

# 星点设计—效应面法优化红梅消总皂苷双水相提取工艺

励娜<sup>1</sup>, 周文杰<sup>1,2</sup>, 禹奇男<sup>1,2</sup>, 杨荣平<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>重庆市中药研究院, 重庆 400065; <sup>2</sup>成都中医药大学, 成都 611137

**摘要:**为得到红梅消中总皂苷的最佳提取工艺参数,首次采用硫酸铵-乙醇双水相体系对其进行提取;以双水相中两相的质量百分比为自变量,以红梅消总皂苷得率为因变量,通过确定中心点及缩小变量取值范围,用星点设计-效应面分析法进行优化,得到双水相最佳提取条件:硫酸铵 12.14%,乙醇 40.00%,总皂苷得率为 2.95%。结果表明用星点设计-效应面分析法筛选双水相各相的质量百分比方法可行性高,结果可靠;双水相体系对红梅消总皂苷有较好的提取作用,工艺简单、节能、易放大于工业生产。

**关键词:**红梅消;总皂苷;星点设计—效应面分析法;双水相

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Optimization of Aqueous Two-Phase Extraction of Saponins from *Rubus parvifolius* L. by Modified Central Composite Design and Response Surface Methodology

LI Na<sup>1</sup>, ZHOU Wen-jie<sup>1,2</sup>, YU Qi-nan<sup>1,2</sup>, YANG Rong-ping<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;

<sup>2</sup>Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** The aqueous two-phase of ethanol/ammonium sulfate system was used for the extraction of saponins from *Rubus parvifolius* L. The extraction conditions were optimized using modified central composite design coupled with response surface methodology with two independent variables including quantity of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , and the saponin content as the dependent variable. The optimal conditions were determined as follows: 12.14%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 40.00%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . The extraction yield of saponins was 2.95%. The results showed that the central composite design and response surface methodology was useful for optimizing the aqueous two-phase extraction of saponins from *R. parvifolius*. The developed extraction technology was simple, energy-saving and easy to zoom in industrial production.

**Key words:** *Rubus parvifolius* L.; saponin; central composite design and response surface methodology; aqueous two-phase system

红梅消为蔷薇科悬钩子属植物红梅消 *Rubus parvifolius* L. 的干燥全草,具有清热凉血、止血散结、止痛利尿消肿等功效,是一味常见的,在民间有着悠久应用历史的传统中药,民间多以茅莓、五月红、草杨梅等别名沿用。早在唐《本草拾遗》中就有红梅消能“止血活血、散瘀定痛、清热解毒之功效,可内服、外敷”的记载;现代药理研究表明,红梅消的主要有效成分皂苷类物质具有显著的保护神经元,抗肿瘤,抗脑缺血<sup>[1-3]</sup>等作用。因红梅消易获得、种植与加工成本低廉、且其临床疗效显著,故研究红梅消

总皂苷的提取技术在心脑血管类疾病的新药研制方面有着极大的开发空间及市场需求,也势必会带来良好的经济和市场效应。

传统的提取技术在红梅消总皂苷的提取纯化上存在提取率较低,纯化工艺复杂等弊端,故笔者将数学模型与现代新型提取分离技术相结合,对红梅消总皂苷的提取进行了优化研究。本试验首次将超声提取技术耦合乙醇-硫酸铵双水相萃取分离技术应用到红梅消的提取工艺中:在常温条件下,以红梅消总皂苷的得率为指标,依据星点设计要求和双水相图特点,首次采用先依据双水相图确定中心点并缩小因素取值范围,使因素水平满足双水相的条件要求后,再应用星点设计法进行实验,得到提取红梅消总皂苷的最优方法。上述改进,使实验更有理据,结

收稿日期: 2013-12-11 接受日期: 2014-03-18

基金项目: 重庆市科研院所创新能力建设计划项目 (cstc2012pt-kys10004)

\* 通讯作者 Tel: 86-23-89029056; E-mail: yangrongping@cqacmm.com

果更准确可靠且符合实际。双水相提取红梅消总皂苷法为其后续开发以红梅消总皂苷为主要原料的新药研制奠定了一定的工作基础,同时也为双水相提取技术在中药材提取上的应用提供一定的参考依据。

## 1 仪器与材料

UV2800PC 紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司), AEG-45SM 电子天平(日本岛津公司), BS110 S 电子天平(德国 Sartorius 公司), KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

红梅消药材经重庆市中药研究院秦松云研究员鉴定为蔷薇科悬钩子属植物红梅消 *Rubus parviflorus* L. 的干燥全草。齐墩果酸对照品(由南通飞宇生物科技有限公司提供,批号:FY15170920,含量 $\geq 98\%$ );其试剂均为分析纯,由重庆川东化学试剂有限公司提供。

## 2 实验方法

### 2.1 乙醇—硫酸铵双水相体系的建立

双水相体系的形成主要受有机溶剂和盐的质量百分比影响,整个双水相体系性质随着上述两个值的变化而改变,出现单相、双水相、固-液三相、固-液两相四种不同的状态。而浊点曲线和盐析曲线即为双水相体系中不同状态的分界线。

#### 2.1.1 浊点曲线(单相区与双水相相区的分界线<sup>[4]</sup>)的测定

加入定量的硫酸铵于 50 mL 烧杯中,再加 5 mL 蒸馏水充分溶解,静置 15 min 至溶液澄清,容器底部无固体存在,用无水乙醇滴定至溶液刚好浑浊,搅拌均匀,静置 15 min 后,体系出现分层现象,反复搅拌分层现象不消失,记录此点各组分的加入量,该点即为双水相浊点的液-液相平衡数据,以硫酸铵的质量百分数为横坐标 X,乙醇的质量百分数为纵坐标 Y,建立函数  $y_1 = 0.0358x^2 - 2.6402x + 58.228$ ,  $r = 0.9990$  ( $x \in [5.07 - 34.5]$ ),见图 1。

#### 2.1.2 盐析曲线(双水相相区和固液三相区的分界线<sup>[4]</sup>)的测定

以上述浊点曲线实验中配制的双水相体系为基础,继续滴加无水乙醇,至体系刚好出现微量硫酸铵的絮状沉淀,静置 15 min 后,沉淀不消失,记录此点体系各组分的量,该点即为双水相盐析点的液-液相

平衡数据,以硫酸铵的质量百分数为横坐标 X,乙醇的质量百分数为纵坐标 Y,建立函数  $y_2 = -1.3887x + 59.03$ ,  $r = 0.9995$  ( $x \in [5.07 - 34.5]$ ),见图 1。

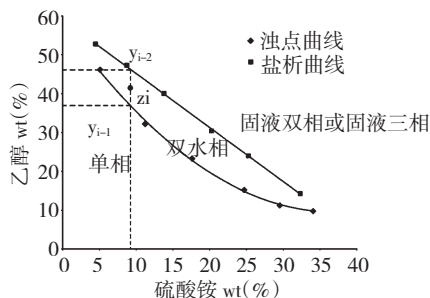


图 1 硫酸铵-乙醇双水相相图

Fig. 1 The phase diagrams of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{CH}_3\text{COOH}$  aqueous mixtures

### 2.2 红梅消总皂苷含量测定方法的建立

#### 2.2.1 对照品溶液的制备

称取齐墩果酸对照品 0.007 g,精密称定,置于 25 mL 容量瓶内,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为 0.3044 mg/mL 的齐墩果酸对照品溶液。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

称取红梅消药材粉末 10 g,精密称定,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 100 g 硫酸铵-乙醇双水相,浸泡 1 h,超声 30 min,过滤,取上层滤液适量,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 100 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

#### 2.2.3 含量测定方法

精密移取上述对照品和供试品溶液适量于 20 mL 具塞试管中,水浴挥干溶剂,冷却至室温,依次加入 0.2 mL 新配制 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸,摇匀,于 80 °C 水浴反应 15 min 取出,立即用冰水冷却,加入 5 mL 冰醋酸稀释,摇匀,于 30 min 后测定其在 545 nm 处的吸光度。按根据最小二乘法计算出红梅消总皂苷含量测定的回归方程,回归方程为:  $y = 8.161x - 0.014$  ( $r = 0.9995$ )。结果表明,在 0.01522 ~ 0.24352 mg 含量范围内,显色后的齐墩果酸对照品溶液含量与吸光度线性关系良好。

### 2.3 双水相提取工艺的星点设计优化

#### 2.3.1 中心点与因素水平范围的优化

依据星点设计一效应面法原理及其因素水平设计要求,结合实际操作的可能性,将图 1 中双水相区域硫酸铵的质量百分数(X)范围平均分为 7 份,每个等分点记为  $x_i$  ( $x_1 \sim x_8$ ),每个点分点之间的距离

记为一个步长  $a$  ( $a = 4.14$ ), 将其分别带入浊点曲线和盐析曲线, 得到对应的乙醇的质量百分数 ( $Y$ )  $y_{i-1}$  和  $y_{i-2}$ , 而点  $z_i(x_i, y_{i-2}-y_{i-1})$  即为整个双水相区域的平均点 (见图 1)。将  $z_i$  点作为两相质量百分比条件, 对红梅消药材进行双水相提取。依据获得的  $z_i$  点

总皂苷含量值, 找出中心点, 并限定个因素水平的范围。

### 2.3.2 因素水平的设计

选择乙醇和硫酸铵的质量百分比作为主要影响因素, 设计效应面因素水分分布, 如表 1 所示。

表 1 星点设计因素水平表

Table 1 Factors and level of central composite design

因素 Factors	水平 Levels				
对应代码值 Alpha	-1.414	-1	0	1	1.414
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (wt%)	5.07	6.28	9.21	12.14	13.35
$\text{CH}_3\text{COOH}$ (wt%)	37.46	38.67	41.60	44.53	45.74

## 2.4 数据处理

本实验采用 Excel2007 进行数据处理, Design Expert8.0 进行统计设计分析及 3D 作图。

## 3 结果与分析

### 3.1 中心点与因素水平范围的确定

将 2.3.1 中所测得结果 (见表 2) 进行分析; 以  $z_2(9.21, 41.60)$  点为条件的总皂苷含量最高, 表明在此双水相体系中, 以此点及其附近区域为条件提取得到总皂苷含量相对较高, 故以此点为星点设计

因素水平的中心点; 由于星点设计实验要求个因素水平需要范围限制, 而双水相提取中也存在对需对各相质量百分比进行限定才能成相的问题, 故以步长  $a$  小于  $z_2$  到曲线  $y_1$  和  $y_2$  的最短距离, 故用步长  $a \times 2$  作为因素水平的范围值, 即硫酸铵 wt% 的范围为 5.07 ~ 13.35; 乙醇 wt% 范围为 37.46 ~ 45.74。通过此因素水平的范围限定, 可使效应面优化出的结果全部落在双水相成相范围内, 使设计更有理据, 结果更准确可靠且符合实际。

表 2 取点设计与结果 ( $n=3$ )

Table 2 Design of points and results ( $n=3$ )

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8
$x_i$ (%)	5.07	9.21	13.35	17.49	21.63	25.77	29.91	34.05
$y_{i-2}-y_{i-1}$ (%)	48.88	41.60	34.93	28.88	23.44	18.61	14.39	10.79
$z_i$ 点总皂苷含量 (%) Total saponins yield in $z_i$	2.54	2.76	2.43	2.11	1.45	1.00	0.51	0.08

### 3.2 星点设计及效应面分析优化提取工艺

#### 3.2.1 星点设计方案及实验结果

分别取红梅消药材粉末 100 g, 按上述实验设计原理, 用 2 因素 5 水平共计 13 个实验点效应面实验设计, 实验结果见表 3。

表 3 星点设计与结果 ( $n=3$ )

Table 3 Central composite design and results ( $n=3$ )

实验号 No.	变量 Factors		总皂苷得率 Z (%) Total saponins yield Z
	X	Y	
1	13.35	41.60	2.58
2	5.07	41.60	2.67
3			9.21
4			6.28
5			9.21
6			9.21
7			9.21
8			9.21
9			12.14
10			9.21
11			6.28
12			9.21
13			12.14

3.2.2 模型拟合分析

以红梅消总皂苷得率为因变量对各因素进行二项式拟合,拟合模型如下: $Z = 2.61 - 0.032X + 0.025Y - 0.20XY - 0.032Y^2 - 0.54X^2Y - 0.32XY^2$  ( $R^2 =$

0.9809) 上述拟合式中, R 为红梅消总皂苷得率(%), X 为硫酸铵质量百分数, Y 为乙醇质量百分数(%). 回归方程各项的方差分析见表 4。

表 4 效应面二次模型的方差分析结果

Table 4 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F value	P value	显著性 Significance
模型/Model	2.433808	4	0.608452	102.9094	< 0.0001	****
XY	0.16	1	0.16	27.06131	0.0008	***
Y <sup>2</sup>	0.702208	1	0.702208	118.7666	< 0.0001	****
X <sup>2</sup> Y	1.0816	1	1.0816	182.9345	< 0.0001	****
XY <sup>2</sup>	0.49	1	0.49	82.87526	< 0.0001	****
残差 Residual	0.0473	8	0.005913			
失拟项 Lack of fit	0.04358	4	0.010895	11.71505376	0.0176	
纯误差 Pure error	0.00372	4	0.00093			
总离差 Cor total	2.481108	12				

注: \*\*\*\* P < 0.0001 为高度显著; \*\*\* P < 0.001 为显著。

Note: \*\*\*\* P < 0.0001, highly significant; \*\*\* P < 0.001, significant.

表 4 就线性项、二次项、以及交互项对红梅消总皂苷提取得率的影响进行了分析,结果表明,乙醇质量百分比的二次项(Y<sup>2</sup>)、硫酸铵与乙醇质量百分比的二次项交互作用(X<sup>2</sup>Y、XY<sup>2</sup>) (P < 0.0001) 对模型具有高度显著性;硫酸铵与乙醇质量百分比的项交互作用(XY) (P = 0.0008) 对模型具有显著性;得到硫酸铵与乙醇质量百分比之间的三维效应面曲线,见图 2。

12.14%、乙醇 wt% (Y) 为 40.01%。考虑到实际试验及放大生产的可操作性,将最佳配比调整为硫酸铵 wt% (X) 为 12.14%、乙醇 wt% (Y) 为 40.00%, 预测得红梅消总皂苷含量为 2.97%。

对优化的提取工艺最佳配比进行验证试验,结果优化工艺测得总皂苷含量为 2.95% (n = 6), 相对标准偏差 (RSD%) 为 1.52%, 模型预测值为 2.97%, 实测值与预测值非常接近,充分验证了所建模型的正确性、有效性。同时也说明了响应面分析法适用于双水相体系中质量百分比的优化。

3.3 不同提取方法的比较

为验证双水相提取红梅消总皂苷较传统提取的优越性,故将双水相提取法与其他常用提取方法进行比较研究,料液比均为 1:10,各方法的提取条件分别为:回流提取法,70%乙醇,回流时间 1.5 h;超声提取法,70%乙醇,常温下浸泡 1 h,超声 0.5 h;双水相浸泡提取法:硫酸铵 12.14%,无水乙醇 40.00%,浸泡 1.5 h;超声耦合双水相浸泡提取法:硫酸铵 12.14%,无水乙醇 40.00%,浸泡 1 h,超声 0.5 h。结果见表 5。

在表 5 中,用现今普遍采用的回流提取法,得到红梅消总皂苷的含量为 2.11%,并以此为基准,计算各种提取法所得总皂苷含量的提升率。由表 5 结果可知,超声提取与双水相浸置分别比回流法提

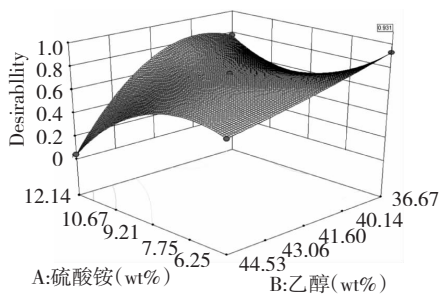


图 2 硫酸铵 wt% (X)、乙醇 wt% (Y) 对总皂苷得率 (%) 影响的 3D 效应曲面图

Fig. 2 Response surface plot (3D) showing the effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (X) and CH<sub>3</sub>COOH (Y) on the response value of total saponin yield

3.2.3 双水相最佳配比的确定及验证实验

Design Expert 软件分析预测得到最佳工艺为: X 为 12.14, Y 为 40.01, 即硫酸铵 wt% (X) 为

表5 不同提取方法的皂苷得率结果( $n=3$ )Table 5 Total saponin yield using different extraction methods( $n=3$ )

提取方法 Extraction method	总皂苷得率 Z(%) Total saponin yield Z	含量提升率(%) Increase rate of content
回流 Refluxing	2.11	0
超声 Ultrasonic	1.82	-13.74
双水相-浸置 Two-phase system--soaking	0.63	-70.14
双水相-超声 Two-phase system--ultrasonic	2.95	39.81

取率低 13.74% 和 70.14%，而双水相耦合超声提取较回流提取提取率高 39.81%，表明超声耦合双水相提取法明显优于其他提取方法。

### 3.4 超声时间的考察

分别称取红梅消药材粉末各 10 g，精密称定，置于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入 100 g 硫酸铵-乙醇双水相(硫酸铵 12.14%、乙醇 40.00%)，浸泡 1 h，分别超声 15、30、45、60、90、120 min，过滤，取上层滤液适量，水浴蒸干，残渣用甲醇溶解并转移至 100 mL 容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，采用香草醛-高氯酸显色的紫外分光光度法，在 545 nm 下测定其吸光度值，计算总皂苷的得率。结果表明超声时间越长，总皂苷得率越高，但超声 45 min 及以后，总皂苷的得率为 2.96% ~ 2.98%，与超声 30 min 的总皂苷得率 2.95% ( $n=3$ , RSD = 1.53%) 相差不大，且超声时间过长会造成时间及资源浪费，故选择超声时间为 30 min。

## 4 讨论

星点设计结合效应面分析法与传统的正交设计等应用于中药材提取的设计方法相比，具有试验设计次数少，试验精度高，分析结果直观、方便等优点，在药学实验的各个领域中正得到广泛的应用<sup>[5]</sup>。近年来，星点设计法对双水相提取进行优化的报道<sup>[6-8]</sup>缺乏对星点设计的全面理解，所设计的因素缺乏一定的范围约束，会造成双水相中各物质比例范围变大，部分条件不能形成双水相体系，导致所拟合出的效应曲面部分超出因素取值范围以外(实际提取实验时会出现单液相、固液两相或三相等情况)，造成模拟效应曲面模型可信度低，优化出的条件与实际偏离大准确率低。

本文首次仅在双水相的两相质量百分比上采用星点设计优化分析，通过在双水相图中找特征点

(趋势点)缩小因素取值范围，使因素水平有线性范围约束，满足双水相成相条件要求，使设计更有依据，结果更准确可靠且符合实际；又因其设计因素少，实验次数少，精度高，分析结果更加直观，故此分析设计法可在优化双水相提取中的两相质量百分比上得到广泛的应用与推广。

双水相提取分离技术现多以无机盐代替高聚物的普通有机物的双水相体系，尤其是适用极性物质的提取和纯化。皂苷类物质在水饱和正丁醇中溶解性能较佳，但正丁醇沸点高，难回收；而低浓度乙醇对皂苷也有不错的溶解性，且回收方便，因此选择无水乙醇为双水相体系的有机相。

通过实验考察了 NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  与无水乙醇的成相能力，发现 NaCl 与无水乙醇无法形成双水相体系； $\text{K}_2\text{HPO}_4$  与无水乙醇形成的双水相体系分相能力较弱，相比过大； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  与无水乙醇形成的双水相体系成相稳定，而且提取液中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  可用甲醇除去，不影响总皂苷的含量测定，故采用乙醇-硫酸铵双水相体系提取红梅消总皂苷。

红梅消总皂苷现多以 70% 乙醇回流提取，但因其药材质地较轻、体积较大，致使在热醇回流时药材始终浮于液面上，耗时耗能且提取率较低<sup>[9]</sup>。超声耦合双水相提取技术，首次运用于红梅消总皂苷的提取工艺中，提取时药材位于两相之间，与两相均有充分的接触，提取过程中，皂苷类产物转移至乙醇上相，可改变提取过程中的化学平衡，有利于更多皂苷类物质溶出<sup>[6]</sup>。整个提取工艺常温下即可进行，避免了某些活性成分因高温分解而损失，而且缩短了提取时间，大大的提高了皂苷的提取率，为后续的工业化生产奠定了基础。

**致谢:**中国科学院植物研究所刘为博士为本实验提供了在双水相图中寻找趋势点的方法，特此感谢!

### 参考文献

- 1 Wang JS(王继生), Qiu ZY(邱宗荫), Xia YP(夏勇鹏), et al. The protective effects of total glycosides *Rubus parvifolius* on cerebral ischemia in rat. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31: 138-141.
- 2 Wang JS(王继生), Li HZ(李惠芝), Qiu ZY(邱宗荫), et al. Pharmacodynamics study of the saponins from *Rubus parvifolius* L. *Pharm Clinic Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2007, 23: 34-36.