

响应面法优化塞北紫堇中总生物碱的超声提取工艺

王达威^{1,2},李荣正³,李冰⁴,丁晨旭^{1,5*}

(¹青海民族大学化学与生命科学学院,西宁 810007;²青藏高原植物资源化学重点实验室,西宁 810007;³青海省红十字会,西宁 810001;⁴青海省科学技术信息研究所,西宁 810001;⁵中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810001)

摘要:为优化超声提取藏药塞北紫堇中总生物碱的提取工艺,根据单因素试验结果,选择影响总生物碱提取效果较大的盐酸浓度、液料比、提取时间为自变量,以总生物碱的紫外吸收为响应值,进行 Box-Behnken 中心组合试验设计,采用响应面法(RSM)评估了这些因素对总生物碱提取效果的影响。结果表明:超声波法辅助提取塞北紫堇中总生物碱的最佳工艺条件为液料比 47.5 mL·g⁻¹,盐酸浓度为 3%,提取时间为 78 min。在此条件下,总生物碱的紫外吸收达 0.3117。

关键词:塞北紫堇;生物碱;超声提取;响应面法

Optimization of ultrasonic extraction of total alkaloids from *Corydalis impatiens* by response surface analysis

WANG Da-wei^{1,2}, LI Rong-zheng³, LI Bing⁴, DING Chen-xu^{1,5*}

(¹College of Chemistry & Life Science, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China; ²Key Chemistry Laboratory of Plant Resources of Qinghai-Tibet Plateau, Xining 810007, China; ³Qinghai Red Cross Hospital, Xining 810001, China; ⁴Science and Technology Information Institute of Qinghai Province, Xining 810001, China; ⁵Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: In order to optimize ultrasonic-assisted extraction process of total alkaloids from *Corydalis impatiens*, the hydrochloric acid concentration, liquid-feed ratio and extraction time, which were major factors influencing the extraction according to the single factor experiments, were selected as independent variables, and through using the ultraviolet absorption of total alkaloids as response values and making the Box-Behnken central combinational design, the effects of the above factors on the extraction were estimated by response surface methodology. The results indicated that the optimal extraction conditions were 47.5 mL·g⁻¹ of liquid-feed ratio, 3% of hydrochloric acid concentration, and 78-min extraction time, in which the ultraviolet absorption of total alkaloids was 0.3117.

Key words: *Corydalis impatiens*; Alkaloid; Ultrasonic extraction; Response surface methodology

紫堇属(*Corydalis* DC.)植物广泛分布于北温带至北非—印度沙漠区边缘地区,少数品种分布在东非草原地区,全球约有 300 余种,主要产于亚洲^[1]。中国有 290 种,主要分布在西南地区,青藏高原约有 120 余种^[2,3]。藏药塞北紫堇[*Corydalis impatiens*(Pall.) Fisch]为罂粟科紫堇属植物,多年生草本,主要产于青海、西藏、四川、甘肃、内蒙古、黑龙江等地^[4],临床中主要用于治疗各种出血、肝炎或胆囊炎、流感等疾病,在藏药处方中入药率高达 70%^[5]。云南民族大学李吉昌等^[6]通过常压硅胶柱分离制得该植物中 7 个生物碱成分,青海民族大学李海丽教授等对其总生物碱的 LD₅₀做了相关测定,宋晓楠等对其总生物碱的抗炎作用做了研究,但国内外对其总生物碱的提取工艺研究尚不深入,本研究通过响应面法优化了超声提取塞北紫堇全草中总生物碱的提取工艺。

收稿日期:2014-11-10

基金项目:教育部重点科技资助项目(212188);青海省科技项目(2014-HZ-810)

作者简介:王达威(1988—),男,在读硕士,从事药物化学研究。E-mail:qhmuwdw@sina.com;Tel:18997199550

*通信作者:丁晨旭(1973—),男,博士,副研究员,从事天然药物化学和野生植物资源开发利用研究。Tel:0971-6143857

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

塞北紫堇:2012 年采于青海省门源县,经中科院西北高原生物研究所丁晨旭副研究员鉴定,阴干,粉碎待用。

仪器:TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;KQ-500E 型超声波清洗器(500 W),昆山市超声仪器有限公司;BUCHI R-215 旋转蒸发仪,瑞士 BUCHI 公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 超声提取

取阴干的塞北紫堇全草粉碎,过 50 目筛,精确称量 1 g,加入 50 mL 浓度为 3% 盐酸于 50 ℃,30 kHz 下超声提取 80 min。将提取液抽滤取清液,用 3% 盐酸多次冲洗残渣后抽滤与提取液合并。滤液避光静置冷却至室温后用 5% 的 NaOH 溶液调节 pH 至 11,转移至分液漏斗静置 5 min 后用 100 mL 氯仿萃取 3 次,合并氯仿层,减压浓缩回收氯仿后得总生物碱。

1.2.2 吸光度测定

上述方法得到的总生物碱中加入 20 mL(pH 3.6)的缓冲溶液使之溶解,加入 10 mL 溴甲酚绿溶液染色后加入 50 mL 氯仿充分摇匀,静置 30 min,弃去上层。取氯仿层溶液 10 mL 用氯仿定容至 50 mL 后待测。

配制空白对照品:取 20 mL 上述缓冲溶液,加入 10 mL 溴甲酚绿溶液混合后,加入 50 mL 氯仿充分摇匀,静置 30 min,弃去上层。取 10 mL 氯仿层溶液用氯仿定容至 50 mL。

最大吸收波长测定:将稀释后的样品在 TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计上进行全波长(190—900 nm)扫描,得出塞北紫堇总生物碱在 415 nm 处有最大吸收。

1.2.3 单因素试验

本试验采用盐酸为提取助溶剂,分别考察了盐酸浓度、提取温度、液料比、提取时间等因素对塞北紫堇中总生物碱提取效果的影响。

1.2.4 塞北紫堇中总生物碱提取工艺的优化

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,结合单因素试验结果分析,选择合理的水平,在 50 ℃下以盐酸为提取剂,选取对总生物碱提取效果影响较大的因素盐酸浓度(A)、提取时间(B)、液料比(C)进行中心组合试验。以显色处理过的总生物碱在 415 nm 处的紫外吸收为响应值,通过响应面分析得出超声波提取塞北紫堇中总生物碱的最佳提取工艺条件。试验设计因素编码及水平见表 1。

表 1 中心组合设计因素与水平表
Table 1 Factors and levels of the central combinational design

	水平		
	-1	0	1
盐酸浓度(A)/%	2	3	4
提取时间(B)/min	60	70	80
液料比(C)/mL·g ⁻¹	30	40	50

2 结果与分析

2.1 单因素对塞北紫堇总生物碱提取效果的影响

2.1.1 盐酸浓度对塞北紫堇总生物碱提取效果的影响

选定水浴温度 50 ℃,液料比 50 mL·g⁻¹,提取时间 80 min 条件下,分别用 1%、2%、3%、4%、5% 浓度的盐酸溶液按照 1.2.1 所述方法提取目标物,按照 1.2.2 所述方法在 415 nm 测所得总生物碱的吸光度。由图 1 可以看出,当盐酸浓度为 3% 时,所得总生物碱的紫外吸收最高,提取率最高,因此盐酸浓度的最佳条件应处于 3% 左右为宜。

2.1.2 提取时间对塞北紫堇总生物碱提取效果的影响

选定水浴温度 50 ℃,液料比 50 mL·g⁻¹,盐酸浓度 3% 条件下,分别用超声提取器提取样品 30 min、

50 min、70 min、90 min、110 min,其他操作按照 1.2.1 所述方法进行,并按照 1.2.2 所述方法在 415 nm 测所得总生物碱的吸光度(图 2)。

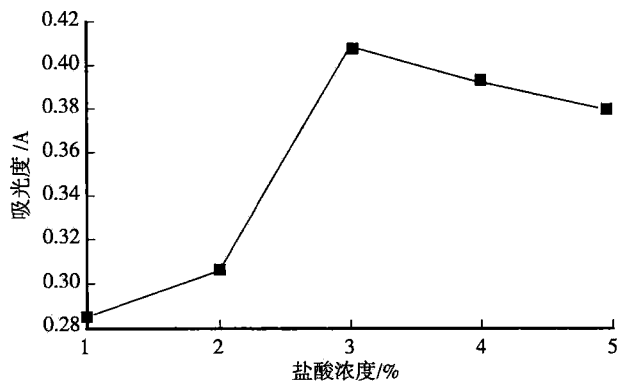


图 1 盐酸浓度对总生物碱提取效果的影响

Fig. 1 Effect of hydrochloric acid concentration on extraction of total alkaloid

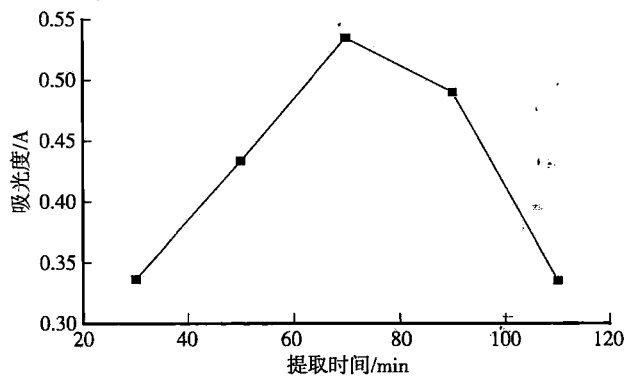


图 2 提取时间对总生物碱提取效果的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on extraction of total alkaloids

通过数据可以看出,提取时间在 30—70 min 过程中,总生物碱的提取效果显著提高,当时间到达 70 min 时提取效果达到最佳,因此,提取时间应选择在 70 min 左右为宜。

2.1.3 提取温度对塞北紫堇总生物碱提取效果的影响

选定液料比 $50 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,盐酸浓度 3%,超声提取时间 70 min 条件下,分别在 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下按照 1.2.1 所述方法提取总生物碱,并按照 1.2.2 所述方法在 415 nm 测所得总生物碱的吸光度(图 3)。

通过数据可以看出,提取温度对总生物碱的提取率影响不大,相比之下在 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时总生物碱的紫外吸收最大。考虑到温度升高对化合物的分解促进作用及节能等因素,提取温度应选择在 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右为宜。

2.1.4 液料比对塞北紫堇总生物碱提取效果的影响

选定水浴温度 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$,盐酸浓度 3%,超声提取时间 70 min 条件下,分别使用盐酸溶液体积与样品质量比例为 $10 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $30 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $40 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $50 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,按照 1.2.1 所述方法提取总生物碱,并按照 1.2.2 所述方法在 415 nm 处测所得总生物碱的吸光度(图 4)。

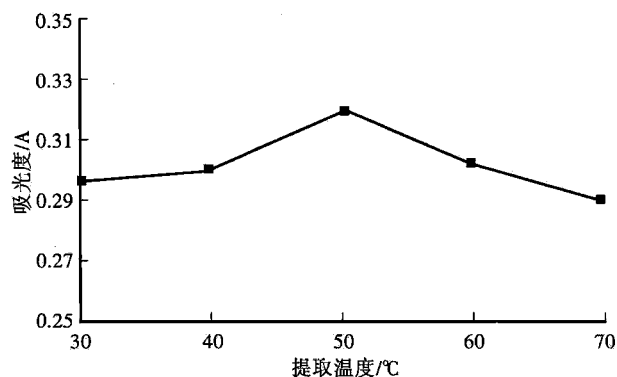


图 3 温度对总生物碱提取效果的影响

Fig. 3 Effect of temperature on extraction of total alkaloids

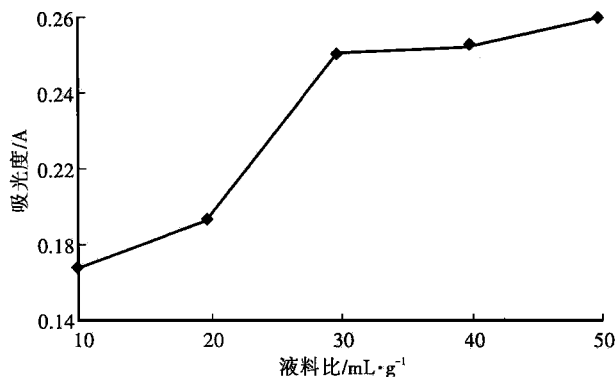


图 4 液料比对总生物碱提取效果的影响

Fig. 4 Effect of liquid-feed ratio on extraction of total alkaloids

通过数据可以看出,总生物碱的提取效果随着液料比的增加而增大,当液料比达到 $50 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 时紫外吸收值达到最大,在 $30\text{--}50 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内变化不大。考虑到试验误差,以及加大提取液的用量同时带来的工作量、试剂浪费等问题,认为最佳液料比选择在 $40 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 左右为宜。

2.2 响应面分析试验结果与数据分析

将表 2 中的试验数据在 DesignExpert 8.0.5b 软件上进行多元回归拟合和响应面分析,得出该试验方案的回归模型方差分析表(表 3)和响应面图(图 5)。

表2 Box-Behnken 中心组合设计方案及试验结果
Table 2 Box-Behnken combinational design and experimental results

实验号	盐酸浓度(A)	提取时间(B)	液料比(C)	总生物碱紫外吸收
1	1	0	-1	0.1659
2	0	1	1	0.2876
3	-1	-1	0	0.1681
4	0	-1	1	0.1709
5	0	0	0	0.3142
6	0	-1	-1	0.2394
7	-1	0	-1	0.1672
8	1	0	1	0.2214
9	0	0	0	0.3167
10	1	1	0	0.2659
11	-1	0	1	0.2587
12	-1	1	0	0.2106
13	0	0	0	0.2798
14	0	0	0	0.2986
15	0	1	-1	0.1597
16	0	0	0	0.2679
17	1	-1	0	0.1554

表3 拟合二次多项式模型的方差分析
Table 3 Variance analysis of fitted quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
Model	0.050	9	5.524×10^{-3}	7.32	0.0078	**
A	2.000×10^{-6}	1	2.000×10^{-6}	2.650×10^{-3}	0.9604	
B	4.513×10^{-3}	1	4.513×10^{-3}	5.98	0.0444	*
C	5.325×10^{-3}	1	5.325×10^{-3}	7.06	0.0326	*
AB	1.156×10^{-3}	1	1.156×10^{-3}	1.53	0.2557	
AC	3.240×10^{-4}	1	3.240×10^{-4}	0.43	0.5332	
BC	9.643×10^{-3}	1	9.643×10^{-3}	12.78	0.0090	**
A ²	0.012	1	0.012	15.83	0.0053	**
B ²	7.488×10^{-3}	1	7.488×10^{-3}	9.92	0.0162	*
C ²	6.362×10^{-3}	1	6.362×10^{-3}	8.43	0.0229	*
残差	5.282	7	7.546×10^{-4}			
失拟项	3.465×10^{-3}	3	1.155×10^{-3}	2.54	0.1945	不显著
净误差	1.817×10^{-3}	4	4.542×10^{-4}			
总差	0.055	16				
R ² =0.9040	R ² Adj=0.9278					

** 差异极显著($P < 0.01$); * 差异显著($P < 0.05$)

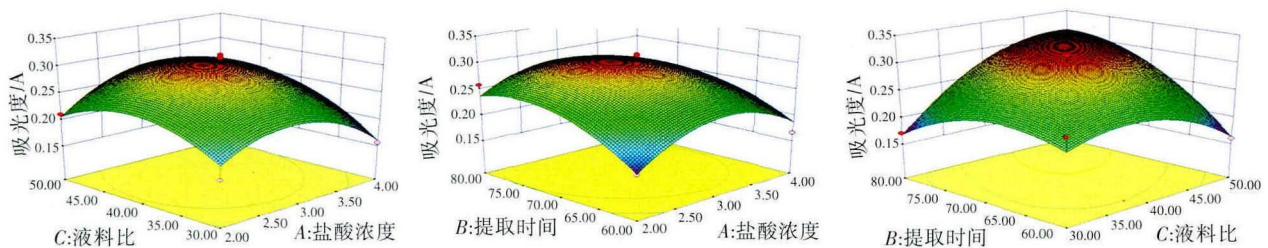


图5 各两因素交互作用对总生物碱提取效果影响的响应面
Fig. 5 Response surfaces of reciprocal effects of two factors on extraction of total alkaloids

从方差分析结果可以看出:试验模型的 $F = 7.32, P = 0.0078 < 0.01$, 证明所选用的二次多项模型具有高度的显著性; $F_{失拟} = 2.54$, 失拟项 $P = 0.1945 > 0.05$, 证明该模型失拟不显著; 模型的决定系数 $R^2 Adj$ 值为 0.9278。分析数据显示, 该模型拟合度较好, 我们可以用该模型解释 92.78% 的响应值变化, 进一步可分析和预测超声辅助提取塞北紫堇中总生物碱的提取工艺条件。

通过拟合求出影响因素的一次效应、二次效应以及交互效应的关联方程, 经多元回归拟合分析得到塞北紫堇中提取得到的总生物碱吸光度 Y 与因素变量 A (盐酸浓度)、 B (提取时间)、 C (液料比) 的二次方程模型: $Y = 0.30 + 0.0005A + 0.024B + 0.026C + 0.017AB - 0.009AC + 0.049BC - 0.053A^2 - 0.042B^2$

$-0.039C^2$ 。

表3中 $P_B = 0.0444$, $P_C = 0.0326$, $P_{BC} = 0.0090$, $P_{A*A} = 0.0053$, $P_{B*B} = 0.0162$, $P_{C*C} = 0.0229$ 均具有较高的显著性,说明上述分析结果可靠;在交互作用对目标物提取率的影响方面,结合表3及图5可以看出 B (提取时间)和 C (液料比)的交互作用最为显著,其他项之间的相对不明显。

综上所述可以推断:由于一次项 B 和 C 、二次项及交互性 BC 具有较高的显著性,可以看出提取时间、液料比以及提取时间与液料比的交互作用对超声辅助提取塞北紫堇中总生物碱的提取率有较显著影响。

依照 DesignExpert 8.0.5b 软件对试验数据进行处理后预测超声提取塞北紫堇中总生物碱的最佳工艺条件为:盐酸浓度 3.06%,提取时间 78.07 min,液料比 $47.64 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,预测在此条件下提取到的总生物碱的吸光度为 0.3147。

2.3 实验验证

根据模型预测条件和结果,本课题组进行了近似验证实验。鉴于实际操作与理论值的差异,我们将最佳工艺条件修正为:盐酸浓度 3%,提取时间 78 min,液料比 $47.5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,在此条件下提取到塞北紫堇中的总生物碱在 415 nm 处的紫外吸收为 0.3117($n=3$)。

3 结论

通过预实验验证,选用超声辅助提取塞北紫堇总生物碱,可以提高样品内分子的内能,从而达到更快析出目标物进入提取试剂中,有利于提高提取效果。根据单因素实验的结果,采用 Box-Behnken 试验设计以及响应面法分析试验数据,对提取工艺进行优化,最终得出超声辅助提取塞北紫堇中总生物碱的最优工艺条件为:盐酸浓度 3%,提取时间 78 min,液料比 $47.5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在此工艺条件下,1 g 塞北紫堇药材提取到的总生物碱在 415 nm 处的紫外吸收为 0.3117($n=3$)。该结果可以为分离纯化塞北紫堇中生物碱成分的研究提供帮助,对于工业化提取该药材中总生物碱具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 吴征镒. 西藏植物志[M]. 北京:北京科学技术出版社,1986:246.
- [2] 范彩霞. 紫堇属(*Corydalis* DC.)植物资源在藏药中的应用及其开发与保护[J]. 中国医学生物技术应用杂志,2003(1):36.
- [3] 张秀峰,王水潮. 青海紫堇属药用植物资源调查与开发利用[J]. 时珍国药研究,1997,8(6):547.
- [4] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 青海:青海人民出版社,1991:212.
- [5] 李海丽,吴彤,潘国庆. 赛北紫堇总生物碱 LD_{50} 的测定[J]. 湖北农业科学,2013,52(10):2371.
- [6] 李吉昌,董秀华,邓杰文,等. 赛北紫堇的生物碱成分研究[J]. 中药材,2010,33(10):210-213.

(责任编辑:程智强)