

响应曲面法优化文殊兰中生物碱的提取工艺

于淼^{1,2,3}, 柏云娇^{1,2}, 代岐昌^{1,2}, 高世勇^{1,2,3}, 张秀娟^{1,2,3}, 季宇彬^{1,2,3*}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部 抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研流动站, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 研究提取文殊兰中生物碱的最佳工艺条件。**方法** 在单因素的基础上运用 Box-Behnken 中心组合设计以提取温度, 提取时间, 乙醇的体积分数 3 个因素 3 水平的实验模型, 建立提取回归方程。以响应曲面法 (RSM) 对实验结果进行分析, 对文殊兰中生物碱的提取工艺进行优化。**结果** 模拟得到的最优条件为提取时间 4.13 h, 乙醇体积分数为 66.36%, 提取温度为 71.64 °C, 此条件下生物碱的最高提取率为 3.422 mg/g。为了方便实际操作, 修正条件为提取时间 4.1 h, 乙醇体积分数为 66%, 提取温度 72 °C。验证实验结果平均提取率为 3.563 mg/g, 与模型预测值较为接近。**结论** 曲面响应法可以对文殊兰中生物碱的提取工艺进行优化。

关键词: 文殊兰; 生物碱; 提取工艺; 单因素; 响应曲面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)10-1286-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.015

Optimization of extracting process for alkaloid from the seeds of *Crinum asiaticum* by response surface methodology

YU Miao^{1,2,3}, BAI Yun-jiao^{1,2}, DAI Qi-chang^{1,2}, GAO Shi-yong^{1,2,3}, ZHANG Xiu-juan^{1,2,3}, JI Yu-bin^{1,2,3}

1. Center of Life Science and Environmental Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Engineering Research Center of Natural Anti-tumor Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

3. Post-doctoral Research Center of Drugs Research Institute, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To optimize the extracting technology for alkaloids from the seeds of *Crinum asiaticum*. **Methods** On the basis of the single factor test, the effects of extracting time, volume of ethanol, and extracting temperature were studied by the orthogonal test developed by Box-Behnken central composite test design and the relative equation was established. Using the response surface method (RSM), the result was analyzed and the extracting process was optimized. **Results** The optimized conditions were as follows: the extracting time was 4.13 h, the volume of ethanol was 66.36%, the extracting temperature was 71.64 °C, and the yield was 3.422 mg/g. In order to facilitate the practice, the conditions were modified as follows: the extracting time was 4.1 h, the volume of ethanol was 66%, and the extracting temperature was 72 °C. The experimental results was verified with an average yield of 3.563 mg/g, which is close to the model predicted value. **Conclusion** The RSM technology optimization for extracting alkaloids from the seeds of *C. asiaticum* is suitable.

Key words: seeds of *Crinum asiaticum* L.; alkaloid; extraction optimization; single factor; response surface method

文殊兰 *Crinum asiaticum* L. 别名十八学士、白花石蒜等, 多分布于华南地区, 是石蒜科多年生草本植物, 有行血散瘀、消肿止痛的作用。其主要活

性成分生物碱类具有镇痛消炎、抗疟疾、抑制乙酰胆碱酯酶、抗病毒、抗寄生虫、抗肿瘤同时对心脑血管也有保护作用, 例如降血压等^[1-2], 其中以石蒜

收稿日期: 2012-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81274067); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2011126); 黑龙江省教育厅科技项目 (1211135); 教育部科学技术研究重点项目 (211045); 教育部博士点基金项目 (20112332110003); 黑龙江省教育厅科技重点项目 (12511z011); 黑龙江省研究生创新基金项目 (YJSCX2011-165HLJ)

作者简介: 于淼 (1982—), 男, 博士, 研究方向为抗肿瘤药物。Tel: 13945005136 E-mail: ym913@yahoo.com.cn

*通信作者 季宇彬 (1956—), 男, 博士生导师。E-mail: jyb@hrbcu.edu.cn

网络出版时间: 2013-04-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130409.1206.003.html>

碱、加兰他敏较为常用。

响应曲面法 (response surface method, RSM) 是一种通过对响应曲面及等高线分析并寻求最优工艺参数的方法, 采用多元二次回归方程来拟合响应值与因素之间函数关系的一种优化统计方法^[3-4]。该方法将试验体系的目标响应值 (例如中草药植物活性成分的提取率) 作为单个或多个实验因素 (例如提取时间、溶剂体积分数等) 的函数, 并将函数关系通过立体或多维图形显示出来, 结合图形分析、函数求导等方法优化试验设计中的最佳提取条件。本实验在单因素的基础上, 确定因素水平, 依照此种方法 (RSM) 以生物碱提取率为响应值, 优化文殊兰中生物碱的最佳提取工艺^[5-10]。

1 仪器与材料

EYELA SB—2000 旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社), BS110S 型电子分析天平 (北京塞多利斯天平有限公司), DHG—9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司), HH—2 型数显恒温水浴锅 (上海一恒科技有限公司)。

文殊兰新鲜种子购于海南, 经黑龙江省药检所王清华教授鉴定为石蒜科文殊兰属植物文殊兰 *Crinum asiaticum* L. 成熟种子。经切片晒干, 粉碎机粉碎至 20~40 目。

2 方法与结果

2.1 生物碱的制备

原料经鼓风干燥箱干燥后用中药粉碎机粉碎至 20~40 目。精密称取 50.00 g 原料粉末乙醇回流提取, 提取液滤掉滤渣, 得滤液, 再向滤液中加入 1 mol/L 盐酸调其 pH 值至 3~4, 旋转蒸发仪浓缩。浓缩后滤过, 向滤液中滴加氨水调 pH 值至 10, 静置过夜, 氯仿萃取碱液, 取氯仿层浓缩得粗提物, 以此粗提物的质量和原料质量比计算提取率。将此粗提物滴在薄层硅胶板上, 以改良后碘化铋钾试剂喷显桔红色, 碘化钾试剂喷显红棕色, 以碘蒸气显色显棕色斑点, 表明此粗提物中含生物碱成分。

2.2 单因素试验

将提取时间、乙醇体积分数、提取温度作为影响因素, 以生物碱提取率为评价指标。

2.2.1 提取时间的影响 准确称取粉碎后的文殊兰种子 50.00 g (5 份), 按 1:8 的料液比加入 65% 乙醇溶液, 提取温度为 70 °C, 提取 2 次, 考察提取时间分别为 2、3、4、5、6 h 对文殊兰生物碱提取率的影响, 结果生物碱提取率分别为 2.102、2.678、

3.770、3.110、2.682 mg/g。随着提取时间的升高文殊兰生物碱提取率也在逐渐增加, 时间超过 4 h 后, 提取率逐渐下降。这可能由于提取时间过长, 热效应增大, 生物碱部分降解或异构化, 从而导致提取率下降。

2.2.2 乙醇体积分数的影响 准确称取粉碎后的文殊兰种子 50.00 g (5 份), 分别按 1:8 的料液比加入 45%、55%、65%、75%、85% 乙醇溶液, 在提取温度为 70 °C 的条件下, 提取 2 次, 时间为 4 h, 考察不同乙醇体积分数对文殊兰中生物碱提取率的影响, 结果生物碱提取率分别为 2.274、2.462、3.370、3.274、3.108 mg/g。随着乙醇体积分数的增加, 文殊兰生物碱提取率逐渐增大, 当乙醇体积分数超过 65% 时, 水溶性生物碱的溶出量减少, 总生物碱提取率减少。

2.2.3 温度的影响 准确称取粉碎后的文殊兰种子 50.00 g (5 份), 按 1:8 的料液比加 65% 乙醇溶液, 在提取温度分别为 50、60、70、80、90 °C 的条件下, 提取 2 次, 时间为 4 h, 考察不同温度对文殊兰中生物碱提取率的影响, 结果生物碱提取率分别为 2.770、3.154、3.370、3.050、2.694 mg/g。随着温度逐渐升高, 提取率也逐渐变大, 当温度达到 70 °C 时, 生物碱提取率达到最大, 接下来温度继续升高, 生物碱的提取率却逐渐下降, 这可能因为某些文殊兰中的生物碱的稳定性不高, 温度过高使其分解, 从而导致提取率的下降。

2.3 响应曲面法优化试验的设计

为优化提取文殊兰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, 共设计 17 个试验点, 12 个分析点, 5 个零点以估计误差, 每次精密称取 50.00 g 文殊兰种子进行试验, 选取提取时间 (X_1)、乙醇体积分数 (X_2) 提取温度 (X_3) 3 个因素进行响应曲面分析来确定影响生物碱提取率的主要因素。试验设计和结果见表 1。

为了考察各影响因素及其交互作用对提取工艺的影响, 利用 Design Expert 7.0 软件对表 1 中的数据进行多元回归拟合, 得文殊兰生物碱提取率 (Y) 对提取时间 (X_1)、乙醇体积分数 (X_2)、提取温度 (X_3) 的二次多项回归模型方程 $Y=0.34+0.012 X_1+0.015 X_2+8.125 \times 10^{-3} X_3-0.014 X_1 X_2+6.950 \times 10^{-3} X_1 X_3+9.800 \times 10^{-3} X_2 X_3-0.046 X_1^2-0.042 X_2^2-0.023 X_3^2$ 。

从表 2 可以看出, 模型的 $F=54.54, P<0.000 1$,

表 1 Box-Behnken 试验设计及结果

试验号	X_1 / h	X_2 / %	X_3 / °C	提取率 / (mg·g ⁻¹)
1	3 (-1)	55 (-1)	70 (0)	2.044
2	5 (1)	55 (-1)	70 (0)	2.618
3	3 (-1)	75 (1)	70 (0)	2.702
4	5 (1)	75 (1)	70 (0)	2.710
5	3 (-1)	65 (0)	60 (-1)	2.548
6	5 (1)	65 (0)	60 (-1)	2.612
7	3 (-1)	65 (0)	80 (1)	2.654
8	5 (1)	65 (0)	80 (1)	2.996
9	4 (0)	55 (-1)	60 (-1)	2.502
10	4 (0)	75 (1)	60 (-1)	2.914
11	4 (0)	55 (-1)	80 (1)	2.778
12	4 (0)	75 (1)	80 (1)	2.798
13	4 (0)	65 (0)	70 (0)	3.386
14	4 (0)	65 (0)	70 (0)	3.370
15	4 (0)	65 (0)	70 (0)	3.354
16	4 (0)	65 (0)	70 (0)	3.432
17	4 (0)	65 (0)	70 (0)	3.444

表明模型对提取工艺影响极其显著, $R^2=0.9859$, $CV=2.50\%$, $R^2_{adj}=0.9679$, 表明模拟程度良好, 实验误差较小, 模型相关度良好。 X_1 、 X_2 、 X_3 对提取工艺均有显著影响, 交互项中 X_1X_2 、 X_2X_3 对提取率的影响显著。二次项中 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对提取率的影响也显著。

结合 Box-Behnken 试验设计方案, 利用 RSM 研究各个因素之间对生物碱提取率的影响, 做出响应面图, 以考察提取时间、乙醇体积分数与提取温度的交互作用对文殊兰中生物碱的提取率的影响, 进一步对文殊兰生物碱的提取工艺进行优化。试验因素间交互作用的 3-D 响应曲面见图 1。

由图 1 曲面的弯曲程度可知, 乙醇体积分数与

表 2 回归方程显著性检验

项目	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.025	9	54.54	<0.000 1
X_1	1.220×10^{-3}	1	23.56	0.001 8
X_2	1.746×10^{-3}	1	33.72	0.000 7
X_3	5.281×10^{-4}	1	10.20	0.015 2
X_1X_2	8.009×10^{-4}	1	15.46	0.005 7
X_1X_3	1.932×10^{-4}	1	3.73	0.094 7
X_2X_3	3.842×10^{-4}	1	7.42	0.029 6
X_1^2	8.991×10^{-3}	1	173.58	<0.000 1
X_2^2	7.308×10^{-3}	1	141.08	<0.000 1
X_3^2	2.278×10^{-3}	1	43.98	0.000 3
残差	3.626×10^{-4}	7		
失拟项	3.012×10^{-4}	3	6.55	0.050 5
纯误差	3.133×10^{-5}	4		
总误差	0.026	16		

$P < 0.001$ 为极显著; $P < 0.05$ 为显著

$P < 0.001$ is highly significant; $P < 0.05$ is significant

提取时间的交互作用对文殊兰生物碱的影响率显著, 表现为曲面较陡呈钟罩形, 而提取时间与提取温度对文殊兰生物碱提取率的影响较小, 图中表现为曲面较平滑。文殊兰生物碱随乙醇体积分数及提取时间呈现由低到高再降低的趋势, 即文殊兰提取率在合适的乙醇体积分数及提取时间下具有极大值, 该极大值存在于响应曲面的顶部, 可通过软件对模型极值求解和分析等高线得到最佳提取条件: 提取时间 4.13 h, 乙醇体积分数为 66.36%, 提取温度为 71.64 °C, 生物碱的最高提取率为 3.422 mg/g。

2.4 验证试验

为了检验方法预测的结果, 用实验中得到的最佳提取工艺条件重复试验。为便于实际操作, 将条件确定为, 提取时间 4.1 h, 乙醇体积分数为 66%,

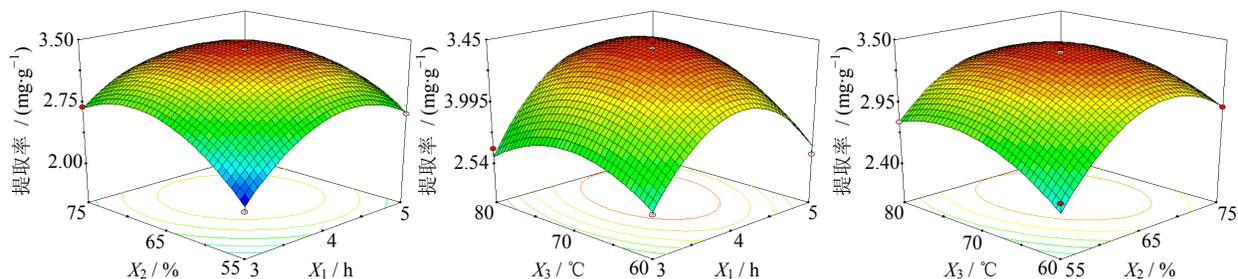


图 1 交互作用对文殊兰中生物碱提取率的影响

Fig. 1 Effect of interaction on extracting rate of alkaloids from seeds of *C. aticum*

提取温度 72 °C, 修正后的条件提取生物碱 3 次, 提取率为分别为 3.592、3.539、3.558 mg/g, 平均提取率为 3.563 mg/g, 与理论值较为吻合, 表明优选工艺提取效果较为理想。

3 讨论

生物碱类化合物往往是许多中草药及药用植物的有效成分, 大多具有药理活性, 其抗肿瘤作用得到了许多学者的青睐^[11-12]。

文殊兰既是观赏植物也可入药, 其中石蒜碱、加兰他敏是极具开发潜力的重要成分, 其诱导肿瘤细胞凋亡作用已得到证实^[13]。RSM 是采用多元二次回归的方法将函数作为估计工具, 研究因素与响应值之间、因素与因素之间交互作用的方法, 通过对拟合后的回归方程进行分析寻找最优工艺参数, 同时响应面法可以更好地处理离散水平值, 更加准确地优化文殊兰中生物碱的提取工艺, 还具备实验周期短、精密度高等优点, 能对因素间交互作用进行研究。

通过响应面法所得模型优化提取条件为提取时间 4.13 h, 乙醇体积分数为 66.36%, 提取温度为 71.64 °C, 生物碱的最高提取率为 3.422 mg/g。为了实验操作的便利, 将提取条件修正为: 提取时间 4.1 h, 乙醇体积分数为 66%, 提取温度为 72 °C, 提取率为 3.563 mg/g, 与模型预测的提取率误差较小, 认为此次实验模型的设计是比较可行的。综上, 利用响应曲面法对文殊兰生物碱提取工艺的优化是科学可靠的, 为进一步地文殊兰生物碱的研究提供了依据。

参考文献

[1] 秦昆明, 李笑, 徐昭, 等. 石蒜碱及其衍生物的药

理作用研究概况 [J]. 北京联合大学学报: 自然科学版, 2009, 23(1): 6-9.

[2] 沙美, 丁林生. 文殊兰属植物中生物碱的研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2001, 16(5): 193-196.

[3] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 455-457.

[4] Pan Y, Cai B C, Wang K L, *et al.* Neferine enhances insulin sensitivity in insulin resistant rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(1): 98-102.

[5] 季宇彬, 严琴琴, 曲中原, 等. 正交试验法优选青龙衣中胡桃醌的提取工艺 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 152-154.

[6] 欧阳辉, 田启建, 余 佶, 等. 酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺优化 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 886-889.

[7] 陈敬, 温庆果, 刘韶, 等. 正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2183-2188.

[8] 刘红梅, 李可意. 均匀设计-响应曲面法优化莪术的超临界 CO₂ 萃取工艺 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 535-538.

[9] 杨磊, 刘婷婷, 卫蔚, 等. 响应面法优选新疆紫草总萘醌的匀浆提取工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 568-573.

[10] 杨秀芳. 正交实验法优选紫草的提取工艺 [J]. 中成药, 2005, 27(3): 351-353.

[11] 季宇彬, 莫科, 于蕾, 等. 野西瓜总生物碱诱导 SGC-7901 凋亡机制的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2009, 25(1): 1-6.

[12] 庞琳琳, 于蕾, 杨海帆, 等. 野西瓜水溶性生物碱抑制 HepG-2 增殖作用 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2009, 25(4): 391-394.

[13] 陈建荣, 杨扬, 杨月. 文殊兰叶氯仿提取物诱导 NCI-H460 细胞凋亡的研究 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(6): 628-631.