high as 0.9884. **Conclusion:** This extraction process of total saponins from *C. dahurica* by central composite design/response surface methodology was a simple method with high precision and good predictability.

[Key words] *Cimicifuga dahurica*; central composite design; response surface methodology; total saponins; extraction process

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom. 兴安升麻 *C. dahurica* (Turcz.) Maxim. 或升麻 *C. foetida* L. 的干燥茎。其味辛、

微甘, 微寒, 有发表投疹、清热解毒、升举阳气之功效^[1]。其主要化学成分有环菠萝蜜烷型三萜及其衍生物, 阿魏酸、异阿魏酸等咖啡酸衍生物和色酮

[收稿日期] 20110906(008)

[基金项目] 黑龙江省创新研究群体科学基金项目(YJSCX2011-429HLT)

[第一作者] 王秋红, 教授, 博士, 从事中药炮制、中药药效物质基础及新药研究, Tel: 0451-82195994, E-mail: qhwang668@sina.com

[通讯作者] * 匡海学, 教授, 博士, 从事中药及天然药物药效物质基础研究, Tel: 0451-82193001, E-mail: zhkuang@hotmail.com

类化合物等。现代药理学证实升麻中的三萜化合物具抑制核昔转运、抗病毒^[2]及防治骨质疏松^[3-4]等多种活性,酚酸类化合物具有抗炎、解热、镇痛、镇静、抗氧化等作用^[5]。其提取工艺的优化,目前国内采用正交设计法或均匀设计法优化提取工艺,2种方法均采用线性数学模型,具有简便、试验次数少等优点,但精度不高。星点设计-效应面法是目前国外常用的实验设计方法,近年国内已有将其应用于优化处方或制剂工艺的报道^[6-9],本实验以升麻总皂苷含量为评价指标,引入星点设计-效应面法优选升麻的提取工艺,旨在对升麻提取工艺进行优化,为升麻进一步的合理研究与利用奠定基础,同时也为探讨该法应用传统药材提取工艺的可行性提供依据。

1 仪器与试剂

756-PC型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),AL204型电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司),HH-S型恒温水浴锅(江苏金坛市医疗仪器厂),升麻总皂苷对照品(实验室自制,HPLC检测纯度>98%),高氯酸(霸州市鑫盛源化工工业有限公司),香草醛(沈阳环化特种试剂有限公司),冰乙酸(天津市广成化学试剂有限公司),所用试剂均为分析纯,药材采自黑龙江省方正县高楞林业局,经黑龙江中医药大学药学院药用植物教研室鉴定为兴安升麻 *C. dahurica* 的干燥果实。

2 方法与结果

2.1 星点设计试验 根据文献报道及中药材传统提取经验和预试验结果,升麻回流提取的影响因素有乙醇体积分数、提取时间、溶媒比^[10],因提取次数为非连续变量,回归处理较困难,暂固定为3次。根据星点设计的原理,每个因素设5水平,用代码- α , -1, 0, 1, α 来表示,代码所代表的实际操作物理量见表1。

表1 升麻总皂苷醇提工艺星点设计试验因素水平

水平	X_1 乙醇体积分数 /%	X_2 提取时间 /min	X_3 溶媒比 /倍
-1.682	50	60	6
-1	59.12	88.38	10.87
0	72.50	130	18
1	85.88	171.62	25.13
1.682	95	200	30

2.2 升麻中总皂苷含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取升麻总皂苷对照品5 mg置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取升麻药材粉末约10 g,精密称定,置圆底烧瓶中,用65%乙醇150 mL加热回流,回流3次,每次170 min,合并提取液,回收乙醇,得其浸膏,用甲醇定溶于25 mL量瓶中,摇匀,即得。

2.2.3 最大吸收波长的确定 精密吸取上述升麻总皂苷对照品溶液,回收甲醇至干,加5%香草醛溶液1 mL,高氯酸4 mL,在60℃水浴中加热15 min,取出置冰水中冷却2~3 min,以甲醇为空白溶剂,照紫外-可见分光光度法2010年版《中国药典》一部附录VA,于200~800 nm扫描,结果在537 nm处有最大吸收,故以537 nm为测定波长。

2.2.4 标准曲线制备 精密吸取0.5 g·L⁻¹上述升麻总皂苷对照品溶液0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL回收甲醇至干,加5%香草醛溶液1 mL,高氯酸4 mL,60℃水浴中加热15 min,取出置冰水中冷却2~3 min,以甲醇为空白溶剂,于537 nm处测吸光度。以升麻总皂苷对照品质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.0211X - 0.0309$ ($r = 0.9993$),在4.167~41.667 mg·L⁻¹呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取0.5 g·L⁻¹的升麻总皂苷对照品溶液0.5 mL,重复测定10次,升麻总皂苷对照品溶液吸光度RSD 0.37%,表明测定方法精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于0, 5, 10, 20, 30 min进行测定,吸光度RSD 2.54%,结果表明供试品溶液在30 min内显色稳定。

2.2.7 重复性试验 精密吸取同一提取液6份,按照2.2.2项下供试品溶液的制备方法制备,精密吸取10 μ L供试品溶液,再按2.2.3项下显色方法处理样品,以甲醇为空白溶剂,在537 nm测定吸光度并计算升麻总皂苷含量。结果升麻总皂苷平均质量分数为每克生药66.50 mg, RSD 1.7%,表明该法具有良好的重复性。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量升麻药材粉末6份,每份约5 g,精密称定。分别置圆底烧瓶中,分别精密加入升麻总皂苷对照品适量,按照2.2.2项下供试品溶液的制备方法制备,精密吸取10 μ L供试品溶液,再按2.2.3项下显色方法处理样品,于537 nm测定吸光度,计算加样回收率,结果见表2。

表 2 升麻总皂苷加样回收率试验 (n=6)

No.	称样量/g	样品含量/g	对照品加入量/g	测得量/g	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	5.021	0.326	0.300	0.624	99.39	99.64	0.41
2	5.020	0.320	0.300	0.619	99.69		
3	5.024	0.321	0.300	0.618	99.06		
4	5.017	0.318	0.300	0.617	99.69		
5	5.019	0.326	0.300	0.627	100.30		
6	5.022	0.327	0.300	0.626	99.69		

2.3 效应面优化 试验以升麻总皂苷得率为因变量进行多元线性回归和二项式拟合,运用统计分析软件 Design-Expert 7,拟合方程如下多元线性回归: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$,二项式拟合: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_1X_3 + b_9X_2X_3$ 。分析结果,得到回归方程,绘制出效应曲面。

2.4 统计分析 取升麻粉末约 10.0 g,精密称定,按表 3 试验号进行提取,滤过,提取液浓缩,按照上述测定方法,测定升麻中总皂苷得率,试验安排与结果见表 3。

以总皂苷得率为因变量对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,使用 Design-Expert 7,拟合模型, $r = 0.8283$, $P = 0.034$,模型不能通过检验,模型拟合度不高,预测性也不好,因此不采用线性模型拟

表 3 升麻中总皂苷醇提工艺星点试验设计

No	X_1 乙醇体积 分数/%	X_2 提取时间 /min	X_3 溶媒比 /倍	总皂苷得率 /%
1	-1	-1	-1	5.85
2	1	-1	-1	5.79
3	-1	1	-1	6.64
4	1	1	-1	6.33
5	-1	-1	1	5.74
6	1	-1	1	5.79
7	-1	1	1	6.47
8	1	1	1	6.29
9	-1.682	0	0	6.01
10	1.682	0	0	5.85
11	0	-1.682	0	5.79
12	0	1.682	0	6.86
13	0	0	-1.682	6.22
14	0	0	1.682	6.01
15~20(重复)	0	0	0	6.26(均值)

表 4 升麻总皂苷醇提工艺拟合回归方程的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.75	9	0.19	94.40	<0.000 1
X_1	0.043	1	0.043	21.01	0.001 0
X_2	1.39	1	1.39	674.93	<0.000 1
X_3	0.033	1	0.033	16.09	0.002 5
X_1X_2	0.029	1	0.029	13.97	0.003 9
X_1X_3	7.20×10^{-3}	1	7.20×10^{-3}	3.49	0.091 2
X_2X_3	1.25×10^{-3}	1	1.25×10^{-3}	0.61	0.454 2
X_1^2	0.20	1	0.20	97.89	<0.000 1
X_2^2	6.54×10^{-3}	1	6.54×10^{-3}	3.17	0.105 2
X_3^2	0.040	1	0.040	19.59	0.001 3
残差	0.021	10	2.06×10^{-3}		
失拟项	2.49×10^{-3}	5	4.97×10^{-4}	0.14	0.976 0
误差	0.018	5	3.63×10^{-3}		
总离差	1.77	19			

合。二项式拟合复相关系数 $r = 0.9884$, $P < 0.0001$,各项方差分析结果见表 4。从表 4 可以看出,各因素中一次项、二次项都是具有显著性差异,说明个具体实验因子对效应值的影响不是简单的线性关系。最后选择二项式拟合模型为成功模型,实测值和预测值基本吻合,有较好的预测作用。

多元线性回归方程 $Y = 6.16 - 0.056X_1 + 0.32X_2 - 0.049X_3$

二项式拟合方程 $Y = 6.28 - 0.056X_1 + 0.32X_2 - 0.049X_3 - 0.060X_1X_2 - 0.12X_1^2 - 0.055X_3^2$

2.5 工艺条件优化与预测把因变量与另两因素拟合为三维曲面图,固定 3 个变量中的 1 个为中值,再以拟合的目标函数为数学模型,绘制因变量曲面图(见图 1~3),在图上选取总皂苷得率最佳工艺范围 $X_1:63\% \sim 67\%$, $X_2:165 \sim 180 \text{ min}$, $X_3:14 \sim 17$ 倍,考虑到工业生产的实际情况,故把试验选取提取升麻中总皂苷的优化工艺暂定为 15 倍量 65% 乙醇回流 3 次,每次 170 min。

2.6 提取次数对升麻总皂苷提取效果的影响按溶媒比 15 倍量 65% 乙醇,分别连续回流提取 1,2,3

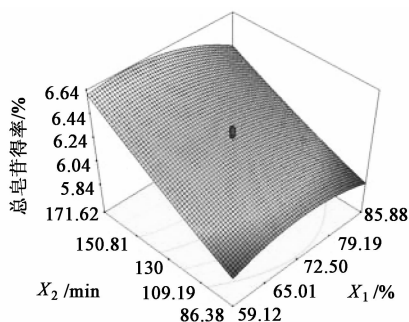


图1 乙醇体积分数和提取时间对含总皂苷量效应曲面

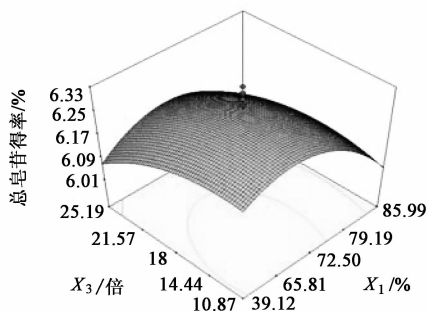


图2 乙醇体积分数和溶剂比对总皂苷含量效应曲面

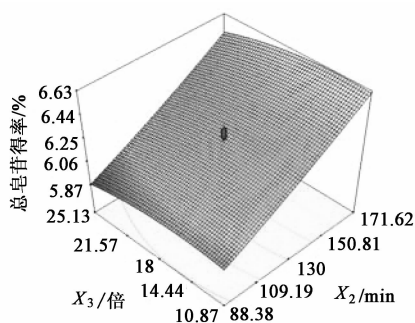


图3 提取时间和溶媒比对总皂苷含量效应曲面

次,每次 170 min,按照 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备,精密吸取 10 μL 供试品溶液,再按 2.2.3 项下显色方法处理样品,以甲醇为空白溶剂,在 537 nm 测定吸光度并计算升麻总皂苷含量。提取 1 次,升麻中总皂苷的含量测定值为 $50.489 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 2.31%),连续提取 2 次,升麻中总皂苷的含量测定值为 $60.489 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 2.16%),连续提取 3 次,升麻中总皂苷的含量测定值为 $64.174 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.41%),根据试验测定结果和工业生产实际情况,把提取次数定为连续提取 3 次。

2.7 验证试验 按上述最佳工艺条件提取并测定升麻中总皂苷的含量,真实值为 $64.502 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.21%,预测值 $65.985 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。结果表明所建立的数学模型具有良好的预测性,所选工艺条件重现性好。

3 讨论

升麻提取物多用于治疗女性雌激素失调而引起的疾病,如更年期综合征、因手术切除卵巢或子宫而导致的雌激素紊乱等,同时在抗骨质疏松及抗肿瘤等方面运用也较广。为充分发挥升麻的功效,合理利用资源,本实验以升麻总皂苷得率为评价指标,对升麻提取工艺进行优化,为升麻提取物行业发展奠定了基础。试验结合星点试验设计方法深入地对比升麻总皂苷提取工艺参数进行系统考察,发现提取时间和乙醇体积分数,以及乙醇体积分数与乙醇用量的交互作用和变化趋势,考察总皂苷得率,并绘制了效应面图,有助于深入了解升麻提取过程的变量参数。采用该方法确定升麻提取工艺表现出较高的总皂苷得率,验证试验表明所建立的模型具有较好的预测性。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010: 50.
- [2] 林新,蔡有余,肖培根. 升麻皂甙体外 SIV 抑制作用及其机制[J]. 华西药学杂志, 1994, 9(4): 221.
- [3] 李春梅,刘志峰,李敏,等. 升麻提取物对去卵巢所致大鼠骨质疏松症的作用[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1686.
- [4] LI J X, LIU J, HE C C, et al. Triterpenoids from cimicifugae rhizoma, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss [J]. Maturitas, 2007, 58(1): 59.
- [5] 刘勇,陈迪华,陈雪松. 升麻属植物的化学、药理与临床研究[J]. 国外医学·植物药分册, 2001, 16(2): 55.
- [6] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学·药学分册, 2000, 27(5): 292.
- [7] 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]. 中国药理学杂志, 2000, 35(8): 530.
- [8] 吴伟,阙刚,陈健,等. 星点设计-效应面法优化苯甲酸利扎曲普坦片的处方[J]. 复旦大学学报:医学版, 2003, 30(4): 381.
- [9] 刘艳杰,项荣威. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用.[J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(6): 455.
- [10] 靳波,刘友平,彭月,等. 多指标正交试验优选升麻提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 27.

[责任编辑 全燕]