

响应面法优化穿山龙总皂苷提取工艺

施政, 王建平, 章建军, 蒋剑平* (浙江省中医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 优化穿山龙总皂苷的提取工艺。方法 采取超声波辅助纤维素酶法提取穿山龙总皂苷; 以单因素实验结果为基础, 利用响应面设计系统分析且优化影响总皂苷含量的主要因素, 从而建立影响因素与对应的响应值之间的数学关系模型, 得到最优提取条件。结果 最佳提取工艺条件为 pH 值 6.0, 水浴温度 31.3 ℃, 乙醇浓度 44.21%, 总皂苷得率为 0.421%。结论 优化所得工艺操作方便、效率高, 适合工业化大生产。

关键词: 穿山龙; 响应面设计; 薯蓣总皂苷; 超声辅助提取; 纤维素酶

中图分类号: R285.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)01-0068-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.016

Optimizing the Extraction Process of the Total Saponin of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* by Response Surface Methodology

SHI Zheng, WANG Jianping, ZHANG Jianjun, JIANG Jianping* (Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction conditions of the total saponin from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*. **METHODS** Ultrasonic assisted cellulose enzymatic extraction was used to extract the total saponin from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*. With the basis of the single factor experimental results, the main factors which influence the content of total saponin by using response surface methodology(RSM) were analyzed and optimized. The mathematical model was founded between the influence factors and the response values, and then got the optimum extracting conditions. **RESULTS** The optimal conditions of total saponin extraction were obtained as the follows: pH value 6.0, bathing temperature 31.3 ℃, ethanol concentration 44.21%. Under the above condition, the total saponin yield was up to 0.421%. **CONCLUSION** The optimized process is easy to operate with high efficiency, suitable for industrial production.

KEY WORDS: *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*; response surface methodology; dioscin; ultrasonic assisted extraction; cellulase

穿山龙为薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎, 被收载于中国药典 2015 年版, 性温, 味甘、苦; 具有止咳化痰, 祛痰平喘, 舒筋活血, 祛风止痛等功效, 临床上主要用于风寒湿痹、支气管炎等症, 也用于免疫调节、改善心血管功能等^[1]。穿山龙的主要化学成分为穿山龙总皂苷, 包括非水溶性皂苷和水溶性皂苷, 非水溶性皂苷如薯蓣皂苷、纤细皂苷等。薯蓣皂苷的分子式为 $C_{45}H_{72}O_{16}$, 分子量为 869.05, 其水解产物为薯蓣皂苷元, 化学名为 Δ^5 -异螺旋甾烯-3- β -醇, 是合成多种甾体激素类药物的重要原料^[2]。

传统工艺一般采用水提醇沉或乙醇浸渍等方法, 工艺比较复杂, 提取率不高。本研究选择超声波辅助纤维素酶法对穿山龙总皂苷进行提取, 纤维素酶可以酶解纤维素的 β -D-葡萄糖苷联结键而破坏细胞壁, 因此能够显著提高有效成分的提取率; 与超声相结合, 可以更有效地提高皂苷的得率^[3]。本

研究采用响应面法优化提取工艺。与正交试验法相比, 正交试验法只能从试验的水平中筛选出最优水平, 响应面法可以通过对回归方程和响应面等高线图的分析得到精确度更高的最佳工艺参数^[4]。

1 试剂与仪器

1.1 药材与试剂

穿山龙购于杭州华东中药饮片有限公司(批号: 150524, 产地: 辽宁)经浙江省中医院蒋剑平副主任中药师鉴定为薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎; 穿龙薯蓣对照品(批号: MUST-15012101, 成都曼思特生物科技有限公司); 酸性纤维素酶[批号: 140510, 苏柯汉(潍坊)生物工程有限公司]; 冰乙酸(批号: 151001, 上海凌峰化学试剂有限公司); 无水乙酸钠(批号: 130902, 天津市永大化学试剂有限公司); 无水乙醇(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司); 高氯酸(批号: 150101, 国药集团化学试剂有限公司); 香

基金项目: 浙江省药学会医院药学专项科研资助项目(2013ZYY36)

作者简介: 施政, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0571)87072980
药师 Tel: (0571)87072980 E-mail: jiangjp77@163.com

E-mail: fryszy@163.com *通信作者: 蒋剑平, 男, 博士, 副主任中

兰素(批号: 141103, 上海强顺化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 天津市光复科技发展有限公司)。

1.2 仪器

KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); SHZ-D(III) 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); HH-6 数显恒温水浴锅(上海江星仪器有限公司); UV2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制

精密称取穿龙薯蓣皂苷对照品 3.45 mg, 用甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 得到对照品溶液的质量浓度为 $0.345 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 标准曲线的制备^[5]

分别精密移取穿龙薯蓣皂苷对照品溶液 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 mL, 置于具塞试管内水浴加热, 挥干溶剂, 再分别加入高氯酸 0.8 mL 和 15% 的香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL, 振荡混匀, 密塞, 置 60 °C 恒温水浴锅中显色 20 min, 取出后立即将其放入冰水中冷却 5 min, 再加入冰醋酸 5.0 mL, 摇匀, 静置 10 min。将试剂空白设为参比对照, 于 461 nm 处用 UV-759S 型紫外分光光度计测定其吸光度。作回归方程, 用浓度作横坐标, 吸光度作纵坐标, 得标准曲线: $y=0.017\ 66x-0.013\ 11$, $R^2=0.990\ 83$ 。

2.3 总皂苷的提取^[6]

穿山龙经粉碎后过 40 目筛, 取 5 g 穿山龙粉末于 250 mL 锥形瓶中, 加入 pH 为 4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲液 100 mL(液料比 20:1), 并加入纤维素酶 0.15 g(酶用量 3%), 搅拌状态下于 30 °C 水浴 1.5 h, 然后在 200 W 条件下超声处理 20 min, 获得混合料液, 加入一定量的 95% 乙醇, 使得乙醇体积分数达到 50%, 在 200 W 的频率下超声处理 30 min, 抽滤, 获得提取液和滤饼。

2.4 含量的测定

精密移取“2.3”项下提取液 5.0 mL, 定容于 10 mL 量瓶中, 从中取 0.1 mL 置试管内挥干溶剂, 按“2.2”项下方法制备。将试剂空白设为参比对照, 于 461 nm 处测定吸光度, 计算总皂苷的含量。

2.5 单因素试验

分别以 A(pH 值), B(水浴温度), C(提取时间), D(乙醇浓度), E(超声频率), F(超声时间)为单因素,

每一个因素设置 3 个水平进行提取测定实验。考察这些因素对总皂苷得率的影响。结果见表 1。

表 1 单因素水平

Tab. 1 Single factor level

水平	A pH 值	B 水浴 温度/°C	C 提取 时间/h	D 乙醇 浓度/%	E 超声 频率/W	F 超声时 间/min
1	4.6	20	1	40	100	30
2	5.3	30	1.5	50	150	45
3	6.0	40	2	60	200	60

2.6 响应面分析设计对穿山龙总皂苷提取工艺的优化

综合分析各个单因素对实验结果的影响, 对 pH 值、水浴温度和乙醇浓度这 3 个对穿山龙总皂苷提取率影响显著的因素, 采用响应面法进一步优化。实验的分析因素与水平设计见表 2。

表 2 响应面分析因素与水平

Tab. 2 Factors and levels of response surface analysis

水平	A pH 值 (Z ₁)	B 水浴温度 T/°C (Z ₂)	C 乙醇浓度/% (Z ₃)
-1	4.6	20	40
0	5.3	30	50
1	6.0	40	60

3 结果

3.1 单因素实验研究结果

3.1.1 pH 值对总皂苷提取率的影响 在水浴温度 40 °C, 水浴时间 1.5 h, 乙醇浓度 50%, 超声频率 200 W, 超声时间 30 min 条件下, 缓冲液的 pH 分别为 4.6, 5.3, 6.0 时, 总皂苷的得率分别为 0.298%, 0.302%, 0.299%, 结果显示, 3 个 pH 条件下提取的总皂苷含量无明显差异。

3.1.2 水浴时间对总皂苷提取率的影响 在水浴温度 40 °C, 缓冲液 pH 6.0, 乙醇浓度 50%, 超声频率 200 W, 超声时间 30 min 条件下, 水浴 1, 1.5, 2 h 时总皂苷的得率分别为 0.287%, 0.291%, 0.272%, 结果显示, 水浴时间对总皂苷的得率影响不大。

3.1.3 水浴温度对总皂苷提取率的影响 在水浴时间 1.5 h, 缓冲液 pH 4.6, 乙醇浓度 50%, 超声频率 200 W, 超声时间 30 min 条件下, 水浴温度分别为 20, 30, 40 °C 时, 总皂分别为 0.290%, 0.342%, 0.262%, 结果显示, 水浴温度为 30 °C 时, 总皂苷得率最大。

3.1.4 乙醇浓度对总皂苷提取率的影响 在水浴

时间 1.5 h, 缓冲液 pH 5.3, 水浴温度 40 ℃, 超声频率 200 W, 超声时间 30 min 条件下, 乙醇浓度分别为 40%, 50%, 60% 时, 总皂苷的得率分别为 0.251%, 0.312%, 0.172%, 结果显示, 乙醇浓度为 50% 时, 总皂苷得率最大。

3.1.5 超声频率对总皂苷提取率的影响 在水浴时间 1.5 h, 缓冲液 pH 5.3, 水浴温度 40 ℃, 乙醇浓度 50%, 超声时间 30 min 条件下, 超声频率分别为 100, 150, 200 W 时总皂苷的得率分别为 0.272%, 0.264%, 0.275%, 结果显示, 超声频率对总皂苷的得率影响不大。

3.1.6 超声时间对总皂苷提取率的影响 在水浴时间 1.5 h, 缓冲液 pH 5.3, 水浴温度 40 ℃, 乙醇浓度为 50%, 超声频率 200 W 条件下, 超声时间分别为 30, 45, 60 min 时, 总皂苷的得率分别为 0.313%, 0.311%, 0.322%, 结果显示, 超声时间对总皂苷的得率影响不大。

3.2 响应面分析设计及结果

利用 Design-Expert 8.0.6 软件设计, 对 pH 值 (Z_1)、水浴温度 (Z_2)、乙醇百分数 (Z_3) 作如下编码: $X_1=(Z_1-5.3)/0.7$, $X_2=(Z_2-30)/10$, $X_3=(Z_3-50)/10$, 将 X_1 , X_2 , X_3 设为自变量, 设穿山龙总皂苷的得率为响应值 (Y), 响应面分析设计的试验方案及结果见表 3。

表 3 中的 17 个实验由析因点和零点组成, 其中实验号 2~7、12~17 是析因实验, 而中心实验由 1、8~11 组成, 可用作对实验误差的估计。依据 Design-Expert 8.0.6 软件, 通过二次多项回归对表 2 的数据进行拟合, 从而得到二次多元回归方程: $Y=0.36+0.022X_1+5 \times 10^{-4}X_2-0.077X_3+0.014X_1X_2-3.5 \times 10^{-3}X_1X_3+0.016X_2X_3-6.5 \times 10^{-3}X_1^2-0.02X_2^2-0.068X_3^2$ 。

回归方程的显著性检验结果见表 4, 各因素对总皂苷得率的响应面与等高线图见图 1。

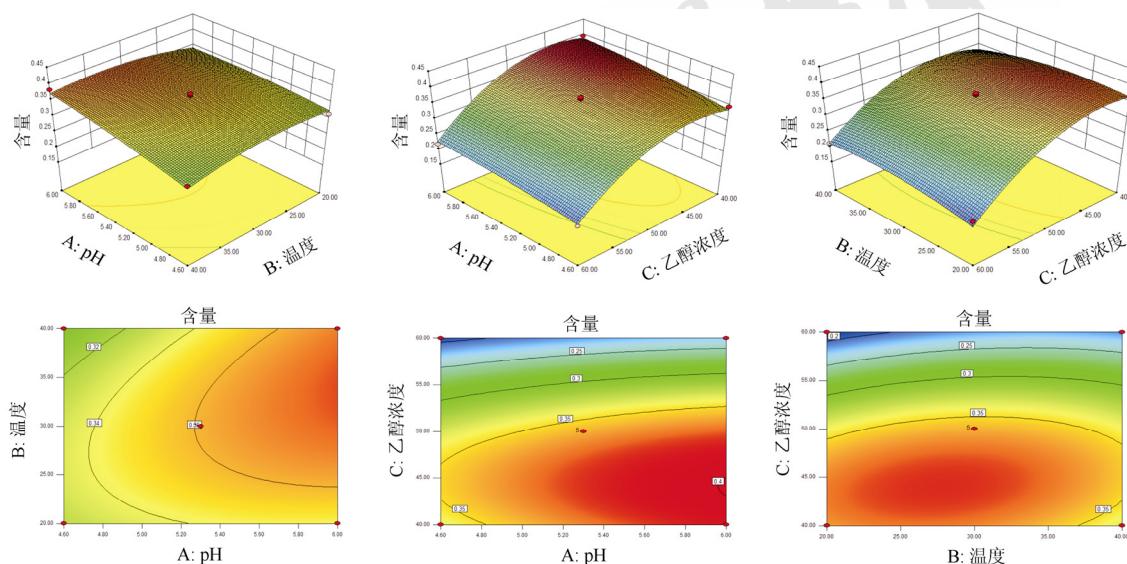


图 1 缓冲液 pH、乙醇浓度与温度对总皂苷得率的响应面与等高线图

Fig. 1 Response surface and contour map of buffer pH, ethanol concentration and temperature on the extraction rate of the total saponins

由图 1 可知, 当乙醇浓度为 50% 时, 随着缓冲液 pH 值在 4.6~6.0 内增大, 穿山龙总皂苷得率呈上升趋势; 而当水浴温度在 20~40 ℃ 内增加时, 总皂苷得率先变大后减小, 说明缓冲液 pH 与水浴温度对总皂苷的提取率均有影响。

当水浴温度为 30 ℃ 时, 随着缓冲液 pH 值在 4.6~6.0 内增大, 穿山龙总皂苷的提取率呈上升趋势; 而当乙醇浓度在 40%~60% 内增加时, 总皂苷得率先变大后减小, 说明缓冲液 pH 与乙醇浓度对总皂苷的提取率均有影响。

当缓冲液 pH 值为 5.3 时, 随着水浴温度在 20~40 ℃ 内增大, 穿山龙总皂苷的提取率呈先上升后降低的趋势; 而当乙醇浓度在 40%~60% 内增加时, 总皂苷得率先变大后减小, 说明水浴温度与乙醇浓度对总皂苷的提取率均有影响。

从回归方程得到最佳条件: $X_1=1.0$, $X_2=0.128$, $X_3=-0.58$, 即 $Z_1=6.0$, $Z_2=31.30$, $Z_3=44.21$, 并求得该条件下的穿山龙总皂苷得率预测值为 0.400%。进行 3 次验证试验, 穿山龙总皂苷得率为 $(0.421 \pm 0.042)\%$, 与预测值相当接近。

3.3 验证试验结果

对实验模型进一步分析, 得理论最佳提取条件: 缓冲液 pH 6.0, 水浴温度 31.30 ℃, 乙醇浓度为 44.21%, 并在此条件下进行 3 次验证试验, 将结果填入表 4, 结果计算平均得率为 0.421%。

表 3 响应面试验结果

Tab. 3 Experimental results of response surface method

编号	pH	水浴温度/℃	乙醇浓度/%	皂苷得率/%
1	5.3	30	50	0.368
2	5.3	40	60	0.211
3	4.6	20	50	0.315
4	4.6	30	40	0.348
5	6.0	30	60	0.218
6	6.0	20	50	0.336
7	5.3	20	40	0.367
8	5.3	30	50	0.325
9	5.3	30	50	0.368
10	5.3	30	50	0.373
11	5.3	30	50	0.371
12	5.3	40	40	0.319
13	6.0	30	40	0.395
14	4.6	30	60	0.185
15	4.6	40	50	0.306
16	6.0	40	50	0.382
17	5.3	20	60	0.196

表 4 回归方程显著性检验结果

Tab. 4 The regression equation of significance test results

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.076	9	8.436×10^{-3}	21.46	0.000 3
X_1	3.916×10^{-3}	1	3.916×10^{-3}	9.96	0.016 0
X_2	2.000×10^{-6}	1	2.000×10^{-6}	5.088×10^{-3}	0.945 1
X_3	0.048	1	0.048	121.84	<0.000 1
X_1X_2	7.562×10^{-4}	1	7.562×10^{-4}	1.92	0.208 0
X_1X_3	4.900×10^{-5}	1	4.900×10^{-5}	0.12	0.734 4
X_2X_3	9.923×10^{-4}	1	9.923×10^{-4}	2.52	0.156 1
X_1^2	1.779×10^{-4}	1	1.779×10^{-4}	0.45	0.522 7
X_2^2	1.642×10^{-3}	1	1.642×10^{-3}	4.18	0.080 2
X_3^2	0.019	1	0.019	49.53	0.000 2
残差	2.752×10^{-3}	7	3.931×10^{-4}		
失拟	1.114×10^{-3}	3	3.713×10^{-4}	0.91	0.512 6
误差	1.638×10^{-3}	4	4.095×10^{-4}		
总变异	0.079	16			

4 讨论

穿山龙的主要药效成分有薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷、穗菰甾甾苷及其苷元, 具有祛痰、截疟、活血、舒筋的功效, 在临床上可用于治疗劳损扭伤、风寒湿痹、慢性气管炎、冠心病及心绞痛等疾病^[7]。李永茂等从薯蓣皂苷水溶性成分中分离出一种酸性物质, 有较强的镇咳作用, 确定为对-羟苕基酒石酸^[8]。近代药理研究结果表明, 穿山龙还对改善免疫功

能、止咳化痰且对心血管疾病也有一定的改善作用^[9]。鉴于其药用价值, 有必要提高其总皂苷得率。

酶解技术并以超声波辅助提取法是目前在对活性物质的提取上应用较广的新兴技术, 植物细胞壁能在超声波的空化作用下加速破裂, 更有效地释放活性物质^[10]; 同时植物细胞壁能在纤维素酶的作用下有效地降解, 更好地促使植物细胞中的有效成分溶出, 二者均能破坏植物细胞。相较于传统的提取纯化方法, 该法可最大限度地将皂苷类物质提取出来, 并能够进一步提高皂苷类物质的纯度。

正交试验做配方优化试验次数相对较少, 但只能得到离散优化的组合, 也就是说, 最后的最优工艺条件只能从实验方案中每个因素的各水平中选取一个。

响应面分析设计系统本质上是正交试验与回归分析相结合, 以建立各因素对响应值的回归方程, 除了可以分析各因素的变化对响应值的影响规律, 同时可以得到相对精确的优化条件。本研究用响应面分析法得到超声波辅助纤维素酶法提取穿山龙总皂苷的最佳工艺条件: 缓冲液 pH 6.0, 水浴温度 31.30 ℃, 乙醇浓度为 44.21%。此工艺操作方便、效率高, 适合工业化大生产。

REFERENCES

[1] 路芳. 穿山龙药理研究进展[J]. 科技资讯, 2006(16): 5-6.
[2] 杨文远, 王天勇. 穿山龙中薯蓣皂苷元的测定与宁夏药物资源的开发[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 1995, 16(2): 25.
[3] LIAO N, ZHONG J, YE X, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Corbicula fluminea*: Characterization and antioxidant activity [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 60(2): 1113-1121.
[4] WANG F, MA W L, HU Z X, et al. Optimization of Gynostemma polysaccharide-Fe complex of preparation with response surface methodology [J]. Food Indust(食品工业), 2014, 35(5): 81-85.
[5] 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.
[6] 蒋剑平, 熊耀康, 林圣云, 等. 一种葡萄柚皮黄酮类提取物及制备与应用: 中国, 201210118093.9 [P]. 2013-11-06.
[7] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1726.
[8] 李永茂, 何宝俊, 刘振庸. 穿山龙水溶性有效成分的研究[J]. 中国医科大学学报, 1979(4): 14-15.
[9] 陈延铺. 甾体皂苷的生产现状[J]. 医药工业, 1985, 16(1): 32.
[10] GUO P S, HUA P, LI Z. Mechanism analysis of desorption enhancement by ultrasonic field [J]. J Chem Eng Chin Univ(高校化学工程学报), 2002, 16(6): 614-620.

收稿日期: 2016-04-25