

响应面法优化铁棒锤根中一种咪唑生物碱的超声提取工艺

刘永玲^{1,2}, 王萍^{1,2}, 陈涛¹, 陈晨¹, 李玉林^{*1}

¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; ²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 采用响应面法优化铁棒锤根中一种咪唑生物碱 Imidazole-2-Carboxylic acid butyl ester (ICABE) 的超声提取工艺。在单因素试验基础上筛选出液料比、提取温度、提取时间三个主要因素, 并通过响应面分析得到的最佳工艺条件为: 液料比 23 mL/g、提取温度 58 °C、提取时间 51 min, 在此条件下的理论提取率为 0.081%, 实际测得值为 0.079%, 两者较接近。验证试验表明, 所得模型方程能较好地预测试验结果。

关键词: 铁棒锤; 咪唑生物碱; 超声提取; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of An Imidazole Alkaloid from *Aconitum pendulum* Busch by Response Surface Methodology

LIU Yong-ling^{1,2}, WANG Ping^{1,2}, CHEN Tao¹, CHEN Chen, LI Yu-lin^{*1}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, CAS, Xining 81008, China;

²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In this study, imidazole-2-carboxylic acid butyl ester (ICABE) was ultrasonically extracted from *Aconitum pendulum* Busch. Three influencing parameters, namely ratio of solvent to solid, extraction time and extraction temperature, were optimized using response surface methodology (RSM). The optimum conditions were as follows: the ratio of solvent to solid was 23 mL/g, extraction temperature was 58 °C and extraction time was 51 min. The predicted value of extraction rate of ICABE was 0.081% under the optimum conditions, and the experimental value was 0.079%. The validation test showed that the ultrasonic-assisted extraction process of ICABE was successfully optimized by RSM.

Key words: *Aconitum pendulum* Busch; imidazole alkaloid; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

铁棒锤(*Aconitum pendulum* Busch)为毛茛科乌头属多年生草本植物,其原植物来源丰富,藏药铁棒锤主产于青藏高原,在青海、陕西西部、甘肃南部、四川西部亦有分布。《中华人民共和国卫生部药品标准(藏药)》第一册以“铁棒锤”一名收录的药材为铁棒锤和伏毛铁棒锤的干燥块根和幼苗^[1]。铁棒锤是民间常用草药之一,味苦、辛、性温、剧毒。有祛瘀活络、止血镇痛等作用,用于神经痛、风湿关节痛、妇女痛经、胃痛、牙痛、跌打损伤等^[2,3]。铁棒锤中主要药效成分为二萜生物碱类^[4,6],咪唑类生物碱的相关报道。另外,关于铁棒锤研究多集中在炮制工艺上,而对提取工艺报道甚少,且工艺考察简

单^[7-10]。本课题组利用高速逆流色谱技术从存放3年的铁棒锤根部提取物中首次分离得到了一种咪唑类生物碱 Imidazole-2-carboxylic acid butyl ester (ICABE)。ICABE是含吡啶环的化合物,可作为蛋白激酶的抑制剂,并且可用于治疗癌症^[11]。因此研究铁棒锤根中咪唑类生物碱的提取工艺对铁棒锤的深入开发利用具有重要的意义。本文在单因素预试验的基础上,采用响应面法优化了铁棒锤根中ICABE超声提取工艺参数,为更好地开发该传统中药提供试验参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

铁棒锤根 2009年8月采集于青海省互助县北山乡,由中国科学院西北高原生物研究所孙菁副研究员鉴定。ICABE对照品由实验室自制(纯度98%

收稿日期: 2013-05-20

接受日期: 2013-07-23

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX-EW-J-26); 青海省应用基础研究项目(2012-Z-715)

* 通讯作者 Tel: 86-013519719519; E-mail: liyulin@nwipb.cas.cn

以上); HPLC 分析用甲醇为色谱纯(山东禹王公司); 自制超纯水; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 配备 G1311C 四元泵、自动脱气机、G1316 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器、G1329B 自动进样器; KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Agilent Esclipse-XDB C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; METTLER TOLEDO PL203 和 XS204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 供试品溶液的制备

称取 1.0 g 干燥的铁棒锤块根粉末(80 目), 置于 50 mL 三角瓶中, 在选定乙醇浓度(pH = 2)、液料

比、提取时间、提取温度等条件下超声提取两次, 合并提取液离心, 上清液减压浓缩至无醇味, 加 10 mL 水(pH = 2)溶解, 过滤除去醇溶性杂质, 滤液调 pH 为 10 后用 20 mL 氯仿萃取, 萃取两次, 氯仿层减压浓缩至干后用无水乙醇定容至 5 mL。HPLC 测定前 0.45 μm 有机滤膜过滤, 即为样品溶液。

1.3.2 HPLC 检测条件

Agilent Esclipse-XDB C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 梯度洗脱程序: 0 ~ 30 min, 59% 乙腈; 30 ~ 32 min, 59% ~ 70% 乙腈; 32 ~ 40 min, 70% ~ 90% 乙腈; 40 ~ 50 min, 90% 乙腈, 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C。此条件下对照品及样品色谱图如图 1。

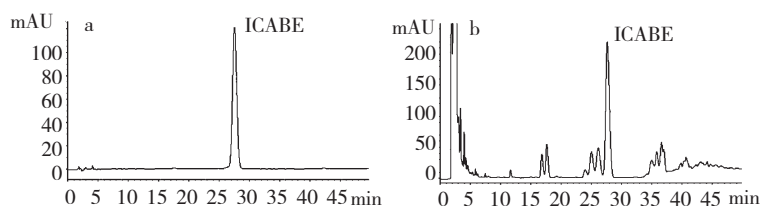


图 1 对照品(a)及铁棒锤样品(b)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard (a) and *A. pendulum* sample (b)

1.3.3 标准曲线的绘制

精密称取 ICABE 对照品 2.74 mg, 用无水乙醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中, 配制成浓度为 0.274 mg/mL 的对照品溶液。吸取以上对照品溶液 5、10、20、30、40 μL, 注入高效液相色谱仪进行检测, 拟合峰面积(y)和进样量(x, μg)作回归曲线, 得回归方程 $Y = 1251.9X + 40.98$ 相关系数 $R^2 = 0.9998$, 在 1.37 ~ 10.96 μg 范围内呈良好的线性关系。

1.3.4 提取率计算

按上述方法吸取 10 μL 样品溶液注入高效液相色谱仪, 重复进样三次, 峰面积取平均值, 代入回归方程, 即可求出样品溶液中 ICABE 的含量 A, 带入下式计算提取率。

$$R(\%) = \frac{AD}{Bm} \times 100\%$$

式中: A 为每次进样的 ICABE 含量(μg); B 为进样体积(μL); D 为定容体积(mL); m 为原料质量(mg)。

1.3.5 响应面试验设计

通过单因素预试验, 选择液料比(mL/g)、提取

温度(°C)、提取时间(min) 3 个因素为自变量, 以 ICABE 提取率为响应值, 对铁棒锤的超声提取工艺进行优化。采用 Design Expert 7.0.0 统计分析软件, 设计 3 因素 3 水平的响应面试验, 试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

水平 Level	因素 Factor		
	A 液料比 Solid-liquid ratio (mL/g)	B 提取温度 Extraction temperature (°C)	C 提取时间 Extraction time (min)
-1	15	45	40
0	20	55	50
1	25	65	60

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取溶剂对 ICABE 提取率的影响

准确称取 1 g 干燥的 80 目铁棒锤根, 置于 50 mL 三角瓶中, 提取 30 min, 提取两次, 液料比为 15

mL/g, 提取温度为 45 °C, 考察不同酸性乙醇 (pH = 2) 浓度和乙酸乙酯对 ICABE 提取率的影响。结果表明, 在 55% ~ 95% 范围内, 随乙醇浓度的增高, 提取率呈上升趋势; 在乙醇浓度达到 95% 左右时, 提取率达到最大; 乙酸乙酯的提取率比 95% 乙醇略大。文献报道有用乙醚-三氯甲烷混合液加少量氨水浸泡提取和用其他亲脂有机溶剂提取^[12, 13], 但考虑到成本与安全问题, 故选用 95% 的酸性乙醇液 (pH = 2) 作为提取溶剂。

2.1.2 液料比对 ICABE 提取率的影响

准确称取 1 g 干燥的 80 目铁棒锤根, 置于 50 mL 三角瓶中, 提取 30 min, 提取两次, 酸性乙醇 (pH = 2) 浓度为 95%, 提取温度为 45 °C, 考察不同液料比对 ICABE 提取率的影响。结果表明, 在 5 ~ 30 mL/g 范围内, 随液料比的增大, 提取率先呈上升趋势, 但当液料比超过 20 mL/g 时, 提取率上升趋势则趋于平缓。

2.1.3 提取时间对 ICABE 提取率的影响

准确称取 1 g 干燥的 80 目铁棒锤根, 置于 50 mL 三角瓶中, 在酸性乙醇 (pH = 2) 浓度为 95%, 提取温度为 45 °C, 液料比为 15 mL/g, 提取两次, 考察不同提取时间对 ICABE 提取率的影响。结果表明, 在 20 ~ 60 min 内, 随着提取时间的延长, 提取率在 50 min 左右达到峰高值后又下降, 推断该化合物在混合因素的影响下长时间提取会对其稳定性有影响。

2.1.4 提取温度对 ICABE 提取率的影响

准确称取 1 g 干燥的 80 目铁棒锤根, 置于 50 mL 三角瓶中, 提取 30 min, 提取两次, 酸性乙醇 (pH = 2) 浓度为 95%, 液料比为 15 mL/g, 考察不同提取温度对 ICABE 提取率的影响。结果表明, 随着温度的升高, 提取率不断上升; 当提取温度为 55 °C 左右时, 提取率达到最高值; 在 55 ~ 65 min 内, 随着温度的升高, 提取率反而不断下降, 说明 ICABE 在较高温度下稳定性较差。

2.2 响应面法优化铁棒锤根中 ICABE 的工艺

2.2.1 响应面设计与回归模型的建立

综合考虑单因素试验结果, 响应面分析方案及试验结果见表 2。从表 2 可以看出, 液料比、提取温度和提取时间的中心点试验值均高于析因点试验, 这与单因素试验的结果相吻合, 说明该响应面设计的 17 个试验点可信度较高。

表 2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

试验号 No.	因素 factor			提取率 Yield (%)
	A 液料比 Solid-liquid ratio (mL/g)	B 提取温度 Extraction temperature (°C)	C 提取时间 Extraction time (min)	
1	0	0	0	0.076
2	0	0	0	0.077
3	1	0	1	0.064
4	1	-1	0	0.066
5	0	-1	0	0.051
6	-1	-1	0	0.052
7	1	1	0	0.075
8	0	0	0	0.076
9	-1	0	1	0.049
10	0	0	0	0.079
11	0	1	-1	0.051
12	1	0	-1	0.066
13	0	0	0	0.078
14	0	-1	1	0.055
15	-1	0	-1	0.042
16	0	1	1	0.057
17	-1	1	0	0.046

2.2.2 方差分析

利用 Design Expert 7.0.0 软件对表 2 试验数据

表 3 回归方程系数及其显著性检验

Table 3 Regression coefficients and significance analysis

方差来源 Source	F 值 F value	P 值 P value	显著性 P > F
模型 Model	153	< 0.0001	**
A	442.37	< 0.0001	-
B	2.37	0.1677	-
C	16.84	0.0046	**
AB	29.61	0.001	**
AC	10.66	0.0138	*
BC	0.13	0.7275	-
A ²	132.25	< 0.0001	**
B ²	209.59	< 0.0001	**
C ²	448.42	< 0.0001	**
失拟度 Lack of Fit	1.27	0.3963	-

注: ** $P < 0.01$ 为极显著, * $P < 0.05$ 为显著。

Note: ** $P < 0.01$ indicates extremely significant difference, * $P < 0.05$ indicates significant difference.

进行回归分析,得二次多元回归模型为: $R = 0.077 + 0.01A + 7.5E^{-4}B + 2E^{-3}C + 3.75E^{-3}AB - 2.25E^{-3}AC + 2.5E^{-4}BC - 7.725E^{-3}A^2 - 9.725E^{-3}B^2 - 0.014C^2$

对模型进行方差分析,结果见表3。由表3可以得出:模型的 $P < 0.0001$,表明模型极显著;失拟项 $P = 0.3963 > 0.05$,说明模型失拟度不显著;模型的调整确定系数 $R_{Adj2} = 0.9884$,说明该模型拟合程度良好,试验误差较小,可以用此模型对铁棒锤根中 ICABE 的超声提取工艺进行分析及预测。

模型回归方程的系数显著性检验如下:一次项 $A (P < 0.0001)$ 、 $B (P = 0.1677)$ 、 $C (P = 0.0046)$,表

明液料比、提取时间对 ICABE 提取率有显著影响,提取温度影响不显著,在所选取的各因素水平范围内,按对结果的影响排序,液料比 > 提取时间 > 提取温度;二次项 $AB (P = 0.001 < 0.05)$ 、 $AC (P = 0.0138 < 0.05)$,表明液料比与提取温度以及液料比与提取时间的交互作用对 ICABE 提取率影响显著。

2.2.3 效应面分析

根据二次多项式方程,分别绘制各指标与响应值交互的响应曲面图,用来确定各因素对铁棒锤根中 ICABE 提取率的影响,结果见图2至图4。

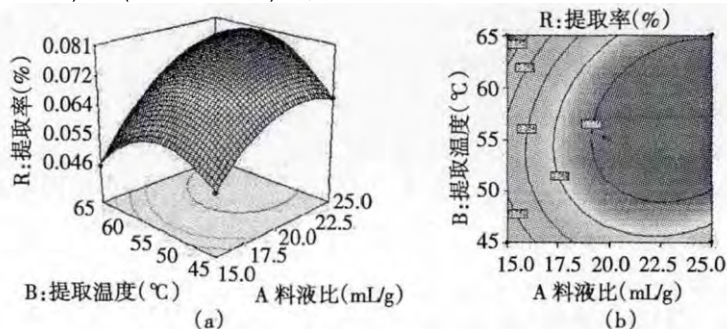


图2 R = f(A, B) 的响应面(a)及等高线图(b)

Fig. 2 Response surface plot (a) and contour plot (b) of $R = f(A, B)$

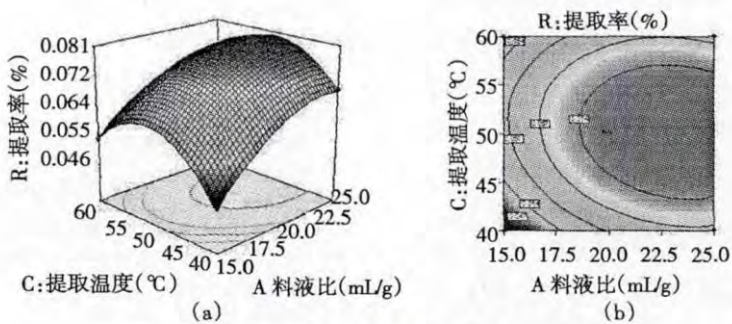


图3 R = f(A, C) 的响应面(a)及等高线图(b)

Fig. 3 Response surface plot (a) and contour plot (b) of $R = f(A, C)$

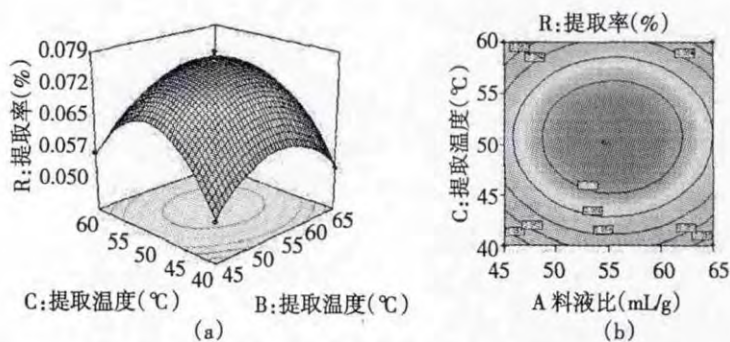


图4 R = f(B, C) 的响应面(a)及等高线图(b)

Fig. 4 Response surface plot (a) and contour plot (b) of $R = f(B, C)$

从图 2 可知,提取率随提取温度的升高先升高后降低,成抛物线趋势,在 58 °C 左右达到最高值;液料比在 15 ~ 25 mL/g 范围内,随液料比的增大,提取率不断增大,当液料比达到 23 mL/g 时,提取率增大趋势不明显。从图 3 可知,提取时间对提取率的影响成抛物线形,即随提取时间的增大,提取率先增大后稍有下降趋势,在 51 min 左右达最大,其原因可能与 ICABE 的稳定性有关。由图 4 可知,提取温度和提取时间对提取率的影响呈抛物线趋势;由方差分析可知,液料比和提取温度对提取率影响的交互作用较显著。

利用 Design Expert 7.0.0 软件对回归模型进行进一步的典型性分析,得到最优提取工条件为:液料比 23 mL/g、提取温度 58 °C、提取时间 51 min,此时 ICABE 的理论提取率为 0.081%。采用此最佳工艺条件平行提取三次,测得提取率为 0.079%,与预测值的相对误差为 2.5%。因此,采用响应面法得到的提取条件参数可靠,具有使用价值。

3 结论

本试验首次在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 响应面法优化了铁棒锤中 ICABE 的超声提取工艺,确定的最佳提取工艺条件为:液料比 23 mL/g、提取温度 58 °C、提取时间 51 min,此条件下铁棒锤 ICABE 理论提取率可达 0.081%,实际测得值为 0.079%,两者较接近,因此,试验所得模型方程能较好地预测试验结果。本研究为应用超声技术规模化提取 ICABE 提供了理论依据。

参考文献

- Hu JR(胡君茹),Jiang H(姜华). Advances in studies on chemical constituents and their pharmacological effects of Tibetan medicine *Aconitum pendulum*. *Gansu J TCM*(甘肃中医) 2006,19: 18-19.
- Yang JZ(杨建忠),Liu JF(刘建峰),Dang QP(党秋萍). Determination of the total alkaloids content of *Aconitum pendulum*. *Shanxi J TCM*(陕西中医) 2007,28: 220-222.
- Wang YJ,Zhang J,Zeng CJ,et al. Three new C19-diterpenoid alkaloids from *Aconitum pendulum*. *Phytochem Lett*, 2011,4: 166-169.
- Wang YJ(王毓杰),Zeng CJ(曾陈娟),Yao Z(姚喆),et al. Diterpene alkaloids from roots and processed products of *Aconitum pendulum*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010,41: 347-351.
- Zhang F(张帆),Wang XM(王兴明),Peng SL(彭树林),et al. Study on diterpene alkaloids from the roots of *Aconitum flavum*. *Chin Pharm J*(中国药学杂志),2006,41: 1851-1854.
- Gao SY(高绍阳),Yu P(喻萍),Chen WY(陈武元),et al. RP-HPLC determination of bullatine A in *Aconitum brachypodium* diels. *J Pharm Anal*(药物分析杂志),2005,25: 1382-1384.
- Gao XJ(高晓娟). Preliminary study on the processing methods of radix aconiti. Lanzhou: Lanzhou University(兰州大学) MSc. 2011,1-38.
- Wu L(武琳),Zhang Fan(张帆),Halmurat P(哈木拉提·吾甫尔),et al. Influences on contents of alkaloid in *Aconitum pendulum* Busch samples processed by different methods. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2011,26: 1307-1309.
- Wang YJ(王毓杰),Zhang J(张静),Tian HP(田会萍),et al. Study on processing principle of *Aconitum pendulum*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2010,35: 588-592.
- Chan TYK. Aconitum alkaloid content and the high toxicity of aconite tincture. *Forensic Sci Int* 2012,222: 1-3.
- Beck G,Heitzer H,Eue L,et al. Halogenated derivatives of imidazolecarboxylic acids and their use as herbicides. EP31086A1,1981-7-1.
- Du T(杜弢),Chen HG(陈红刚),Lin L(林丽),et al. Study on optimization of extraction technology for total alkaloids of *Aconitum flavum* by orthogonal design method. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志) 2011,17: 20-22.
- Zou J(邹洁),Wang X(王璇). The research on extraction technology of alkaloids. *Guangdong Chem Ind*(广东化工), 2012,39: 96-97.
- Ministry of Health of the People's Republic of China(中华人民共和国卫生部). Specification of Health Food Inspection and Technology(保健食品检验与技术规范) 2003. 306-307.
- Shi S(史坤),Zhang ZS(张泽生),Zhang M(张民),et al. Effect of apple polyphenols on antioxidant ability in hyperuricemic rats. *Prog Mod Biomed* 2010,10: 3460-3463.

(上接第 1289 页)