

响应面法优化超声 提取黄花倒水莲总皂苷提取工艺^①

罗亚兰, 张吉仲, 陶伟, 任艳, 马闪闪, 吕露阳

西南民族大学药学院, 成都 610041

摘要: 采用响应面法优化黄花倒水莲中总皂苷的提取工艺. 选取提取时间、乙醇浓度、料液比 3 个考察因素, 在单因素试验基础上利用 Box-Behnken 进行试验设计, 得出了超声提取黄花倒水莲总皂苷的最佳工艺条件为提取时间 41 min, 乙醇浓度 67%, 料液比 1:40 时, 黄花倒水莲总皂苷得率最大为 11.97 mg/g, 接近模型预测值 12.32 mg/g.

关键词: 黄花倒水莲; 总皂苷; 响应面法; 超声提取

中图分类号: R932

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)10-0056-05

黄花倒水莲(*Polygala fallax* Hemsl)为远志科(Polygalaceae)远志属(*Polygala* L)下灌木或小乔木, 又名鸡根、黄花参、吊吊黄、观音串、倒吊黄等, 主产于两广地区、江西和云南^[1]等地, 黄花倒水莲多为野生, 多生长于山坡或丛林中. 具有药用价值和观赏价值, 其人工栽培技术日益成熟^[2]. 黄花倒水莲的化学成分有皂苷、酮类、寡糖酯和有机酸等, 皂苷为主要有效成分, 从中分离的 20 多种皂苷单体, 具有多种药理作用. 现代研究表明, 黄花倒水莲总皂苷有调血脂^[3]、护肝^[4]、降低血液的黏度、改善血液循环^[5]的作用. 而提取总皂苷的方法有很多, 回流提取、超声波提取、浸提法等, 本研究采用超声波辅助提取黄花倒水莲总皂苷, 其提取设备简单、操作方便、经济易行.

响应面是数学方法和统计方法结合的产物, 包括对试验设计、数理统计及最优化技术的综合运用^[6], 是对因素和响应值之间的变化做精确的动态描述^[7]. 近年来, 统计学广泛应用于各个领域, 响应面的应用在化工、生物医药领域都有广泛的应用. 本研究以黄花倒水莲总皂苷为评价指标采用 Box-Behnken 进行试验设计, 得出了超声提取黄花倒水莲总皂苷的最佳工艺条件, 为黄花倒水莲的进一步开发利用提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄花倒水莲的根, 购自广西省贺州市钟山县, 经西南民族大学药学院吕露阳副教授鉴定为远志科(Polygalaceae)远志属(*Polygala* L)植物黄花倒水莲(*Polygala fallax* Hemsl); 远志皂苷元对照品(批号: 15112, 纯度 98%, 成都普菲德生物技术有限公司); 冰醋酸、甲醇、无水乙醇、高氯酸、香草醛均为国产分析纯, 所用水均为蒸馏水.

紫外分光光度计(TU-1950), 北京普析通用仪器有限责任公司; 数显恒温水浴锅(HH-2), 国华电器有限公司; KQ-250DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; IKARV10 旋转蒸发仪, 巩义市英峪

① 收稿日期: 2016-06-23

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(2015YJ0226); 西南民族大学研究生创新科研项目(CX2016SZ055).

作者简介: 罗亚兰(1989-), 女, 重庆大足人, 硕士研究生, 主要从事生药学的研究.

通信作者: 吕露阳, 副教授.

予仪器厂; 电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司; WJX-100 型高速多功能粉碎机, 上海缘沃工贸有限公司; SHZ-D(3)循环式真空泵, 巩义市英峪予化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制备

精密称取一定量的远志皂苷元对照品, 加甲醇溶解, 定容至 10 mL 容量瓶中, 得质量浓度为 0.087 6 mg/mL 的远志皂苷元对照品溶液。分别精确吸取远志皂苷元对照品溶液 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 mL, 置于 7 支 10 mL 具塞磨口比色管中, 水浴挥去溶剂, 随后于每只试管加入 0.2 mL 新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸, 0.8 mL 高氯酸溶液, 密塞, 摇匀。于 60 ℃ 水浴加热 20 min, 取出, 立即冰水浴冷却 5 min, 加冰醋酸各 5 mL, 摇匀, 静置 15 min, 于 575 nm 处测定吸光度值, 以未加远志皂苷元的对照品溶液做空白。以远志皂苷元对照品溶液的质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 得到回归方程为 $y = 0.094\ 03x + 0.055\ 07$, $R^2 = 0.999\ 2(n = 7)$ 。

1.2.2 黄花倒水莲中总皂苷的提取及测定

黄花倒水莲粉末(过四号筛)→60 ℃ 烘干→准确称量 1.0 g 粉末于 250 mL 锥形瓶中→按一定的料液比加入乙醇水溶液→超声提取^[8](60 ℃, 功率 250 W, 频率 40 kHz, 提取 2 次, 合并提取液)→抽滤旋蒸后定容→测定吸光度值→计算总皂苷得率。

1.2.3 单因素试验

以黄花倒水莲中总皂苷得率为评价指标, 固定提取时间、乙醇浓度、料液比 3 因素中的 1 个, 其他因素不变, 考察不同超声时间(20, 30, 40, 50, 60 min)、乙醇浓度(50%, 60%, 70%, 80%, 90%)、料液比(1: 10, 1: 20, 1: 30, 1: 40, 1: 50)对黄花倒水莲中总皂苷得率的影响。通过单因素确定试验水平值。

1.2.4 响应面试验设计

在单因素试验结果的基础上, 对影响黄花倒水莲总皂苷提取率的提取时间、乙醇浓度、料液比做响应面试验。以黄花倒水莲中总皂苷得率为指标, 试验设计借助 Design-Expert 软件中 Box-Behnken 设计优化单因素, 因素的水平及编码如表 1。

表 1 响应面分析因素水平表

因 素	水平		
	−1	0	1
提取时间(A)/min	30	40	50
料液比(B)/(g · mL ^{−1})	1: 30	1: 40	1: 50
乙醇浓度(C)/%	60	70	80

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取时间对黄花倒水莲中总皂苷得率的影响

称取样品 1.0 g, 料液比 1: 25, 乙醇浓度 75%, 超声提取时间分别为 20, 30, 40, 50, 60 min, 提取 2 次, 提取温度 60 ℃, 功率 250 W, 过滤, 合并滤液, 测定黄花倒水莲总皂苷质量分数, 得出时间对得率的影响。结果见图 1。

由图 1 可知, 总皂苷得率随着时间的延长逐渐增加, 在 40 min 时皂苷得率达到最大值。这可能是在提取时间 40 min 时, 总皂苷提取率达到平衡, 此时总皂苷得率最高。提取时间超过 40 min 后, 黄花倒水莲中的杂质成分溶出率增大, 总皂苷得率降低^[9]。因此以 40 min 的提取时间为最大值。

2.1.2 乙醇浓度对黄花倒水莲中总皂苷得率的影响

称取 1.0 g 样品, 料液比 1: 25, 提取时间 40 min 条件下提取 2 次, 提取温度 60 ℃, 功率 250 W, 考察

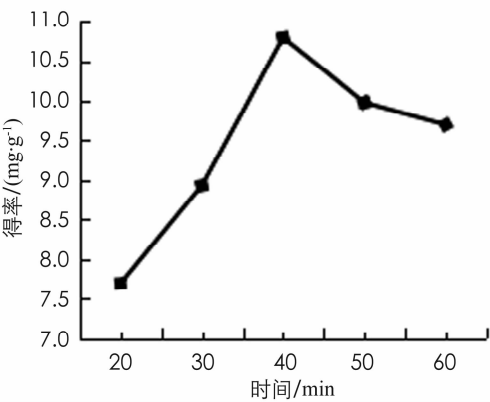


图 1 提取时间对总皂苷得率的影响

乙醇浓度分别为 50%,60%,70%,80%,90%时对黄花倒水莲总皂苷得率的影响,结果见图 2.

由图 2 可知,当提取时间 40 min,料液比 1:25 时,改变乙醇浓度,结果在乙醇浓度为 70%时,黄花倒水莲中皂苷得率最高,黄花倒水莲总皂苷中以五环三萜皂苷(Reininoside C)质量分数最多^[10-11],五环三萜皂苷的极性较大,乙醇浓度过高会降低皂苷类组分溶解性,相反增加其他的弱极性的物质溶出.因此以 70%乙醇浓度为最大值.

2.1.3 料液比对黄花倒水莲中总皂苷得率的影响

称取样品 1.0 g,分别按 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50 的料液比加入 70%的乙醇溶液,超声 40 min,提取 2 次,提取温度 60 ℃,功率 250 W,过滤,合并滤液,测定总皂苷质量分数,得出料液比对得率的影响.结果见图 3.

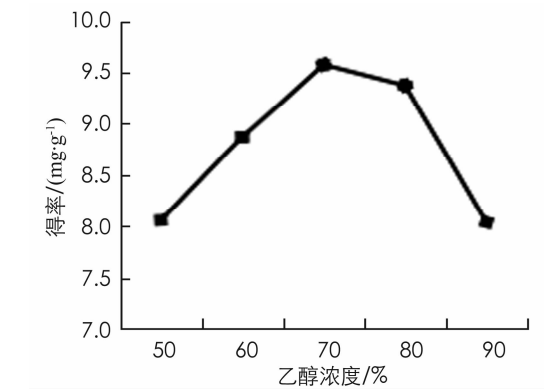


图 2 乙醇浓度对总皂苷得率的影响

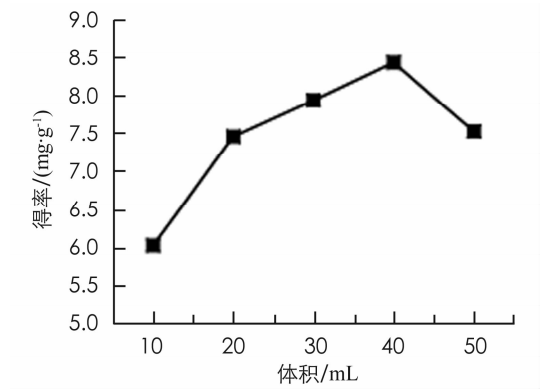


图 3 料液比对总皂苷得率的影响

由图 3 可知,当用 70%乙醇溶液、提取时间 40 min 时,料液比 1:40 得率最高,黄花倒水莲总皂苷得率随着料液比的增加而增加.溶剂量的增加,黄花倒水莲中总皂苷溶出量增加.当料液比超过 1:40 后,总皂苷得率下降,可能是黄花倒水莲中的杂质成分竞争性溶出不利于总皂苷的提取^[12].因此以取料液比 1:40 为最大料液比提取值.

2.2 响应面优化试验

以提取时间、乙醇浓度、料液比为影响因素,以黄花倒水莲中总皂苷得率为响应面值做响应面分析试验,试验方案及结果见表 2,图 4.

表 2 响应面分析试验结果

试验号	A	B	C	总皂苷得率/(mg·g ⁻¹)
1	0	1	-1	11.06
2	0	0	0	12.14
3	0	0	0	12.56
4	0	0	0	12.07
5	-1	0	1	10.54
6	-1	1	0	10.11
7	1	0	-1	11.22
8	1	-1	0	10.12
9	0	1	1	9.31
10	0	0	0	12.03
11	-1	0	-1	10.08
12	1	1	0	10.57
13	1	0	1	10.63
14	0	-1	1	9.55
15	0	-1	-1	10.17
16	-1	-1	0	9.72
17	0	0	0	12.42

采用 Design-Expert 软件对表 1 的试验结果进行多项拟合回归, 得到总皂苷得率对提取时间、乙醇浓度、料液比的二次多项回归模型方程:

$$Y=12.24+0.16A+0.19B-0.41C+0.015AB-0.062AC-0.28BC-0.66A^2-1.45B^2-0.77C^2$$

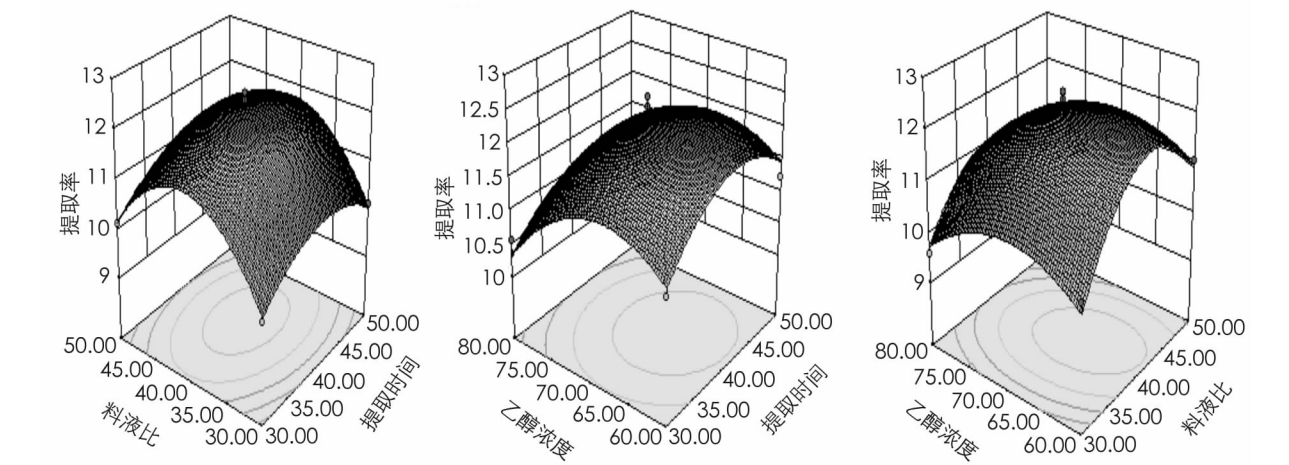


图 4 总皂苷得率影响的响应面交互作用图

2.2.1 方差分析

为了进一步确定相关因素对黄花倒水莲总皂苷得率的影响程度, 检查回归方程的有效性, 对回归模型进行方差分析, 结果见表 3.

表 3 回归模型方差分析结果

参数	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
A	0.21	1	0.21	0.51	0.133 2	
B	0.28	1	0.28	2.89	0.090 5	
C	1.36	1	1.36	3.85	0.003 4	* *
AB	9.000E-004	1	9.000E-004	0.012	0.914 2	
AC	0.016	1	0.016	0.22	0.655 6	
BC	0.32	1	0.32	4.43	0.073 4	
A ²	1.83	1	1.83	25.41	0.001 5	* *
B ²	8.91	1	8.91	123.58	<0.000 1	* *
C ²	2.48	1	2.48	34.37	0.000 6	* *
模型	16.69	9	1.85	25.73	0.000 1	* *
残差	0.5	7	0.072			
失拟项	0.29	3	0.096	1.76	0.293 9	
纯误差	0.22	4	0.054			
总离差	17.20	16				
C.V=2.47% R ² =0.9707 R ² _{Adj} =0.932 9						

注: * * 表示差异有统计学意义($p<0.01$); * 表示差异有统计学意义($p<0.05$).

从表 3 可知, 整体模型达到统计学意义($p<0.01$), 失拟项无统计学意义($p<0.05$), 表明该模拟方程与实际情况拟合良好, 模型中一次项(C), 二次项(A^2 , B^2 , C^2)均达到统计学意义($p<0.01$), 表明试验因素与响应值不是简单的线性关系, 该方程可以对未知条件下的黄花倒水莲中总皂苷得率进行预测. 该模型的变异系数值越小, 试验的重复性越好. 在响应面分析中, 各变量对响应值的影响显著性可由 F 值检验判定, P 值越小, 其响应值越显著. 由 F 值推断得到因素对黄花倒水莲中总皂苷得率影响排序由大到小为乙醇浓度(B), 料液比(C), 提取时间(A).

2.2.2 最佳工艺及验证试验

根据模型得出最佳工艺条件是提取时间 41.37 min, 乙醇浓度 67.07%, 料液比 1:40.93. 试验皂苷得率预测值为 12.32 mg/g. 为了使试验更方便进行, 试验选择了提取时间 41 min, 乙醇浓度 67%, 料液比

1:40, 在此条件下进行 3 次平行试验, 得率为 $(11.97 \pm 0.07) \text{ mg/g}$, 与预测值相比, 相对误差在 5% 以内, 与模型预测值一致, 说明通过响应面优化得出的黄花倒水莲中总皂苷提取工艺参数准确可靠, 由此可以得出该模型可以较好地模拟黄花倒水莲总皂苷的提取条件。

3 结 论

在单因素试验的基础上, 通过 Design Expert 软件中 Box-Behnken 响应面法对黄花倒水莲中总皂苷的提取工艺进行设计和优化。研究结果表明, 提取时间、乙醇浓度、料液比对黄花倒水莲总皂苷得率的影响不是简单的线性关系。在提取温度 60°C , 超声功率 250 W 条件下, 本试验确定了超声辅助提取黄花倒水莲最佳工艺参数为提取时间 41 min, 乙醇浓度 67%, 料液比 1:40, 该条件下黄花倒水莲总皂苷得率为 11.97 mg/g , 与预测值相接近。说明该模型可以较好地预测黄花倒水莲总皂苷提取条件与得率之间的关系, 同时也证明了响应面法优化黄花倒水莲中总皂苷的提取工艺参数的可行性。

参考文献:

- [1] 陈书坤, 李 恒, 陈邦余. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 151—152.
- [2] 杨 国, 罗 洁, 莫亿伟, 等. 黄花倒水莲的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学报, 2016, 52(3): 349—355.
- [3] 李 浩, 王秋娟, 袁 林, 等. 黄花倒水莲总皂苷对鹌鹑高血脂血症模型的调脂作用 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 289—291.
- [4] 郭继远, 王秋娟, 吴锦慧, 等. 黄花倒水莲总皂苷对动物实验性肝损伤的保护作用 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(4): 303—306.
- [5] 李 浩, 王秋娟, 朱丹妮. 黄花倒水莲总皂苷对血瘀大鼠和高脂血症家兔血液流变学指标的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(11): 21—23.
- [6] 吴 伟, 张 云, 向 福. 响应面法优化龙葵皂苷类成分的提取工艺 [J]. 河南农业科学, 2016, 45(9): 153—157, 162.
- [7] 陈慧斌, 王梅英, 陈绍军, 等. 响应面法优化牡蛎复合酶水解工艺研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(11): 146—151.
- [8] 梁戈亮, 林书玉, 刘 东. 超声提取一分光光度法测定远志总皂苷的含量 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 104—105, 111.
- [9] 揭 晶, 孙桂芝, 刘冬琳, 等. 响应面法优化超声提取芦笋总皂苷 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 310—311.
- [10] 朱丹妮, 李 丽, 朱瑶俊, 等. 黄花倒水莲化学成分研究 [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(3): 222—224.
- [11] 韩毅丽, 梁 璐, 张丹丹, 等. 超声提取远志总皂苷的研究 [J]. 山西医药杂志, 2010, 39(11): 1051—1052.
- [12] 刘剑青, 肖小年, 许英伟, 等. 响应面法优化藟头中皂苷的提取工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 254—255.

Optimization of Ultrasound Extraction Technology for Total Saponins from *Polygala Fallax* Hemsl in Response Surface Methodology

LUO Ya-lan, ZHANG Ji-zhong, TAO Wei,
REN Yan, MA Shan-shan, LV Lu-yang

Southwest University for Nationalities College of Pharmacy, Chengdu 610041, China

Abstract: To optimize the ultrasonic extraction technique for the total saponins from *Polygala fallax* Hemsl by response surface methodology. The factor study were ultrasonic time, ethanol concentration and solid-liquid ratio. On the basis of single factor experiment using Box-Behnken experiment design. the optimum ultrasound extraction technology was as following: ultrasonic time 41mins, 67% ethanol and solid liquid ratio 1:40. The yield of total saponins reached 11.97 mg/g , which was well matched with the predictive extraction yield 12.32 mg/g , regression coefficient of the binomial fitting complex model was 0.9707.

Key words: *Polygala fallax* Hemsl; total saponins; Response surface methodology; Ultrasound extraction

责任编辑 周仁惠