

星点设计-效应面法优选茯苓皮总三萜的提取工艺

闫雪生^{1*},赵许杰²,韩媛媛²,刘 虎²(1.山东省中医药研究院,济南 250014;2.山东中医药大学药学院,济南 250355)

中图分类号 R284;R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2910-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.11

摘要 目的:优选茯苓皮总三萜的提取工艺。方法:以茯苓皮总三萜提取率为评价指标,以乙醇体积分数、料液比、提取时间为考察因素,分别采用单因素试验和星点设计-效应面法优选茯苓皮总三萜的提取工艺。结果:最优工艺条件为乙醇体积分数为70%,料液比为1:10(g/ml),提取时间为0.5 h。该条件下,茯苓皮总三萜提取率为2.99%。验证试验结果为3.02%,与预测值接近。结论:该方法简便合理、稳定、可预测性优,可用于茯苓皮总三萜的提取。

关键词 茯苓皮总三萜;星点设计-效应面法;提取工艺

Optimization of Extraction Technology of Triterpene from *Poria cocos* by Central Composite Design and Response Surface Method

YAN Xue-sheng¹, ZHAO Xu-jie², HAN Yuan-yuan², LIU Hu²(1. Shandong Academy of TCM, Jinan 250014, China; 2. College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of triterpene from *Poria cocos*. METHODS: The single factor test and central composite design and response surface method were optimized with ethanol concentration, extraction time and ratio of solvent to raw material as factors using the content of triterpene as index. RESULTS: The optimized technology was as follows: ethanol concentration of 70%, ratio of raw material to solvent 1:10(g/ml), extracting for 0.5 h. The content of triterpene in *P. cocos* was 2.99%. The result of verification test was 3.02%, which was closed to the predicted value. CONCLUSIONS: The method is reasonable, stable and predictable, and can be used for the extraction of triterpene from *P. cocos*.

KEYWORDS Triterpene from *Poria cocos*; Central composite design and response surface method; Extraction technology

茯苓皮为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 菌核的干燥外皮,味甘、淡,性平,归肺、脾、肾经,具有利水消肿的作用^[1]。茯苓皮总三萜为茯苓皮中的主要有效成分之一,研究发现茯苓皮总三萜具有抗氧化^[2]、抑菌^[3]等作用。

传统的中药成分提取工艺的优化方法一般采用正交设计和均匀设计,采用线性数学模型,虽有简便、试验次数较少等优点,但精度不高。星点设计采用非线性数学模型拟合,复相关系数高、精度高,预测值更接近真实值。本研究以茯苓皮总三萜的提取率为指标,引入星点设计方法,结合效应面法优选茯苓皮总三萜的提取工艺,旨在优化茯苓皮总三萜提取工艺的同时,为探讨该试验设计法进一步应用于优化中药提取工艺的可行性提供依据。

1 材料

1.1 仪器

BP211D型电子天平(德国 Sartorius 公司);UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津公司);HH-4型数显电子恒温水浴锅(金坛市晶玻实验仪器厂);减压旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 药材

茯苓皮(精华制药亳州康普有限公司,批号:20121023),经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为真品。

* 研究员,硕士研究生导师,硕士。研究方向:中药制剂及新技术。电话:0531-82948006。E-mail:tcmyxs@126.com

1.3 试剂

熊果酸(UA)对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110742-200518);试验所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 茯苓皮总三萜含量的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取UA对照品2.5 mg,置25 ml量瓶中,用无水乙醇溶解并定容,即得质量浓度为0.1 mg/ml的UA对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取10 g茯苓皮,加入100 ml 90%乙醇,水浴提取3次,每次2 h,合并3次提取液,减压浓缩,置50 ml量瓶中,用无水乙醇定容,即得供试品溶液。

2.1.3 标准曲线的制备 分别精密量取0.2、0.4、1.2、1.6、2.0、2.4 ml UA对照品溶液,置15 ml量瓶中(以无水乙醇为空白试剂),水浴挥干,加0.4 ml 5%香草醛-冰醋酸溶液与2 ml高氯酸,60℃下恒温水浴10 min后立刻用冷水冷却至室温,再加入10 ml冰醋酸,摇匀,于551 nm波长处测定吸光度(A)^[4-5]。以A为纵坐标,质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=0.04254x-0.04779$ ($r=0.9989$, $n=6$)。结果表明,茯苓皮总三萜质量浓度在1.613~19.356 mg/L范围内与A呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 按“2.1.3”项下方法测定UA对照品溶液的A,连续测定6次,计算RSD。结果,精密度的RSD=0.93%($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.2”项下方法稀释至符合要求的供试品溶液1份,分别于0、2、6、12、24 h测定A,计算RSD。结果,稳定性的RSD=2.20% (n=5),表明供试品溶液稳定性良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密称定已知含量的茯苓皮粗粉5 g,平行6份,分别按药材含量与对照品加入量大致比例(1:1, m/m)加入UA对照品,按“2.1.2”“2.1.3”项下方法测定并计算茯苓皮总三萜的加样回收率及RSD。结果,平均回收率为101.7%,RSD=2.23% (n=6)。

2.2 单因素考察

2.2.1 乙醇体积分数对茯苓皮总三萜提取率的影响 称取10 g茯苓皮粗粉,固定料液比为1:10(g/ml)、提取时间为2 h、提取次数为2次,分别用50%、70%、90%、95%的乙醇加热回流提取。按“2.1”项下方法进行提取测定,计算茯苓皮总三萜提取率。结果,选取乙醇体积分数为70%。乙醇体积分数对茯苓皮总三萜提取率的影响见图1。

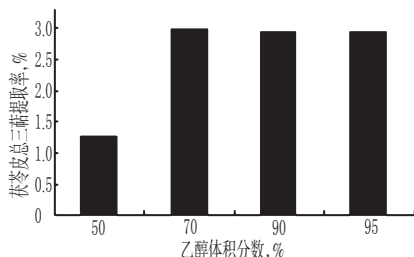


图1 乙醇体积分数对茯苓皮总三萜提取率的影响

Fig 1 Effects of ethanol concentration on the extraction of triterpene from *P. cocos*

2.2.2 料液比对茯苓皮总三萜提取率的影响 称取10 g茯苓皮粗粉,固定乙醇体积分数为70%、提取时间为2 h、提取次数为2次,分别用料液比为1:5、1:10、1:15、1:20(g/ml)加热回流提取。按“2.1”项下方法进行提取测定,计算茯苓皮总三萜提取率。结果,选取料液比为1:10(g/ml)。料液比对茯苓皮总三萜提取率的影响见图2。

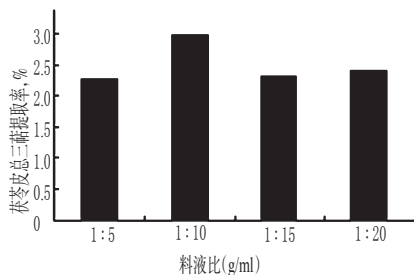


图2 料液比对茯苓皮总三萜提取率的影响

Fig 2 Effects of the ratio of solvent to raw material on the extraction of triterpene from *P. cocos*

2.2.3 提取时间对茯苓皮总三萜提取率的影响 称取10 g茯苓皮粗粉,固定乙醇体积分数为70%、料液比为1:10(g/ml)、提取次数为2次,分别加热回流提取0.5、1.5、2.5、3.5 h。按“2.1”项下方法进行提取测定,计算茯苓皮总三萜提取率。结果,选取提取时间为1.5 h。提取时间对茯苓皮总三萜提取率的影响见图3。

2.3 星点设计-效应面试验^[6-7]

2.3.1 效应面试验设计及试验结果 根据中心组合设计原理及单因素考察的结果,以乙醇体积分数(X_1)、料液比(X_2)、提取

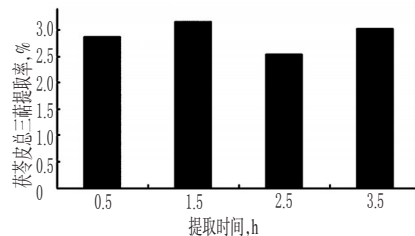


图3 提取时间对茯苓皮总三萜提取率的影响

Fig 3 Effects of extraction time on the extraction of triterpene from *P. cocos*

时间(X_3)为自变量,茯苓皮总三萜提取率为响应值,设计三因素三水平共20个试验点的效应面分析,其中14个为析因试验,6个为中心试验,用中心试验统计试验误差。因素与水平见表1;星点设计-效应面试验安排与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	X_1 , %	X_2 , g/ml	X_3 , h
-1.732	50	5.00	0.50
-1	58	7.11	0.92
0	70	10.00	1.50
1	82	12.89	2.08
1.732	90	15.00	2.50

表2 星点设计-效应面试验安排与结果

Tab 2 Design and result of response surface test

试验号	A	B	C	茯苓皮总三萜提取率, %
1	-1	-1	-1	2.00
2	1	-1	-1	3.05
3	-1	1	-1	2.60
4	1	1	-1	2.49
5	-1	-1	1	1.38
6	1	-1	1	2.78
7	-1	1	1	1.50
8	1	1	1	3.00
9	-1.732	0	0	1.12
10	1.732	0	0	2.34
11	0	-1.732	0	2.48
12	0	1.732	0	2.86
13	0	0	-1.732	2.94
14	0	0	1.732	2.54
15	0	0	0	2.81
16	0	0	0	2.91
17	0	0	0	2.86
18	0	0	0	2.82
19	0	0	0	2.71
20	0	0	0	2.82

2.3.2 模型方程的建立与显著性检验 以茯苓皮总三萜提取率为因变量,对各因素进行多元线性回归和二项式拟合。使用 Design-Expert Software 8.0.5 软件拟合模型,多元线性回归: $r=0.3913$, $P=0.0117 > 0.01$,模型拟合度不佳,预测性较差,因此线性模型不合适。二项式拟合: $r=0.9028$, $P < 0.0001$,说明二项式拟合度高,预测性优,此模型适合,其方程为 $Y=2.82+0.43X_1+0.074X_2-0.16X_3-0.13X_1X_2+0.25X_1X_3+0.038X_2X_3-0.37X_1^2-0.056X_2^2-0.033X_3^2$ 。方差分析结果见表3。

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	自由度	离差平方和	方差	F	P
总模型	9	5.730	0.640	20.60	<0.000 1
X_1	1	2.530	2.530	81.85	<0.000 1
X_2	1	0.007	0.077	2.49	0.145 7
X_3	1	0.340	0.340	10.90	0.008 0
X_1X_2	1	0.140	0.140	4.54	0.058 9
X_1X_3	1	0.480	0.480	15.53	0.002 8
X_2X_3	1	0.011	0.011	0.36	0.559 9
X_1^2	1	2.150	2.150	69.57	<0.000 1
X_2^2	1	0.050	0.050	1.61	0.232 9
X_3^2	1	0.017	0.017	0.55	0.474 4
残差	10	0.310	0.310		
失拟项	5	0.290	0.057	13.13	0.006 7
纯误差	5	0.022	4.377E-003		
总变异	19	6.040			

由表3可知,总模型、乙醇体积分数(X_1)及二次项乙醇体积分数(X_1^2)、提取时间(X_3)与乙醇体积分数、提取时间相互作用(X_1X_3)对茯苓皮总三萜提取率影响极显著;乙醇体积分数、料液比相互作用(X_1X_2)对茯苓皮总三萜的提取影响达到显著水平。在所选取的各因素水平范围内,按照对结果的影响排序为乙醇体积分数(X_1)>提取时间(X_3)>料液比(X_2)。

2.3.3 效应面分析 通过 Design-Expert Software 8.0.5 软件统计绘制效应面图,详见图4。

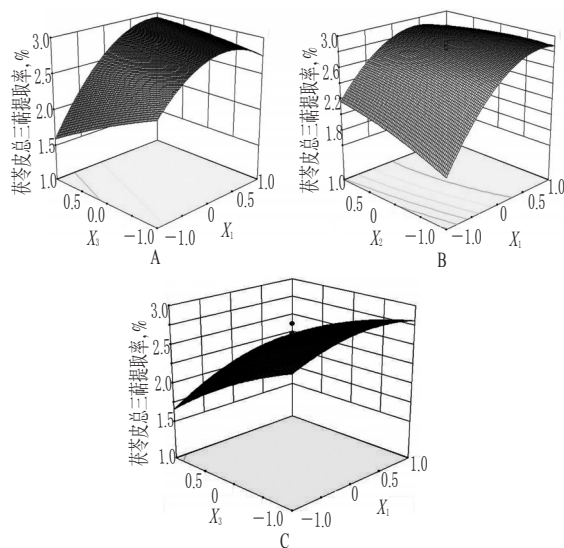


图4 茯苓皮总三萜的提取效应面图

A. 提取时间和乙醇体积分数对茯苓皮总三萜提取率的影响; B. 料液比和乙醇体积分数对茯苓皮总三萜提取率的影响; C. 提取时间和料液比对茯苓皮总三萜提取率的影响

Fig 4 Response surface methodology of total triterpene from *P. cocos*

A. effects of extraction time and ethanol concentration on the content of triterpene from *P. cocos*; B. effects of ratio of solvent to raw material and ethanol concentration on the content of triterpene from *P. cocos*; C. effects of extraction time and ratio of solvent to raw material on the content of triterpene from *P. cocos*

2.4 验证试验

在图4上选取提取率较佳工艺范围,利用 Point Prediction 进行预测分析,并考虑到工业生产中的实际情况,选择最佳工艺:乙醇体积分数为70%,料液比为1:10(g/ml),提取时间为0.5 h。此时,茯苓皮总三萜提取率为2.99%。根据得到的最优条件,对预测结果进行验证:取样品3批,按上述最佳工艺提取,得提取率为3.02%($n=3$)。预测值与实际值之间偏差较小,说明二次多项式数学模型所得到的优化条件符合设计目标,试验设计和数学模型具有可靠性和重现性。

3 讨论

本研究在预试验的基础上,通过单因素考察影响茯苓皮总三萜提取率的因素,选取影响最大的水平区间,缩小考察范围,提高了试验精密度,进而采用星点设计-效应面法进行提取工艺的优化和筛选。比如提取时间的考察,虽3.5 h时茯苓皮总三萜提取率显著升高,但是其最高值在1.5 h,根据中心组合设计原理故于1.5 h范围左右进行考察。通过对各因素进行拟合,得出二项式拟合方程, $r=0.9028$,说明该拟合模型为成功的模型,具有较好的预测作用。

目前,国内关于茯苓皮有效成分提取采用的多为传统的正交试验设计或均匀设计,提取溶剂多为甲醇,不适合工业化大生产^[8-9]。本研究为给工业化生产提供参考,优选茯苓皮原药材中总三萜成分的提取方法,最终确定提取溶剂为70%乙醇溶液、料液比为1:10(g/ml)、提取时间为0.5 h、提取2次的简便、快捷、稳定、提取效率高的工艺方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:224.
- [2] 程水明, 桂圆, 沈思, 等. 茯苓皮总三萜类物质抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(9):27.
- [3] 沈思, 李孚杰, 梅光明, 等. 茯苓皮总三萜类物质含量的测定及其抑菌活性的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(1):95.
- [4] 余志坚, 包水明, 李荣同. 比色法测定菌核侧耳中总三萜类成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6):911.
- [5] 丁诚实. 分光光度法测定茯苓活性成分的含量[J]. 食品工程, 2008, 12(4):26.
- [6] 辛秀, 袁琳, 雷磊. 星点设计-效应面法优化赶黄草提取工艺[J]. 中国药房, 2009, 20(24):1872.
- [7] 申雪丽, 袁勇, 黄川生, 等. 星点设计-效应面法优化沙棘黄酮提取物分散片处方[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17):19.
- [8] 施溯筠, 祖丽菲, 陈东照. 正交法优选茯苓总三萜提取工艺[J]. 延边大学医学学报, 2009, 32(1):31.
- [9] 沈思. 茯苓皮中总三萜的提取、分离纯化及其美白皮肤活性基础研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2008.

(收稿日期:2013-09-13 修回日期:2014-03-23)