

# 响应面法优化假北紫堇总生物碱提取工艺

马 涛<sup>1,2</sup> 张秋龙<sup>1,2</sup> 丁晨曦<sup>3</sup> 索有瑞<sup>1</sup> 王洪伦<sup>1</sup> 丁晨旭<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所藏药重点研究实验室, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海省红十字医院, 青海 西宁 810000)

**摘要** 目的: 采用响应面法优化热回流提取假北紫堇总生物碱的工艺研究。方法: 在单因素试验基础上, 选取 4 因素 3 水平响应面法建立假北紫堇总生物碱得率与影响因子的多元二次回归方程, 得到总生物碱的最佳提取条件。结果: 假北紫堇总生物碱的最佳提取工艺为: 液料比 25 mL/g、提取时间 1.7 h、提取温度 53 ℃、乙醇浓度 73%, 总生物碱得率为 1.62%。结论: 实验结果表明二次多项式建立的数学模型具有良好的预测性, 响应面法筛选得到的总生物碱提取工艺稳定、可行, 重现性好。

**关键词** 假北紫堇; 总生物碱; 响应面法; 热回流提取

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2015)08-1736-05

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2015.08.044

藏药假北紫堇 *Corydalis pseudoimpatiens* Fedde 为罂粟科紫堇属植物, 主要分布于青海、甘肃、四川、西藏等地<sup>[1]</sup>, 生于海拔 2 850 ~ 4 500 m 的山坡或山谷石砾处。假北紫堇以全草入药, 具有活血散瘀、行气止痛、清热解毒的功效, 主治胃脘痛、肝炎、胆囊炎、腰腿痛、痈肿等<sup>[2]</sup>。化学成分研究表明本属植物主要含有异喹啉类生物碱<sup>[3-7]</sup>。本文采用 Box-Behnken 响应面法得到了假北紫堇总生物碱得率的最佳提取工艺。现将结果报道如下。

## 1 仪器与材料

1.1 仪器 759 紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; AL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 材料 实验用假北紫堇采自青海群加乡, 经中科院西北高原生物研究所植物学专家卢学峰副研究员鉴定为罂粟科紫堇属植物假北紫堇 *Corydalis pseudoimpatiens* Fedde 的干燥全草, 自然阴干, 粉碎; leptopidine 对照品由中国科学院西北高原生物研究所藏药研究重点实验室制得(质量分数 97.8%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 生物碱得率的测定

2.1.1 检测波长的选择: 在 250 mL 分液漏斗中加入 0.2 mol/L 冰醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.6) 20 mL 后, 加入 4 mL 溴甲酚绿指示液, 摇匀, 以 50 mL 氯仿萃取, 取萃取液 10 mL 转移至 100 mL 量瓶中, 加氯仿定容。氯仿作为随行空白。在 200 ~ 800 nm 波长范围内进行扫描, 结果在 415 nm 波长处有最大吸收。

2.1.2 标准曲线的制备: 精密称取干燥恒重的 leptopidine 对照品 6.40 mg 于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀。量取对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 摇匀。分别取上述 5 种溶液 10 mL, 在 60℃ 下减压蒸干。待加入 20 mL 缓冲液溶解后分别置于分液漏斗中, 加入溴甲酚绿指示液摇匀, 反应 5 min 后加入氯仿 30 mL, 充分振摇, 静置。分取氯仿层于已放入少量无水硫酸钠的带塞锥形瓶, 以上述缓冲液同法操作, 所得氯仿液作空白, 以吸光度值  $A$  为纵坐标, 对照品浓度( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线<sup>[8]</sup>, 得到吸光度( $y$ ) 与浓度( $x$ ) 之间的回归方程:  $y = 0.013x - 0.056$ ,  $r = 0.9995$ , 表明对照品浓度在 10 ~ 80  $\mu\text{g/mL}$  范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.3 得率计算: 依据上述标准曲线和吸光度值进行假北紫堇总生物碱含量测定, 并计算假北紫堇中生物碱的提取得率。

2.2 假北紫堇生物碱提取的单因素试验考察 称取假北紫堇粗粉 5 份, 每份 1.00 g, 分别考察液料比、提取时间、提取温度、乙醇浓度和提取次数 5 个单因素对总生物碱得率的影响。

2.2.1 液料比对总生物碱得率的影响: 当液料比分别为 24 和 32 mL/g 时, 生物碱得率均达到较大值, 且数值相近(图 1)。其原因主要是在此范围内, 溶剂用量的增加有助于生物碱的浸出, 当液料比达到 24 mL/g 时, 液料比的进一步增加对提取率的影响不大。故选取适宜生物碱提取的液料比为 24 mL/g。

收稿日期: 2014-11-24

基金项目: 青海省科技计划项目(2014-HZ-810, 2014-NS-516); 中国教育部重大攻关课题(212188)

作者简介: 马涛(1989-) 女, 在读硕士研究生, 专业方向: 天然药物化学; Tel: 15209719164, E-mail: matao15209719164@163.com。

\* 通讯作者: 丁晨旭, E-mail: cxding@nwipb.cas.cn。

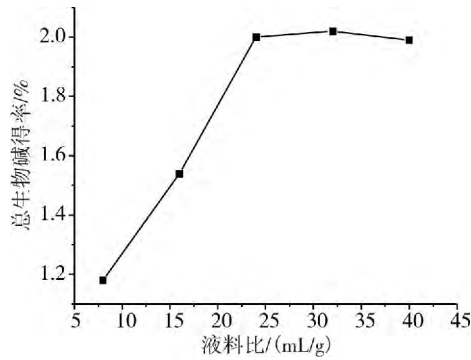


图1 液料比对假北紫堇总生物碱得率的影响

2.2.2 提取时间对总生物碱得率的影响: 总生物碱得率在提取时间为 1.5 h 时达到最大值, 当时间超出 1.5 h 后, 总生物碱得率反而呈现出下降趋势(图2)。可能是因为随着提取时间的增加部分不太稳定的生物碱发生了降解。故选取 1.5 h 作为总生物碱的提取时间。

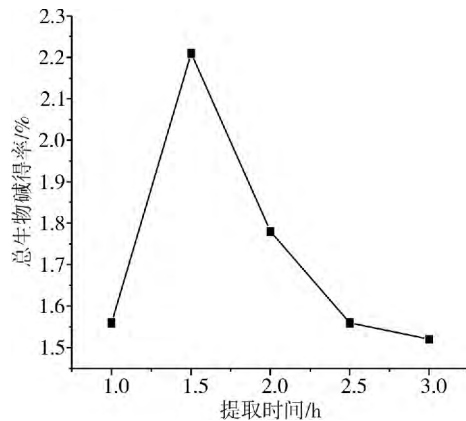


图2 提取时间对假北紫堇总生物碱得率的影响

2.2.3 提取温度对总生物碱得率的影响: 当提取温度在 40 ~ 50 °C 范围内, 总生物碱得率随着温度的升高而增加; 超过 50 °C 时, 总生物碱得率反而略有所降低(图3)。这是因为温度升高后, 生物碱的溶出量减少; 也可能由于过高的温度使得生物碱结构发生改变, 故选择 50 °C 为较适宜的提取温度。

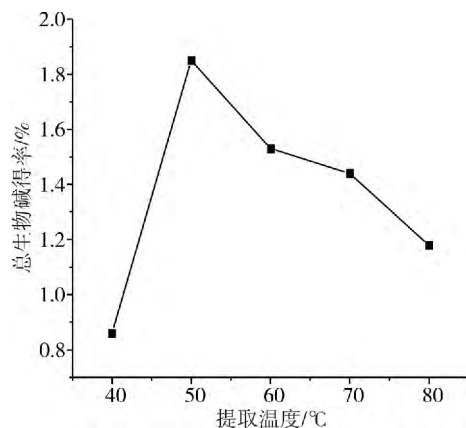


图3 提取温度对假北紫堇总生物碱得率的影响

2.2.4 乙醇浓度对总生物碱得率的影响: 在乙醇浓度为 70% 时, 总生物碱得率最高, 随着乙醇浓度的继续增大, 总生物碱得率呈下降趋势(图4)。当乙醇浓度较小时, 总生物碱的溶解度较小, 随着乙醇浓度的增大, 也会将样品中的油脂类、三萜类等物质提取出来, 不利于生物碱的提取。因此选取总生物碱提取的乙醇浓度为 70%。

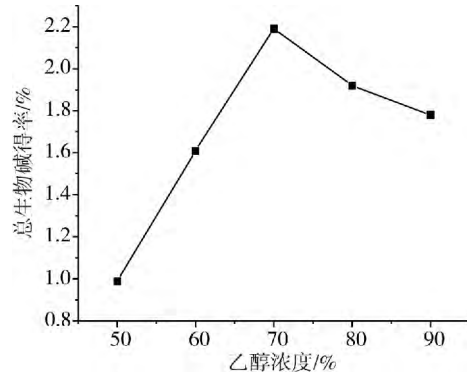


图4 乙醇浓度对假北紫堇总生物碱得率的影响

2.2.5 提取次数对总生物碱得率的影响: 提取次数由 1 变为 2 时, 总生物碱得率大幅增加, 当提取次数为 3 次及超过 3 次时, 总生物碱的得率增加缓慢(图5)。故选择提取次数为 2 次。

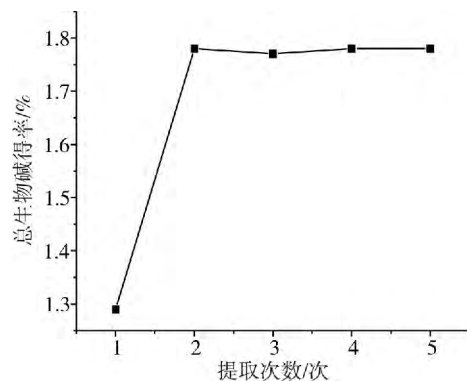


图5 提取次数对假北紫堇总生物碱得率的影响

2.3 响应面法优化提取工艺 综合单因素试验结果进行极差分析, 在固定提取次数 2 次的条件下优选出 4 个主要影响因素, 按照响应面试验设计 4 因素 3 水平(共 29 个试验点 5 个中心点)的方案进行生物碱提取。每组试验重复 3 次, 取其平均值。试验设计因素编码及水平见表 1。29 组响应面试验结果见表 2。方差分析见表 3。

对试验结果进行响应面软件分析, 经二次回归拟合后得到假北紫堇总生物碱得率(Y)与上述 4 个因素之间的模拟方程为:  $Y = 1.62 + 0.030A + 0.11B + 1.865 \times 10^{-3}C + 0.096D + 0.025AB - 1.350 \times 10^{-3}AC - 2.421 \times 10^{-3}AD + 0.10BC + 0.035BD + 8.150 \times 10^{-3}CD - 0.14A^2 - 0.18B^2 - 0.073C^2 - 0.19D^2$ 。该回

表 1 中心组合设计因素与水平表

因素	水平			
	A 液料比 /( mL/g)	B 提取 时间/h	C 提取 温度/°C	D 乙醇 浓度/%
-1	16	1	50	60
0	24	1.5	60	70
1	32	2	70	80

表 2 响应面试验结果

编号	A 液料比 /( mL/g)	B 提取 时间/h	C 提取 温度/°C	D 乙醇 浓度/%	Y 总生物碱 得率/%
1	16	1.5	40	70	1.4078
2	16	1.5	50	60	1.1568
3	32	1.5	40	70	1.4089
4	24	1	40	70	1.3944
5	16	2	50	70	1.3344
6	24	1.5	50	70	1.6218
7	24	1.5	50	70	1.6220
8	24	1.5	50	70	1.6321
9	24	1.5	40	60	1.1833
10	24	1.5	40	80	1.4472
11	32	1	50	70	1.1907
12	24	1.5	50	70	1.6038
13	16	1	50	70	1.1561
14	16	1.5	50	80	1.3411
15	32	1.5	50	60	1.2551
16	24	1	60	70	1.1561
17	24	1	50	60	1.1203
18	24	2	40	70	1.4018
19	24	1.5	50	70	1.6187
20	24	2	60	70	1.5752
21	24	1.5	60	80	1.5197
22	24	2	50	80	1.4505
23	24	1.5	60	60	1.2231
24	32	1.5	50	80	1.4297
25	16	1.5	60	70	1.3979
26	24	1	50	80	1.1689
27	32	1.5	60	70	1.3936
28	24	2	50	60	1.2627
29	32	2	50	70	1.4704

归模型  $F$  检验为显著 ( $P < 0.01$ ) ,其失拟项在  $\alpha = 0.05$  水平上为极显著 ( $P < 0.01$ ) ,其决定系数  $R^2 = 0.9659$  ,说明该拟合方程与实际情况相符 ,且误差较小 ,能充分反映出各因素与响应值之间的关系 ,其影响不是呈简单的线性关系。通过该方程发现 ,各种因素之间存在一定的交互作用 ,其中  $B$ 、 $D$ 、 $BC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  均呈极显著影响 ( $P < 0.01$ )  $A$  呈显著影响 , $C$ 、 $AB$ 、 $AC$ 、 $AD$ 、 $CD$ 、 $BD$  之间的交互作用均不显著。从单因素水平观察 ,其影响顺序为:  $B$ ( 提取时间)  $> D$ ( 乙醇浓度)  $> A$ ( 液料比)  $> C$ ( 提取温度) 。在有交互作用存在下 ,对假北紫堇总生物碱得率的影响顺序为:  $BC > BD > AB > CD > AD > AC$ 。

2.6.2 响应面分析: 从各因素之间两两相互作用的响应面图形( 图 6) 观察 ,曲线走势越平滑 ,其影响越小; 图形曲线走势较陡 ,说明其影响最为显著。由 Design-Expert 7.0 软件进行系统分析 ,得出影响假北紫堇总生物碱得率的最佳提取工艺条件为: 液料比 25.11 mL/g、提取时间 1.72 h、提取温度 53.44°C、乙醇浓度 72.98% ,此时总生物碱得率理论值为 1.66% ,结合实际操作修正后的工艺条件为: 液料比 25 mL/g、提取时间 1.7 h、提取温度为 53°C、乙醇浓度为 73%。按照此优化条件进行 3 组

表 3 拟合二次多项式模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值 $> F$	显著性
模型	0.74	14	0.053	28.32	$< 0.0001$	**
A	0.010	1	0.010	5.63	0.0325	*
B	0.14	1	0.14	76.85	$< 0.0001$	**
C	$4.176 \times 10^{-5}$	1	$4.176 \times 10^{-5}$	0.022	0.8829	
D	0.11	1	0.11	59.95	$< 0.0001$	**
AB	$2.573 \times 10^{-3}$	1	$2.573 \times 10^{-3}$	1.39	0.2588	
AC	$7.290 \times 10^{-6}$	1	$7.29 \times 10^{-6}$	$3.926 \times 10^{-3}$	0.9509	
AD	$2.345 \times 10^{-5}$	1	$2.345 \times 10^{-5}$	0.013	0.9121	
BC	0.042	1	0.042	22.83	0.0003	**
BD	$4.853 \times 10^{-3}$	1	$4.853 \times 10^{-3}$	2.61	0.1282	
CD	$2.657 \times 10^{-3}$	1	$2.657 \times 10^{-4}$	0.14	0.7109	
$A^2$	0.13	1	0.13	72.38	$< 0.0001$	**
$B^2$	0.20	1	0.20	108.91	$< 0.0001$	**
$C^2$	0.035	1	0.035	18.68	0.0007	**
$D^2$	0.24	1	0.24	128.69	$< 0.0001$	**

续表 3

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值 > F	显著性
残差	0.026	14	$1.857 \times 10^{-3}$			
失拟项	0.026	10	$2.558 \times 10^{-3}$	24.55	0.0037	**
纯误差	$4.167 \times 10^{-4}$	4	$1.042 \times 10^{-4}$			
总差	0.76	28				

决定系数  $R^2 = 0.9659$ ; 矫正的决定系数  $R_{adj}^2 = 0.9318$

注: \*\*  $P < 0.01$ , 差异极显著; \*  $P < 0.05$ , 差异显著

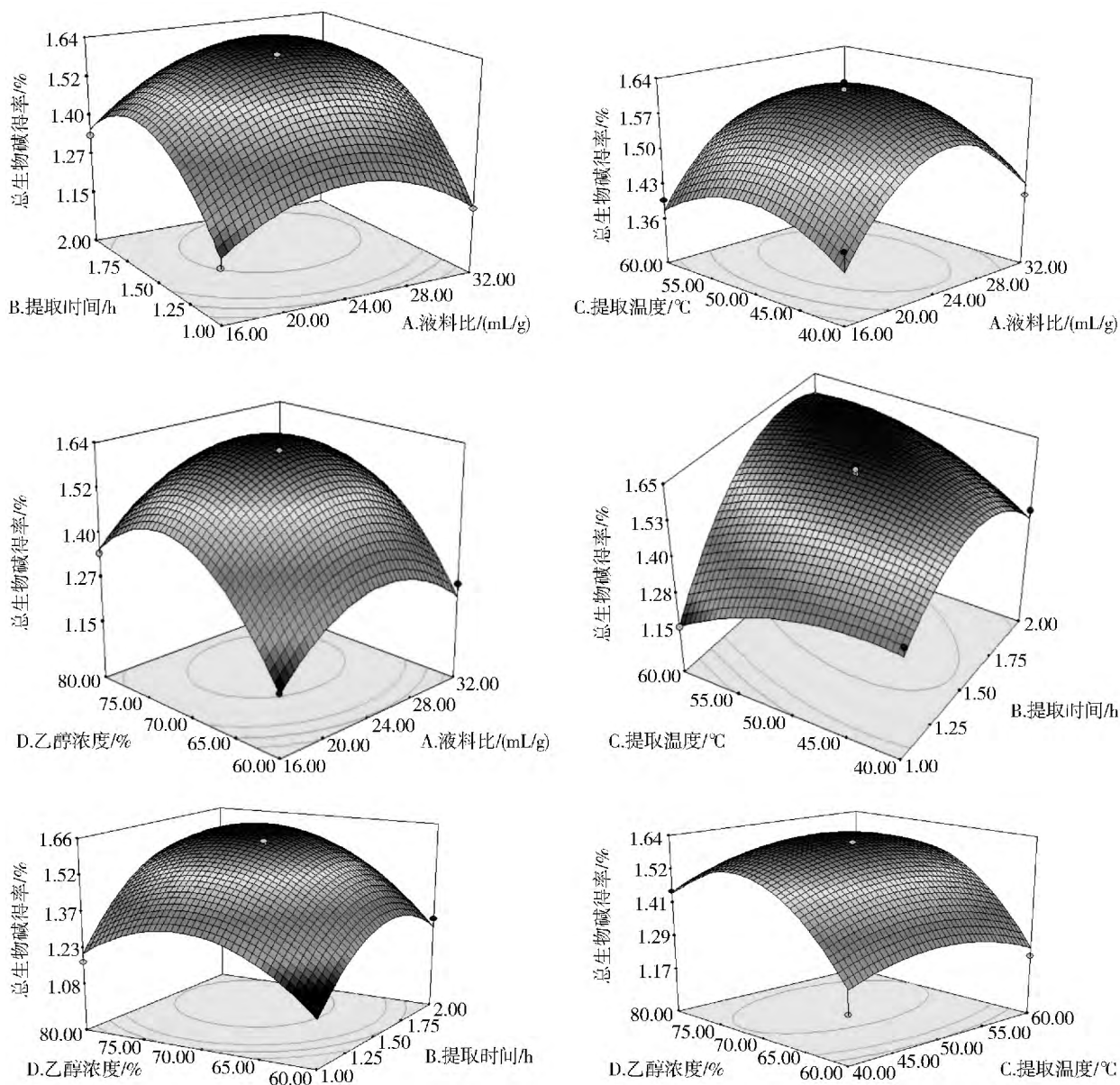


图 6 各两两因素交互作用对假北紫堇总生物碱得率影响的响应面图

平行试验, 得其平均实测值为 1.62%, 与其理论值偏差为 2.41%, 可见采用上述响应面法优化的提取条件可靠。

### 3 结论

用热回流法提取假北紫堇中总生物碱, 根据单因素试验结果, 采用 Box-Behnken 试验设计以及响

应面分析得出最优工艺条件为: 液料比 25 mL/g、提取时间 1.7 h、提取温度为 53 °C、乙醇浓度为 73%。本实验采用 Box-Behnken 响应面法首次对假北紫堇中总生物碱的提取工艺进行了优化, 为其进一步开发提供了科学、合理的理论和实验依据。

## 参 考 文 献

- [1] 吴征镒. 中国植物志[M]. 第32卷. 北京: 科学出版社, 1999: 343.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 第1卷. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 350.
- [3] 余欢欢, 高瑾, 宋王婷, 等. 紫堇属植物中生物碱类化合物的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(5): 28-29.
- [4] 於佳佳, 崔秀月, 毛美娜, 等. 紫堇属植物中异喹啉类生物碱的综述[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(3): 407-409.
- [5] Aljofan M, Netter HJ, Aljarbou AN, et al. Anti-hepatitis B activity of isoquinoline alkaloids of plant origin [J]. *Archives of Virology* 2014, 159(5): 1119-1128.
- [6] 方起程, 林茂, 翁庆梅, 等. 紫堇属植物生物碱的化学——青海高原四种紫堇属植物生物碱的化学研究[J]. 药学学报, 1981, 16(10): 798-800.
- [7] 尚伟庆, 陈月梅, 高小力, 等. 紫堇属藏药的化学与药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1190-1198.
- [8] 李吉昌, 林跃华, 龙清平, 等. 紫外分光光度法测定赛北紫堇中总生物碱含量[J]. 云南化工, 2012, 39(4): 19-21.