

星点设计-响应面分析法优选陕产铁筷子皂苷提取工艺

王月茹¹ 谢伟² 张建² 席鹏洲²

(1 陕西国际商贸学院, 咸阳, 712046; 2 陕西步长制药有限公司, 西安, 710075)

摘要 目的: 采用星点设计-响应面分析法优化陕产铁筷子皂苷的醇提取工艺。方法: 选用乙醇为提取溶剂, 以乙醇浓度、乙醇倍数、提取时间为自变量, 铁筷子皂苷含量为因变量, 采用响应面分析法优化该药材的提取工艺参数。结果: 确定了提取工艺的最佳条件为: 乙醇浓度 70%, 提取时间 2 h, 乙醇倍数 6.5 倍。在此条件下铁筷子提取物中皂苷的含量为 0.065 8 g/g, 二项式拟合复相关系数 $R^2 = 0.847 5$ 。结论: 该工艺方法能够用于陕产铁筷子皂苷的提取, 并且具有简单、可行, 预测性较好优势。

关键词 铁筷子; 星点设计; 响应面; 提取工艺

Optimization of Extraction Technology for *Helleborus Thibetanus* Franch of Shaanxi by Central Composite Design-Response Surface Method

Wang Yueru¹, Xie Wei², Zhang Jian², Xi Pengzhou²

(1 *Shaanxi Institute of International Trade and Commerce, Xianyang 702046, China*;

2 *Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co. Ltd., Xi'an 710075, China*)

Abstract Objective: To optimize the extraction technology of total dioscin from *Helleborus thibetanus* Franch of Shaanxi by central composite design response surface method. **Methods:** Ethanol was used as the extraction solvent, and the parameters of extraction technology of total dioscin from *Helleborus thibetanus* Franch were optimized by 3 factors and 5 levels. Independent variables were ethanol concentration, ethanol multiples and extraction time; dependent variable was the dioscin content. **Results:** The optimal extraction technology was realized by the following conditions: ethanol concentration was 70%, ethanol was multiplied with 6.5 times, and extraction time was 2 hours. The maximal yield of total dioscin reached to 0.065 8 g/g. Regression coefficient of the binomial fitting complex model was 0.8475. **Conclusion:** The technology can be used as the extraction process of total dioscin from *Helleborus thibetanus* Franch of Shaanxi.

Key Words *Helleborus thibetanus* Franch; Central composite design; Response surface methodology; Extraction process

中图分类号: R284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.12.028

铁筷子 (*Helleborus thibetanus* Franch) 为毛茛科铁筷子属的草本植物, 别名黑毛七、见春花、九百棒, 经考, 诸历代本草文献认为铁筷子主要有两种: 毛茛科植物铁筷子和腊梅科植物腊梅根, 陕西生长的中药铁筷子为毛茛科植物铁筷子的干燥根及根茎, 其主要功效有: 清热解毒, 活血散瘀, 消肿止痛。主治膀胱炎、尿道炎、疮疗肿毒、跌打损伤、劳伤^[1-2]。目前, 关于陕产铁筷子皂苷提取工艺的相关报道较少, 在药制剂工艺和处方筛选过程中, 常需同时考察多个因素对结果的影响, 并对结果进行优化。当因素水平数较多时, 考虑到试验成本和试验周期, 需采用试验次数较少的试验设计优化法。国内现在用得比较成熟的方法为均匀设计和正交试验设计方法。虽然, 上述两种方法在试验处理时可以取得较佳点, 基本可以满足一般试验的要求。但是它们还存在一些问题, 如试验的精度不够, 选择的试验取值仅仅是接近最佳取值, 无法精确找到最佳点;

条件优选凭经验, 不能灵敏地考察各因素间的交互作用等等。鉴于以上问题, 为了更加优选出铁筷子总皂苷的提取工艺, 笔者在实验中运用国内外近年来常用集数学和统计学方法于一体的星点设计效应面优化法进行试验设计, 星点设计 (Central Composite Design, CCD) 是一种新型的试验设计方法, 简单地说, 效应面优化法就是通过拟合效应变量对考察因素变量的效应面, 即函数 f 可以用某一数学模型 f' 近似地模拟函数, 依据该模型可以描绘效应面, 从效应面上选择最优的效应域, 利用 f' 求得自变量 $x_1, x_2, \dots, x_n$ 取值范围即最佳试验条件的优化法。该方法具有试验次数少, 试验精度高, 能够采用非线性预测模型拟合, 在中心点进行重复试验以提高精度, 使预测值更接近真实值等特点, 在药学应用上成效显著^[3-6]。然客观来说, 该方法不适宜用于非连续型变量的考察, 所以在设计试验时应尽可能选用连续变量, 而非连续性变量宜用其他方法

先考察。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, Empower 色谱工作站, 2996 二极管阵列检测器; 梅特勒电子天平。

1.2 试剂 薯蓣皂苷元对照品(中国药品生物制品检定所提供), 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。铁筷子药材采自陕西秦岭山区。

2 方法与结果

2.1 陕产铁筷子皂苷元的含量测定^[7]

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 用 Waters 2695 高效液相色谱仪, 2996PDA 检测器, 色谱柱 C₁₈ ODS 柱; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 ℃; 检测波长: 203 nm; 流动相: (乙腈: 水 = 85: 15)。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取薯蓣皂苷元对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.6 mg 溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取 20 份铁筷子药材, 每份 20 g, 按照表 2 的实验设计进行回流提取, 提取液过滤, 滤液定容, 即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密移取薯蓣皂苷元对照品 5 μL、10 μL、20 μL、25 μL、30 μL 注入高效液相色谱仪中, 在上述的色谱条件下进行分析, 以峰面积 A 为纵坐标, 薯蓣皂苷元含量 C(μg) 为横坐标绘制标准曲线。计算得回归方程为: $A = 201\ 120C - 75\ 214$, 相关系数 $r = 0.999\ 7$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 并依据上述色谱条件, 记录峰面积, 结果 RSD 为 1.24% ($n = 6$)。

2.1.6 稳定性试验 对照品溶液在 1 h、2 h、4 h、8 h、24 h 分别取 10 μL, 记录峰面积, 结果 RSD 为 1.46%。

2.1.7 重复性试验 取同一样品适量, 共 6 份, 照“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液, 分别精密取 10 μL 进样, 在上述色谱条件下测得样品, RSD 为 3.52%, 表明此方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 采取加样回收法, 取一定量已知含量的样品 6 份, 分别精密加入薯蓣皂苷元对照品适量, 照“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定含量, 计算回收率为 99.78%, RSD 为 2.96%。

2.1.9 样品的测定 精密吸取制备好的供试品溶液, 依上述色谱条件测定, 计算即得。

2.2 星点设计-响应面法优选方法^[8-16]

2.2.1 实验因素的确定 铁筷子皂苷是黄酮属于中等极性物质, 可选择乙醇作为提取剂, 结合药学领域的提取特点和产业化方法, 因此本实验的考察因素可以

是乙醇浓度、提取时间、提取次数和溶媒用量, 其中由于提取次数为非连续变量, 不能进行统计学上的回归处理, 故本实验中对提取次数结合生产的成本、提取率及其预实验的结果, 暂定为 3 次。

2.2.2 试验设计及结果 根据 CCD 原理, 选取乙醇浓度, 提取时间, 溶媒用量对薯蓣皂苷元含量影响显著的 3 个因素, 采用 3 因素 5 水平的响应面分析方法进行设计, 试验设计与结果分别见表 1、表 2。

表 1 因素水平表

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X ₁ 乙醇浓度/%	29.77	40	55	70	80.23
X ₂ 溶媒用量/倍	2.64	4	6	8	9.36
X ₃ 提取时间/min	39.55	60	90	120	140.45

表 2 星点设计试验及结果

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	含量/g · g ⁻¹
1	0	0	0	0.059 8
2	1	1	-1	0.055 2
3	0	0	0	0.059 6
4	0	0	0	0.058 6
5	1	-1	-1	0.048 1
6	0	1.682	0	0.054 2
7	-1	1	1	0.045 2
8	-1.682	0	0	0.042 5
9	1	1	1	0.059 6
10	0	0	0	0.062 1
11	0	0	0	0.062 2
12	-1	-1	1	0.042 5
13	-1	1	-1	0.045 8
14	-1	-1	-1	0.041 2
15	0	0	-1.682	0.058 1
16	1.682	0	0	0.062 1
17	0	0	1.682	0.062 1
18	1	-1	1	0.055 2
19	0	-1.682	0	0.046 9
20	0	0	0	0.063 2

2.2.3 模拟方程的建立与方差分析 应用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的数据进行多元线性回归和二项式方程拟合, 得到乙醇浓度(X₁)、溶媒用量(X₂)、提取时间(X₃)与薯蓣皂苷元之间的二项式回归方程和多元线性回归方程, 分别如下: $Y = 0.061 + 5.592 \times 10^{-3} X_1 + 2.276 \times 10^{-3} X_2 + 1.386 \times 10^{-3} X_3 + 5.250 \times 10^{-4} X_1 X_2 + 1.350 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 5.750 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 4.063 \times 10^{-3} X_1^2 - 4.682 \times 10^{-3} X_2^2 - 1.305 \times 10^{-3} X_3^2$ 。对该二项式模型进行方差分析, 结果见表 3, 其中 $R = 0.920\ 6$, 该模型拟合度较好并具有显著的统计学意义 $P < 0.001$, 充分证明响应面法优化陕产铁筷子皂苷提取工艺是可行的。

表3 星点设计试验及结果

方差来源	SS	df	MS	F	P
模型	1.052×10^{-3}	9	1.168×10^{-4}	12.73	0.000 2 **
X ₁	4.270×10^{-4}	1	4.270×10^{-4}	46.52	<0.000 1 ***
X ₂	7.072×10^{-5}	1	7.072×10^{-5}	7.70	0.019 6 *
X ₃	2.623×10^{-5}	1	2.623×10^{-5}	2.86	0.121 8
X ₁ X ₂	2.205×10^{-6}	1	2.205×10^{-6}	0.24	0.634 6
X ₁ X ₃	1.458×10^{-6}	1	1.458×10^{-6}	1.59	0.236 2
X ₂ X ₃	2.645×10^{-6}	1	2.645×10^{-6}	0.29	0.603 1
X ₁ ²	2.379×10^{-4}	1	2.379×10^{-4}	25.92	0.000 5 **
X ₂ ²	3.158×10^{-4}	1	3.158×10^{-4}	34.41	0.000 2 **
X ₃ ²	2.455×10^{-5}	1	2.455×10^{-5}	2.67	0.133 0
残差	9.179×10^{-5}	10	9.179×10^{-6}		
失拟项	7.518×10^{-5}	5	1.504×10^{-5}	4.53	0.061 5
误差	1.661×10^{-5}	5	3.322×10^{-6}		
总离差	1.143×10^{-3}	19			

注: *** $P < 0.000 1$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ 。

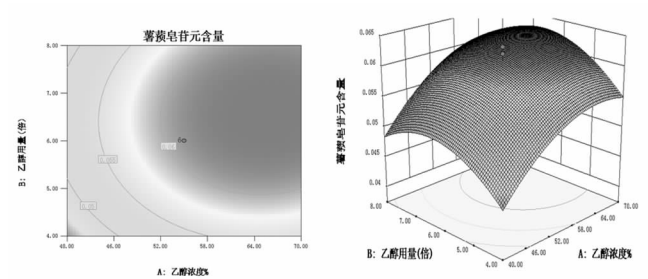


图1 乙醇浓度和溶媒用量对薯蓣皂苷元含量的影响

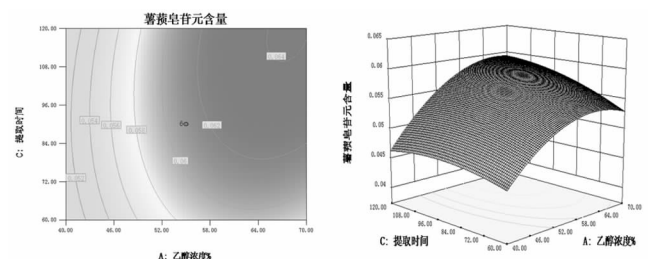


图2 乙醇浓度和提取时间对薯蓣皂苷元含量的影响

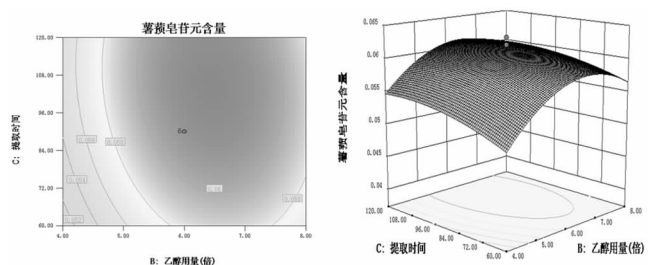


图3 溶媒用量和提取时间对薯蓣皂苷元含量的影响

2.2.4 工艺参数优化与预测 把因变量与其中任2个因素拟合为三维曲面图,以拟合目标函数为数学模型,绘制因变量曲面和等高线图(见图1-图3),在图上选取薯蓣皂苷元得率最佳工艺参数:乙醇浓度67.84%,提取时间117.63 min,溶媒用量倍数6.48倍,考虑到工业生产的实际情况,故把提取铁筷子中薯蓣皂苷元的优化工艺暂定为乙醇浓度为70%,提取时

间为120 min,溶媒比为6.5倍。由简化后的二项式模型进行预测分析,薯蓣皂苷元含量最大值为0.064 4 g/g,根据最优工艺进行验证试验,实际皂苷元提取量平均值为0.065 8 g/g ($n = 3$),实际值比预测值高2.13%。

3 讨论

本试验采用星点设计-响应面法对铁筷子中的薯蓣皂苷元提取方法进行了研究,最终预测最佳提取工艺条件为:乙醇浓度70%,提取3次,每次提取时间为2 h,溶媒比为6.5倍,二项式拟合判定系数较高($R = 0.920 6$),在此工艺条件下陕产铁筷子提取物中薯蓣皂苷元的含量为0.065 8 g/g。

参考文献

- [1] 王月茹,赵涛,卢露,等. 陕产中药铁筷子质量标准研究[J]. 陕西中医,2012,33(6):739-740.
- [2] 王月茹,赵涛,卢露,等. 陕产中药铁筷子显微鉴别研究[J]. 陕西中医,2012,33(10):1416-1417.
- [3] 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):293-297.
- [4] 涂瑶生,李绍林,孙冬梅. 星点设计-效应面法优化苦参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):34-37.
- [5] 崔庆新,刘军海. 响应面分析法优化党参多糖提取工艺[J]. 药物分析杂志,2011,31(5):816-820.
- [6] 颜军,甘亚. 星点设计-效应面法优化槐米中芦丁提取工艺[J]. 中药材,2011,34(4):628-631.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [8] 白曼,马丽娜,张小飞,等. 星点设计-响应面分析法优选穿山龙总皂苷提取工艺[J]. 中草药,2013,11(1):4-7.
- [9] 涂瑶生,李绍林,孙冬梅. 星点设计-效应面法优化苦参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):34-37.
- [10] 崔庆新,刘军海. 响应面分析法优化党参多糖提取工艺[J]. 药物分析杂志,2011,31(5):816-820.
- [11] 张园,康廷国,尹海波. 星点设计-响应面法优化穿龙薯蓣多糖提取工艺[J]. 中药材,2011,34(1):123-126.
- [12] 李长田,李江楠,赵伟. 响应面法优化穿龙薯蓣中薯蓣皂苷的提取[J]. 时珍国医国药,2011,22(8):2044-2047.
- [13] 程骥,戴林东,朱家壁. 星点设计-效应面法优化双嘧达莫肺靶向脂质体[J]. 中国药学杂志,2006,41(10):762-765.
- [14] 孙磊,王玉蓉. 星点设计-效应面法优选远志的提取工艺[J]. 中成药,2006,28(3):328-331.
- [15] 梁丹,欧阳小光,熊万娜. 星点设计-效应面法优选金银花中绿原酸回流提取工艺[J]. 广西中医学院学报,2006,9(4):58-60.
- [16] 吴清,倪宁,王玉蓉,等. 星点设计-效应面法优选人参叶酶法提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(4):5-8.

(2014-02-07 收稿 责任编辑:徐颖)