

·工艺研究·

响应曲面法优化岗梅根总皂苷的提取工艺

赵冉¹, 彭敏桦¹, 张敏敏¹, 汪虎林¹, 赖小平¹, 陈建南², 李耿¹(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523000)

摘要: **目的** 研究岗梅根总皂苷的最佳提取工艺条件。**方法** 采用 Design Expert 8.0 分析软件, 在单因素的基础上运用 Box-Behnken 响应曲面设计法, 以提取时间、乙醇浓度、溶剂用量和提取次数建立 4 因素 3 水平的实验模型, 并确立提取回归方程; 使用响应曲面法优化提取工艺。**结果** 最佳的工艺条件为: 提取时间 100 min, 乙醇体积分数为 56.33 %, 溶媒用量为 11 倍, 提取次数为 2 次。验证实验显示总皂苷平均转移率为 71.92 %, 模型预测值的绝对误差小于 3 %。**结论** 响应曲面法能合理地优化岗梅中总皂苷的提取工艺, 可为岗梅的综合利用提供参考。

关键词: 岗梅根总皂苷; 响应曲面法; 提取工艺

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)03-0363-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.032

Optimization of Extraction Process for Total Saponins from Roots of *Ilex asprella* by Response Surface Methodology

ZHAO Ran¹, PENG Minhua¹, ZHANG Minmin¹, WANG Hulin¹, LAI Xiaoping², CHEN Jiannan¹, LI Geng¹
(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Dongguan 523000 Guangdong, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction technology for total saponins from the roots of *Ilex asprella*. **Methods** On the basis of the single factor test, the effects of extracting time, volume of ethanol, solid/liquid ratio and extraction times on the saponin process were studied by the orthogonal test developed by Box-Behnken central composite test design, and the regression equation was also established. The results were analyzed, and the extracting process was optimized by the response surface methodology(RSM). **Results** The optimal conditions were as follows: extraction with 56 % of ethanol solution for 100 min, solid/liquid ratio being 1 : 11(m/v) and extracting times being twice. The results of validation test showed that the average yield was 71.92 %. The absolute error of model predicted value was less than 3 %. **Conclusion** RSM can be used for the optimization of extracting technology for total saponins from the roots of *Ilex asprella*, which will supply evidence for the multiple utilization of *Ilex asprella*.

Keywords: *Ilex asprella*; Total saponins; Response surface methodology; Extraction process

岗梅根为冬青科植物梅叶冬青 *Ilex asprella* [Hook. et Arn.] Champ. Ex Benth. 的根, 又称点秤根、土甘草、天星根, 主产于广东、广西。味苦、甘、性寒, 具有清热、生津、散瘀、止渴等功效, 主治

收稿日期: 2014-02-05

作者简介: 赵冉, 女, 博士研究生, 研究方向: 中药药理与新药开发。Email: yanzhaoqq@foxmail.com。通讯作者: 李耿, 博士, 副教授, 研究方向: 中药新药研究与开发。Email: lg@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2010A032100006、S2012010011143); 广东省科技计划项目(2011A030100017); 广州中医药大学科研创新资助项目(11CX023); 广东省东莞市科技项目(2012108102013)。

感冒, 头痛发热, 热病烦渴, 痧气, 热泻, 肺痈, 咽喉肿痛, 百日咳, 痔血, 淋病, 疮疹肿毒, 跌打损伤等^[1]。岗梅根中主要含有三萜及其苷类、黄酮类、酚酸类和生物碱类成分^[2-8], 皂苷类成分是其主要的化学成分, 也可能是其发挥作用的药效物质基础, 因此研究从岗梅根中提取皂苷类化合物对岗梅的综合利用具有重要意义。

响应面分析法(response surface methodology, RSM)是一种优化工艺条件的有效方法, 可检查一个或多个响应变量与一系列试验变量之间的关系, 确定试验因素及其交互作用在工艺过程中对指标响应值的影响, 精确地表述因素和响应值之间的关系^[9-10]。响应曲面法已被广泛用于生物过程的优化, 但在皂苷提取工艺研究方面的报道较少。为了充分利用岗梅资源, 本研究拟在前期单因素试验基础上, 首次采用 RSM 进一步综合分析比较影响岗梅总皂苷转移率的关键因子: 提取时间、乙醇浓度、溶媒用量和提取次数, 并对其提取工艺进行优化, 以确定岗梅根总皂苷提取的最佳工艺参数。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂及仪器 岗梅根药材采集于福建龙岩, 经广州中医药大学中药学院喻良文副教授鉴定为冬青科冬青属植物秤星树 (*Ilex asprella* [Hook. et Arn.] Champ. Ex Benth.) 的干燥根。18- 去氢乌苏酸 (纯度大于 97 %) 对照品由广州中医药大学中药学实验室制备。乙醇, 天津市进丰化工有限公司, 批号: 20091115; 冰醋酸, 天津市百世化工有限公司, 批号: 20100328; 高氯酸, 天津市富宇精细化工有限公司, 批号: 20100401; 香草醛, 天津市百世化工有限公司, 批号: 20100315, 均为 AR 级。BS110S 型分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司; UV BlustarA 型紫外-可见分光光度计, 北京莱伯泰科仪器有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发仪, 巩义予华仪器有限公司; DHG-9145A 电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 岗梅根总皂苷含量测定 岗梅根总皂苷含量测定采用分光光度法, 用 5 % 香草醛-冰醋酸显色, 以 18- 去氢乌苏酸作标准品, 于 555 nm 波长处比色定量测定。18- 去氢乌苏酸标准曲线回归方程为: $Y = 0.0083X - 0.02$, $r = 0.9996$ 。其中 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为 18- 去氢乌苏酸浓度, Y 为吸光度值。

1.3 供试品溶液制备 取本品粗粉适量, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 加入乙醇, 精密称定, 加热回流, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 0.2 mL, 置 10 mL 的试管中, 挥干溶剂, 精密加入 5 % 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 60 °C 水浴加热 15 min, 冰水浴中冷却 5 min, 加冰醋酸 5 mL, 摇匀, 即得供试品溶液。

1.4 总皂苷的制备及转移率计算 精密吸取 1.3 项下续滤液 25 mL, 置已干燥至恒质量的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量。计算岗梅根总皂苷在浸出物中的含量(%)。

2 结果

2.1 单因素考查 见图 1~图 4。将乙醇浓度、提取时间、溶剂用量和提取次数作为影响因素, 以总皂苷转移率为评价指标。当乙醇浓度达到 50 %, 提取

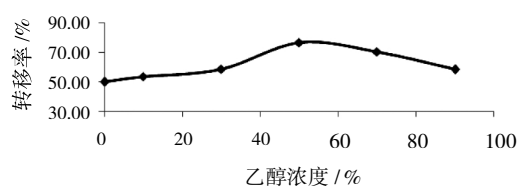


图 1 乙醇浓度对总皂苷转移率的影响

Figure 1 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total saponins

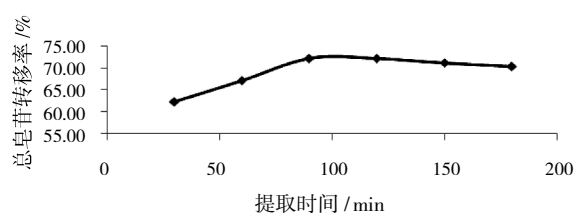


图 2 提取时间对总皂苷转移率的影响

Figure 2 Effect of extraction time on extraction rate of total saponins

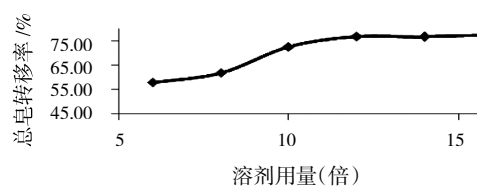


图 3 提取溶剂用量对皂苷转移率的影响

Figure 3 Effect of solid/liquid ratio on extraction rate of total saponins

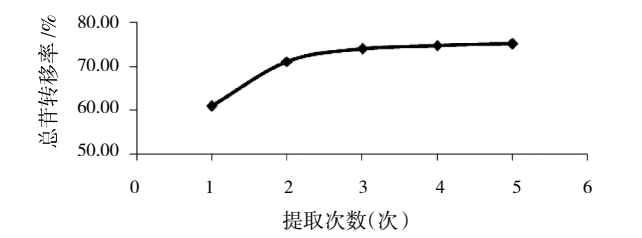


图 4 提取次数对总皂苷转移率的影响

Figure 4 Effect of extraction times on extraction rate of total saponins

时间在 100 min 左右,提取溶媒用量在 9 到 12 倍之间,提取次数选择 2~3 次,总皂苷转移率最高。

2.2 响应曲面优化法优化岗梅总皂苷提取工艺

2.2.1 因素与水平的确定 见表 1。采用 Design Expert 8.0 分析软件,建立 4 因素 3 水平 Box-Behnken 模型并进行优化设计,确定参数中岗梅总皂苷的最佳溶出条件。以岗梅提取液中岗梅总皂苷的含量(Y)为响应值,提取时间(A)、乙醇浓度(B)、溶媒用量(C)、提取次数(D)为自变量。

表 1 试验因素与水平

因素	编码	水平		
		-1	0	1
提取时间 /min	A	60	90	120
乙醇浓度 /%	B	30	50	70
溶剂用量 / 倍	C	8	10	12
提取次数 / 次	D	1	2	3

2.2.2 模型的建立与显著性检验 见表 2~表 4。模型具有高度的显著性($P < 0.0001$),失拟项不显著($P=0.0522$;校正决定系数 $R^2(\text{adj})(0.8592 > 0.80)$),该模型能够很好地描述试验结果,表明回归方程拟合度和可信度均较高,能够用此模型对岗梅根总皂苷转移率进行分析和预测。应用 design-expert 8.0 软件对转移率与提取参数之间的关系进行了拟合分析,结合表 4,得到二次多项回归模型。岗梅总皂苷转移率 $Y(\%)=75.34-0.26A+0.16B+0.98C+4.12D+2.00AB-0.40AC-0.53AD+0.053BC+0.98BD+0.27CD-8.57A^2-1.25B^2-0.19C^2-2.80D^2$ 。

2.3 响应面分析 通过模型建立不同因素之间相互作用的响应面,结果见图 5~图 10。

通过 Design Expert 8.0 软件分析,岗梅根总皂苷提取最佳工艺条件为:乙醇体积分数为 56.33 %,提取时间为 102.3 min,提取次数 2.3 次,提取溶剂用

表 2 响应曲面分析结果

Table 2 Result of Box-Behnken analysis					
试验编号	乙醇浓度 /%	提取时间 /min	溶剂用量 / 倍	提取次数 / 次	岗梅总皂苷转移率 /%
1	50	120	10	1	68.46
2	50	60	8	2	74.26
3	30	90	12	2	69.94
4	30	120	10	2	64.25
5	50	90	10	2	76.96
6	70	90	10	3	68.67
7	50	60	10	1	69.53
8	70	60	10	2	62.45
9	70	120	10	2	68.45
10	50	120	10	3	75.23
11	50	90	10	2	74.74
12	50	90	8	3	76.45
13	70	90	10	1	61.56
14	70	90	12	2	65.24
15	50	90	10	2	75.21
16	30	90	8	2	67.35
17	50	60	12	2	75.56
18	50	90	12	1	67.36
19	30	90	10	3	67.57
20	50	90	10	2	74.56
21	50	120	12	2	73.75
22	50	90	10	2	75.24
23	50	60	10	3	72.39
24	50	90	12	3	79.67
25	30	90	10	1	58.34
26	70	90	8	2	64.23
27	30	60	10	2	66.25
28	50	120	8	2	72.24
29	50	90	8	1	65.24

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression model					
方差来源	平方和 ss	自由度 df	均方和 MS	F	P
模型(Model)	742.90	14	53.06	13.20	<0.0001
残差(Residual)	56.27	14	4.02		
失拟项(Lack of Fit)	52.65	10	5.27	5.82	0.0522
纯误差(Pure Error)	3.62	4	0.90		
总值(Cor Total)	799.17	28			

量为 11.2 倍。此工艺条件下,岗梅总皂苷的转移率达到 74.75 %。从二维(2D)图可以看出,不同因素对总皂苷转移率的影响大小顺序为提取次数(D) > 乙醇浓度(A) > 溶剂用量(C) > 提取时间(B)。通过三维(3D)图不仅可以看出,乙醇浓度与提取次数的交互作用最大,说明乙醇浓度和提取次数对岗梅总皂苷的转移率的影响最大,而溶剂用量与提取时间所构

表 4 模型回归方程系数显著性检验

方差来源	平方和 ss	自由度 df	均方和 MS	F	P
A- 乙醇浓度	0.80	1	11.80	3.20	0.1022
B- 提取时间	0.31	1	0.31	0.08	0.7841
C- 溶剂用量	11.51	1	11.51	2.86	0.1128
D- 提取次数	204.11	1	204.11	50.78	< 0.0001
AB	16.00	1	16.00	3.98	0.0659
AC	0.62	1	0.62	0.16	0.6995
AD	1.12	1	1.12	0.28	0.6053
BC	0.01	1	0.01	0.00	0.9590
BD	3.82	1	3.82	0.95	0.3460
CD	0.30	1	0.30	0.08	0.7878
A ²	476.23	1	476.23	118.49	<0.0001
B ²	10.19	1	10.19	2.54	0.1336
C ²	0.25	1	0.25	0.06	0.8082
D ²	50.75	1	50.75	12.63	0.0032

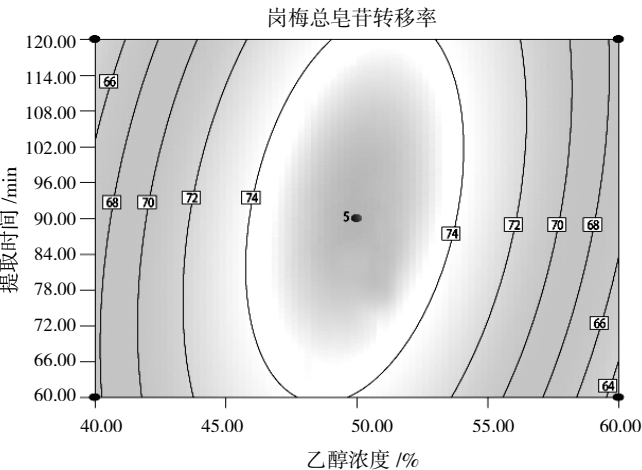


图 5 乙醇浓度与提取时间对总皂苷转移率的影响
Figure 5 Effect of ethanol concentration and extraction time on extraction rate of total saponins

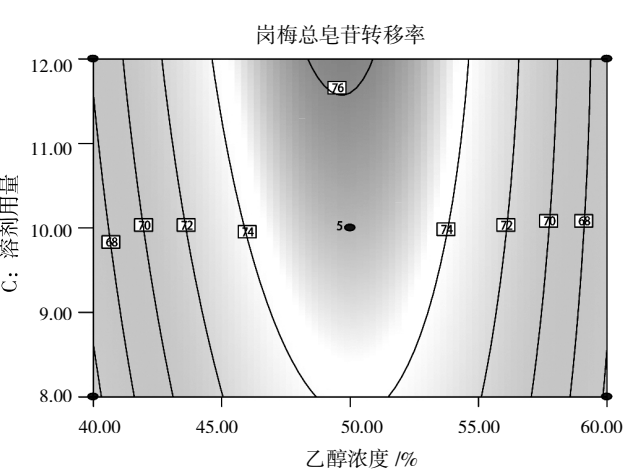


图 6 乙醇浓度与溶剂用量对总皂苷转移率的影响
Figure 6 Effect of ethanol concentration and solid/liquid ratio on extraction rate of total saponins

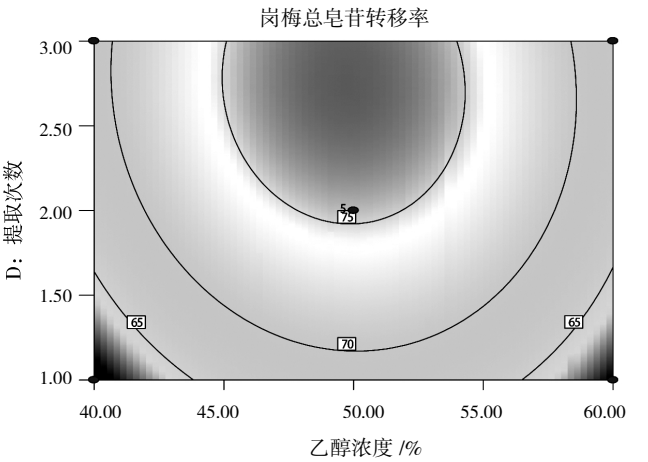


图 7 乙醇浓度与提取次数对总皂苷转移率的影响
Figure 7 Effect of ethanol concentration and extraction times on extraction rate of total saponins

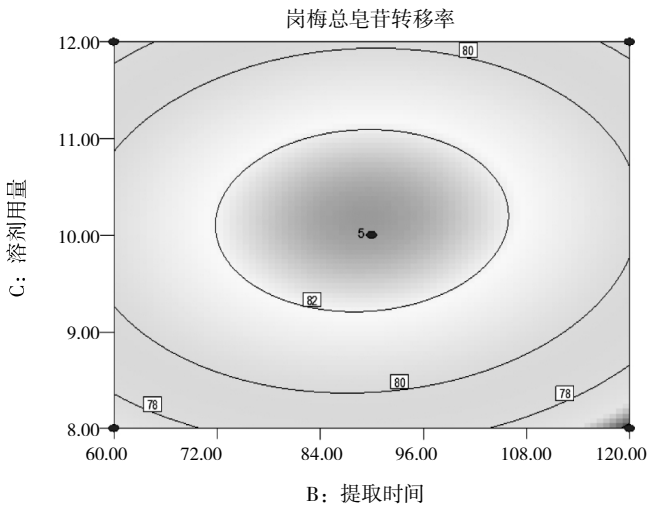


图 8 溶剂用量与提取时间对总皂苷转移率的影响
Figure 8 Effect of solid/liquid ratio and extraction time on extraction rate of total saponins

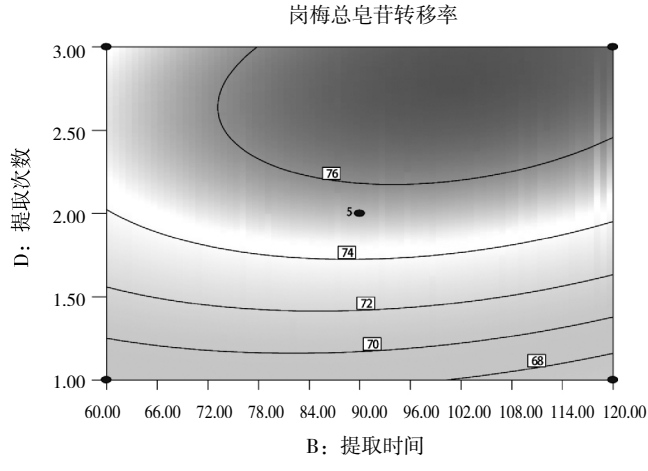


图 9 提取次数与提取时间对总皂苷转移率的影响
Figure 9 Effect of extraction times and extraction time on extraction rate of total saponins

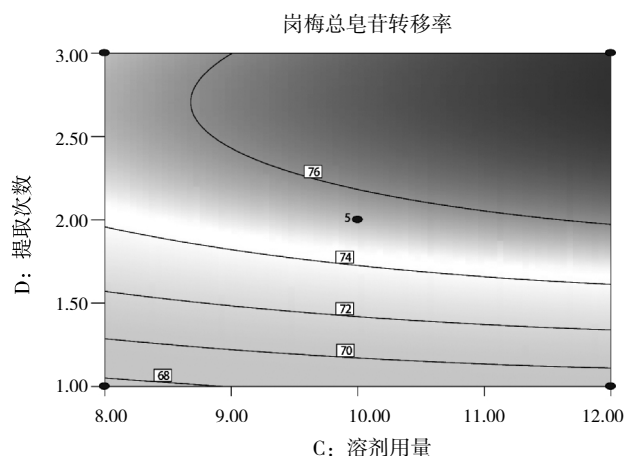


图 10 提取次数与溶剂用量对总皂苷转移率的影响

Figure 10 Effect of extraction times and solid / liquid ratio on extraction rate of total saponins

成的曲面，近似一个平面，说明溶剂用量与提取时间的交互作用最小，而乙醇浓度与提取次数的交互作用，比与溶剂用量的交互作用大。

2.4 验证性试验 见表 5。采用 2.3 实验中得到的最佳提取工艺条件重复试验。为便于操作，将条件确定为：提取溶剂 56 %乙醇，提取时间 100 min，提取次数 2 次，提取溶剂用量 11 倍。用修正后的条件提取总皂苷 3 次。结果表明，总皂苷平均转移率为 71.92 %，模型预测值的绝对误差小于 3 %，表明优选工艺提取效果较为理想。

表 5 验证性实验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Result of replication experiment

编号	样品质量 /g	吸光度	含量 /%	总皂苷转移率 /%	平均转移率 /%	RSD /%
1	5.003	0.3122	2.51	72.83		
2	5.007	0.3087	2.48	72.01	71.92 ± 0.96	1.33
3	4.995	0.3029	2.45	70.92		

3 讨论

传统的数理统计方法要求数据量大，无法考虑几种因素的综合作用。正交试验设计可考虑几种因素，但不能找到因素与响应值之间的明确的函数表达式，从而无法找到因素的最佳组合和响应值的最优值。因此人们期望找到一种实验次数少、周期短，求得的回归方程精度高、能研究几种因素间交互作用的回归分析方法，响应曲面法在很大程度上满足

了这些要求^[11]。

RSM 采用多元二次回归的方法将函数作为估计工具，研究因素与响应值之间、因素与因素之间的交互作用。通过对拟合后的回归方程进行分析，寻找最优工艺参数，同时响应面法可以更好地处理离散水平值，更加准确地优化岗梅根中总皂苷的提取工艺。

本研究首次将响应曲面法用于提取岗梅总皂苷条件的优化，获得了良好的结果。通过工艺优化得出的最佳条件是：提取溶剂 56 %乙醇，提取时间 100 min，提取次数 2 次，提取溶剂用量 11 倍，总皂苷平均转移率为 71.92 %。与模型预测的转移率误差较小，经检验证明该参数是合理可靠的。利用响应曲面法对岗梅中总皂苷提取工艺的优化能大量减少试验组数，节省人力物力，可为岗梅的综合利用提供理论依据。

参考文献：

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.《中华本草》[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：145.
- [2] 王宁生，冯美蓉，赵萍，等. 岗梅根化学成分定性鉴别及其方法的探讨[J]. 广州中医学院学报，1991，8(1)：28-30.
- [3] 李敏华，俞世杰，杜上鑑. 岗梅根化学成分的研究[J]. 中草药，1997，28(8)：454-456.
- [4] 王海龙，吴立军，雷雨，等. 岗梅叶的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报，2009，26(4)：279-282.
- [5] 蔡艳，张庆文，李旨君，等. 岗梅根化学成分的研究[J]. 中草药，2010，41(9)：1426-1429.
- [6] 温金莲，陈晓丽，莫瑞意，等. 岗梅根化学成分研究[J]. 广东药学院学报，2011，27(5)：468-470.
- [7] 黄锦茶. 岗梅化学成分与质量标准研究[D]. 广州中医药大学 2010 届硕士学位论文，2011，32.
- [8] Wang L, Cai Y, Zhang XQ, et al. New triterpenoid glycosides from the roots of *Ilex asprella*[J]. Carbohydrate Research, 2011, 16, 6
- [9] Myers WR. Encycloedia of biopharmaceutical statistics[M]. NewYork: Marcel Dekker, 2003: 858-869.
- [10] 陈魁. 试验设计与分析[M]. 北京：清华大学出版社，1996：94-180.
- [11] 冯涛，曹东旭，高辉，等. 利用响应面法确定竹叶中黄酮最佳提取条件[J]. 天津轻工业学院学报，2003，18(2)：8-13.

(编辑：邓响潮)