

穿山龙乙醇动态提取工艺优化研究

曹 颂,王 蕾,周培培,蒋建兰*

(天津市生物与制药工程重点实验室,天津大学化工学院制药工程系,天津 300072)

摘要:优化穿山龙乙醇动态连续提取工艺。通过单因素试验对乙醇浓度、液料比、回流速度、回流时间等进行了筛选,利用 Central Composite Design 响应面设计优化试验,以干浸膏得率和薯蓣皂苷含量作为评价指标,利用响应面对干浸膏得率进行了分析,支持向量回归(SVR)对薯蓣皂苷含量进行了分析。根据单因素试验结果确定了各因素对提取效果的影响,并确定了相应工艺范围。

关键词:穿山龙;醇提;响应面;支持向量回归;干浸膏得率;薯蓣皂苷

中图分类号:R93

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2015)11-0081-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2015.11.019

Alcohol dynamic extraction of *Dioscorea nipponica* Makino

CAO Song, WANG Lei, ZHOU Pei-pei, JIANG Jian-lan*

(Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Biological and Pharmaceutical Engineering and Technology, Tianjin University 300072, China)

Abstract: The dynamic alcohol extraction of *Dioscorea nipponica* Makino is optimized in this study. The effects of ethanol concentration, solvent/solid ratio, reflux time and reflux speed on the yield of dry extractant and dioscin are studied. A Central Composite Design response surface methodology is employed. Support Vector Regression Algorithm is used to analyze the dioscin content. The extracting effect and process parameters can also be evaluated by single factor experiment.

Key words: *Dioscorea nipponica* Makino; alcohol dynamic extraction; response surface methodology; Support Vector Regression Algorithms; yield of dry extractant; dioscin

穿山龙为薯蓣科穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎^[1],味甘苦温,具有祛风止痛,舒筋活血,止咳平喘祛痰功效^[2]。穿山龙主要成分是甾体皂苷类,包括薯蓣皂苷(Dioscin)、纤细皂苷(Gracillin)和水溶性皂苷等^[3],其中薯蓣皂苷可以合成200多种药物,为合成肾皮质激素以及避孕药的主要原料,也是合成心脑血管系统药物的主要原料^[4-5]。

目前穿山龙提取工艺多为乙醇热浸提法^[6-7],其主要问题有:①随着浸提时间的增加,浸提液与药材的传质力减小,浸提效率降低;②为浸提完全,常需浸提2~3次,产生的浸提液体积庞大,后续浓缩时间长,能耗较大。

近年来,溶剂连续循环提取浓缩机组成为研究的热点,提取与浓缩同时进行,浓缩产生的蒸汽冷凝成热溶剂回流到提取罐,溶剂不断更新,该机组具有设备利用率高,提取速度快及能耗低等特点^[8]。

笔者通过向提取罐内加入新溶剂,同时从提取罐流出相同体积的提取液来模拟溶剂回流,从而模拟溶剂连续循环提取浓缩机组,对穿山龙的提取工艺进行了研究。

1 试剂与仪器

试剂:薯蓣皂苷对照品,中国食品药品检定研究院生产,批号为111707;穿山龙饮片,产地为东北,批号为151004;无水乙醇,分析纯,天津市江天化工科技有限公司生产;乙腈,色谱纯,天津市康科德科技有限公司生产。

仪器:SSIPC2000 高效液相色谱仪系统,美国 LabAlliance 公司生产;AL2004 电子分析天平,梅特勒—托利多仪器有限公司生产;N-1100 型旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 薯蓣皂苷含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XD₈-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(50:50);进样量:20 μL;体积流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长为203 nm,理论板数不低于3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备

取薯蓣皂苷对照品适量,精密称定,加甲醇定容

收稿日期:2015-04-21

作者简介:曹颂(1989-),男,硕士生,主要从事中药研发的工艺研究,caosong1108@126.com;蒋建兰(1972-),女,博士,副教授,从事中药现代化研究工作,通讯联系人,022-27400388, jliang@tju.edu.cn。

于 10 mL 容量瓶中,制成 1.88 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 798 μL 于 5 mL 容量瓶中,加入甲醇定容,配成每 1 mL 含 0.300 mg 的薯蓣皂苷对照品溶液。

2.1.3 穿山龙的提取

称取穿山龙药材 100 g 于中药提取罐,加入一定量质量分数为 70% 的乙醇溶液,浸泡 2 h。水浴锅循环泵将 60 $^{\circ}\text{C}$ 水泵出,对提取罐夹套进行循环加热,同时开启搅拌,待提取罐内料液到达 60 $^{\circ}\text{C}$ 后开始动态回流提取。打开进水口和出料口,每隔 10 min 向提取罐中加入 60 $^{\circ}\text{C}$ 的一定体积(体积 = 回流速度 \times 10 min) 的 70% 乙醇,同时流出相同体积的提取液。按照回流时间进行回流。回流结束后,收集提取液。对提取液进行减压浓缩,回收乙醇,得浓缩液。

2.1.4 供试品的制备

精密称量一定质量的浓缩液,加 65% 乙醇定容至 5 mL 容量瓶中,精密称定质量。超声处理(120 W, 频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 65% 乙醇补足减失的质量,摇匀,过 0.22 μm 有机膜,即得。

2.1.5 工艺流程

工艺流程如图 1 所示。

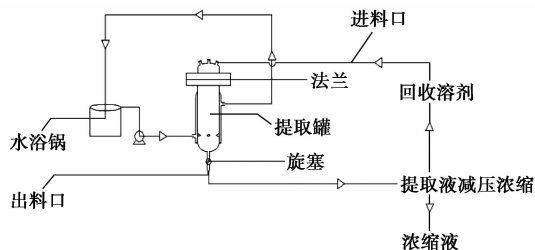


图 1 工艺流程图

2.1.6 干浸膏的制备

精密称定 10 g 浓缩液于恒重的蒸发皿中,水浴上蒸干,再放入烘箱中于 105 $^{\circ}\text{C}$ 至恒重,即得。

2.1.7 计算方法

$$\text{薯蓣皂苷质量浓度} = (A_1/A_0) \times C_0$$

式中, A_1 为供试品峰面积; A_0 为对照品峰面积; C_0 为对照品质量浓度, mg/mL。

$$\text{薯蓣皂苷含量} = [(5A_1/A_0 \times C_0) \times M_1/m_1] / M$$

式中, m_1 为供试品称样质量, g; M_1 为供试品总质量, g; M 为穿山龙药材质量, g。

$$\text{干浸膏得率} = (m_2/m_3) \times (M_1/M)$$

式中, m_2 为供试品得干浸膏质量, g; m_3 为供试品称量质量, g。

2.2 单因素实验

2.2.1 提取温度

准确称取 4 份穿山龙饮片 20 g 于锥形瓶中,加入 200 mL 65% 乙醇溶液,置于水浴锅中加热,温度分别设定为 40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 。浸泡 0.5 h 后,吸取适量上清液,过 0.22 μm 有机膜,作为供试品,测定薯蓣皂苷浓度。

2.2.2 液料比

准确称取 5 份穿山龙饮片 20 g 于锥形瓶中,分别按照液料比为 4、6、8、10、12,加入 65% 乙醇溶液,浸泡 0.5 h,吸取适量上清液,过 0.22 μm 有机膜,作为供试品,测定薯蓣皂苷质量浓度。

2.2.3 回流时间

准确称取 5 份穿山龙饮片 100 g 于中药提取罐中,加入 800 mL 质量分数为 65% 乙醇溶液,浸泡 0.5 h。加热,待料液温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$ 时开始回流提取,回流速度为 4 mL/min,回流时间分别为 2、3、4、5、6 h,过滤,减压浓缩,得浓缩液。测定薯蓣皂苷质量分数。

2.2.4 回流速度

准确称取 5 份穿山龙饮片 100 g 于中药提取罐中,加入 800 mL 质量分数为 65% 乙醇溶液,浸泡 0.5 h。加热,待料液温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$ 时开始回流提取,回流时间为 2 h,回流速度分别为 4、6、8、10、12 mL/min,过滤,浓缩,得浓缩液。测定薯蓣皂苷质量分数。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 提取温度对提取效果的影响

提取温度对提取效果的影响如图 2 所示。

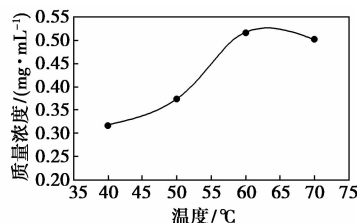


图 2 薯蓣皂苷质量浓度随提取温度的变化曲线

由图 2 可以看出,提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,薯蓣皂苷质量浓度最高。40~60 $^{\circ}\text{C}$ 内,随温度升高,薯蓣皂苷质量浓度逐渐越高,其原因是温度升高加速了分子运动,促进了薯蓣皂苷更快地扩散到溶剂中;提取温度升到 70 $^{\circ}\text{C}$ 时,薯蓣皂苷质量浓度反而下降,原因是温度过高,破坏了穿山龙药材中有效成分^[9],导致薯蓣皂苷量下降。因此,将 60 $^{\circ}\text{C}$ 定为试验设计的提取温度。

2.3.2 液料比对提取效果的影响

液料比对提取效果的影响如图3所示。

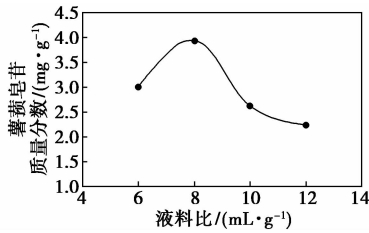


图3 薯蓣皂苷质量分数随液料比的变化曲线

料液比为4 mL/g的实验中,浸泡0.5 h后,药材无法完全浸泡,因此舍弃了4 mL/g的数据。由图3可以看出,随液料比的增大,薯蓣皂苷质量分数先增大后减小,将液料比作为响应面设计试验的影响因素,确定其范围为6~10 mL/g。

2.3.3 回流时间对提取效果的影响

回流时间对提取效果的影响如图4所示。

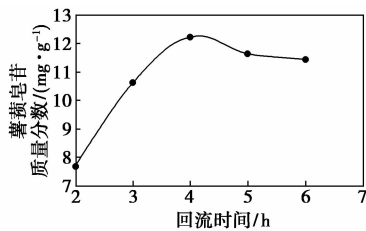


图4 薯蓣皂苷质量分数随回流时间的变化曲线

由图4可以看出,薯蓣皂苷质量分数随回流时间的增长先增大后减小。基于时间、能耗考虑,回流时间定为3~5 h。

2.3.4 回流速度对提取效果的影响

回流速度对提取效果的影响如图5所示。

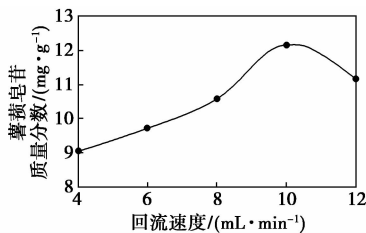


图5 薯蓣皂苷质量分数随回流速度变化曲线

由图5可以看出,随着回流速度的增加,薯蓣皂苷质量分数先上升后下降,回流速度为10 mL/min达到峰值。因此,回流速度取值范围为8~12 mL/min。

2.4 响应面试验设计及结果

2.4.1 响应面试验设计

响应面试验设计如表2所示。

表2 响应面试验设计

	-1.68	-1	0	1	1.68
液料比(A)/(mL·g ⁻¹)	4.64	6	8	10	11.36
回流时间(B)/h	2.32	3	4	5	5.68
回流速度(C)/(mL·min ⁻¹)	6.64	8	10	12	13.36

提取过程按2.1.3中所述方法进行,以干浸膏得率(Y_1)和薯蓣皂苷质量分数(Y_2)为评价指标。

2.4.2 响应面试验结果

响应面试验结果如表3所示。

表3 响应面试验结果

序号	A	B	C	Y_1	Y_2
1	6	3	8	0.1645	11.20
2	6	3	12	0.1614	11.76
3	10	5	12	0.1701	12.93
4	8	4	6.64	0.1743	11.53
5	8	4	10	0.1946	12.88
6	8	4	10	0.1774	13.50
7	8	4	10	0.1860	13.19
8	4.64	4	10	0.1717	12.76
9	8	4	13.36	0.1570	11.26
10	8	2.32	10	0.1602	9.051
11	8	4	10	0.1946	13.50
12	10	3	8	0.1570	10.82
13	6	5	12	0.1651	13.47
14	8	4	10	0.1774	12.88
15	11.36	4	10	0.1719	8.247
16	6	5	8	0.1845	11.35
17	8	5.68	10	0.1864	13.45
18	8	4	10	0.1860	13.19
19	10	5	8	0.1864	13.92
20	10	3	12	0.1638	12.13

2.5 数学模型的建立

2.5.1 干浸膏得率数学模型拟合及方差分析

以干浸膏得率为因变量,利用 Design-expert

8.0.6对提取因素进行二次式拟合,干浸膏得率:

$$Y_1 = -0.19894 + 0.013262A + 0.062450B + 0.040543C + 7.5AB + 4.0625AC - 2.4625BC - 1.26538A^2 - 4.53119B^2 - 1.80897C^2$$

对拟合的方程进行方差分析,结果如表4所示。

由方差分析可知,回归方程的 $P < 0.05$,失拟性检验 $P > 0.05$,相关系数为 $r_1^2 = 0.8904 > 0.8$;说明方程拟合度良好,可以用该模型对试验结果进行预测。

表 4 干浸膏得率的方差分析

方差来源	均方	F 值	P 值
模型	2.77×10^{-4}	9.03	0.001 ^②
A	3.34×10^{-7}	0.011	0.9189
B	7.84×10^{-4}	25.56	0.0005 ^②
C	2.73×10^{-4}	8.91	0.0137 ^①
AB	1.80×10^{-5}	0.59	0.4613
AC	2.11×10^{-5}	0.69	0.4259
BC	1.94×10^{-4}	6.33	0.0306 ^①
A ²	3.69×10^{-4}	12.04	0.006 ^②
B ²	2.96×10^{-4}	9.65	0.0111 ^①
C ²	7.55×10^{-4}	24.61	0.0006 ^②
残差	3.07×10^{-5}	—	—
失拟项	2.15×10^{-6}	0.036	0.9988
纯误差	5.92×10^{-5}	—	—
总误差	—	—	—

注:①显著;②极显著。

该模型中,一次项 B 、二次项 A^2 、 C^2 对模型影响极显著, C 、 BC 、 B^2 对模型影响显著。

响应面可直观反映 2 个因素之间的交互作用以及对响应面值的影响^[10],以液料比和回流时间对应的干浸膏得率为例,当回流速度为 10 mL/min 时,结果如图 6 所示。

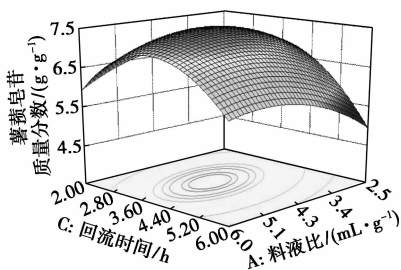


图 6 液料比和回流时间对干浸膏得率的影响

2.5.2 干浸膏得率工艺参数优化与预测

干浸膏得率最优工艺参数如表 5 所示。

表 5 响应面预测干浸膏得率工艺条件

液料比/ (mL·g ⁻¹)	回流时间/ h	回流速度/ (mL·min ⁻¹)	干浸膏得率/ (g·g ⁻¹)
8	5	8.9	0.1924

2.5.3 薯蓣皂苷含量数学模型拟合及方差分析

Design-expert 8.0.6 中,数学模型包括 Liner、Quadratic 等模型,薯蓣皂苷含量数据拟合中,Model 中 P 值均大于 0.05,即薯蓣皂苷数据不能用以上方法拟合,于是进行了 SVR 模拟。

2.5.4 SVR 模拟

SVR 的核心思想是通过核函数(Gauss 径向基函数)把低维非线性的关系转化至高维空间中,在特征高维空间选择最优超平面进行线性拟合,建立模型分析预测数据。以 g 为参数的 Gauss 径向基函数为:

$$K(x, x') = \exp[-\|x - x'\|^2 / g^2]$$

支持向量机拟合的优劣取决于核函数的选择,核函数的参数 g 选择决定了其回归的性能,支持向量机的惩罚参数 C 则决定模型的泛化能力。为了选取较优的参数 C 和 g ,引入粒子群优化算法。粒子群优化算法(PSO)源于鸟群、鱼群群体运动行为的研究^[11]。该算法是通过一群粒子不断的更新迭代,从而在整个可解空间中进行全局寻优。使用粒子群算法优化 SVR 参数 C 和 g ,并使用该算法去寻找 SVR 模型的最优解,具体流程如图 7 所示。

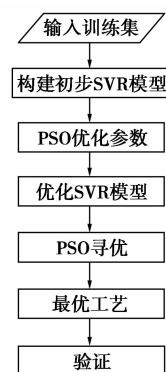


图 7 SVR 建模流程图

以薯蓣皂苷含量 Y_2 作为响应值,将 20 组试验结果输入训练集进行 SVR 建模。惩罚参数与核函数的寻优区间为 $[0.1, 100]$,粒子群数量为 50,优化代数为 100,以全体样本拟合的均方差(MSE)作为 PSO 优化参数过程中的评价指标,经过 Matlab 运算,得到优化参数。选择平均 MSE 最接近理论值的 C 和 g 为优化的最适参数。优化结果如表 6 所示。使用优化的参数进行建模,最终得到最优 SVR 模型,真实值与预测值的相关性系数大于 0.90,表明该模型具有良好的拟合性能,可以较为客观地表述 3 种因素与响应值的关系。

表 6 SVR 参数寻优结果

响应值	C	g	MSE	R^2
Y_2	0.3502	4.924	0.014	0.9273

支持向量回归是一种“黑箱子”算法,没有明确的函数关系表达式,故不能从方程式上看出因素与

响应值之间的关系。依据四维图像对 SVR 拟合出的模型进行简单的分析。以薯蓣皂苷质量分数为响应值的 SVR 模型图如图 8 所示,显然等色面是一系列曲面,薯蓣皂苷质量分数与三因素之间不是简单的线性关系。

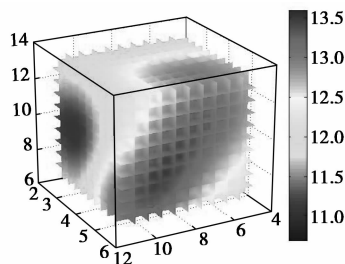


图 8 SVR 模型 4 维图

由图 8 可知,薯蓣皂苷质量分数存在 1 个最高点。通过 PSO 寻优算法,结果如表 7 所示。

表 7 SVR 预测薯蓣皂苷质量分数的工艺参数

液料比/ (mL·g ⁻¹)	回流时间/ h	回流速度/ (mL·min ⁻¹)	薯蓣皂苷质量分数/ (mg·g ⁻¹)
7.6	4.7	10.3	13.58

2.6 工艺验证

2.6.1 干浸膏得率工艺验证

干浸膏得率工艺验证结果如表 8 所示。

表 8 干浸膏得率工艺验证结果

序号	干浸膏得率/(g·g ⁻¹)	均值/(g·g ⁻¹)
1	0.1905	
2	0.1899	0.1899
3	0.1894	

干浸膏得率与预测值偏差为 1.30%, 差异较小, 工艺稳定可行。

2.6.2 薯蓣皂苷质量分数工艺验证

薯蓣皂苷质量分数工艺验证结果如表 9 所示。

表 9 薯蓣皂苷质量分数工艺验证结果

序号	薯蓣皂苷质量分数/(mg·g ⁻¹)	均值/(mg·g ⁻¹)
1	13.92	
2	13.84	13.83
3	13.73	

薯蓣皂苷质量分数与预测值偏差为 1.84%, 差异较小, 工艺稳定可行。

3 讨论

(1) 对穿山龙乙醇动态提取工艺进行了研究, 以干浸膏得率为评价指标, 最佳工艺条件: 液料比为 8 mL/g, 回流时间为 5 h, 回流速度为 8.9 mL/min, 浸膏得率为 0.1899 g/g。

(2) SVR 模型对薯蓣皂苷质量分数进行拟合, 得出薯蓣皂苷质量分数的最优值: 液料比为 7.6, 回流时间为 4.7 h, 回流速度为 10.3 mL/min, 薯蓣皂苷质量分数为 13.83 mg/g。

(3) 模拟溶剂连续动态回流提取机组, 可为穿山龙乙醇动态连续提取提供一定的参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2010; 250-251.
- [2] 王宝庆, 李学彬, 等. 穿山龙现代研究概况[J]. 中国林副特产, 2010, 10(5): 96-97.
- [3] 王桂香, 赵英日, 等. 穿山龙总皂苷提取工艺研究[J]. 中国民族民间医药, 2013, 16: 10-13.
- [4] 仇华泉, 苏酪, 田景振. 中药穿山龙治疗风湿病的研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(11): 115-116.
- [5] 柳全文, 田景振, 李民. 穿山龙的成分、药理及临床应用研究概况[J]. 山东中医杂志, 1998, 17(1): 29-31.
- [6] 白曼, 马丽娜, 等. 星点设计-响应面分析法优选穿山龙总皂苷提取工艺[J]. 中南药学, 2013, 11(1): 4-7.
- [7] 刘颖, 刘树民, 等. 正交设计法优选穿山龙总皂苷的提取工艺[J]. 医学信息, 2010, 5: 1247-1248.
- [8] 李国名, 郑彦慧, 等. 索式提取浓缩机组在中药浸膏生产中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(8): 810-813.
- [9] 闫海全, 李崇瑛. 三七总皂苷的液相色谱分析及其稳定性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(13): 5973-5974.
- [10] Parisa Yasini, Farzaneh Shemirani, Rouhollah Khani. Combination of in situ surfactant-based solid phase extraction and central composite design for preconcentration and determination of manganese in food and water samples [J]. Food Anal Methods, 2012, 5: 1303-1310.
- [11] 李建勇, 等. 粒子群优化算法研究[D]. 浙江: 浙江大学硕士学位论文, 2003. ■