

内部沸腾法提取七叶一枝花皂苷的工艺优化

Optimization on saponin extraction from *Rhizoma paridis* by inner ebullition

袁志辉^{1,2}

蒋琼凤^{1,2}

YUAN Zhi-hui^{1,2} JIANG Qiong-feng^{1,2}

(1. 湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室, 湖南 永州 425199;

2. 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199)

(1. Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South, Yongzhou, Hunan 425199, China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China)

摘要:为提高药用成分皂苷的提取得率,合理有效开发七叶一枝花药材,以乙醇浓度、温度、料液比和提取时间为单因素进行试验,确定各因素的最佳水平。在该基础上,采用基于 Box-Behnken 试验设计的响应面法进一步优化,得到最佳提取工艺为:乙醇浓度 39%、水浴温度 86 ℃、提取时间 5.5 min。在该条件下,七叶一枝花中皂苷提取得率达 11.02%。内部沸腾法提取七叶一枝花中皂苷具有简便、快速、高效等优点。

关键词:七叶一枝花;皂苷;内部沸腾法

Abstract: In order to improve the unit yields of medicinal components, and provide a scientific basis for effective exploring of *Rhizoma paridis*, single factor experiments were combined with inner ebullition and response surface methods to extract the saponin from *Rhizoma paridis*. Based on the single factor experiments of ethanol concentration, temperature, liquid feed ratio, and extraction time, the best levels of all factors were established. The extraction conditions were optimized by the Box-Behnken design and the optimum conditions were as follows: 39% of ethanol concentration, 86 ℃ of extraction temperature, and 5.5 min of extraction time. The yield of saponin extracted under the optimal conditions reached 11.02%. The present strategy is simple, rapid and efficient.

Keywords: *Rhizoma paridis*; saponin; Inner ebullition

七叶一枝花(*Rhizoma paridis*),为百合科重楼属多年生草本植物,药用价值高^[1-3],其药用部分为根茎,有小毒。现代药理研究^[4-5]表明:七叶一枝花根茎具有止血、镇痛、免疫调节、抗肿瘤、抗真菌等多种生理活性,已成为著名中成药如云南白药、宫血宁胶囊、季德胜蛇药片等产品的主要原料^[6],其主要活性成分为甾体皂苷^[7]。

对七叶一枝花皂苷的提取工艺研究目前还较少,在仅有的两篇文献^[8-9]中报道均采用正交试验设计进行研究,提取方法为酶醇解—微波助提—双相酸水解联合技术^[8]和浸渍法^[9]。该两种方法均有各自的不足,前者操作过程较复杂,后者的提取剂用量大。内部沸腾法是一种在低温条件下快速强化植物有效成分的提取方法,具有收率高、产品杂质少及容易实现等^[10]优点。此外,正交试验法试验次数较多,周期较长,而且不能从整个区域的水平上找到因素的最佳组合,响应面法一定程度上能满足这些要求,其在多酚等的提取中已得到广泛的应用^[11-12]。本研究拟利用响应面优化内部沸腾法提取七叶一枝花皂苷,旨在提高药用成分的提取得率,为合理有效开发七叶一枝花药材提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

七叶一枝花:永州恒康药品零售连锁有限公司馨雅堂连锁店;

重楼皂苷 II 标准品:≥99%,中国药品生物制品检定所;95 %乙醇、甲醇、高氯酸等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

紫外分光光度计:UV2800 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

电子分析天平:AUY120 型,岛津国际贸易公司;

基金项目:湖南省科技计划项目(编号:2014NK3002);湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室开放基金(编号: XNZW14C05);永州市科技局项目(编号:2015[10])

作者简介:袁志辉,男,湖南科技学院讲师,湖南农业大学在读博士研究生。

通讯作者:蒋琼凤(1982—),女,湖南科技学院高级实验师,硕士。

E-mail: jiangxinyi477@sohu.com

收稿日期:2016—05—06

高速台式冷冻离心机:TGL-16M型,长沙湘仪离心机仪器有限公司;

旋转蒸发仪:R-1001-VN型,郑州长城科工贸有限公司;

超声波提取仪:SY-150型,上海宁商超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的制作 精密称取重楼皂苷Ⅱ对照品10.000 mg,用适量的甲醇溶解定容至25 mL,摇匀,分别吸取0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL于干净试管中,60℃水浴挥干溶剂,各加入高氯酸5 mL,密封,摇匀后置于65℃恒温水浴锅中加热15 min,取出冷却至室温,以高氯酸为空白溶液,在波长407 nm处测定吸光度^[13]。

1.3.2 内部沸腾法提取七叶一枝花皂苷 将2.00 g七叶一枝花粉末置于100 mL烧杯中,加入适量的80%乙醇解析剂,在功率为150 W的超声波提取器中保持20 min,温度控制在25℃,使乙醇解析剂充分渗透到细胞组织中,然后加入温度高于解析剂沸点的乙醇,于恒温水浴中提取一定时间后再抽滤^[14]。滤渣以相同条件再提取一次,合并滤液,经减压浓缩至无醇味,用蒸馏水定容至100 mL,再用等体积的水饱和正丁醇萃取二次,合并正丁醇萃取液,经减压蒸馏至无液体流出,回收正丁醇,后用乙醚洗涤,抽滤,沉淀即为总皂苷。按标准曲线法测定皂苷含量。

1.3.3 七叶一枝花总皂苷提取条件优化 在其它条件固定的情况下,分别考察乙醇浓度、水浴温度、料液比和提取时间对七叶一枝花皂苷得率的影响。

(1) 乙醇浓度对皂苷提取的影响:设置乙醇浓度梯度为20%、30%、40%、50%和60%,在料液比1:24(g/mL)、温度85℃条件下提取5 min,考察乙醇浓度对皂苷得率的影响。

(2) 水浴温度对皂苷提取的影响:设置水浴温度梯度为75、80、85、90、95℃,在料液比1:24(g/mL)、30%乙醇条件下提取5 min,考察水浴温度对皂苷得率的影响。

(3) 料液比对皂苷提取的影响:设置料液比梯度为1:8、1:16、1:24、1:32、1:40(g/mL),用30%乙醇在水浴温度85℃条件下提取5 min,考察料液比对皂苷得率的影响。

(4) 提取时间对皂苷提取的影响:设置提取时间梯度为3、5、7、9、11 min,用30%乙醇在水浴温度85℃、料液比1:24(g/mL)条件下,考察提取时间对皂苷得率的影响。

在此基础上,选择对七叶一枝花皂苷提取有显著影响的3个因素,采用Box-Behnken试验设计^[15]进一步优化,确定内部沸腾提取七叶一枝花皂苷的最佳条件。

1.3.4 样品液皂苷的测定 取适量样品用甲醇溶解,并定容至25 mL的容量瓶中,按标准曲线法在407 nm处测定吸光度,并以式(1)计算皂苷提取得率。

$$R = \frac{C \times V \times N}{1\,000 \times M} \times 100\%,$$

(1)

式中:

R——皂苷提取得率,%;

C——皂苷质量浓度,mg/mL;

V——七叶一枝花皂苷提取液的体积,mL;

N——稀释的倍数;

M——七叶一枝花样品质量,g。

2 结果与分析

2.1 重楼皂苷标准曲线的制作

以重楼皂苷浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线(见图1),得回归线方程为: $y = 10.3x - 0.002$, $R^2 = 0.998\,9$ 。

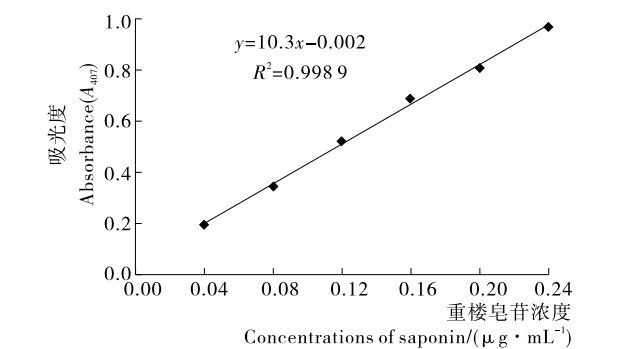


图1 重楼皂苷标准曲线

Figure 1 The standard curve of *Rhizoma paridis* saponin

2.2 提取因素对总皂苷得率的影响

由图2(a)可知,乙醇浓度的提高有利于皂苷的浸出,40%时达到最大值,之后皂苷提取得率反而降低。可能是提取剂浓度过低,皂苷溶解度最小,提取不充分;而提取剂浓度过高,与物料内部解析剂浓度差缩小,内部沸腾强度可能降低,皂苷扩散较慢,提取得率也下降。

由图2(b)可知,总皂苷提取得率随水浴温度升高而上升,在85℃时提取得率最高,之后逐渐下降。温度是内部沸腾法的重要因素,浓度为80%的乙醇在常压下的沸点约为82.4℃,当水浴温度高于此沸点时,物料内部的乙醇沸腾,分子扩散较快,提取效果好,但当温度超过85℃时,物料的内外均能产生沸腾,使对流扩散在很短时间就结束,相当于缩短了提取时间,提取得率反而下降。当提取温度低于解吸剂沸点时,物料内部不能发生沸腾,分子扩散较慢,在较短时间内提取不完全,故提取效果不好。

由图2(c)可知,总皂苷提取得率随着乙醇用量的增加而升高,在乙醇体积为48 mL时,提取得率最大,之后乙醇用量的增加对皂苷提取得率无影响,因此最适料液比为1:24(g/mL),后续试验不再考察料液比因素。

由图2(d)可知,在5 min内,皂苷提取得率急剧增加,5 min时,总皂苷得率最高,之后提取得率逐渐下降。内部沸腾过程提取速度相当快,物料内部沸腾过程中,分子运动方式为对流扩散,其速度比普通条件下快100倍,故内部沸腾提取时间相当短。此外,皂苷的热稳定性较差,若高温下提取时间过长,皂苷结构会遭到破坏导致提取得率下降。

2.3 响应面优化试验结果

选择皂苷提取得率影响较大的3个因素乙醇浓度、提取时间、水浴温度作三因素三水平Box-Behnken试验设计,具

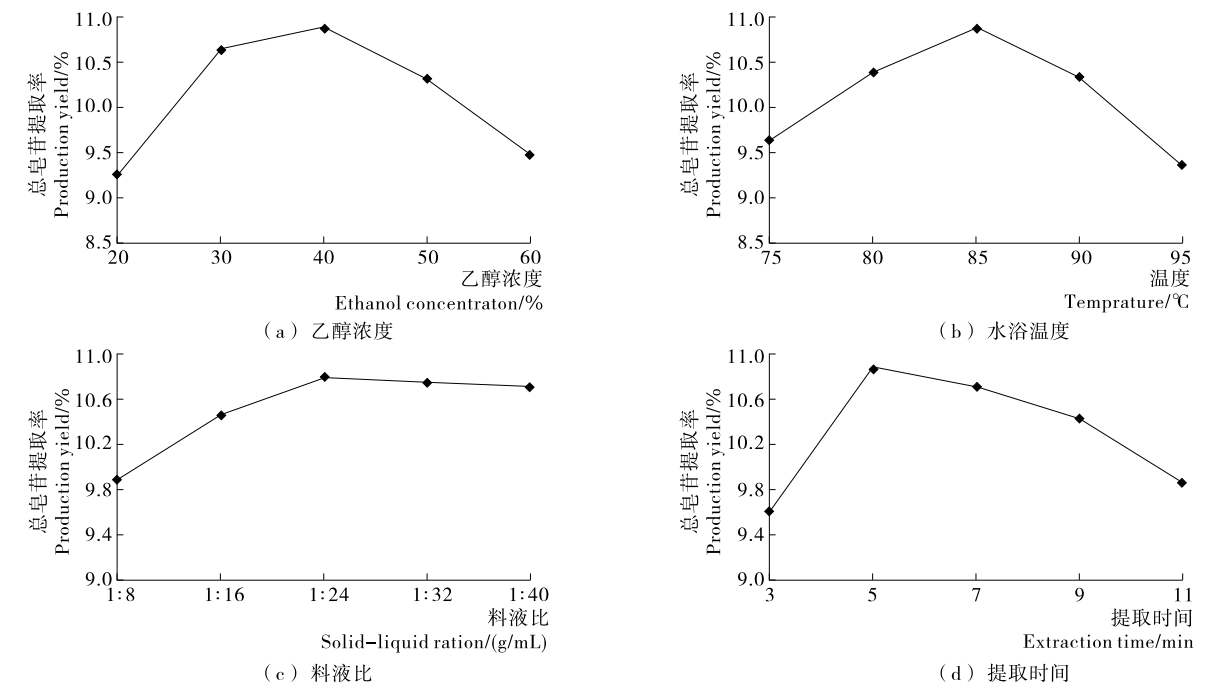


图 2 提取条件对总皂苷得率的影响
Figure 2 Effects of extraction technological conditions on Saponins production yield

体方案及结果见表 1、2。

利用 Design-Expert 软件对表 2 数据进行二次多项式回归拟合,得到皂苷提取得率对乙醇浓度、提取时间、水浴温度的模型为:

$$Y=10.91-0.33A+0.17B+0.58C+0.085AB-0.30AC-0.16BC-0.71A^2-0.17B^2-0.68C^2。$$
 (2)

模型方差分析见表 3。

由表 3 可知,模型的 $F=2\,641.84$, $P<0.000\,1$,表明二次多元回归模型极其显著。三因素及交互项、二次项的 P 值均小于 $0.000\,1$,说明乙醇浓度、提取时间、水浴温度三因素及其交互项、二次项都具有显著性影响;缺失项 F 值 $=2.13$, $P=0.238\,7>0.05$,模型失拟不显著;决定因素 $R^2=0.999\,7$,说明该模型拟合度较好,误差小,能较好地反应响应值的变化。

图 3 分别表示在固定水浴温度 $85\,^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 $5\,\text{min}$ 及乙醇浓度为 40% 条件下,乙醇浓度与提取时间、乙醇浓度与水浴温度、提取时间与水浴温度交互作用对皂苷提取得率的影响。结果表明:当乙醇浓度和提取时间都固定时,皂苷提取得率随着温度的变化幅度较大,故水浴温度对提取得率影响最大。通过最优分析,得到各因素最佳水平为:乙醇浓度

表 1 响应面试验因素水平

水平	A 乙醇浓度/%	B 提取时间/min	C 水浴温度/℃
−1	30	3	80
0	40	5	85
1	50	7	90

表 2 响应面试验结果

试验号	A	B	C	Y 总皂苷提取得率/%
1	0	1	1	10.66
2	0	0	0	10.92
3	0	−1	−1	9.14
4	1	−1	0	9.46
5	−1	0	−1	8.96
6	−1	−1	0	10.28
7	1	1	0	9.96
8	0	0	0	10.90
9	0	0	0	10.89
10	−1	1	0	10.44
11	0	0	0	10.91
12	0	0	0	10.93
13	0	1	−1	9.84
14	0	−1	1	10.62
15	1	0	−1	8.90
16	−1	0	1	10.74
17	1	0	1	9.50

38.67% 、提取时间 $5.44\,\text{min}$ 、水浴温度 $86.11\,^{\circ}\text{C}$,预测皂苷提取得率为 11.07% 。因实际操作的局限性,将提取工艺修改为乙醇浓度 39% 、水浴温度 $86\,^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 $5.5\,\text{min}$ 。在此条件下进行验证,3 次实验取平均值为 11.03% ,与预测值基本相符。

表 3 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	8.83	9	0.98	2 641.84	<0.000 1
A	0.84	1	0.84	2 275.00	<0.000 1
B	0.25	1	0.25	659.62	<0.000 1
C	2.74	1	2.74	7 371.00	<0.000 1
AB	0.029	1	0.029	77.81	<0.000 1
AC	0.35	1	0.35	937.19	<0.000 1
BC	0.11	1	0.11	293.19	<0.000 1
A ²	2.11	1	2.11	5 674.32	<0.000 1
B ²	0.12	1	0.12	318.05	<0.000 1
C ²	1.93	1	1.93	5 203.31	<0.000 1
残差	2.60×10 ⁻³	7	3.71×10 ⁻⁴		
缺失项	1.60×10 ⁻³	3	5.33×10 ⁻⁴	2.13	0.238 7
纯误差	1.00×10 ⁻³	4	2.50×10 ⁻⁴		
总和	8.83	16			

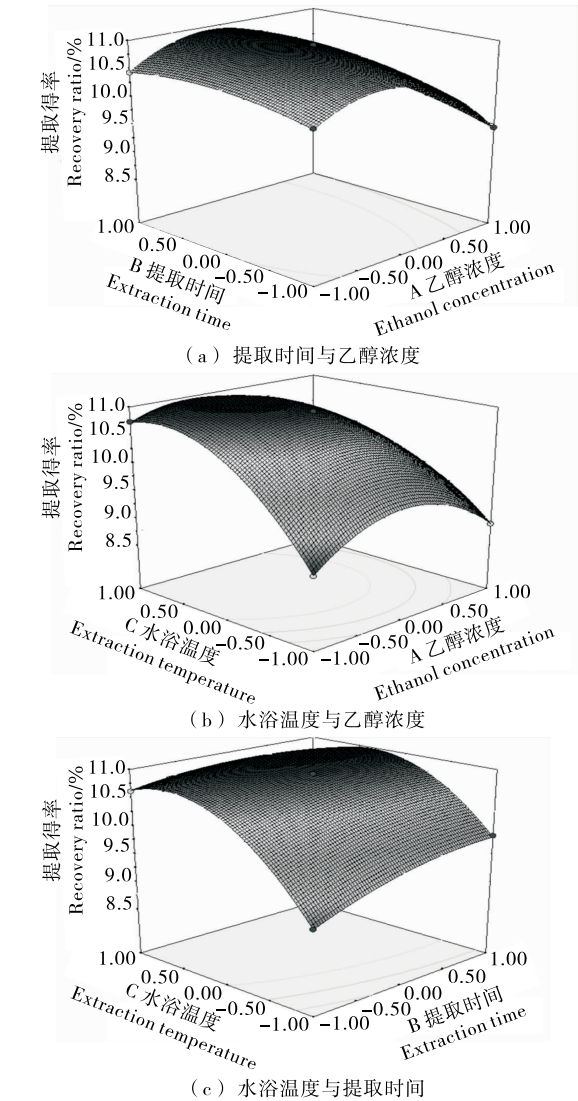


图 3 因素交互作用对皂苷提取得率影响的响应面图

Figure 3 Response surface plots showing the cross interaction among three factors

3 结论

采用单因素试验及响应面分析对内部沸腾法提取七叶一枝花皂苷的工艺条件进行了优化,通过建立影响提取得率的二次多项模型,得到了七叶一枝花皂苷的最佳提取条件为乙醇浓度 39%、水浴温度 86 ℃、提取时间 5.5 min。经验证,在此条件下七叶一枝花中总皂苷提取得率为 11.03%,与预测值相符,证实该模型准确,适用于七叶一枝花皂苷提取的分析和预测。可为更加科学合理地开发和应用七叶一枝花提供了重要的数据参考和方法支撑。此外,该领域还有更大的研究空间和价值,如改变提取剂,利用正丁醇萃取法进行总皂苷的提取以进一步优化工艺;或者从提取得到的总皂苷中进一步分离单体皂苷,并研究其生理活性等。

参考文献

[1] JIN Ling-yu, LU Ting-xiang, QIN Xu-jie, et al. Two new highly oxygenated spirostanol saponins from *Paris polyphylla* var. *stenophylla* [J]. Natural Products and Bioprospecting, 2016, 6(4): 1-6.

[2] 王羽, 张彦军, 高文远, 等. 滇重楼的抗肿瘤活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1 425-1 428.

[3] 袁晓, 袁萍, 严海燕, 等. 野生珍稀药用植物七叶一枝花的成分含量分析[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(6): 575-577.

[4] DENG Da-wei, LAUREN DR, COONEY JM. et al. Antifungal saponins from *Paris polyphylla* smith [J]. Planta Medica, 2008, 74(11): 1 397-1 402.

[5] MAN Shu-li, GAO Wen-yuan, ZHANG Yan-jun, et al. Antitumor and antimetastatic activities of *Rhizoma Paridis* saponins [J]. Steroids, 2009, 74(13/14): 1 051-1 056.

[6] 武姗姗, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(3): 344-347.

[7] 张娟, 路金才. 皂苷的提取方法及含量测定研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(3): 25-28.

[8] 李于善, 周强, 张玉针, 等. 三峡七叶一枝花薯蓣皂苷元的分离提取工艺研究[J]. 化学世界, 2009, 50(2): 86-89.

[9] 王丹辉, 李刚, 张静, 等. 七叶一枝花酞提取工艺研究[J]. 中国药师, 2013, 16(9): 1 364-1 366.

[10] 柳昌武. 辣椒内部沸腾提取及其缓释制剂工艺优化的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012: 19-21.

[11] 唐华丽, 熊汉国, 王玮. 响应面法优化葡萄籽多酚提取工艺[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 147-149, 163.

[12] 郑菲, 黄亮, 李安平, 等. 响应面法优化橡实壳中多酚提取工艺条件[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 49-51.

[13] 喻祖文, 刘颖新, 李辉, 等. 微波法提取重楼总皂苷的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 833-834.

[14] 郑韵英, 童张法, 韦藤幼. 内部沸腾法提取银树叶总黄酮的研究[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2013, 38(3): 527-531.

[15] 余响华, 蒋琼凤, 邵金华. 响应曲面优化喜树生物碱醇提工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(11): 1 858-1 862.