

响应面法优化延胡索生物碱乙醇提取工艺研究



SHANG Xiao-jin

商小金, 钱俊青*, 郭辉

(浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

摘 要: 为了提高中药延胡索的利用率, 采用响应面法优化其生物碱的提取工艺。考察了不同反应条件对延胡索生物碱得率以及生物碱纯度的影响。在单因素试验基础上, 以生物碱得率为指标, 通过响应面法对提取工艺条件进行优化。得到的优化条件为: 提取时间 116 min, 提取温度 49 ℃, 乙醇体积分数 80%, 乙醇用量 10 mL/g (以延胡索计)。在此条件下提取 3 次, 生物碱得率为 0.598%, 其纯度为 17.38%。

关键词: 延胡索; 生物碱; 响应面法; 提取

中图分类号: TQ351

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2010)02-0032-05

Optimization of Extraction of Alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by Response Surface Methodology

SHANG Xiao-jin, QIAN Jun-qing, GUO Hui

(Pharmaceutical College, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: For improving the yield of alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang, response surface methodology was adopted to optimize the extraction process. The effects of different parameters on yield and purity of alkaloid were studied. Based on response surface methodology, the extraction conditions on the basis of single factor experiment using alkaloid yield as index were optimized. The optimal conditions were: extraction time 116 min, extraction temperature 49 ℃, 80% (volume fraction) EtOH as solvent, EtOH dose 10 mL/g (based on raw material). Under optimal conditions, the yield of alkaloids and purity were 0.598% and 17.38% respectively, after three times extraction.

Key words: *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang; alkaloids; response surface; extraction

延胡索是罂粟科植物延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 的干燥块茎。具有活血化瘀、理气止痛的功效, 其主要活性成分为生物碱^[1], 目前从延胡索中已经分离出 20 多种生物碱^[2], 其中, 以延胡索乙素的镇痛作用最强^[3], 延胡索总生物碱具有抗溃疡、抑制胃酸分泌、解痉及增加冠脉血流量^[4], 抗心肌缺血等作用^[5]。近年来, 有关延胡索戒毒作用方面的研究也有很多^[6]。延胡索总生物碱在酸水或乙醇中有较好的溶解性能。文献报道, 采用冷浸法、渗漉法、热回流法分别提取延胡索生物碱, 其中冷浸法和渗漉法的溶剂用量大, 操作周期远长于回流法, 乙醇热回流法不仅提取得率高, 而且节省溶媒, 工艺稳定^[7]。延胡索是著名的“浙八味”之一, 浙江省农村普遍种植, 年产量近 2 000 t。然而人工种植的延胡索中生物碱含量不稳定且低于野生延胡索生物碱含量, 因此对其进行提取纯化以提高并稳定其制剂中生物碱含量, 有利于增强以延胡索为主药药品的药效。本实验以延胡索生物碱得率和生物碱纯度为指标, 首次采用 3 因素 3 水平响应面法优化延胡索生物碱醇提的工艺。重复性实验中, 不仅考察了生物碱得率和生物碱纯度两个指标, 并以高效液相色谱法测定了延胡索乙素的含量, 证实本工艺稳定、可行。

收稿日期: 2009-06-12

基金项目: 浙江省教育厅科技项目 (20060808)

作者简介: 商小金 (1982-), 女, 浙江建德人, 硕士, 主要从事天然产物分离纯化研究工作

* 通讯作者: 钱俊青, 博士生导师, 研究领域为天然产物分离纯化。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

旋转蒸发器;数显恒温水浴锅;紫外可见分光光度计 752 型;电子天平;Agilent 1200 系列高效液相色谱仪;延胡索药材;延胡索乙素对照品;甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 延胡索生物碱的提取

称取 10 g 延胡索粉末,置于 250 mL 圆底烧瓶中,按照实验方案,乙醇为溶剂,保温回流提取,过滤,收集滤液,于 45 °C 真空回收乙醇得到膏状物,备用。提取过程中的主要考察因素为乙醇体积分数、提取温度、提取时间、提取次数和乙醇用量。

1.3 延胡索生物碱含量的测定

1.3.1 标准曲线的绘制 精密称取延胡索乙素对照品 3.6 mg,加入 5 滴 H_2SO_4 ,以 70 % (体积分数,下同)乙醇溶解,并定容至 25 mL,即得延胡索乙素对照品溶液,质量浓度为 0.144 g/L。分别精密吸取对照品溶液 0.5、1、2、3、4 mL 置于分液漏斗中,加入溴甲酚绿 5 mL,pH 值 4.0 缓冲液 15 mL,分别用二氯甲烷 20 mL 萃取 2 次,每次振荡 2 min,静置 0.5 h,合并萃取液,二氯甲烷定容至 50 mL。以二氯甲烷溶液为空白,在波长 414 nm 处测吸光度。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,得到回归方程: $Y = 0.1003X + 0.0247, R^2 = 0.9991$,在 1.44~11.52 mg/L 范围内,质量浓度与吸光度呈良好的线性关系。

1.3.2 样品生物碱含量的测定 将 1.2 节中所得膏状物用 70 % 乙醇溶解,准确移取溶液 1 mL,按照 1.3.1 节进行,测定 414 nm 处的吸光度(A)。

延胡索生物碱得率(Y_1)是指提取所得的生物碱的质量占药材质量的百分比。可用下式计算:

$$Y_1 = (A - 0.0247) \times n / (0.1003 \times m) \times 100 \%$$

延胡索生物碱纯度可用下式计算:

$$Y_2 = (A - 0.0247) \times n / (0.1003 \times m_1) \times 100 \%$$

式中:A—吸光度; m —延胡索粉末的质量,mg; m_1 —膏状物的质量,mg; n —稀释倍数。

1.4 延胡索乙素含量的测定

1.4.1 色谱条件^[8] 色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C18;流动相:甲醇-0.1 % 磷酸溶液(三乙胺调至 pH 值 6.09)(体积比为 55:45);柱温 25 °C;流速 1.0 mL/min;检测波长为 280 nm。

1.4.2 标准曲线的制备 精密称取延胡索乙素对照品,少量甲醇溶解,转移入 25 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀。分别吸取 1、2、3、4、5 mL,稀释至 10 mL,按上述色谱条件测定。以峰面积与对照品浓度进行线性回归,得回归方程:

$$y = 10228x - 29.55, R^2 = 0.9997$$

1.4.3 样品延胡索乙素含量的测定 取优化条件下所得膏状物用甲醇溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,按 1.4.1 节色谱条件测定峰面积。根据线性回归计算其浓度,进而计算出含量。延胡索乙素纯度 $Y = (A_1 + 29.55) \times n_1 / (10228 \times m_1) \times 100 \%$ 。式中: A_1 —峰面积; n_1 —稀释倍数。

2 结果与讨论

2.1 乙醇提取延胡索生物碱工艺的单因素试验

2.1.1 提取温度对生物碱得率及纯度的影响 按照试验方法,考察不同提取温度对生物碱得率及纯度的影响。结果如图 1(a)所示。由图 1(a)可知,提取温度在 25~55 °C 范围内,生物碱得率随着温度的升高而增加,25~45 °C 时增长速度最快,随着温度的继续升高,增长速率逐渐放缓。当温度为 55~65 °C 时,生物碱得率反而略有降低。25~45 °C 时,生物碱的纯度随着提取温度的升高而增加,当超过 45 °C 后,纯度反而随着温度的增加而降低。这是因为温度升高后,不仅生物碱的溶出量增加,其它成分的溶出也大大增加,导致了生物碱纯度的降低。考虑两方面因素,选择 45 °C 为较适宜温度。

2.1.2 提取时间对生物碱得率及纯度的影响 由图1(b)可知,生物碱的得率随着提取时间的增加而增加。提取时间为30 min时,乙醇与延胡索中的生物碱浓度存在高浓度差,传质动力大,生物碱浸出速度快。随着时间的继续增加,生物碱得率的增加趋势慢慢放缓。这是因为两个体系浓度梯度下降,生物碱浸出缓慢。图中显示,生物碱纯度先是随着时间的增加而增加,随后呈下降趋势,在90~120 min范围内,下降趋势减缓,后大幅下降。这是因为随着时间的延长,延胡索中的其它物质大量溶出,影响了生物碱的纯度。提取时间过短,生物碱来不及溶出,得率较低,而提取时间过长,影响生物碱纯度。120 min为较适宜的提取时间。

2.1.3 乙醇体积分数对生物碱得率及纯度的影响 由图1(c)可知,当乙醇体积分数从60%增至80%时,生物碱得率呈增加趋势,超过80%以后,生物碱得率随着乙醇体积分数的提高反而下降。这是因为延胡索生物碱主要分为季胺型生物碱和叔胺型生物碱两种,乙醇体积分数增加后,季胺型生物碱的溶出逐渐减少。总体上,生物碱纯度随着乙醇体积分数的增加而增加。考虑上述两个因素以及成本因素,80%乙醇为较好的提取溶剂。

2.1.4 乙醇用量对生物碱得率及纯度的影响 由图1(d)可知,随着乙醇用量的增加,生物碱得率也逐渐增加。而生物碱的纯度随着乙醇用量的增加呈现先增加后缓慢降低的过程。总体上,乙醇用量对生物碱纯度影响不大。考虑生物碱得率、溶剂使用成本以及溶剂回收等因素,每克延胡索乙醇用量为10 mL/g较为合适。

2.1.5 提取次数对生物碱得率及纯度的影响 如图1(e)所示,提取次数为1~3次时,生物碱得率大幅增加,但超过3次后,生物碱得率增加缓慢。生物碱纯度随着提取次数的增加先缓慢增加后降低,超过4次后大幅下降。考虑到生物碱得率、纯度、溶剂使用回收以及生产周期等问题,提取3次为宜。

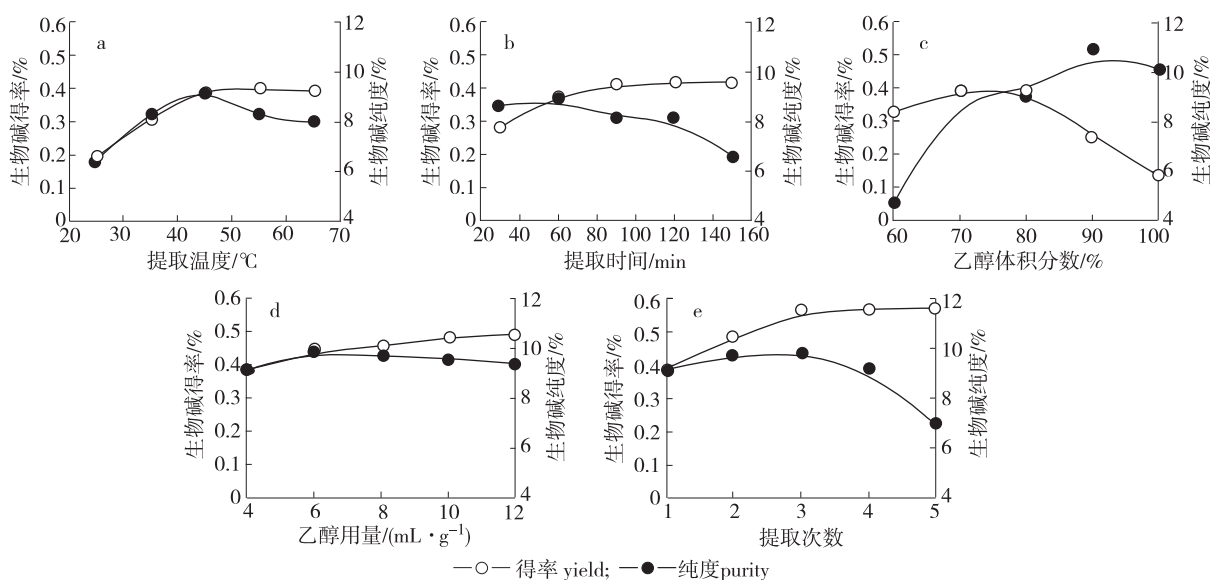


图1 不同反应条件对生物总碱得率及纯度的影响

Fig. 1 Effects of different reaction conditions on yield and purity of alkaloids

2.2 乙醇提取延胡索生物碱工艺的响应面优化

2.2.1 响应面表头设计 由乙醇提取延胡索生物碱工艺的单因素试验结果可知,乙醇用量对生物碱得率及纯度的影响较小,提取温度、提取时间以及乙醇体积分数的影响较为明显。因此,在响应面优化中,对提取时间、提取温度、乙醇体积分数3个因素进行了优化,见表1。

2.2.2 响应面分析试验结果及方差分析 以生物碱得率为指标,对提取时间、提取温度以及乙醇体积分数3个因素响应面优化的试验结果及方差分析见表2、表3。

表 1 响应面 3 因素 3 水平试验设计

Table 1 Experimental design of RSM with 3 factors and 3 levels

水平 levels	X_1 提取时间/min extraction time	X_2 提取温度/°C extraction temperature	X_3 乙醇体积分数/% ethanol volume fraction
-1	90	35	70
0	120	45	80
1	150	55	90

表 2 响应面设计及结果

Table 2 Design and results of the response surface methodology

试验号 No.	X_1	X_2	X_3	生物碱得率/% alkaloid yield
1	-1	-1	0	0.434
2	-1	+1	0	0.533
3	+1	-1	0	0.394
4	+1	+1	0	0.583
5	0	-1	-1	0.462
6	0	-1	+1	0.404
7	0	+1	-1	0.523
8	0	+1	+1	0.496
9	-1	0	-1	0.515
10	+1	0	-1	0.545
11	-1	0	+1	0.420
12	+1	0	+1	0.433
13	0	0	0	0.605
14	0	0	0	0.598
15	0	0	0	0.599

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

来源 sources	df	SS	F	P
X_1	1	0.000351	0.407961	0.551112
X_2	1	0.02431	28.24514	0.003154
X_3	1	0.010658	12.38318	0.016938
X_1^2	1	0.0107	12.43246	0.016812
X_1X_2	1	0.002025	2.352782	0.185642
X_1X_3	1	0.000072	0.083945	0.783651
X_2^2	1	0.013664	15.87588	0.010484
X_2X_3	1	0.00024	0.279139	0.619867
X_3^2	1	0.017367	20.17863	0.006447
模型 model	9	0.073912	9.54171	0.011502
误差 error	5	0.004303	0.000861	
合计 total	14	0.078215		

由表 3 回归模型系数显著性检验结果可知,模型的一次项 X_2 极显著, X_3 显著,二次项 X_3^2 极显著, X_1^2, X_2^2 显著,交互项影响不显著。表明各影响因素对于生物碱得率的影响不是简单的线性关系。

2.2.3 响应面两项交互影响分析 分别保持提取时间、提取温度、乙醇体积分数这 3 个变量中的一项为常量,绘制其他两项与生物碱得率的三维响应面,如图 2 所示。

回归方程为:

$$Y_1 = -5.31644 + 0.012335X_1 + 0.045062X_2 + 0.104296X_3 - 0.00006X_1^2 + 0.000075X_1X_2 - 0.000014X_1X_3 - 0.000608X_2^2 + 0.000078X_2X_3 - 0.000686X_3^2$$

方差分析结果显示,本实验所选用模型显著($P = 0.0115 < 0.05$),拟合度好,预测值和实测值之间具有高度的相关性,仅有约 5.5% 的变异不能由该模型解释($R^2 = 0.9450$)。根据响应面图及回归方程

可得,以生物碱得率为指标时提取生物碱的最佳条件为:当 $X_1 = -0.1407$, $X_2 = 0.3924$, $X_3 = 0.2275$ 时, Y_1 有极大值 0.61, 此时 $X_1 = 115.8 \text{ min}$, $X_2 = 48.9 \text{ }^\circ\text{C}$, $X_3 = 82.3 \%$, 为方便操作, 故选择优化的条件为提取时间 116 min, 提取温度 $49 \text{ }^\circ\text{C}$, 乙醇体积分数为 80%。

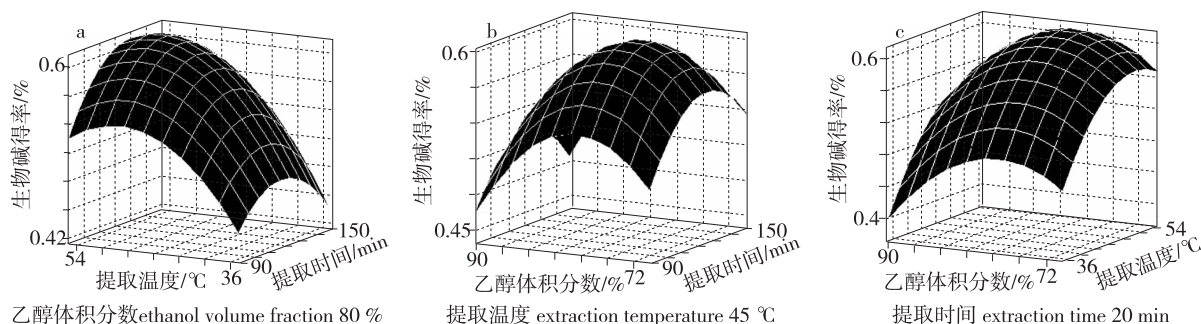


图2 不同因素对生物碱得率的响应面图

Fig. 2 Response surface plots of alkaloid yield by different factors

2.3 验证实验

将优化条件:提取时间 116 min、提取温度 $49 \text{ }^\circ\text{C}$ 、乙醇用量 10 mL/g(以延胡索计)、乙醇体积分数 80%、提取次数 3 次,进行两次重复实验,测定生物碱得率、生物碱纯度以及按照色谱条件测定延胡索乙素的纯度,结果见表 4。

表4 验证试验的结果

Table 4 Results of verifying experiment

序号 No.	生物碱得率/% alkaloid yield	生物碱纯度/% alkaloid purity	延胡索乙素纯度/% tetrahydropalmatine purity
1	0.601	17.45	1.72
2	0.595	17.31	1.78
平均值 mean value	0.598	17.38	1.75
相对标准偏差 RSD/%	0.50	0.40	1.71

3 结论

3.1 响应面试验设计方法是利用合理的试验设计并通过实验得到的一定数据,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法。此设计方法可在连续范围内进行分析,优于现在普遍采用的只能分析离散条件的正交试验设计。本实验通过二次回归设计得到了延胡索生物碱得率、生物碱纯度与提取时间、提取温度和乙醇体积分数之间关系的回归模型,经检验证明该模型是合理可靠的,能够较好地预测试验结果,能有效减少工艺操作的盲目性,从而为进一步的放大试验研究奠定基础。

3.2 应用响应面法得到的优化工艺为:提取时间 116 min,提取温度 $49 \text{ }^\circ\text{C}$,乙醇体积分数 80%,乙醇用量 10 mL/g(以延胡索计)。在此条件下提取 3 次,生物碱得率为 0.598%,其纯度为 17.38%。

参考文献:

- [1] 黄康泰. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994:874.
- [2] 许翔鸿,王铮涛. 延胡索中生物碱成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2002,33(6):483-486.
- [3] 刘芳,罗跃娥. 延胡索研究概况[J]. 天津中医学院学报,2005,24(4):240-242.
- [4] 王义明,张效禹,李云兴. 延胡索全碱抗溃疡作用研究[J]. 辽宁中医杂志,1980(1):37.
- [5] 邱蓉丽,李祥,陈建伟,等. 延胡索总生物碱抗心肌缺血作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2001,8(4):265.
- [6] 胡晨,莫志贤,王瑞丞. 延胡索戒毒作用研究进展[J]. 医药导报,2007,26(8):916-917.
- [7] 窦志华,张谦. 延胡索止痛片提取工艺研究[J]. 中成药,1991,13(10):525.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005:94.