

葛根素超临界 CO₂ 抗溶剂结晶模型建立

张文成

(合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥

230009)

摘 要: 选择葛根提取物(葛根素含量 10%)为实验原料, 采用超临界 CO₂ 抗溶剂结晶法进行高效提纯葛根素研究。具体考察压力、温度、时间的影响, 并采用高效液相色谱法检测样品纯度。采用响应曲面法对超临界 CO₂ 抗溶剂结晶葛根素的三个主要工艺参数压力、温度和时间进行了实验设计, 并建立了相关数学模型, 结果表明实际值与模型预测值偏差为 3.37%。

关键词: 超临界 CO₂; 抗溶剂结晶; 葛根素; 响应曲面法

Supercritical CO₂ Anti-solvent Crystallizing Puerarin Modeling

ZHANG Wen-cheng

(Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei

230009, China)

Abstract: With extract of pueraria as experimental material, by the supercritical CO₂ anti-solvent technology the puerarin was purified. The effects of crystallization pressure, temperature and time were studied, and the purity of puerarin was detected with high performance liquid chromatography. The model of purification of puerarin about crystallization pressure, temperature and time was established with response surface methodology (RSM). Results showed that the relative deviation of actual value to predicted value was 3.37%.

Key words supercritical CO₂ anti-solvent; puerarin; purification; response surface methodology

中图分类号: TS272

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0250-03

葛根素(puerarin)是由豆科植物野葛(*Pueraria lobata*)、甘葛藤(*Puerarin thomsonii*)根中提取的一种黄酮苷。葛根素化学名为8-C-β-D-葡萄糖基-7,4'-二羟基异黄酮(8-C-β-D-Glucopyranosyl-7,4'-hydroxyisoflavone), 异名葛根黄素^[1], 分子式为 C₂₁H₂₀O₉, 分子量 416.37。近代药理研究证明, 葛根中所含有效成分葛根总黄酮(以葛根素为代表)具有降低心肌耗氧量, 增加冠脉、脑血管血流量, 明显缓解心绞痛, 抗心律失常等药理作用^[2]。

目前葛根素的分离纯化方法很多, 但主要可归结为溶剂法、铅盐法、柱层析法及溶剂结晶法等^[3-7]。这些方法各有其优点也各有其缺点。水提法、铅盐沉淀法、醇提法主要用于葛根黄酮粗提物的制备, 所得葛根素的纯度较低; 葛根素的分离纯化大都以溶剂萃取、色谱分离或溶剂结晶为主要手段。因此, 葛根素的高效纯化方法或工艺已受到业界高度关注。为此, 作者尝试采用超临界 CO₂ 抗溶剂(supercritical CO₂ anti-solvent, SAS)^[8] 结晶方法进行高效分离葛根素研究。

鉴于 SAS 结晶葛根素工艺条件内存在一定的协同或

拮抗关系。为了寻求超临界 CO₂ 抗溶剂结晶较佳分离工艺条件, 作者以葛根黄酮提取物(葛根素含量约 10%)为原料, 乙醇为溶媒, 采用响应曲面分析法(response surface methodology, RSM)^[9], 对影响抗溶剂结晶的三个主要参量: 结晶压力、温度和时间进行试验设计, 拟找出它们对纯化葛根素的作用规律, 建立相关工艺模型, 并进行实验结果的验证。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

葛根黄酮提取物(葛根素含量约为 10%) 合肥拓峰生物工程有限公司; 葛根素对照品 中国药品生物制品检定所; 乙醇(分析纯)、甲醇(色谱纯) 江苏淮安恒天有限公司。

HPLC 检测仪(2487 紫外检测器) 美国 Waters 公司。

1.2 方法

采用 RSM-Design-Expert 6.0.10 中的 Box-Behnken 法, 对抗溶剂结晶葛根素的三个主要工艺参数结晶压

收稿日期: 2007-08-05

基金项目: 教育部科技创新工程重大项目培育基金项目(704027); 国家自然科学基金资助项目(29976008)

作者简介: 张文成(1973-), 男, 副研究员, 博士后, 主要从事超临界流体结晶新方法研究。

力、温度和时间进行试验设计,建立超临界CO₂抗溶剂结晶葛根素关于纯度的实验模型,并进行验证。

葛根素纯度检测方法参照中华人民共和国药典^[10]。

1.3 响应曲面(RSM)试验设计

采用Box-Behnken方法,以结晶压力、温度、时间三个因子为自变量,分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 表示,并根据现有试验条件、研究经验及研究报道,其取值范围确定为10~22MPa、40~70℃和1~3h。按方程 $X_i = (x_i - x_0) / \Delta x$ 对自变量进行编码(X_i 为自变量的编码值, x_i 为自变量的真实值, x_0 为实验中心点处自变量的真实值, Δx 为自变量的变化步长),并以自变量的编码值+1、0、-1分别代表自变量的高、中、低水平。葛根素的纯度Y为响应值,试验自变量因素编码及水平见表1。

表1 试验自变量因素编码及水平
Table 1 Code and level of factors chosen for trials

自变量因素	编码及水平		
	-1	0	+1
压力 x_1 (MPa)	10	16	22
温度 x_2 (℃)	40	55	70
时间 x_3 (h)	1	2	3

$$X_1 = (x_1 - 6) / 2; X_2 = (x_2 - 55) / 15; X_3 = (x_3 - 3) / 2$$

假设由最小二乘法拟合的二次多元回归方程(模型)为:

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^n B_i X_i + \sum_{i=1, j=1}^n B_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

上式中, $n=3$,则方程(1)可转换为:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 \quad (2)$$

式中, B_0 为常数项; B_1 、 B_2 、 B_3 分别为线性系数; B_{12} 、 B_{13} 、 B_{23} 为交互项系数; B_{11} 、 B_{22} 、 B_{33} 为二次项系数。为了求得此方程的各项系数,至少须17组试验来求解,试验设计及结果见表2。利用统计软件Design-Expert 6.0.10来进行试验设计与数据分析。

2 结果与分析

2.1 纯化工艺模型建立及其显著性检验

试验结果见表2。

利用Design Expert软件对表2试验数据进行回归分析,得二次多元回归方程(模型)为:

$$Y = 51.02 + 3.83X_1 - 5.94X_2 + 0.80X_3 - 1.77X_1^2 - 1.92X_2^2 - 2.82X_3^2 + 0.14X_1X_2 + 0.30X_1X_3 + 0.05X_2X_3 \quad (3)$$

对该模型进行方差分析,结果见表3。

由表3回归模型方差分析(ANOVA)可以看出, $F_{\text{回归}} = 3050.51 > F_{0.01}(9, 4) = 14.66$, p 值 < 0.0001 表明模型极其显著,不同处理间的差异极显著。

图1为表3中影响纯度响应值Y的实验值相对回归

表2 试验设计与结果
Table 2 Test designs and results

试验号	自变量编码值			响应值Y	
	X_1	X_2	X_3	实验值	预测值
1	0	+1	-1	39.46	39.62
2	-1	-1	0	49.57	49.57
3	+1	0	-1	49.18	49.03
4	+1	+1	0	45.34	45.35
5	0	-1	-1	51.33	51.34
6	-1	0	+1	43.07	43.23
7	0	0	0	51.01	51.02
8	0	-1	+1	52.99	52.84
9	0	0	0	51.13	51.02
10	+1	-1	0	57.05	56.94
11	+1	0	+1	51.22	51.23
12	0	+1	+1	41.32	41.32
13	-1	+1	0	37.31	37.17
14	0	0	0	50.97	51.02
15	-1	0	-1	42.23	42.23
16	0	0	0	51.05	51.02
17	0	0	0	50.92	51.02

表3 纯度回归模型方差分析表
Table 3 Analysis of variance for regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F比	p值(显著水平) (Prob>F)
模型	473.96	9	52.66	3050.51	<0.0001
残差	0.12	7	0.017		
失拟	0.095	3	0.032	4.98	0.0775
误差	0.026	4	6.380E-003		
总和	474.08	16			
模型的确定系数		模型的调整确定系数			
R ² =0.9997		Adj R ² =0.9994			

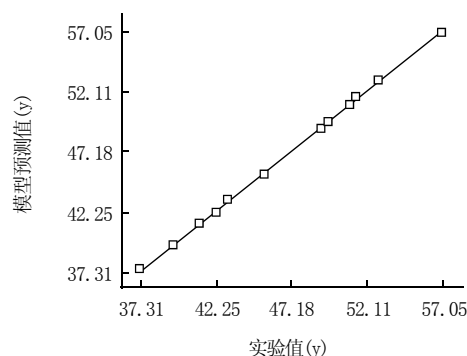


图1 实验值与模型预测值对照图

Fig.1 Contrast between trial values and predicted values

方程预测值的偏离情况对照图例。在设定的17组实验中最小响应值为37.17,最大值为56.94;预测值与实验值之间的最大偏差为:

$$\text{最大偏差} = \frac{|\text{实验值} - \text{预测值}|}{\text{实验值}} \times 100\%$$

$$= \frac{|41.32 - 41.19|}{41.32} \times 100\% = 3.15\%$$

即最大偏差为 3.15%。从这一方面说明采用响应曲面法(Design-Expert 6.0.10)建立超临界CO₂抗溶剂结晶提纯葛根素模型是可行的。

2.2 模型的检验

为了更好的把超临界CO₂抗溶剂结晶提纯葛根素应用于实践中,对上述数学模型中的参数进行验证实验,以获得较优的回归模型。由模型分析,优选出10组数据,表4统计了按回归模型(1)所预测的10组纯化工艺参数的验证结果。

表4 回归模型所优化的10组工艺参数的验证结果

Table 4 Verified results of optimum ten groups from regression equation

实验号	自变量			响应值(Y ₀ 值)		相对误差
	x ₁ (比值)	x ₂ (°C)	x ₃ (h)	响应预测值	实验值	
1	6.61:1	45.85	2.85	54.82	51.98	5.18
2	5.14:1	55.44	3.14	48.90	50.44	3.15
3	5.65:1	46.93	1.43	50.64	51.27	1.25
4	7.79:1	44.52	2.89	56.08	54.40	2.99
5	7.54:1	54.67	3.87	52.95	52.65	0.56
6	6.93:1	58.62	3.14	50.93	54.43	6.87
7	5.72:1	47.23	3.41	53.05	55.54	4.70
8	7.15:1	69.20	1.21	41.57	42.34	1.87
9	7.19:1	52.51	1.42	51.31	51.33	0.04
10	6.36:1	51.26	1.50	52.79	48.43	7.11

从表4可以看出:按照该10组工艺参数进行超临界CO₂抗溶剂结晶提纯葛根素实验,纯度的平均相对误差为3.37%。

3 结 论

3.1 首次将响应曲面分析法(RSM)用于建立超临界CO₂

抗溶剂结晶提纯葛根素工艺模型,从模型的直观示图就能获得工艺参数的大概的取值范围,有利于工艺参数的选择和工艺条件的优化,获得良好的结果。

3.2 由响应曲面法(RSM)获得的超临界CO₂抗溶剂结晶提纯葛根素的优化工艺条件,实验模型验证的平均相对误差为3.37%,证明应用响应曲面法(RSM)优选的超临界CO₂抗溶剂结晶提纯葛根素的数学模型是可行的。

总之,采用上述分离纯化模型可以优选超临界CO₂抗溶剂结晶葛根素工艺参数,为超临界CO₂抗溶剂结晶技术开发高纯度葛根黄酮,特别单一化合物——葛根素提供基础数据。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993.
- [2] 安伟建, 夏光成, 郭瑞. 不同产地葛根总黄酮含量的比较(简报)[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(6): 339.
- [3] 郭建平, 孙其荣, 周全, 等. 葛根总黄酮不同提取工艺的探讨[J]. 中草药, 1995, 26(10): 522-524.
- [4] 李石生, 邓京振, 刘欣, 等. 野葛藤茎的异黄酮类化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(1): 31-33.
- [5] 潘妮婕, 刘谦光. 酸水解法从葛根中提取分离葛根素和大豆苷元[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(6): 66-69.
- [6] RONG H J, STEVENS J F, DEINZERETAL M L. Identification of isoflavones in the roots of pueraria lobata[J]. Planta Medica, 1998, 64: 620.
- [7] 赵爱平. 葛根素及其提取方法和用途[P]. 中国专利: N1129700A[P]. 1996-08-28.
- [8] WERLING J O, DEBENEDETTI P G. Numerical modeling of mass transfer in the supercritical antisolvent process: miscible conditions[J]. J Supercrit Fluids, 2000, 18(1): 11-24.
- [9] AMBATI P, AYYANNA C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(4): 331-335.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:化学工业出版社, 2000.



医学人员研究发现真空包装更易产生细菌

在人们的印象中,真空包装食品由于断绝了与空气接触的机会,所以不会轻易滋生细菌,但美国最新一期的《生物医学中心》月刊的一项最新研究报告称,真空包装食品其实更容易为一种导致食物中毒的病菌提供有利的繁殖环境。

丹麦技术大学的生物医学人员研究发现,一种可以导致食物中毒的病菌——李氏杆菌喜欢在无氧环境中生存。而真空包装食品与氧气隔离,在这种无氧环境下,李氏杆菌会比正常情况下高出100多倍,从而导致食物中毒。与其他许多食品滋生的细菌不同,李氏杆菌即使在冰箱的温度环境中也能繁殖。

美国食品和药品管理局(FDA)指出,可能滋生这种细菌的食品包括火腿、生牛乳、午餐肉、软质熟干酪、生肉和熟肉、未经烹煮的家禽、生鱼和熏鱼等。