

响应面法优化斑花黄堇中总生物碱的提取工艺

确生^{1,2}, 王志波², 李成思², 林鹏程², 陈卫东^{2*} (1.天津大学管理与经济学部, 天津 300072; 2.青海民族大学药学院/青海省青藏高原植物化学重点实验室, 西宁 810007)

摘要: 目的 优化盐酸回流提取藏药斑花黄堇中总生物碱的提取工艺。方法 根据单因素试验结果, 选择影响总生物碱提取效果较大的盐酸浓度、液料比、提取温度为自变量, 以总生物碱的得率为响应值, 进行 Box-Benken 中心组合试验设计, 采用响应面法评估这些因素对总生物碱提取效果的影响。结果 提取斑花黄堇中总生物碱的最佳工艺条件为液料比 35 mL·g⁻¹, 盐酸浓度为 0.4%, 提取温度为 75 °C, 得斑花黄堇中总生物碱的提取率为 0.46 mg·g⁻¹。结论 该法优化的提取工艺科学可靠, 可用于斑花黄堇总生物碱的提取生产。

关键词: 斑花黄堇; 生物碱; 提取工艺; 响应面法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)03-0358-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.012

Optimization of Ultrasonic Extraction of Total Alkaloids from *Corydalis Conspersa* Maxim

QUE Sheng^{1,2}, WANG Zhibo², LI Chengsi², LIN Pengcheng², CHEN Weidong^{2*} (1.School of Management, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2.College of Pharmacy, Qinghai Nationalities University/Key Chemistry Laboratory of Plant Resources of Qinghai-Tibet Plateau, Xining 810001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize ultrasonic-assisted extraction process of total alkaloids from *Corydalis conspersa* Maxim. **METHODS** The hydrochloric acid concentration, liquid-feed ratio and extraction temperature, which were major factors influencing the extraction according to the single factor experiments, were selected as independent variables, and through using the extraction rate of total alkaloids as response values and making the Box-Benken central combinational design, the effects of the above factors on the extraction were estimated by response surface methodology. **RESULTS** The results indicated that the optimal extraction conditions were as follows: 35 mL·g⁻¹ of liquid-feed ratio, 0.4% of hydrochloric acid concentration, and 75 °C extraction temperature. Under these conditions, the content of total alkaloids was 0.46 mg·g⁻¹ from *Corydalis conspersa* Maxim by ultraviolet spectrophotometer. **CONCLUSION** The optimized parameters from the experiments are accurate, which can be used for the extraction and production of total alkaloids from *Corydalis conspersa* Maxim.

KEY WORDS: *Corydalis conspersa* Maxim; alkaloid; extraction process; response surface methodology

紫堇属(*Corydalis* DC.)植物广泛分布于北温带至北非、印度沙漠区边缘地区, 少数品种分布在东非草原地区, 全球约有 300 余种, 主要产于亚洲^[1]。中国有 290 种, 主要分布在西南地区, 青藏高原约有 120 余种^[2-3]。斑花黄堇(*Corydalis conspersa* Maxim)为罂粟科紫堇属植物, 多年生草本, 产于甘肃西南部、青海中南部、四川西北及西部地区 and 西藏东部和中部, 在藏药中全草用于瘟疫病, 烧伤, 赤巴病之热症, 经现代药理研究发现, 有镇痛、抗炎、有抗焦虑活性、保肝、杀虫和抗肿瘤等作用^[4-5]。

响应面分析法是一种优化工艺条件的有效方法, 可用于确定各因素及其交互作用在工艺过程

中对响应值的影响, 精确地表述因素与响应值之间的关系。与正交设计法不同, 其是利用中心组合试验拟合出一个完整的二次多项式模型, 通过偏导数求得最佳参数, 在试验设计与结果表达方面更加优良^[6-7]。本试验在单因素试验的基础上, 选取提取浓度、提取料液比和提取温度 3 个因素进行中心组合设计^[8], 利用响应面分析法优化斑花黄堇总生物碱的提取工艺, 为斑花黄堇总生物碱的生产开发提供参考^[9]。

1 仪器与材料

1.1 材料

斑花黄堇采自青海省贵南县过马营镇, 经青海民族大学药学院林鹏程教授鉴定为斑花黄堇

基金项目: 青海省自然科学基金项目(2016-ZJ-903)

作者简介: 确生, 男, 博士生, 教授 Tel: 13997389914 E-mail: qsyang96@163.com

13997389914 E-mail: chenweidong@tju.edu.cn

*通信作者: 陈卫东, 男, 博士, 教授 Tel:

Corydalis conspersa Maxim; 小檗碱对照品(北京北纳创联生物技术研究院, 批号: 633-65-8; 纯度: HPLC $\geq$ 98%); 浓盐酸、氢氧化钠、95%乙醇、氯仿均来自北京化工厂, 均为分析纯。

1.2 仪器

AL204 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; 759 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); BUCHI R-215 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司)。

2 方法与结果

2.1 盐酸回流提取总生物碱^[8]

取阴干的斑花黄堇全草粉碎, 精确称量 2 g, 加入 35 mL 0.5% 的盐酸, 于圆底烧瓶中 50 °C 超声提取 30 min。将提取液抽滤后取滤液, 药材残渣用 0.5% 盐酸多次冲洗并抽滤, 合并冲洗液与提取液。滤液避光静置冷却至室温后用 5% NaOH 溶液调节 pH 至 11~12, 将调节后的溶液移至分液漏斗, 静置 30 min 后用 100 mL 氯仿萃取 3 次, 合并氯仿层, 减压浓缩回收氯仿后得总生物碱。

2.2 最大吸收波长的确定

将“2.1”项下方法制备的总生物碱溶于 95% 乙醇, 移至 50 mL 量瓶中, 用 95% 乙醇定容, 在 200~600 nm 内进行紫外扫描^[10], 以小檗碱对照品配制对照品溶液, 按以上方法进行测定。另取 95% 乙醇, 同法操作, 95% 乙醇溶液为空白溶液。结果表明, 小檗碱对照品溶液和总生物碱样品溶液的最大吸收峰均出现在 410 nm 处, 选取 410 nm 作为本实验测定波长。

2.3 标准曲线的绘制

准确称取 2.16 mg 小檗碱对照品, 溶于 10 mL 95% 乙醇中, 即得浓度为 0.216 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。依次吸取 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 95% 乙醇定容, 摇匀, 测定吸光度。以纵坐标为吸光度(A), 横坐标为小檗碱对照品的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 绘制标准曲线, 得标准曲线方程为 $y=0.0103x+0.0044$ ($R^2=0.9997$)。

2.4 斑花黄堇总生物碱的测定

采用“2.1”项下方法制得的总生物碱加 95% 乙醇溶解, 转移至 50 mL 量瓶中, 定容至刻度, 在 410 nm 处测定吸光度, 重复 3 次, 取平均值。通过测得的吸光度, 在小檗碱标准曲线范围内对应出相应总生物碱的浓度, 再计算出对应的 2 g 全草中的总生物碱得率。

2.5 单因素试验

选取盐酸浓度(0, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%)、液料比(15, 25, 35, 45, 55 mL·g⁻¹)和提取温度(50, 60, 70, 80, 90 °C)3 个因素进行单因素试验, 以确定相关因素及各因素的适宜范围。

2.5.1 盐酸浓度对总生物碱提取的影响 准确称取 5 份各 2.0 g 的斑花黄堇粉末于 250 mL 锥形瓶中, 分别加入 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% 的盐酸 60 mL, 液料比 30 mL·g⁻¹, 封口放置过夜, 第 2 天于水浴锅 80 °C 下超声提取 30 min, 过滤后滤液避光静置冷却至室温后用 5% NaOH 溶液调节 pH 至 11~12, 转移至分液漏斗静置 30 min 后用 100 mL 氯仿萃取 3 次, 合并氯仿层, 减压浓缩回收氯仿后得总生物碱, 用 95% 乙醇溶解后转移至 50 mL 量瓶中, 95% 乙醇定容, 平行测定吸光度 3 次, 计算其小檗碱浓度, 取其平均值。结果显示, 当盐酸浓度为 0.4% 时, 生物碱的提取效果最好; 当盐酸浓度在 0~0.4% 内, 随着盐酸浓度的增大, 提取效果不断提高; 而在超过 0.4% 后提取效果反而随盐酸浓度增大而降低。结果见图 1。

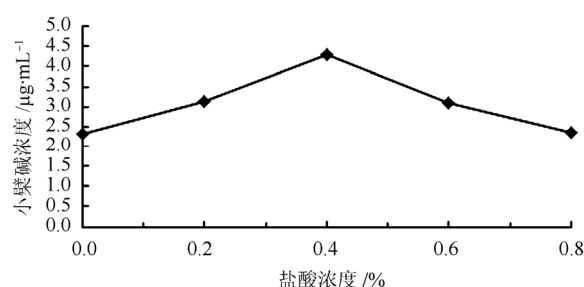


图 1 盐酸浓度对总生物碱提取的影响

Fig. 1 Effect of concentration of HCl on extracting total alkaloid

2.5.2 料液比对总生物碱提取的影响 准确称取 5 份各 2 g 的斑花黄堇粉末于 250 mL 锥形瓶中, 分别加入 30, 50, 70, 90, 110 mL 0.4% 盐酸, 封口放置过夜, 第 2 天于水浴锅 80 °C 下超声提取 30 min, 按“2.5.1”项下方法处理, 用 95% 乙醇溶解后转移至 50 mL 量瓶中, 95% 乙醇定容, 平行测定吸光度 3 次, 取其平均值, 结果显示, 随溶剂量的不断增加, 生物碱的提取效果逐渐增大, 可能是因为溶剂与浸提物接触充分, 使溶出率增加, 当液料比达到 35 mL·g⁻¹ 时, 生物碱的提取效果最佳, 但随溶剂量继续增加, 提取量略有下降, 这可能是因为斑花黄堇中总生物碱的溶出已经达到饱和状态, 故选择液料比为 35 mL·g⁻¹。结果见图 2。

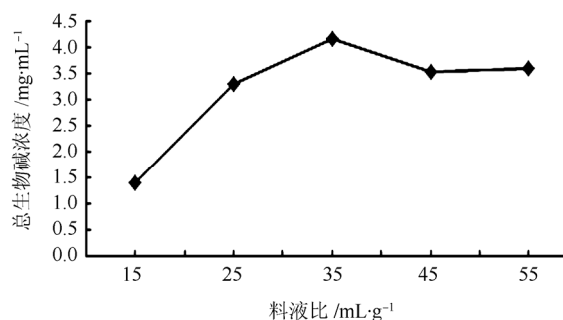


图2 料液比对总生物碱提取的影响

Fig. 2 Effect of the ratio of solvent to material on the yield of total alkaloid

2.5.3 温度对总生物碱提取的影响 准确称取 5 份各 2 g 的斑花紫堇粉末于 250 mL 锥形瓶中, 分别加入 60 mL 0.4% 盐酸, 封口放置过夜, 分别于水浴锅在 50, 60, 70, 80, 90 °C 下超声提取 30 min, 过滤, 静置冷却, 调节 pH 至 11~12, 转移至分液漏斗静置 30 min 后用 100 mL 氯仿萃取 3 次, 合并氯仿层, 减压浓缩回收氯仿后得总生物碱, 用 95% 乙醇溶解后转移至 50 mL 量瓶中, 定容, 测定小檗碱浓度。结果显示, 提取温度为 70 °C 时, 生物碱的提取率最佳, 当提取温度在 50~70 °C 内, 随着提取温度的升高, 提取效果逐渐提高, 而当温度 >70 °C 时, 提取效果反而随提取温度的升高而降低。结果见图 3。

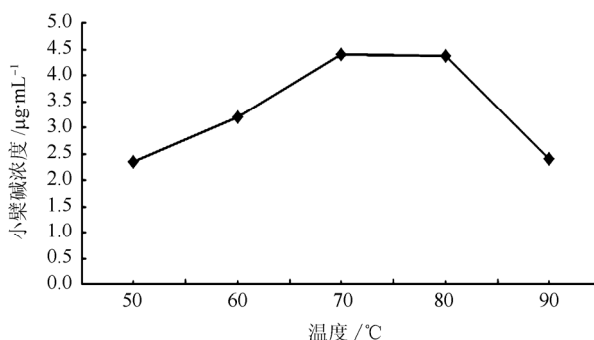


图3 温度对总生物碱提取的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on the yield of total alkaloid

2.6 响应面法优化提取工艺

2.6.1 响应面法试验设计 在单因素试验的基础上, 利用响应面优化法对斑花黄堇中总生物碱的提取工艺进行进一步优化。根据 Box-Benhken 试验设计原理^[11], 选取对斑花黄堇中总生物碱提取率有显著影响的单因素盐酸浓度(A)、料液比(B)和提取温度(C)作为自变量设计响应面试验, 考察

提取总生物碱的最佳工艺条件, 因素水平见表 1^[12]。

表 1 响应面试验因素水平设计表

Tab. 1 Factors and levels of response surface test

因素	水平		
	-1	0	+1
盐酸浓度(A)/%	0.2	0.4	0.6
料液比(B)/mL·g ⁻¹	25	35	45
提取温度(C)/°C	60	70	80

2.6.2 回归方程的建立及显著性检验 根据响应面法 Box-Benhken 设计, 对 17 个实验点进行试验, 斑花黄堇中总生物碱的提取量见表 2, 利用 Design-Expert 8.0.6 Trial 软件进行分析, 以斑花黄堇总生物碱的提取率为响应值^[13], 得到斑花黄堇总生物碱的提取率(Y)对盐酸浓度(A), 料液比(B), 提取温度(C)的二次多项式回归模型方程为 $Y = 0.044 - 0.004A + 0.015B - 0.019C - 0.01AB + 0.003AC + 0.005BC - 0.117A^2 + 0.010B^2 - 0.092C^2$ 。方程中各项系数绝对值的大小直接反映各因素对测定指标的影响程度, 系数的正负反映各因素影响的方向。由方程可知, 3 个因素影响总生物碱提取率的程度次序为提取温度>料液比>盐酸浓度。模型系数显著性结果和方差分析结果见表 3。

表 2 斑花黄堇总生物碱响应面分析方案及实验结果

Tab. 2 Test design and results of response surface analysis of total alkaloids in *Corydalis conspersa* Maxim

序号	因素			生物碱得率/%
	A	B	C	
1	0.2	35	50	0.26
2	0.4	35	60	0.44
3	0.4	45	70	0.36
4	0.6	25	60	0.33
5	0.2	25	60	0.21
6	0.4	45	50	0.39
7	0.4	35	60	0.44
8	0.4	35	60	0.45
9	0.2	35	70	0.26
10	0.4	35	60	0.45
11	0.4	35	60	0.43
12	0.4	25	70	0.32
13	0.2	45	60	0.36
14	0.6	35	50	0.24
15	0.6	45	60	0.34
16	0.6	35	70	0.21
17	0.4	25	50	0.37

表 3 回归统计分析表

Tab. 3 Analysis of variance for each term of the fitted regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.072	9	7.991×10^{-3}	33.80	<0.000 1	显著
A	3.200×10^{-3}	1	3.200×10^{-3}	13.53	0.007 9	$P < 0.05$
B	4.512×10^{-3}	1	4.512×10^{-3}	19.09	0.003 3	$P < 0.05$
C	1.512×10^{-3}	1	1.512×10^{-3}	6.40	0.039 3	$P < 0.05$
AB	2.500×10^{-5}	1	2.500×10^{-5}	0.11	0.754 6	
AC	0.016	1	0.016	66.09	<0.000 1	$P < 0.000 1$
BC	1.000×10^{-2}	1	1.000×10^{-2}	42.30	0.000 3	$P < 0.05$
A ²	7.967×10^{-3}	1	7.967×10^{-3}	33.70	0.000 7	$P < 0.05$
B ²	0.018	1	0.018	77.58	<0.000 1	$P < 0.000 1$
C ²	7.078×10^{-3}	1	7.078×10^{-3}	29.94	0.000 9	$P < 0.05$
残差	1.655×10^{-3}	7	2.364×10^{-4}			
失拟项	1.375×10^{-3}	3	4.583×10^{-4}	6.55	0.650 7	不显著
纯误差	2.800×10^{-4}	4	7.000×10^{-5}			
总差	0.074	16				

由表 3 可知, 该模型极显著($P < 0.000 1$), 模型的相关系数 $R^2 = 0.996 1$, 这说明响应值的 99.61% 来自于自变量(即盐酸的浓度、液料比、提取温度), 该模型与实际实验模型拟合度较好, 所选自变量与响应值之间关系显著。模型失拟项 $P = 0.650 7$, 即不显著, 模型调整确定系数 $R_{Adj} = 0.991 1$, 表明该回归模型对实验结果拟合较好, 实验可以利用该回归模型对实验结果进行分析, 并确定斑花黄堇总生物碱提取的最佳工艺。

由表 3 可知, 各因素的一次项和二次项均达到显著水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.000 1$), 盐酸浓度和温度的交互项、温度和料液比的交互项达到显著水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.000 1$), 而盐酸浓度和料液比的交互项不显著($P > 0.05$)。结果表明, 各变量因素对总生物碱提取效果的影响不是简单的线性关系。

2.6.3 响应面分析与优化 利用软件 Design-Expert 8.0.6 Trial 对表 2 数据进行二次回归多元

拟合, 得到的二次回归方程的响应面, 结果见图 4。

盐酸浓度(A)与料液比(B)交互作用响应面图显示, 当盐酸浓度为 0.42%, 料液比为 $35.21 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 总生物碱提取量达到最大值。由响应面图形可以观察到, 等高线的形状偏椭圆形, 表明盐酸浓度(A)与料液比(B)交互作用显著。结果见图 4。

盐酸浓度(A)与温度(C)交互作用响应面图显示, 当盐酸浓度为 0.42%, 温度为 75°C 时, 总生物碱的提取效果最佳。由响应面图形可以观察到, 等高线的形状偏圆形, 表明盐酸浓度与温度交互作用不显著。结果见图 4。

料液比(B)与温度(C)交互作用响应面图显示, 当料液比为 $35.21 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 温度为 75°C 时, 总生物碱的提取率达到最佳。由响应面图形可以观察到, 曲线走势平滑, 温度和液料比的相互作用不显著。结果见图 4。

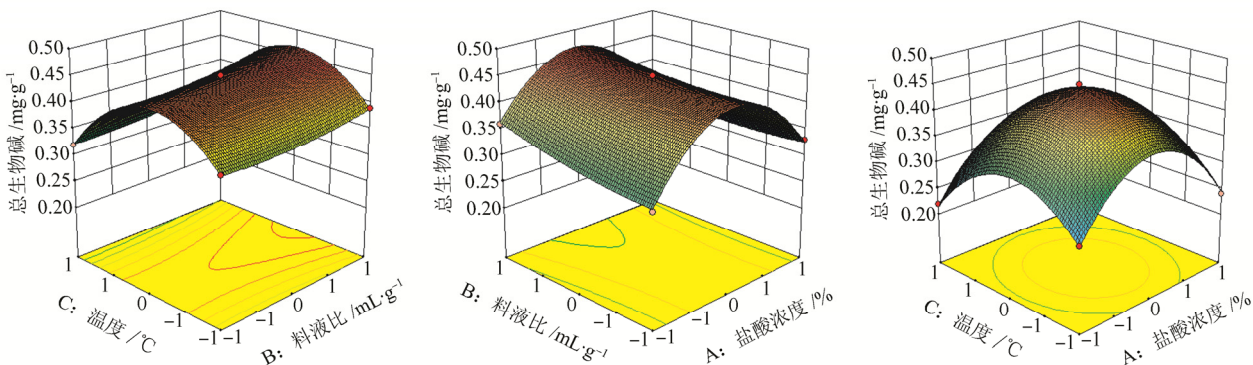


图 4 盐酸浓度、料液比和温度对总生物碱提取的影响

Fig. 4 Effect of concentration of HCl, the ratio of solvent, extraction temperature on the yield of total alkaloid

利用 Design-Expert 8.0.6 Tria 软件分析可知, 得到斑花黄堇总生物碱的最佳工艺条件为盐酸浓度为 0.42%, 料液比为 $35.21 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 温度为 75°C 时, 在此条件下, 得到斑花黄堇总生物碱提取量为 $0.48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

考虑到实验的可操作性, 将最佳条件修改为 0.4%, 料液比为 $35 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 温度为 75°C , 在此条件下进行验证实验得总生物提取量为 $0.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。此条件下总生物碱提取量的理论计算值为 $0.57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 结论

在斑花黄堇总生物碱提取的工艺中, 盐酸浓度、料液比、温度对实验均有影响, 通过单因素试验和响应曲面分析法, 以总生物碱提取量为指标, 确定了最佳提取工艺如下: 盐酸浓度为 0.4%, 料液比为 $35 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 温度为 75°C 时, 在此条件下测得斑花黄堇总生物碱的实际值为 $0.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

REFERENCES

- [1] 吴征溢. 西藏植物志[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1986: 243-246.
- [2] FAN C X. Tibetan medicinal plant from *Corydalis* and their exploitation and protection [J]. Chin Acad Med Magazine Organism(中国医学生物技术应用杂志), 2003(1): 36-38
- [3] ZHANG X F, WANG S C. The investigation on Qinghai *Corydalis* medicinal plant resources and their exploitation [J]. Shizhen J Tradit Chin Med Res(时珍国药研究), 1997, 8(6): 547-548.
- [4] LI J C, LIN Y H, LONG Q P, et al. Determination of the content of total alkaloid in *Corydalis impatiens* by UV spectrophotometric [J]. Yunnan Chem Technol(云南化工), 2012, 39(4): 19-21.
- [5] 马涛, 张秋龙, 丁晨曦, 等. 响应面法优化假北紫堇总生物碱提取工艺[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1736-1740.
- [6] SHANG X J, QIAN J Q, GUO H. Optimization of extraction of alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by response surface methodology [J]. Chem Indust Forest Product(林产化学与工业), 2010, 30(2): 32-36.
- [7] 刘萍, 程轩轩, 张旭红, 等. 响应面法优化龙眼核多糖的酶法提取工艺研究[J]. 今日药学, 2016, 26(5): 331-334.
- [8] LUAN Q X, ZHAO Y, ZHOU X, et al. Optimization on extraction technology for *Eucommia ulmoides* by single-factor experiment combined with response surface methodology [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(5): 859-865.
- [9] ZHAO W X, SUN Z Q, GAO Y H, et al. Optimization of extraction technique of total alkaloid from *Radix Stemona* via response surface methodology [J] J Northwest A & F Univ(西北农林科技大学学报), 2008, 36(7): 185-190.
- [10] DU Y Y, LIU C J, LIU Y Y. Optimization of total alkaloids extraction from *Actinidia arguta* stems using response surface methodology [J]. Sci Technol Food Indust(食品工业科技), 2015, 36(13): 220-224.
- [11] HU J, ZHANG L, MIN Y J, et al. Study of the extracting technology of alkaloid from *Lycoris radiate* [J]. Forest By-Product Speciality in China(中国林副特产), 2007, 89(4): 8-12.
- [12] SONG Z Q, AO M H. Research progress of alkaloids in *Uncaria* [J]. Medicinal Plant, 2014, 5(5): 56-58.
- [13] JIN G Z. Study of hepatoprotective effect of the total alkaloids from *Corydalis saxicola* Bunting of the acute chemical hepatic injury model mice [J]. China Modern Medicine, 2010, 17(27): 29-30.

收稿日期: 2016-05-20
(本文责编: 蔡珊珊)