

响应面法优化超声辅助提取马钱子中生物碱的工艺研究

邹建国, 徐小龙, 刘燕燕, 彭海龙, 徐彪, 罗平, 肖鉴谋
(南昌大学环境与化学工程学院, 江西 南昌 330031)

摘要: 采用响应面法对超声波辅助提取马钱子中生物碱的工艺进行了优化, 在单因素试验的基础上, 选择提取溶剂中乙醇体积分数、超声功率、提取时间为随机因素, 进行三因素三水平的 Box-Behnken 中心组合设计, 采用响应面法(RSM)分析了 3 个因素对响应值的影响。结果表明, 超声波法提取马钱子中生物碱的最佳工艺条件为: 马钱子颗粒度为 20~40 目, 溶剂中乙醇体积分数为 32.3%, 溶剂 pH 值为 5, 超声功率 300W, 提取时间为 37min, 液料比为 10:1。在此条件下, 土的宁、马钱子碱的提取量分别达到 18.75、9.24mg/g, 与理论预测值基本吻合, 说明该优化方法可行。

关键词: 马钱子; 生物碱; 超声提取; 响应面法

Ultrasonic-assisted Extraction of Alkaloids from *Semen Strychni* by Response Surface Analysis

ZOU Jian-guo, XU Xiao-long, LIU Yan-yan, PENG Hai-long, XU Biao, LUO Ping, XIAO Jian-mou
(School of Environmental and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the ultrasonic-assisted extraction conditions of alkaloids from *Semen Strychni*. Based on the signal factor test, ethanol concentration, ultrasonic power and extraction time were chosen as casual factors, and a three-factor and three-level Box-Behnken central composite design leading to a set of 15 combinations of these variables was performed to attain the highest weighed value of yields of strychnine and brucine (their weighed coefficients both were 0.5). The optimal ultrasonic-assisted extraction conditions were determined as follows: particle size of *Semen Strychni* 20—40 mesh, ethanol concentration 32.3%, pH 5, ultrasonic power 300 W, ultrasonic-assisted extraction time 37 min, and ratio of liquid to solid 10:1. Under these conditions, the yields of strychnine and brucine were 18.75 mg/g and 9.24 mg/g respectively, which were consistent with the predicted values. These results demonstrate the validity of this extraction process.

Key words: *Semen Strychni*; alkaloids; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)16-0111-04

马钱子别名番木鳖, 为马钱科植物马钱(*Strychnos nux-vomica* L.)或云南马钱(*Strychnos pierriana* A.W. Hill)的干燥成熟种子, 临床上常被用于神经系统、免疫系统、心血管系统和癌症等方面疾病的治疗^[1-3]。马钱子中主要活性成分为生物碱类, 其中土的宁约占总碱的 35%~50%, 其次是马钱子碱^[4]。利用现代分离技术, 把天然产物中的有效成分提取分离出来加以科学利用, 这也是当前医药、食品和化工等领域广泛关注的热点之一。

超声辅助提取技术主要是利用超声波产生的强烈振动、高加速度、强烈空化效应及搅拌作用等, 增加植

物细胞壁的通透性, 加速药物有效成分渗透进入溶剂, 从而提高提取率, 缩短提取时间, 并且可免去高温对活性成分的影响^[5-6]。本实验采用超声波辅助方法对马钱子中生物碱的提取工艺进行研究, 并在单因素试验的基础上, 通过响应面法对其工艺条件进行优化, 旨在为制订科学、经济的马钱子生物碱制备工艺提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马钱子购于樟树市医药公司, 经本校制药工程教研

收稿日期: 2009-05-12

基金项目: 江西省自然科学基金项目(2007GZH1924)

作者简介: 邹建国(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为精细化工和天然产物有效成分的提取与分离。

E-mail: Jianguozou@163.com

室蒋以号博士鉴定为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子。

士的宁(批号: 110705-200306)、马钱子碱(批号: 0706-200104)标准品 中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-10AT 型高效液相色谱仪、SPD-10A 紫外检测器 日本岛津公司; N-2000 色谱工作站 浙江大学智达信息工程有限公司; KQ-600DB 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; SENCO 型旋转蒸发器 上海申生科技有限公司; FZ-102 微型植物粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司; TDL-4 型离心机 杭州汇尔仪器设备有限公司; FA2104 型电子天平 上海伦捷机电仪表有限公司; SHB-III B 循环水式真空泵 上海仪表(集团)供销公司。

1.3 方法

1.3.1 马钱子中生物碱的提取

马钱子生品经粉碎, 筛分, 烘干, 备用。精密称取马钱子样品 1.0g, 采用超声辅助提取法用一定浓度的酸性乙醇溶液提取马钱子中生物碱, 提取液经旋蒸浓缩后, 用无水乙醇溶解, 经离心过滤, 无水乙醇定容, 再经高效液相色谱仪分析检测, 计算出生物碱的提取量。试验分别考察了样品粒径、超声功率、超声提取时间、液料比、乙醇浓度、溶剂 pH 值等因素对提取效率的影响, 并在单因素试验的基础上, 选取乙醇体积分数(X_1)、超声功率(X_2)、超声提取时间(X_3)三个对马钱子有效成分提取率影响较大的因素, 对提取条件进行响应面分析, 对提取工艺进行优化。

1.3.2 分析检测方法

1.3.2.1 色谱条件

色谱柱为 SHIMADZU VP-ODS (150mm × 4.6mm, 4.6 μm); 流动相: A(78%)为水:乙酸:三乙胺(230:2.4:0.3), B(22%)为甲醇; 流速: 1.0ml/min, 检测波长: 254nm, 柱温: 30℃。在该色谱条件下士的宁和马钱子碱的分离度值大于 1.5, 定量方法为外标工作曲线法。理论塔板数按士的宁峰计算不低于 2000。

1.3.2.2 标准曲线的绘制

精密称取士的宁和马钱子碱对照品分别为 7.1mg 和 6.5mg, 置 25ml 容量瓶中, 加 pH9.0 的无水乙醇至刻度作为混合对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 2、4、6、8、10 μl, 注入液相色谱仪, 测定其峰面积积分值。以进样量(μg)为横坐标, 峰面积值为纵坐标绘制标准曲线。士的宁和马钱子碱的回归方程分别为: $Y=906150X+40645(r=0.9998)$ 和 $Y=472718X-53457(r=0.9996)$ 。

1.3.2.3 供试品溶液的制备

精密量取马钱子提取液 25ml, 置旋转蒸发器 40℃下减压浓缩, 用经 NaOH 试液调节 pH 值至 9.0 的 2 倍量无

水乙醇溶解样品, 低速离心机 2000r/min 离心 20min, 取上清液, 用无水硫酸钠脱水, 过滤, 用 pH9.0 的无水乙醇定容至 25ml, 混匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 备用。精密吸取各供试品溶液 5 μl, 按上述给定的条件测定峰面积, 以回归方程计算含量。

2 结果与分析

2.1 单因素试验对马钱子有效成分提取条件的优化

根据单因素条件试验, 在影响马钱子有效成分提取的工艺条件中, 初步选定马钱子颗粒度 20~40 目、液料比 10:1、乙醇体积分数 25%、溶剂 pH 值为 5、超声功率 300W、超声提取时间 30min 作为最佳提取条件。

2.2 工艺评价指标

采用多指标试验设计进行工艺优选时, 通常可针对指标间的重要性差异给出不同的权重, 综合评分后再进行统计分析。在本实验中以士的宁、马钱子碱作为马钱子的主要有效成分, 其权重系数均设为 0.5。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化, 再给出不同的统计权重。其工艺评价指标如下式所示:

综合指标 = $(0.5 \times 100 / \text{样品最大士的宁含量}) \times \text{士的宁含量} + (0.5 \times 100 / \text{样品最大马钱子碱含量}) \times \text{马钱子碱含量}$

2.3 响应面法优化马钱子有效成分提取工艺

2.3.1 响应面分析方案及试验结果

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Variables and levels in the three-variable/three-level response surface design

水平	因素		
	乙醇体积分数(%)	超声功率(W)	提取时间(min)
-1	0	240	20
0	25	300	30
1	50	360	40

表 2 响应面分析方案及其计算分析结果

Table 2 Arrangement and results of the three-variable/three-level response surface central composite design

试验号	乙醇体积分数(%)	超声功率(W)	提取时间(min)	士的宁含量(mg/g)	马钱子碱含量(mg/g)	综合指标
1	1	-1	0	14.88	7.16	79.28
2	-1	-1	0	13.40	6.57	72.06
3	0	0	0	17.98	8.99	97.64
4	-1	0	-1	14.27	6.68	75.01
5	0	-1	-1	15.47	7.51	82.78
6	0	0	0	18.45	8.93	98.58
7	-1	1	0	13.40	6.69	72.72
8	0	-1	1	16.93	7.79	88.25
9	0	1	-1	16.35	7.98	87.72
10	1	1	0	16.89	7.35	85.74
11	1	0	1	18.04	8.46	94.91
12	0	0	0	18.53	9.15	100.0
13	1	0	-1	17.49	8.53	93.81
14	0	1	1	17.54	8.60	94.32
15	-1	0	1	14.61	6.92	77.24

为优化超声辅助提取马钱子中生物碱的工艺条件,根据 Box-Behnken 试验设计原理,在单因素试验基础上,精密称取 1.0g 马钱子样品于具塞锥形瓶中,选取乙醇体积分数(X_1)、超声功率(X_2)、提取时间(X_3)三个对马钱子有效成分提取率影响较大的因素,对提取工艺进行响应面分析,其具体试验方案及结果见表 1、2。

2.3.2 模型的建立及其显著性检验

利用 Design-Expert 软件对表 2 试验数据进行二次多项式逐步回归拟合,得到的数学模型为:

$$Y=98.74+7.089X_1+2.266X_2+1.925X_3+1.450X_1X_2-0.283X_1X_3+0.283X_2X_3-12.16X_1^2-9.132X_2^2-1.340X_3^2$$

模型的可靠性可从方差分析及相关系数来考察。从表 3 方差分析结果可知,模型的 $F=15.03 > F_{0.01(9, 5)}=10.2$, $P=0.004079 < 0.01$,说明本试验所选用的二次多项模型具有高度的显著性。在总的作用因素中,回归方程一次项、二次项的 F 值均大于 $F_{0.01(3, 5)}$,表明这 2 项均具有很高的显著性;交互项的 F 值小于 $F_{0.05(3, 5)}$,说明这 3 因素之间的交互作用不大。失拟项在 $P=0.05$ 水平上不显著($P=0.08838 > 0.05$),其决定系数 $R^2=0.9644$,响应值的变化有 96.44% 来源于所选因素,说明该模型能很好地描述试验结果,仅有约 3.55% 的综合指标总变异不能由此模型进行解释。可以用此模型来分析和预测超声波提取马钱子有效成分的工艺结果。

表 3 回归模型各项的方差分析
Table 3 Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1277.2	9	141.9	15.03	0.004079
一次项	472.73	3	157.58	16.69	< 0.01
二次项	860.23	3	286.74	30.38	< 0.01
交互项	9.05	3	3.02	0.32	> 0.05
失拟项	44.37	3	14.79	10.49	0.08838
纯误差	2.82	2	1.41		
残差	47.19	5	9.44		
总和	1324.4	14			

2.3.3 提取工艺的响应曲面分析与优化

比较图 1~3 可知,乙醇体积分数、超声功率对马钱子生物碱提取效果的影响较为显著,表现为曲线较陡,随着乙醇体积分数、超声功率的增加或减小,响应值变化较大,最佳值在乙醇体积分数为 32.33%,超声功率 309.5W;提取时间对响应值的影响较小,曲线较为平滑,其数值的增加或减少,对响应值变化较小,最佳值为提取时间 37.04min。在此条件下,马钱子有效成分的综合指标可达到 100.6。但考虑到实际操作的局限性,并结合表 3 方差分析的结果,将马钱子提取工艺条件修正为乙醇体积分数 32.3%、超声功率 300W、提取时间 37min。

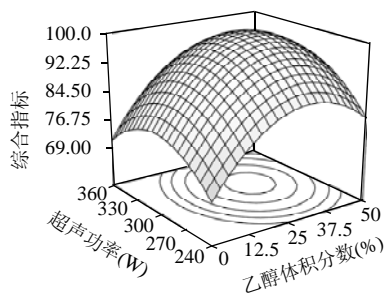


图 1 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面和等高线图

Fig.1 Response surface and contour for the weighed value of yields of strychnine and brucine as a function of ultrasonic power and ethanol concentration

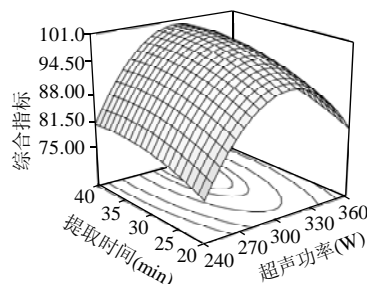


图 2 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面和等高线图

Fig.2 Response surface and contour for the weighed value of yields of strychnine and brucine as a function of extraction time and ethanol concentration

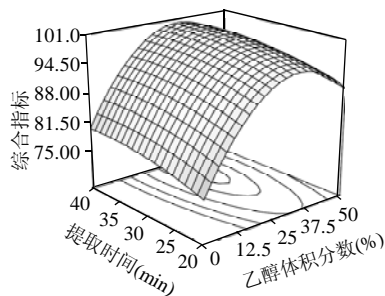


图 3 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面和等高线图

Fig.3 Response surface and contour for the weighed value of yields of strychnine and brucine as a function of extraction time and ultrasonic power

在此修正条件下进行了 3 次重复验证实验,士的宁、马钱子碱的提取量平均值分别达到 18.75mg/g 和 9.24mg/g,综合指标为 101.1,与理论预测值基本吻合,表明响应面分析的优化结果与实际值相吻合,具有一定的实用价值。

2.4 超声辅助提取与热回流提取法的比较

表 4 超声辅助提取与热回流提取结果对比
Table 4 Comparison between ultrasonic-assisted extraction and hot reflux extraction of alkaloids of *Scmen Strychni*

提取方式	样品质量(g)	乙醇体积分数(%)	提取时间(min)	士的宁提取量(mg/g)	马钱子碱提取量(mg/g)
超声波提取	1.0	32.3%	37	18.75	9.24
热回流提取	5.0	65%	180	19.02	8.53

使用同一批样品,在各自的最佳实验条件下分别进行3次实验,对比研究了超声波辅助提取和溶剂热回流提取^[7]马钱子有效成分的收率,条件及结果见表4。

由表4可知,超声辅助提取37min所得到的马钱子生物碱的提取率与溶剂热回流提取180min的提取率相当;而在提取速率方面,超声提取要远远高于溶剂热回流提取,若以提取生物碱量与提取时间的比值作为提取速率的表示方法,超声波的提取速率是热回流提取的4.9倍。由此可见,超声波辅助提取可以明显提高生产效率,降低提取温度,减小能量消耗,经济效益明显。

3 结 论

3.1 采用响应面法对超声波辅助提取马钱子中生物碱工艺条件进行优化,得到最佳的提取工艺条件为:马钱子颗粒度为20~40目,乙醇体积分数为32.3%,溶剂pH值为5,提取时间为37min,超声功率300W,液料比为10:1,土的宁、马钱子碱提取量分别可达18.75mg/g

和9.24mg/g。

3.2 超声波辅助提取马钱子中生物碱技术与传统热回流提取方法相比较,超声波辅助提取可以明显提高生产效率,降低提取温度,减小能耗,具有较为良好的经济效益前景。

参考文献:

- [1] 魏世超,徐丽君,张秀桥.马钱子总生物碱对大鼠佐剂性关节炎的作用[J].中国药理学通报,2001,17(4):479-480.
- [2] 邓旭坤,蔡宝昌,殷武,等.Brucine对Heps荷瘤小鼠的抗肿瘤作用和毒性的研究[J].中国药理学通报,2006,22(1):35-39.
- [3] 魏宁,张松伟.马钱子的研究进展[J].航空军医,2004,32(3):131-133.
- [4] 欧明,林励,李衍文.简明中药成分手册[M].北京:中国医药科技出版社,2003:50-51.
- [5] 高蓉,陈练洪,李稳宏,等.超声法提取化香树果序中黄酮类化合物工艺[J].化学工程,2007,35(8):65-73.
- [6] 徐怀德.天然产物提取工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2006:51-52.
- [7] 段晓颖.正交试验法优选马钱子醇提工艺研究[J].中国现代应用药学杂志,2007,24(5):375-377.