

响应面法优选雷公藤超声提取工艺

徐晓勇¹, 马凤森^{1,2*}, 方剑乔², 梁 宜², 吴小娟¹
(1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江中医药大学附属第三医院, 浙江 杭州 310009)

摘要: 目的 优化雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的超声提取工艺。**方法** 以总三萜和去甲泽拉木醛为指标, 以超声功率、粉碎粒度、提取时间为影响因素, 采用响应面法优化雷公藤的超声提取工艺。**结果** 最优工艺参数为超声功率 400 W、粉碎粒度 30 目, 提取时间 40 min。总三萜和去甲泽拉木醛提取率分别为 (1.282 ± 0.025)% 和 (0.518 ± 0.006)%。**结论** 该方法简单有效, 具有实际意义。
关键词: 雷公藤; 总三萜; 去甲泽拉木醛; 超声提取; 响应面法
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)05-1030-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.013

Optimizing ultrasonic-assisted extraction of *Tripterygium wilfordii* by response surface method

XU Xiao-yong¹, MA Feng-sen^{1,2*}, FANG Jian-qiao², LIANG Yi², WU Xiao-juan¹
(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. The Third Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the ultrasonic-assisted extraction of *Tripterygium wilfordii* Hook. f.. **METHODS** With total triterpenes and demethylzeylasteral as indices, as well as influencing factors including ultrasonic power, grinded particle size and extraction time, the ultrasonic-assisted extraction of *T. wilfordii* was optimized by response surface method. **RESULTS** The optimized parameters were 400 W for ultrasonic power, 30 mesh for grinded particle size and 80 min for extraction time. The extraction rates of total triterpenes and demethylzeylasteral were (1.282 ± 0.025)% and (0.518 ± 0.006)%, respectively. **CONCLUSION** This simple and effective method holds its practical significance
KEY WORDS: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; total triterpenoids; demethylzeylasteral; ultrasonic-assisted extraction; response surface method

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 为卫矛科藤本植物, 具有祛风活络, 破瘀止痛等功效。现代研究表明, 其有抗免疫、抗炎、抗生育及抗肿瘤等作用^[1], 临床常用于类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的治疗^[2-3]。
由于雷公藤毒性大, 成分复杂, 故药材提取以单一成分为指标时, 难以保证其质量。雷公藤全根中主要含生物碱、二萜、三萜、倍半萜及多糖^[4]等成分, 毒性大小依次为二萜、生物碱、三萜^[5]。

其中, 雷公藤三萜类成分已被证明具有明显的药理作用, 而且雷公藤红素、去甲泽拉木醛与二萜雷公藤甲素有着显著的抗免疫活性^[3-6], 但雷公藤红素和雷公藤甲素存在毒副作用过大、致突变性较强的缺陷^[7-8], 而去甲泽拉木醛的含有量高, 毒性较小, 其 LD₅₀ 值为 1 295 mg/kg^[9]。因此, 本实验在前期研究^[10]的基础上, 选择去甲泽拉木醛和总三萜作为雷公藤提取工艺的指标, 进行多指标的质量控制。

收稿日期: 2015-08-03
基金项目: 浙江省重大科技专项重点社会发展项目 (2010C13014); 浙江省“重中之重”学科 (针灸推拿学) 开放基金项目 (ZTK2010A13)
作者简介: 徐晓勇 (1991—), 男, 硕士生, 从事药物制剂新技术研究。Tel: 15068857772, E-mail: xuxiaoyongjq@163.com
* 通信作者: 马凤森 (1962—), 男, 教授, 从事药物新剂型研究。Tel: (0571) 88871500, E-mail: merrigen@126.com

首先,应用单因素试验法考察了药材产地、药材部位、提取方法、提取溶剂、粉碎粒度、提取时间、料液比、提取功率、提取次数对雷公藤有效成分提取率的影响。结合文献[11]与实验结果,选择对结果影响较大的提取功率、粉碎粒度、提取时间3个因素进行响应面设计试验。然后,采用Box-Benhknen法^[12]对超声提取^[13]雷公藤全根药材的最佳工艺条件进行研究。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(515-717-486,美国Waters公司);UV-1600PC紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);JY92-II细胞破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司);PT-1004/205电子天平(福州华志科学仪器有限公司);FW177中药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

雷公藤根采自浙江省景宁县,经浙江中医药大学附属第三医院药剂科专家鉴定为卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的全根,批号为20130314。去甲泽拉木醛纯品购自南通飞宇生物技术有限公司,批号FY18540803,含有量99.35%。高效液相所用试剂为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 雷公藤有效成分的提取工艺 取干燥雷公藤全根,粉碎,精密称取药材粉末10 g,加入10倍量乙酸乙酯,超声提取一定时间,抽滤,弃去滤渣,测量并记录滤液体积,即得药材提取液。

2.2 去甲泽拉木醛的含有量测定

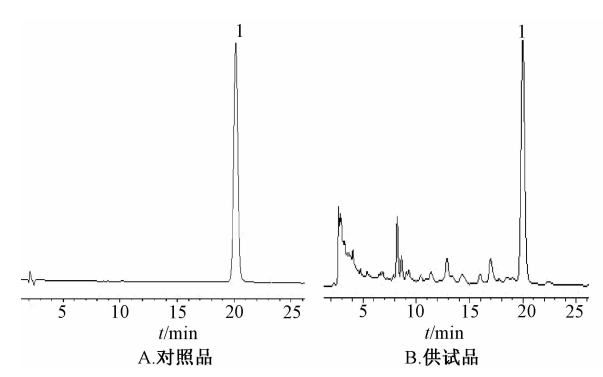
2.2.1 色谱条件^[14] Agilent Zorbax SB-C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长245 nm;流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液(55:45);柱温室温;体积流量1.0 mL/min。

2.2.2 溶液的制备

2.2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取去甲泽拉木醛对照品适量,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含去甲泽拉木醛21.35 μg/mL的溶液。

2.2.2.2 供试品溶液的制备 取雷公藤乙酸乙酯提取液适量,70℃下挥干,甲醇溶解并定容至5 mL,过滤,即得。

2.2.3 专属性试验 取对照品和供试品溶液适量,分别注入HPLC色谱仪中测定,结果见图1,可知供试品溶液中去甲泽拉木醛的分离度大于1.5。



1. 去甲泽拉木醛
1. demethylzeylasteral

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2.4 精密度试验 取对照品溶液适量,在“2.2.1”项色谱条件下连续进样6次,测得峰面积RSD为0.18%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 回收率试验 精密吸取6份等量雷公藤提取液(约含去甲泽拉木醛17 mg),稀释后加入等量的对照品溶液,混合均匀,在“2.2.1”项色谱条件下进样,测得回收率为95.8%,RSD为1.63%。

2.2.6 重复性试验 取同一份雷公藤提取液适量,按“2.2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,测得RSD为1.55%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 标准曲线的制备 取不同体积的对照品溶液注入HPLC色谱仪,在“2.2.1”项色谱条件下测定。以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得回归方程 $Y = 1\,200.9X - 0.089\,4$, $r = 0.999\,7$,在0.1~1.3 μg范围内线性关系良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于0、2、4、6、8、10 h注入液相色谱仪,测得RSD为1.20%,表明溶液在10 h内稳定性良好。

2.3 总三萜的含有量测定 参考文献[10]中的紫外分光光度法,其原理是利用三萜在无水条件下与强酸反应,形成阳碳离子盐的显色反应。取雷公藤提取液适量,70℃下挥干,加入5%香兰素-冰醋酸溶液0.5 mL、高氯酸1.8 mL,摇匀,70℃水浴加热反应15 min,取出,置于冰水浴中冷却5 min,冰醋酸定容至5 mL,摇匀。以空白对照溶液为参比,测定其在530 nm波长处的吸光度。

2.4 响应面优化雷公藤提取工艺研究 在单因素试验的基础上,选择超声功率(A)、粉碎粒度

(B)、提取时间 (C) 作为考察因素进行响应面设计, 因素水平见表 1, 结果见表 2。

表 1 因素水平			
Tab. 1 Factors and levels			
水平	因素		
	A 超声功率/W	B 粉碎粒度/目	C 提取时间/min
-1	100	16	10
0	250	28	25
1	400	40	40

表 2 响应面试验结果					
Tab. 2 Results of response surface experiments					
编号	A 超声功率/W	B 粉碎粒度/目	C 提取时间/min	去甲泽拉木醛提取率/%	总三萜提取率/%
1	-1	-1	0	0.198	0.479
2	1	-1	0	0.201	0.373
3	-1	1	0	0.453	0.969
4	1	1	0	0.466	0.985
5	-1	0	-1	0.471	0.991
6	-1	0	-1	0.538	0.911
7	1	0	-1	0.543	1.186
8	-1	0	1	0.571	1.244
9	1	0	1	0.187	0.443
10	0	-1	-1	0.402	0.836
11	0	-1	1	0.172	0.378
12	0	1	1	0.437	1.001
13	0	0	0	0.558	0.943
14	0	0	0	0.543	0.889
15	0	0	0	0.479	1.147
16	0	0	0	0.509	0.966
17	0	0	0	0.520	0.952

3 响应面结果分析

3.1 模型与数据分析 由于去甲泽拉木醛为雷公藤三萜中的木栓烷型成分, 故与总三萜的提取行为具有一定的相似性。Pearson 相关系数分析发现, 两者提取率 (Y) 的相关系数 r 为 0.923, 具有显著性关系。

应用 Design-Expert 8.0.5 软件进行二次多元回归拟合, 得到去甲泽拉木醛的回归方程为 $Y = 5.22 + 0.14A + 1.25B + 0.16C + 0.025AB - 0.098AC + 0.13BC + 0.19A^2 - 2.12B^2 - 0.11C^2$, 总三萜的回归方程为 $Y = 9.79 - 0.14A + 2.65B + 0.79C + 0.30AB + 0.35AC + 0.57BC + 0.70A^2 - 3.48B^2 + 0.33C^2$ 。方差分析和显著性检验结果见表 3 和表 4。

由表可知, 整体模型的 P 值均小于 0.05, 表明其效果显著; 相关系数 r 分别为 0.982 7、0.948 4, 表明该模型与实际拟合较好, 误差较小, 可对雷公藤中去甲泽拉木醛和总三萜的提取工艺进行分析和预测。另外, 粉碎粒度对雷公藤有效成分

表 3 去甲泽拉木醛方差分析					
Tab. 3 Analysis of variance for demethylzeylasteral					
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	32.06	9	3.56	44.19	<0.000 1
A	0.15	1	0.15	1.91	0.209 4
B	12.50	1	12.50	155.09	<0.000 1
C	0.20	1	0.20	2.42	0.163 5
AB	2.5×10^{-3}	1	2.5×10^{-3}	0.031	0.865 2
AC	0.038	1	0.038	0.47	0.514 3
BC	0.063	1	0.063	0.78	0.407 8
A ²	0.16	1	0.16	1.98	0.202 1
B ²	18.88	1	18.88	234.29	<0.000 1
C ²	0.047	1	0.047	0.58	0.471 7
残差	0.56	7	0.081	—	—
失拟项	0.19	3	0.063	0.67	0.614 4
纯误差	0.38	4	0.094	—	—
总和	32.62	16	—	—	—

表 4 总三萜方差分析					
Tab. 4 Analysis of variance for total triterpenoids					
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	115.66	9	12.85	14.30	0.001 0
A	0.16	1	0.16	0.17	0.688 7
B	56.07	1	56.07	62.39	<0.000 1
C	4.93	1	4.93	5.48	0.051 7
AB	0.37	1	0.37	0.41	0.540 5
AC	0.48	1	0.48	0.53	0.490 4
BC	1.32	1	1.32	1.47	0.264 5
A ²	2.08	1	2.08	2.32	0.171 9
B ²	51.05	1	51.05	56.80	0.000 1
C ²	0.47	1	0.47	0.52	0.494 4
残差	6.29	7	0.90	—	—
失拟项	2.44	3	0.81	0.84	0.536 7
纯误差	3.85	4	0.96	—	—
总和	121.95	16	—	—	—

提取的影响最显著, 其次为提取时间和超声功率。二次项中 B² 的偏回归系数达到非常显著的水平, 而交互项 AB、AC、BC 均不显著。

3.2 响应面分析与优化 利用 Design Expert 软件, 得到去甲泽拉木醛和总三萜的响应曲面, 见图 2 和图 3, 发现两者在提取行为上一致。由图可知, 合适的药材粉碎粒度对提取率有着非常显著的影响, 在 0.5 mm 左右时提取率最高, 但粒度过大时将明显下降。另外, 超声功率和提取时间对两者的提取也有一定影响, 高水平的 2 个因素能获得更高的提取率。

3.3 最佳制备工艺验证 由于去甲泽拉木醛和总三萜均具有药理活性, 并且提取行为一致, 故在进行工艺优化时, 设定两者同等的权重。采用 Design-Expert 软件, 结合实际操作情况, 得到最佳提取工艺为超声功率 400 W, 粉碎粒度 30 目, 提

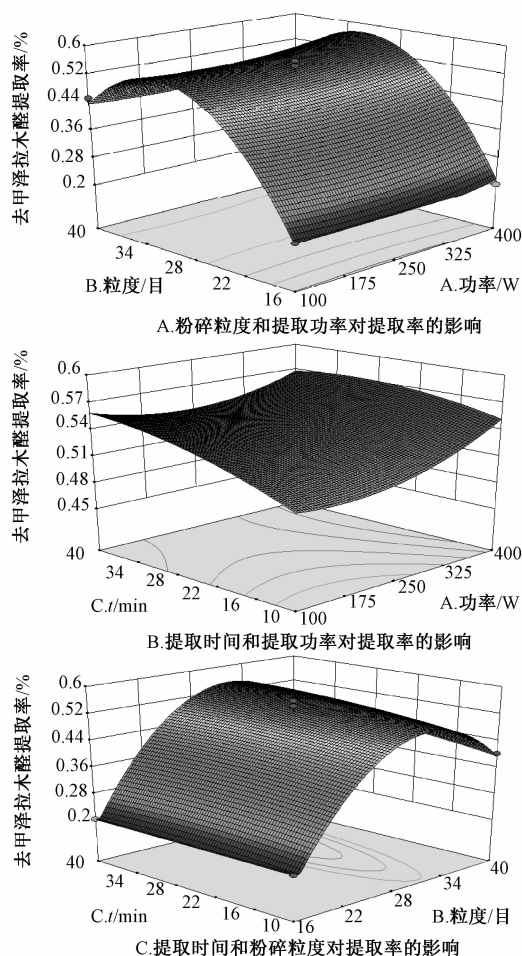


图 2 去甲泽拉木醛提取率的响应面曲线图

Fig. 2 Response surface curves for the extraction rate of demethylzeylasteral

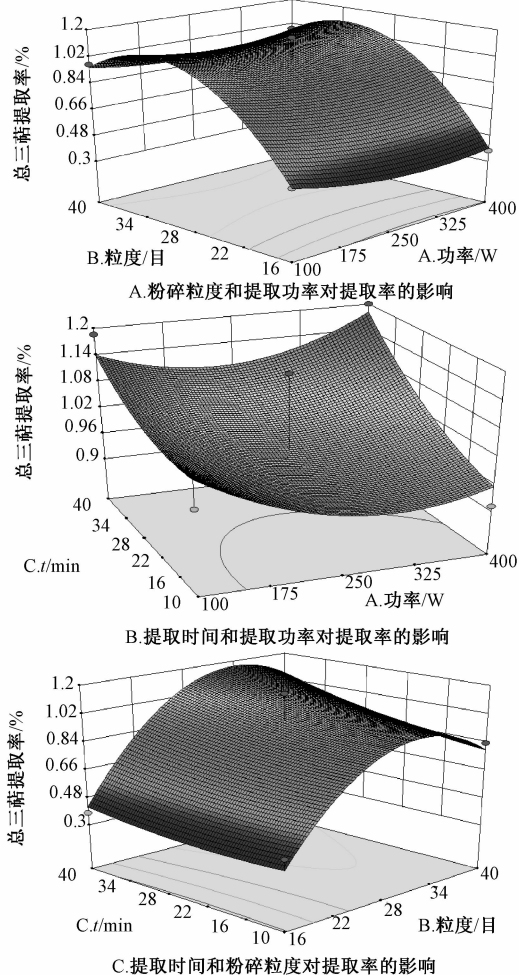


图 3 雷公藤总三萜提取率的响应面曲线图

Fig. 3 Response surface curves for the extraction rate of total triterpenes

取时间 40 min。然后，进行 3 次平行验证实验，测得去甲泽拉木醛和总三萜的提取率分别为 $(0.518 \pm 0.006)\%$ 和 $(1.282 \pm 0.025)\%$ ，与两者的预测值 $(0.567\%$ 和 $1.231\%)$ 较为接近。由此表明，该方程与实际情况拟合度良好，适用于回归分析和参数优化。

4 讨论

由于中药制剂成分复杂，其疗效往往是多成分、多靶点、多效应综合作用的结果。因此，本实验选择去甲泽拉木醛与总三萜作为雷公藤有效成分的提取指标。目前，去甲泽拉木醛的提取方法主要为冷浸法^[11]，而超声提取在节省提取溶剂、时间，提高提取率的方面更具有优势。

在单因素试验中，考察了乙酸乙酯、丙酮、不同体积分数和 pH 的乙醇溶液，发现提取率依次为乙酸乙酯 > 丙酮 > 95% 乙醇 > 80% 乙醇 > 60% 乙醇。推测其原因，可能是去甲泽拉木醛和

总三萜的脂溶性较强，易溶于乙酸乙酯，但由于其渗透力不强，故导致粒径是提取率的重要影响因素。

由响应面曲线图可知，粉碎粒度对提取率影响显著，结合实验操作情况，选择过 30 目药材颗粒作为工艺条件，取得了良好的效果。超声提取药材中的有效成分主要依赖其空化效应及各种次效应，有学者提出超声提取药物成分的缩核模型^[15]。即颗粒内部的“核”在超声作用下不断溶解缩小，并向外扩散。如果粉碎粒度过大，则药材总提取率主要由核界面层细胞的破坏速率决定，故减小药材粒径有利于其提取；当粉碎粒度过小时，浸取的控制步骤不是核-壳界面细胞的破碎，而是有效成分由界面穿过壳层的扩散，引起紧密堆积，导致局部有效浓度过大，从而降低提取率。

参考文献：

[1] 马 哲, 梁茂新, 张 颖. 中药雷公藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(3): 157-160.

[2] 任 荣, 李正翔, 李 彬, 等. 雷公藤有效成分及其制剂的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(11): 1068-1069.

[3] Rios J L. Effects of triterpenes on the immune system[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(1): 11-14.

[4] 薛 璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤化学成分及其毒性研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 730-731.

[5] 田 振, 刘志宏, 宋洪涛. 雷公藤有效部位提取纯化工艺研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(2): 408-412.

[6] 张秋萍, 宋洪涛. 雷公藤制剂研究进展[J]. 中国药师, 2009, 12(7): 881-883.

[7] 梅之南, 杨祥良, 徐辉碧. 雷公藤内酯醇的药理研究[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(9): 557-558.

[8] 张登海, 杨春欣, 秦万章, 等. 雷公藤红素研究 20 年回顾 [C] //第四次全国雷公藤学术会议论文汇编. 北京: 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会, 2004: 17-21.

[9] 苗抗立, 徐雪华, 魏朝晖, 等. 活性成分 demethylzeylasteral 的研究[J]. 中国现代临床医学, 2005, 4(10): 7-10.

[10] 马凤森, 刘 丹, 吴小娟, 等. 雷公藤总三萜测定的方法学比较研究[J]. 浙江工业大学学报, 2015, 43(3): 293-297.

[11] 董 颖, 杨春欣, 许根英, 等. 正交试验优选雷公藤中去甲泽拉木醛的提取工艺[J]. 中成药, 2005, 27(5): 595-597.

[12] 徐 攀, 陈 京, 温思思, 等. 响应面法优化参附汤总多糖的制备工艺[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(2): 121-126.

[13] 曹雁平, 矫庆泽. 粒度、液料比和乙醇体积分数对姜黄素超声间歇浸取的影响[J]. 北京理工大学学报, 2010, 30(8): 1000-1004.

[14] 张茹萍, 何 昱, 石森林, 等. 雷公藤药材中 6 种有效成分以及总二萜内酯、总生物碱、总三萜的含量测定[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 224-229.

[15] 曹雁平, 朱雨辰. 植物有效成分间歇浸取动力学研究进展 [J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2011, 29(6): 20-26.