

文殊兰种子中总生物碱提取方法的比较

于淼^{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 探讨提取文殊兰 *Crinum asiaticum* 种子中总生物碱的最佳提取方法以及工艺条件。方法 以文殊兰种子为原料, 采用超声和加热回流 2 种提取方法提取文殊兰种子中的总生物碱。结果 响应曲面法优化结果表明, 超声波法超声时间 47 min, 超声温度 58 ℃, 超声功率 600 W, 乙醇体积分数为 95%, 料液比 1 : 6, 提取 3 次, 提取总生物碱得率 0.435 7%; 加热回流法提取时间 2.5 h, 提取温度 84 ℃, 料液比 1 : 9, 乙醇体积分数为 95%, 提取 3 次, 提取总生物碱得率 0.449 4%。结论 综合考虑总生物碱提取率、操作方法、除杂难易程度等因素, 选用加热回流提取文殊兰种子中总生物碱较理想。

关键词: 文殊兰; 总生物碱; 超声波提取; 加热回流提取; 响应曲面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)08-1089-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.010

Comparison on extracting methods of total alkaloids in *Crinum asiaticum* seeds

YU Miao^{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 Commercial University, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To optimize the extracting methods and technology for total alkaloids from the seeds of *Crinum asiaticum*.

Methods Ultrasonic extraction and reflux extraction were used to extract the total alkaloids from the seeds of *C. asiaticum*. **Results** The two results showed that the extracting rate of alkaloids by ultrasonic extraction was 0.435 7% under ultrasonic temperature of 58 ℃, ultrasonic time of 47 min, ultrasonic power of 600 W, percentage of ethanol volume of 95%, solid-liquid ratio of 1 : 6, and extraction for three times. Additionally, the extracting yield of alkaloids by reflux extraction was 0.449 4% under extraction temperature of 84 ℃, extraction time of 2.5 h, solid-liquid ratio of 1 : 9, percentage of ethanol volume of 95%, and extraction for three times. **Conclusion** Considering the extracting rate of alkaloids, operating methods, and the difficulty of removing impurity, the heating reflux extraction is an ideal method for total alkaloids extracting from the seeds of *Crinum asiaticum*.

Keywords: *Crinum asiaticum* L.; total alkaloids; ultrasonic extraction; heating reflux extraction; response surface methodology

文殊兰 *Crinum asiaticum* L. 全植株含有生物碱 (主要是石蒜碱^[1])、氨基酸、多糖、黄酮类等多种化学成分, 目前报道其鳞茎中生物碱的量最高, 近年来从西南文殊兰中分离得到石蒜碱、小星蒜碱、文殊兰胺、朱顶红定碱、西南文殊兰芬碱等多种生物碱。研究报道, 文殊兰属植物具有抗菌、抗病毒、抗疟疾、抗癌、抑制蛋白质和 DNA 的合成、抗炎、

抗过敏、抑制乙酰胆碱酯酶、镇痛、镇静作用^[2-3], 对子宫和肠平滑肌以及心血管系统也产生作用^[4-5]。目前国内外对文殊兰的研究主要集中在抗肿瘤药物的开发, 抗病毒作用机制的研究, 新型抗炎、抗寄生虫药物研发, 药动学及多成分配伍作用研究 4 个方面, 其中只有抗肿瘤药物开发的研究较为成熟, 其余方面研究均未取得突破性进展。

收稿日期: 2013-12-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274067); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D201126); 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); 哈尔滨市青年科技创新人才专项资金 (2013RFQXJ150)

作者简介: 于淼 (1982—), 男, 博士, 研究方向为抗肿瘤药理。E-mail: yumiao913@163.com

本实验对乙醇溶剂加热回流法^[6]和超声波提取文殊兰种子中总生物碱进行比较,超声波是利用超声波具有的机械效应、空化效应、热效应和次级效应,如乳化、扩散、击碎、化学效应等,这些作用也促进了提取物(乳化物)中有效成分的溶解^[7-10]。如超声提取药材中的小檗碱,与常规的煎煮、浸泡提取法相比,超声的空化作用大大加速了小檗碱成分的提取速度,还很好地保持了生物碱的特性和品质,同时也提高了小檗碱成分的提取率^[11]。最后通过响应曲面分析法(RSM)确定最佳提取工艺条件。本研究旨在通过RSM来获得文殊兰种子中总生物碱的最佳提取方法以及工艺参数,为新药研发奠定一定的理论基础。

1 仪器与材料

SRC—5 超声波提取机,型号 THC—5B,超声功率 1 000 W,40%~100%可调,超声频率 28 kHz,时间设定 0~199 min,超声温度为室温至 80 ℃可调,上海四瑞仪器有限公司;三用紫外灯,上海康禾光电仪器有限公司;EYELA SB—2000 旋转蒸发器,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;烘箱 DHG—9140A、数显恒温水浴锅、真空干燥箱 DZF—6030A,上海一恒科技仪器有限公司。

文殊兰新鲜种子购于海南,经黑龙江省药品检验所王清华教授鉴定为石蒜科文殊兰属植物文殊兰 *Crinum asiaticum* L. 的成熟新鲜种子,切片阴干,粉碎,过 20~30 目筛,备用。

95%乙醇、浓盐酸、氨水、二氯甲烷、甲醇、无水乙醇等试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 工艺流程

准确称取一定质量(W)的文殊兰种子干燥粉末,采用超声法和加热回流法分别提取总生物碱,然后减压浓缩,回收乙醇得到浸膏,将浸膏用水浓缩至一定体积,用 1% HCl 调节 pH 值至 4,减压抽滤得到酸水液,再用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调节溶液 pH 值至 10,静置后用二氯甲烷萃取至无生物碱反应,合并萃取液浓缩后得到总生物碱提取物浸膏,称质量(M),计算得率(得率 = M/W)^[12]。

2.2 超声提取总生物碱

2.2.1 单因素实验 准确称取文殊兰种子干燥粉末 100 g,分别考察超声时间(10、20、30、40、50、60 min)、超声温度(20、30、40、50、60、70 ℃)、

超声功率(400、500、600、700、800、900 W)和乙醇体积分数(75%、80%、85%、90%、95%、100%)对文殊兰种子总生物碱提取率的影响。在考察其中 1 项因素时其他 3 项因素以 50 min、50 ℃、500 W、95%为条件,其中料液比为 1:6。依次记录数据并计算总生物碱得率。

不同超声时间提取文殊兰种子中总生物碱得率分别为 0.388 0%、0.406 7%、0.420 5%、0.430 5%、0.429 8%、0.410 4%。随着提取时间的延长,总生物碱的得率先迅速升高又逐渐降低,在 40 min 时达到最大值,随后总生物碱得率明显下降,这可能是随着时间的延长,可溶性成分溶出越多,使得提取液黏度增大,另外超声处理时间过久,文殊兰种子中总生物碱在超声波的剪切作用下发生结构破坏较严重。因此提取时间不应太长,时间的考察范围确定为 30~50 min 为宜。

不同超声温度提取文殊兰种子中总生物碱得率分别为 0.360 5%、0.386 7%、0.400 3%、0.422 3%、0.445 8%、0.420 1%。总生物碱得率随着温度的升高先逐渐升高,当温度达到 60 ℃时,总生物碱提取率达到最大值,后又逐渐降低。这可能是随着超声温度的升高,气泡中的蒸气压开始增加,空化强度就会增大,从而加快了生物碱的浸出。因此,超声温度的考察范围确定为 50~70 ℃为宜。

不同超声功率提取文殊兰种子中总生物碱得率分别为 0.428 0%、0.432 7%、0.440 9%、0.420 5%、0.409 8%、0.389 7%。随超声功率的增大,文殊兰种子中总生物碱提取率先增大后减小,当功率达到 600 W 时,提取率达到最大值。这主要是由于当功率增大时,对植物细胞破碎作用加大,加速有效成分的溶解,同时可以加快水循环,强化传质,这也有利于生物碱的浸出。但随着超声功率的增大,某些生物碱的结构可能遭到破坏,从而影响提取率。因此,超声功率考察范围确定为 500~700 W 为宜。

不同乙醇体积分数超声提取文殊兰种子中总生物碱得率分别为 0.408 0%、0.416 7%、0.420 5%、0.428 8%、0.430 5%、0.421 4%。随着乙醇体积分数的增加,文殊兰种子中总生物碱得率先迅速增加,然后又下降,当乙醇体积分数超过 75%时,总生物碱得率增加较快,这可能是由于水溶性生物碱的溶出量导致,当乙醇浓度高于 85%时,水溶性生物碱的溶出减少但是脂溶性的生物碱剧增,乙醇体积分数为 95%时提取率开始下降,这可能是水溶性生物

碱的溶出减少所致,考虑到水溶性杂质溶出相对较少,故宜选择体积分数较大的乙醇进行提取,故乙醇体积分数的考察范围确定为85%~95%。

2.2.2 响应曲面优化试验 在单因素试验的基础上,对影响文殊兰总生物碱超声提取的主要因素进行 Box-Behnken 试验进行设计,优化超声提取文殊兰总生物碱的最佳提取工艺参数。

(1) Box-Behnken 设计试验与结果 根据单因素试验的结果,选取超声时间(X_1 , 30、40、50 min)、

超声温度(X_2 , 50、60、70 °C)、超声功率(X_3 , 500、600、700 W)以及乙醇体积分数(X_4 , 85%、90%、95%)为自变量,以文殊兰总生物碱的提取率(Y)为响应值(因变量),建立回归方程并分析与检验,设计实验方案及总生物碱提取率实验结果见表1,在单因素基础上共有29个试验点,24个分析点,5个零点以估计误差。分析点为析因试验,零点为中心试验。

(2) 回归方程及显著性检验:为了考察各因素

表1 Box-Behnken 设计试验及结果(超声提取)

Table 1 Box-Behnken test design and results (ultrasonic extraction)

试验号	X_1 / min	X_2 / °C	X_3 / W	X_4 / %	Y / %	试验号	X_1 / min	X_2 / °C	X_3 / W	X_4 / %	Y / %
1	30 (-1)	50 (-1)	600 (0)	90 (0)	0.372 5	16	40 (0)	70 (1)	700 (1)	90 (0)	0.387 5
2	50 (1)	50 (-1)	600 (0)	90 (0)	0.401 2	17	30 (-1)	60 (0)	500 (-1)	90 (0)	0.381 0
3	30 (-1)	70 (1)	600 (0)	90 (0)	0.398 7	18	50 (1)	60 (0)	500 (-1)	90 (0)	0.407 8
4	50 (1)	70 (1)	600 (0)	90 (0)	0.388 3	19	30 (-1)	60 (0)	700 (1)	90 (0)	0.377 4
5	40 (0)	60 (0)	500 (-1)	85 (-1)	0.398 2	20	50 (1)	60 (0)	700 (1)	90 (0)	0.398 5
6	40 (0)	60 (0)	700 (1)	85 (-1)	0.405 7	21	40 (0)	50 (-1)	600 (0)	85 (-1)	0.374 4
7	40 (0)	60 (0)	500 (-1)	95 (1)	0.422 2	22	40 (0)	50 (-1)	600 (0)	85 (-1)	0.389 0
8	40 (0)	60 (0)	700 (1)	95 (1)	0.437 8	23	40 (0)	50 (-1)	600 (0)	95 (1)	0.429 5
9	30 (-1)	60 (0)	600 (0)	85 (-1)	0.370 6	24	40 (0)	70 (1)	600 (0)	95 (1)	0.445 9
10	50 (1)	60 (0)	600 (0)	85 (-1)	0.413 2	25	40 (0)	60 (0)	600 (0)	90 (0)	0.426 7
11	30 (-1)	60 (0)	600 (0)	95 (1)	0.402 1	26	40 (0)	60 (0)	600 (0)	90 (0)	0.426 8
12	50 (1)	60 (0)	600 (0)	95 (1)	0.429 0	27	40 (0)	60 (0)	600 (0)	90 (0)	0.427 1
13	40 (0)	50 (-1)	500 (-1)	90 (0)	0.415 0	28	40 (0)	60 (0)	600 (0)	90 (0)	0.427 0
14	40 (0)	70 (1)	500 (-1)	90 (0)	0.412 4	29	40 (0)	60 (0)	600 (0)	90 (0)	0.426 5
15	40 (0)	50 (-1)	700 (1)	90 (0)	0.412 3						

及其相互作用对超声提取工艺的影响,利用 Design-Expert 8.05b (原版)对表1的试验数据进行多元回归拟合分析,得到文殊兰种子中总生物碱提取率(Y)对超声时间(X_1)、超声温度(X_2)、超声功率(X_3)、乙醇体积分数(X_4)的二次多项回归模型方程 $Y = -2.140\ 53 + 0.033\ 954\ X_1 + 0.022\ 168\ X_2 + 1.134\ 20 \times 10^{-3}\ X_3 + 0.015\ 532\ X_4 - 9.775\ 00 \times 10^{-5}\ X_1 X_2 - 1.425\ 00 \times 10^{-6}\ X_1 X_3 - 7.850\ 00 \times 10^{-5}\ X_1 X_4 - 5.550\ 00 \times 10^{-6}\ X_2 X_3 + 9.000\ 00 \times 10^{-6}\ X_2 X_4 + 4.050\ 00 \times 10^{-6}\ X_3 X_4 - 2.379\ 75 \times 10^{-4}\ X_1^2 - 1.299\ 75 \times 10^{-4}\ X_2^2 - 9.360\ 00 \times 10^{-7}\ X_3^2 - 6.540\ 00 \times 10^{-5}\ X_4^2$ 。

RSM 法对模型进行显著性检验,见表2,在对回归系数的分析以及对回归方程的方差分析中,平方和(R^2)称为多元相关指数,也称决定系数,表示用回归方程进行预测的可靠性;均方(R_{adj}^2)是

对回归方程式中变量过多的一种调整, R^2 与 R_{adj}^2 接近1,并且两者接近,表示回归方程效果好; t 检验为计算得到的 t 值如果大于 $t_{\text{临界}}$,表示回归效果好; F 检验为计算得到的 F 如果大于 $F_{\text{临界}}$,表示随机误差引起的波动较小,回归效果好;标准差(s)的值小,表示回归效果比较好; $P < 0.05$ 表示回归方程或系数显著,回归效果比较理想, $P > 0.05$ 表示不显著,回归效果不好;残差为实际值和预测值之差,残差服从以0为均值的正态随机分布,则回归效果好;失拟分析的原假设为回归方程没有失拟,如果 $P > 0.05$,则回归方程没有失拟,拟合良好,如果 $P < 0.05$,则回归方程失拟,即拟合欠佳。

(3) 方差分析结果:由表2可以看出超声时间和乙醇体积分数的 $P < 0.01$,对提取率的影响极为显著,超声温度和超声功率的 $P > 0.05$,为不显著

表2 回归方程显著性检验结果 (超声提取)

Table 2 Significance test results of regression equation (ultrasonic extraction)

项目	平方和	自由度	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.010	14	5.71	0.001 2	X_3X_4	1.640×10^{-5}	1	0.13	0.728 3
X_1	1.535×10^{-3}	1	11.75	0.004 1	X_1^2	3.673×10^{-3}	1	28.13	0.000 1
X_2	2.380×10^{-5}	1	0.18	0.675 9	X_2^2	1.096×10^{-3}	1	8.39	0.011 7
X_3	2.523×10^{-5}	1	0.19	0.667 0	X_3^2	5.683×10^{-4}	1	4.35	0.055 8
X_4	3.866×10^{-3}	1	29.61	<0.000 1	X_4^2	1.734×10^{-5}	1	0.13	0.721 0
X_1X_2	3.822×10^{-4}	1	2.93	0.109 2	残差	1.828×10^{-3}	14		
X_1X_3	8.123×10^{-6}	1	0.062	0.806 7	失拟项	1.828×10^{-3}	10	3 207.04	<0.000 1
X_1X_4	6.162×10^{-5}	1	0.47	0.503 3	纯误差	2.280×10^{-7}	4		
X_2X_3	1.232×10^{-4}	1	0.94	0.347 9	总误差	0.012	28		
X_2X_4	8.100×10^{-7}	1	6.203×10^{-3}	0.938 3					

因素。因此由表2可知各因素对文殊兰中总生物碱提取率影响程度大小依次为乙醇体积分数>超声时间>超声功率>超声温度。

(4) 交互作用的影响: 结合 Box-Behnken 试验设计方案及表2中的回归方程显著性检验结果, 研究这4个因素之间对总生物碱提取率的影响, 做出

响应曲面图, 根据二次方程模型分别做出试验因素间交互作用的3D响应曲面图, 该模型方程的 $P < 0.05$, 表明此模型显著, 回归效果较理想, 由表2可知超声温度和乙醇体积分数为主要影响因素, 超声时间和超声功率为非主要影响因素, 这4个因素之间的交互作用均较弱, 结果见图1。

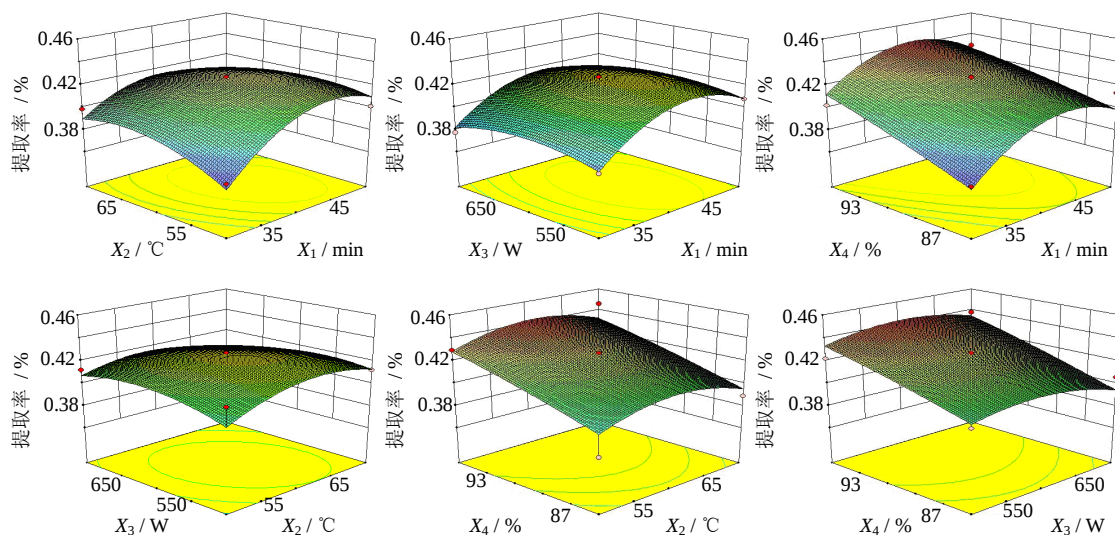


图1 4因素交互作用对总生物碱提取率的影响 (超声提取)

Fig. 1 Four factors interaction influence on extraction rate of total alkaloids (ultrasonic extraction)

2.3 加热回流提取总生物碱

2.3.1 单因素实验 准确称取文殊兰种子干燥粉末100 g, 分别考察提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)、提取温度(70、75、80、85、90、95℃)、料液比(1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9)和乙醇体积分数(75%、80%、85%、90%、95%、100%)对文殊兰种子总生物碱提取率的影响。在考察其中1项因素时其他3项影响因素以2.5 h、

85℃、1:6、95%为条件, 依次记录数据并计算总生物碱得率。

不同提取时间下加热回流提取文殊兰种子总生物碱得率分别为0.190 2%、0.223 1%、0.313 0%、0.389 4%、0.423 1%、0.416 7%。随着提取时间的升高文殊兰总生物碱得率逐渐增加, 2.5 h后得率逐渐下降。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。所

以提取时间考察范围定为 2.0~3.0 h。

不同提取温度下加热回流提取文殊兰种子中总生物碱得率分别为 0.277 3%、0.344 4%、0.432 3%、0.423 7%、0.387 6%、0.345 8%。随着温度逐渐升高,提取率也逐渐变大,当温度到 80 ℃时,总生物碱提取率达到最高,随温度继续升高,总生物碱的提取率开始下降,可能因为文殊兰种子中某些生物碱的稳定性不好,温度过高使其分解,从而导致提取率的下降。所以提取温度考察范围定为 75~85 ℃。

不同料液比下加热回流提取文殊兰种子中总生物碱得率分别为 0.378 9%、0.410 4%、0.422 9%、0.440 8%、0.414 0%、0.400 3%。随着料液比的改变,文殊兰总生物碱的得率改变不大,在误差允许范围内,只要提取溶液能没过药材,提取率变化不大,综合考虑经济环保以及浓缩方便等因素,所以将料液比的考察范围定为 1:5~1:7。

不同乙醇体积分数加热回流提取文殊兰种子中总生物碱得率分别为 0.312 1%、0.347 2%、0.399 3%、0.425 7%、0.430 9%、0.401 1%。随着乙醇体积分数的增加,文殊兰种子总生物碱得率逐渐增大,当乙醇体积分数超过 95%时,总生物碱得率降低,可能由于水溶性生物碱的溶出量减少导致得率降低。所以提取溶剂的乙醇体积分数考察范围定为 90%~100%。

2.3.2 响应曲面优化试验 在单因素实验的基础

上,对影响文殊兰总生物碱提取的主要因素进行 Box-Behnken 试验的 4 因素 3 水平设计,优化加热回流提取的最佳提取工艺参数。

(1) Box-Behnken 设计试验与结果 根据单因素实验结果,选取提取时间 (X_1 , 2.0、2.5、3.0 h)、提取温度 (X_2 , 75、80、85 ℃)、料液比 (X_3 , 1:5、1:6、1:7) 以及乙醇体积分数 (X_4 , 90%、95%、100%) 为自变量,文殊兰种子总生物碱的提取率 (Y) 为响应值 (因变量),建立回归方程并进行分析与检验,设计实验方案及总生物碱提取率实验结果见表 3,选取优化结果中,在单因素基础上共有 29 个试验点。24 个分析点,5 个零点以估计误差。分析点为析因试验,零点为中心试验。将得到的结果建立以总生物碱提取率为响应值的回归方程,进行显著性检验及方差分析,确保优化结果的准确性。

(2) 回归方程及显著性检验:为了考察各因素及其相互作用对加热回流提取工艺的影响,利用 Design-Expert 8.05b (原版) 对表 3 的实验数据进行多元回归拟合分析,得到文殊兰种子中总生物碱提取率 (Y) 对提取时间 (X_1)、提取温度 (X_2)、料液比 (X_3)、乙醇体积分数 (X_4) 的二次多项回归模型方程: $Y = -23.381\ 91 + 0.270\ 17\ X_1 + 0.214\ 38\ X_2 - 0.040\ 857\ X_3 + 0.309\ 55\ X_4 - 1.380\ 00 \times 10^{-3}\ X_1 X_2 + 1.100\ 00 \times 10^{-3}\ X_1 X_3 + 1.510\ 00 \times 10^{-3}\ X_1 X_4 + 4.600\ 00 \times 10^{-3}\ X_2 X_3 + 1.086\ 00 \times 10^{-3}\ X_2 X_4 - 3.320\ 00 \times 10^{-3}$

表 3 Box-Behnken 设计试验及结果 (加热回流提取)

Table 3 Box-Behnken test design and results (heating reflux extraction)

试验号	X_1 / h	X_2 / ℃	X_3	X_4 / %	Y / %	试验号	X_1 / h	X_2 / ℃	X_3	X_4 / %	Y / %
1	2.0 (-1)	75 (-1)	1:6 (0)	95 (0)	0.301 4	16	2.5 (0)	85 (1)	1:7 (1)	95 (0)	0.430 3
2	3.0 (1)	75 (-1)	1:6 (0)	95 (0)	0.321 9	17	2.0 (-1)	80 (0)	1:5 (-1)	95 (0)	0.391 0
3	2.0 (-1)	85 (1)	1:6 (0)	95 (0)	0.420 9	18	3.0 (1)	80 (0)	1:5 (-1)	95 (0)	0.402 1
4	3.0 (1)	85 (1)	1:6 (0)	95 (0)	0.427 6	19	2.0 (-1)	80 (0)	1:7 (1)	95 (0)	0.411 1
5	2.5 (0)	80 (0)	1:5 (-1)	90 (-1)	0.377 8	20	3.0 (1)	80 (0)	1:7 (1)	95 (0)	0.424 4
6	2.5 (0)	80 (0)	1:7 (1)	90 (-1)	0.399 6	21	2.5 (0)	75 (-1)	1:6 (0)	90 (-1)	0.300 1
7	2.5 (0)	80 (0)	1:5 (-1)	100 (1)	0.401 1	22	2.5 (0)	85 (1)	1:6 (0)	90 (-1)	0.299 8
8	2.5 (0)	80 (0)	1:7 (1)	100 (1)	0.356 5	23	2.5 (0)	75 (-1)	1:6 (0)	100 (1)	0.289 7
9	2.0 (-1)	80 (0)	1:6 (0)	90 (-1)	0.403 1	24	2.5 (0)	85 (1)	1:6 (0)	100 (1)	0.398 0
10	3.0 (1)	80 (0)	1:6 (0)	90 (-1)	0.387 4	25	2.5 (0)	80 (0)	1:6 (0)	95 (0)	0.438 0
11	2.0 (-1)	80 (0)	1:6 (0)	100 (1)	0.387 9	26	2.5 (0)	80 (0)	1:6 (0)	95 (0)	0.438 6
12	3.0 (1)	80 (0)	1:6 (0)	100 (1)	0.387 3	27	2.5 (0)	80 (0)	1:6 (0)	95 (0)	0.438 9
13	2.5 (0)	75 (-1)	1:5 (-1)	95 (0)	0.420 9	28	2.5 (0)	80 (0)	1:6 (0)	95 (0)	0.439 1
14	2.5 (0)	85 (1)	1:5 (-1)	95 (0)	0.430 2	29	2.5 (0)	80 (0)	1:6 (0)	95 (0)	0.438 7
15	2.5 (0)	75 (-1)	1:7 (1)	95 (0)	0.329 0						

$X_3X_4 - 0.060\ 787\ X_1^2 - 2.089\ 37 \times 10^{-3}\ X_2^2 - 1.709\ 17 \times 10^{-3}\ X_3^2 - 1.996\ 87 \times 10^{-3}\ X_4^2$ 。RSM 法对模型进行显著性检验见表 4。

(3) 方差分析结果: 由表 4 可以看出提取温度 $P < 0.001$, 对提取率的影响极为显著, 提取时间、料液比和乙醇体积分数的 $P > 0.05$ 为较不显著因素, 因此由表 4 可知各因素对文殊兰中总生物碱提取率影响程度大小依次为提取温度 > 料液比 > 乙醇体积分数 > 提取时间。

(4) 交互作用的影响: 结合 Box-Behnken 试验设计方案及表 4 中的回归方程显著性检验结果, 研究这 4 个因素之间对总生物碱提取率的影响, 做出响应曲面图, 根据二次方程模型分别做出试验因素间交互作用的 3D 响应曲面图, 该模型方程的 $P < 0.05$, 表明此模型显著, 回归效果较理想, 由表 4 可知提取温度为主要影响因素, 提取时间、料液比和乙醇体积分数为次要影响因素, 这 4 个因素之间的交互作用均较弱, 结果见图 2。

表 4 回归方程显著性检验结果 (加热回流提取)

Table 4 Significance test results of regression equation (heating reflux extraction)

项目	平方和	自由度	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.053	14	4.86	0.002 8	X_3X_4	1.102×10^{-3}	1	1.40	0.255 8
X_1	1.038×10^{-4}	1	0.13	0.721 5	X_1^2	1.498×10^{-3}	1	1.91	0.188 8
X_2	0.016	1	20.91	0.000 4	X_2^2	0.018	1	22.54	0.000 3
X_3	4.344×10^{-4}	1	0.55	0.469 3	X_3^2	1.895×10^{-5}	1	0.024	0.878 8
X_4	2.314×10^{-4}	1	0.29	0.595 7	X_4^2	0.016	1	20.59	0.000 5
X_1X_2	4.761×10^{-5}	1	0.061	0.809 1	残差	0.011	14		
X_1X_3	1.210×10^{-6}	1	1.541×10^{-3}	0.969 2	失拟项	0.011	10	6 353.13	<0.000 1
X_1X_4	5.700×10^{-5}	1	0.073	0.791 5	纯误差	6.920×10^{-7}	4		
X_2X_3	2.116×10^{-3}	1	2.70	0.122 9	总误差	0.064	28		
X_2X_4	2.948×10^{-3}	1	3.76	0.073 1					

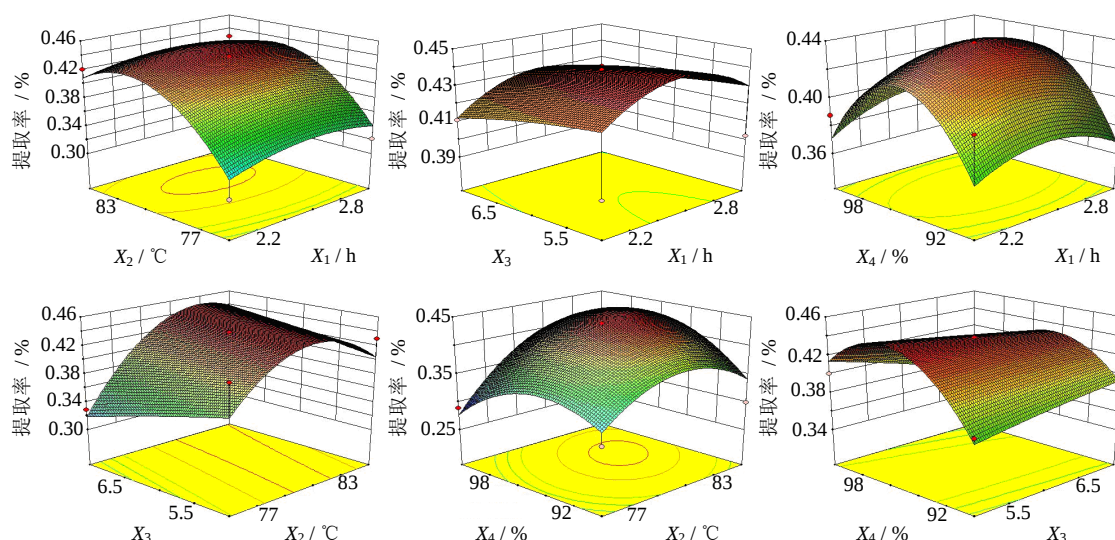


图 2 4 因素交互作用对生物碱提取率的影响 (加热回流提取)

Fig. 2 Four factors of interaction influence on extraction rate of total alkaloids (heating reflux extraction)

2.4 超声提取和回流提取结果比较

2.4.1 超声提取结果 运用 Box-Behnken 中心组合设计在单因素试验基础上对超声提取的超声时间、超声温度、超声功率、乙醇体积分数 4 个因素 3 水平的实验模型, 建立回归方程。以 RSM 对实验结

果进行分析, 对文殊兰中总生物碱的提取工艺进行优化, 得到最优提取工艺条件: 提取时间 46.91 min、提取温度 58.05 °C、超声功率 603.7 W、乙醇体积分数为 95%, 总生物碱的最高提取率为 0.437 4%。为便于实际操作, 将条件确定为提取时间 47 min、

提取温度 58 ℃、超声功率为 600 W、乙醇体积分数为 95%，为了检验方法预测的结果，用修正后的条件重复实验 3 次，文殊兰种子总生物碱得率分别为 0.435 4%、0.436 2%、0.445 5%，平均得率为 0.435 7%，与理论值较为一致，表明优选工艺提取效果较为理想。同时，根据响应面图分析影响因素的交互作用的顺序为乙醇体积分数>超声时间>超声温度>超声功率。

2.4.2 加热回流提取结果 运用 Box-Behnken 中心组合设计在单因素基础上对加热回流提取的提取时间、提取温度、料液比、乙醇体积分数 4 个因素 3 水平的实验模型，建立回归方程。以 RSM 对实验结果进行分析，对文殊兰中总生物碱的提取工艺进行优化，得到最优提取工艺条件为提取时间 2.51 h、提取温度 84.82 ℃、料液比 1:9、乙醇体积分数为 94.05%，总生物碱的最高提取率为 0.460 7%。为便于实际操作，将条件修定为提取时间 2.5 h、提取温度 85 ℃、料液比 1:9、乙醇体积分数为 95%，为了检验方法预测的结果，用修正后的条件重复实验 3 次，总生物碱得率分别为 0.450 1%、0.448 6%、0.449 5%，平均得率为 0.449 4%，与理论值较为一致，表明优选工艺提取效果较为理想。同时，根据响应面图分析影响因素的交互作用的强弱顺序为提取温度>料液比>乙醇体积分数>提取时间。

3 讨论

超声提取虽然具有提取效率高、提取时间短、提取温度低、提取简单易行等特点，但是实验证明超声提取文殊兰种子中总生物碱的效率不及加热回流提取，主要原因是干扰性杂质较多，如黄酮、酰胺类化合物，从而使实验的后续除杂过程较复杂，这可能是由于文殊兰种子中化学成分复杂，超声提取过程中黄酮类及酰胺类化合物更易溶出。所以在

提取文殊兰种子中总生物碱时，综合考虑总生物碱提取率、操作方法、除杂难易程度等因素，选用加热回流提取较理想。

参考文献

- [1] Min B S, Gao J J, Nakamura N, *et al.* Cytotoxic alkaloids and a flavan from the bulbs of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(9): 1217-1219.
- [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): 193-195.
- [3] 令狐昱慰. 石蒜中加兰他敏等有效成分的提取及含量分析 [D]. 西安: 西北大学, 2007.
- [4] 清 风. 文殊兰球茎中的具有细胞毒性的生物碱类和黄酮 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2002, 24(6): 355-356.
- [5] 贾献慧, 周铜水, 郑 颖, 等. 石蒜科植物生物碱成分的药理学研究 [J]. 中医药学刊, 2001, 19(6): 573-574.
- [6] 李云超, 陈建平, 布 仁, 等. 中蒙药生物碱的提取方法与工艺研究 [J]. 北方药学, 2013, 10(12): 50-52.
- [7] 郭孝武. 提取中草药化学成分的方法—超声提取法 [J]. 天然药物研究与开发, 2013, 11(3): 37-38.
- [8] 赵 兵, 伍志春, 王玉春, 等. 超声波在植物提取中的应用 [J]. 中草药, 1999, 30(9): 附 1-附 3.
- [9] 冯 若, 赵逸云, 李化茂, 等. 超声波在生物技术中应用的研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 21(6): 500-501.
- [10] 张晓东, 潘国凤, 吕奎源, 等. 超声提取在中药化学成分提取中的应用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(12): 861-862.
- [11] 赵明明, 熊海蓉, 李 霞, 等. 石蒜中石蒜碱的超声波提取研究 [J]. 化学与生物工程, 2011, 28(8): 33-35.
- [12] 于 淼, 柏云娇, 代岐昌, 等. 响应曲面法优化文殊兰中生物碱的提取工艺 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1287-1289.