

响应面法优化椿皮中铁屎米-6-酮生物碱超声辅助提取工艺

李永春^{1,2}, 李晓兰², 赵美荣², 赵艳², 张智^{1*} (1.东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 2.赤峰学院生命科学院, 内蒙古 赤峰 024000)

摘要: 目的 应用响应面法优化超声辅助提取椿皮中铁屎米-6-酮生物碱的工艺条件。方法 以铁屎米-6-酮生物碱提取量为指标, 在单因素考察乙醇提取铁屎米-6-酮的基础上, 采用中心组合试验设计和响应面分析法优选提取工艺参数。结果 最佳提取工艺条件为乙醇浓度 68%, 液固比 32 mL·g⁻¹, 超声温度 54 ℃, 超声时间 38 min, 铁屎米-6-酮生物碱提取量为 26.19 μg·g⁻¹, 接近于模型预测值(26.31 μg·g⁻¹)。结论 优选的超声提取工艺合理可靠, 可为臭椿的开发应用提供实验依据。

关键词: 椿皮; 铁屎米-6-酮; 超声辅助提取; 响应面法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)05-0628-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.002

引用本文: 李永春, 李晓兰, 赵美荣, 等. 响应面法优化椿皮中铁屎米-6-酮生物碱超声辅助提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 628-632.

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction Technology of Canthin-6-one from Bark of *Ailanthus Altissima* by Response Surface Methodology

LI Yongchun^{1,2}, LI Xiaolan², ZHAO Meirong², ZHAO Yan², ZHANG Zhi^{1*} (1.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2.College of Life Science, Chifeng University, Chifeng 024000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize ultrasonic-assisted extraction technology of canthin-6-one from bark of *Ailanthus altissima*. **METHODS** With yield of canthin-6-one as index, extraction technology parameters were optimized by central composite design-response surface methodology on the basis of the single factor investigation of conditions for extracting canthin-6-one by ethanol. **RESULTS** Optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration 68%, liquid-solid ratio 32 mL·g⁻¹, ultrasound temperature 54 ℃, extraction time 38 min. Under these conditions, yield of canthin-6-one was 26.19 μg·g⁻¹, which was close to the predicted value(26.31 μg·g⁻¹). **CONCLUSION** This optimized technology is reasonable and reliable to provide a basis for development and application of *Ailanthus altissima*.

KEY WORDS: bark of *Ailanthus altissima*; canthin-6-one; ultrasound-assisted extraction; response surface methodology

椿皮, 又称椿根皮、樗白皮, 为苦木科臭椿属植物臭椿 *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle 的干燥根皮或干皮, 是我国传统的中草药, 具有清热燥湿、收涩止带、止泻、止血等功效^[1]。椿皮的主要活性成分为苦木素类和呋喃生物碱类物质, 其呋喃生物碱类多为铁屎米酮型或卡波琳型, 具有较强的抗菌活性。许多研究表明铁屎米-6-酮生物碱是很有潜力的抗真菌成分, 在较低的质量浓度(5~80 μg·mL⁻¹)下就能表现出抗真菌活性, 此外, 生物碱还具有抗病毒、抗肿瘤、抗寄生虫、抗溃疡等生物活性, 近年来逐渐成为臭椿研究的重点^[2-3]。

目前, 国内外对于臭椿生物碱的研究多侧重于结构鉴定和药理学方面^[4-8], 而工业化提取方面研究较少。相对于其他植物, 椿皮中的生物碱类

化合物含量相对较低, 传统的溶剂浸提方法存在操作时间长、溶剂用量大、提取率低等缺点。超声波辅助提取是近年来发展的一项新的提取技术, 普遍应用于提取植物中的生物活性成分, 具有提取时间短、产率高、避免有效成分被破坏等优点^[9-12], 但超声技术应用于提取椿皮中生物碱的研究尚未见报道。本实验以椿皮为原料, 乙醇为提取溶剂, 以铁屎米-6-酮生物碱提取量为评价指标, 在单因素试验基础上, 采用中心组合试验设计和响应面分析法优选椿皮中铁屎米-6-酮生物碱的超声提取工艺, 为椿皮药材的进一步开发利用提供参考。

1 材料与试剂

Autobalance AD6000 型超微量天平(PerkinElmer

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400459)

作者简介: 李永春, 男, 博士生, 讲师 Tel: 15047627886
(0451)82190222 E-mail: ldzhangzhi@163.com

E-mail: yongchun008@qq.com

*通信作者: 张智, 女, 博导, 教授 Tel:

公司); FL2200 II 型高效液相色谱仪(浙江福立分析仪器股份有限公司); SB-5200DNT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); GWA-UN5-30 型超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司); Eppendorf 微量移液器。

椿皮药材样品购自安徽亳州药材市场, 经赤峰学院植物学刘铁志教授鉴定为苦木科植物臭椿的干燥茎皮。铁屎米-6-酮对照品(陕西宝鸡市辰光生物有限公司, 批号: 20170312, HPLC>98%); 甲醇(天津市康科德科技有限公司, 色谱纯); 乙腈(天津市康科德科技有限公司, 色谱纯); 冰醋酸(天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯); 95%乙醇(天津市恒兴化学试剂制造有限公司, 分析纯); 水为超纯水(自制, 并经 0.22 μm 水系滤膜过滤)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%醋酸水溶液(35:65); 流速: 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。见图 1。

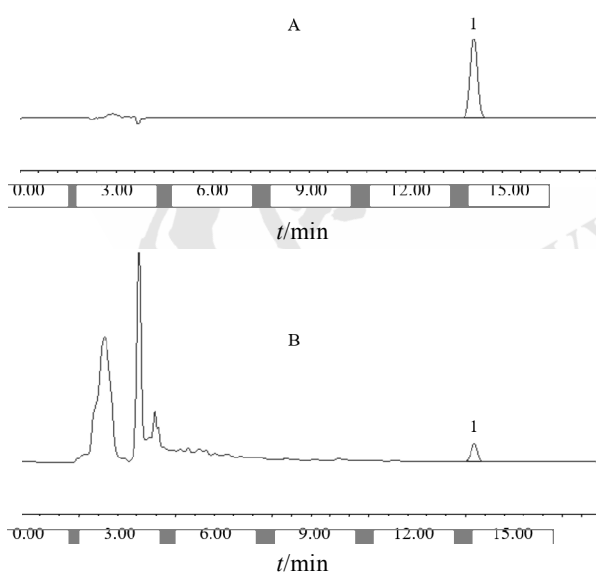


图 1 椿皮高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-铁屎米-6-酮。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-canthin-6-one control; B-sample; 1-canthin-6-one.

2.2 标准曲线的建立

精密称取铁屎米-6-酮 0.657 8 mg, 以甲醇定容制成对照品溶液, 精密吸取一定量对照品溶液, 以甲醇配制成 1.10, 2.19, 4.39, 6.58, 8.77, 10.96,

13.16, 15.35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列浓度, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以峰面积 Y 与进样浓度 X 进行回归分析, 得方程 $Y=10\,026.52+70\,252.688X$ ($r=0.999\,4$), 线性范围为 1.10~15.35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 供试品溶液的制备

准确称取一定量的过 80 目筛的椿皮粉末置于锥形瓶中, 在不同的超声条件下提取, 提取液抽滤, 滤液减压浓缩后定容, 用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 液固比 称取椿皮粉末 5 份, 每份 3.000 g, 固定乙醇浓度 95%, 超声时间 20 min, 超声温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 分别用 10, 20, 30, 40, 50 mL $\cdot\text{g}^{-1}$ 的乙醇溶液提取, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样。铁屎米-6-酮生物碱提取量分别为 10.26, 12.08, 15.22, 14.28, 14.13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 根据测定结果, 选择液固比 20~40 mL $\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.4.2 超声时间 称取椿皮粉末 5 份, 每份 3.000 g, 固定乙醇浓度 95%, 液固比 10 mL $\cdot\text{g}^{-1}$, 超声温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 分别提取 20, 30, 40, 50, 60 min, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样。铁屎米-6-酮生物碱提取量分别为 10.71, 11.25, 13.58, 13.77, 13.87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 根据测定结果, 选择提取时间 30~50 min。

2.4.3 超声温度 称取椿皮粉末 5 份, 每份 3.000 g, 固定乙醇浓度 95%, 液固比 10 mL $\cdot\text{g}^{-1}$, 超声时间 20 min, 超声温度分别为 0, 30, 40, 50, 60 $^{\circ}\text{C}$, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样。铁屎米-6-酮生物碱提取量分别为 6.17, 10.09, 15.00, 20.65, 21.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 根据测定结果, 选择提取温度 40~60 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.4 乙醇浓度 称取椿皮粉末 5 份, 每份 3.000 g, 固定液固比 10 mL $\cdot\text{g}^{-1}$, 超声时间 20 min, 超声温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 分别用 55%, 65%, 75%, 85%, 95% 的乙醇溶液提取, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样。铁屎米-6-酮生物碱提取量分别为 14.72, 19.37, 16.54, 14.79, 9.41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 根据测定结果, 选择乙醇浓度 55%~75%。

2.5 响应面试验

根据单因素试验, 采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件进行中心组合试验设计, 以乙醇浓度、液固

比、超声温度、超声时间为自变量,铁屎米-6-酮生物碱提取量为响应值,优化超声波辅助提取椿皮中铁屎米-6-酮生物碱工艺。试验因素水平见表1,试验安排及结果见表2。

表1 试验因素水平设计表

Tab. 1 Factors and levels of response surface test

水平	A 乙醇浓度/ %	B 液固比/ mL·g ⁻¹	C 超声温度/ ℃	D 超声时间/ min
-2	55	20	40	30
-1	60	25	45	35
0	65	30	50	40
1	70	35	55	45
2	75	40	60	50

表2 中心组合试验安排及结果

Tab. 2 Central composite design and results

试验号	因素				铁屎米-6-酮 提取量/μg·g ⁻¹
	A	B	C	D	
1	60	25	45	35	24.41
2	70	25	45	35	23.92
3	60	35	45	35	24.30
4	70	35	45	35	23.76
5	60	25	55	35	24.39
6	70	25	55	35	24.85
7	60	35	55	35	25.28
8	70	35	55	35	25.69
9	60	25	45	45	24.04
10	70	25	45	45	23.90
11	60	35	45	45	23.93
12	70	35	45	45	23.96
13	60	25	55	45	23.28
14	70	25	55	45	23.85
15	60	35	55	45	24.49
16	70	35	55	45	25.42
17	55	30	50	40	24.84
18	75	30	50	40	25.77
19	65	20	50	40	23.50
20	65	40	50	40	24.42
21	65	30	40	40	24.04
22	65	30	60	40	25.28
23	65	30	50	30	25.14
24	65	30	50	50	23.77
25	65	30	50	40	26.09
26	65	30	50	40	25.93
27	65	30	50	40	26.22
28	65	30	50	40	25.51
29	65	30	50	40	26.19
30	65	30	50	40	26.23

应用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对表2中数据进行多元回归分析,得回归方程 $Y=26.03+0.13A+$

$$0.25B+0.31C+0.27D+0.026AB+0.22AC+0.097AD+0.30BC+0.080BD+0.16CD+0.22A^2+0.56B^2+0.38C^2+0.44D^2。$$

对建立的模型进行方差分析,结果见表3。由方差分析可知,一次项中的 B, C, D , 交叉项 AC, BC 及各因素二次项对响应值的影响极显著, A, CD 项对响应值的影响显著, AB, AD, BD 项对响应值的影响不显著,说明响应值与自变量之间不是简单的线性关系。在本试验范围内,该模型的决定系数 R^2 为 0.959 0,校正后的决定系数 0.920 7,模型极显著,失拟项不显著,说明回归方程拟合度良好,能较好地描述试验结果。

表3 响应面模型的方差分析

Tab. 3 Anova for response surface quadratic model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	23.11	14	1.65	25.05	<0.000 1	极显著
A	0.4	1	0.40	6.08	0.026 2	显著
B	1.52	1	1.52	23.05	0.000 2	极显著
C	2.35	1	2.35	35.73	<0.000 1	极显著
D	1.74	1	1.74	26.37	0.000 1	极显著
AB	0.011	1	0.011	0.17	0.688 3	
AC	0.77	1	0.77	11.72	0.003 8	极显著
AD	0.15	1	0.15	2.26	0.153 2	
BC	1.45	1	1.45	22.06	0.000 3	极显著
BD	0.10	1	0.10	1.56	0.230 4	
CD	0.43	1	0.43	6.51	0.022 1	显著
A ²	1.36	1	1.36	20.59	0.000 4	极显著
B ²	8.57	1	8.57	130.14	<0.000 1	极显著
C ²	4.06	1	4.06	61.65	<0.000 1	极显著
D ²	5.20	1	5.20	78.90	<0.000 1	极显著
残差	0.99	15	0.066			
失拟	0.61	10	0.061	0.8	0.642 3	不显著
误差	0.38	5	0.076			
总和	24.10	29				

根据回归方程作响应面和等高线,考察各因素对铁屎米-6-酮生物碱提取量的影响。通过观察响应曲面的倾斜度和等高线形状密度,判断两者交互作用的显著性。响应曲面的坡度陡峭,表明形成该曲面的因素对响应值影响显著且存在较强交互作用;等高线密集成椭圆形,表明两因素对响应值影响显著且存在较强交互作用^[13-14]。结果见图2~4。从图中可以看出 AC, BC, CD 项形成的曲面较陡峭,且等高线呈椭圆形,说明 AC, BC, CD 项交互作用较显著,对铁屎米-6-酮生物碱提取量影响显著。

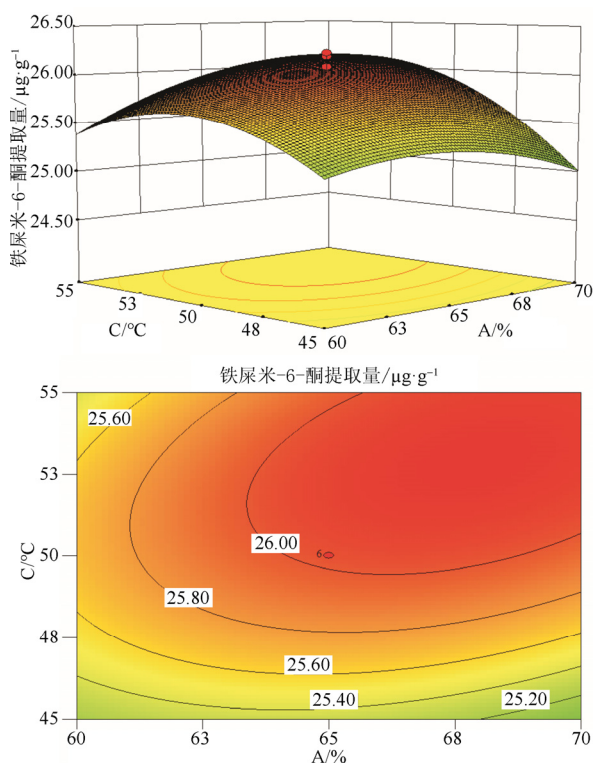


图2 乙醇浓度与超声温度对铁屎米-6-酮提取量的响应面及等高线

Fig. 2 Response surface and contour plots of ethanol concentration and temperature on the extraction rate of canthin-6-one

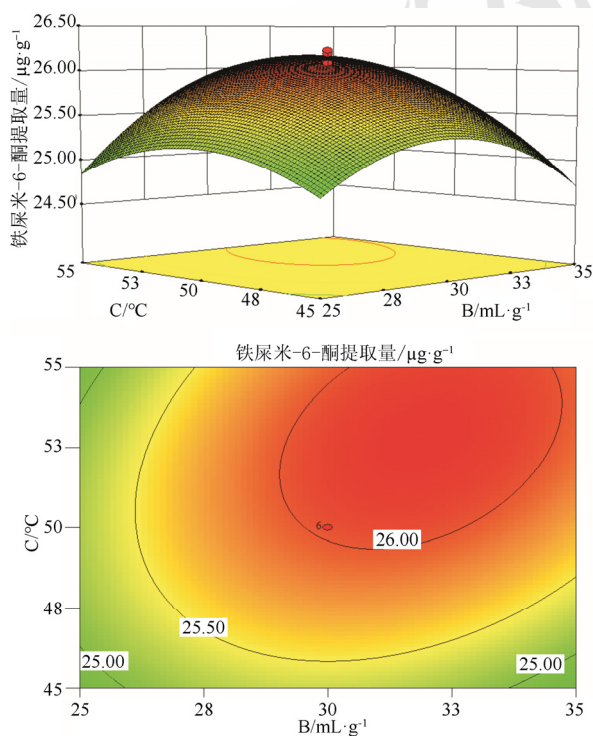


图3 液固比与超声温度对铁屎米-6-酮提取量的响应面及等高线

Fig. 3 Response surface and contour plots of material-to-liquid and temperature on the extraction rate of canthin-6-one

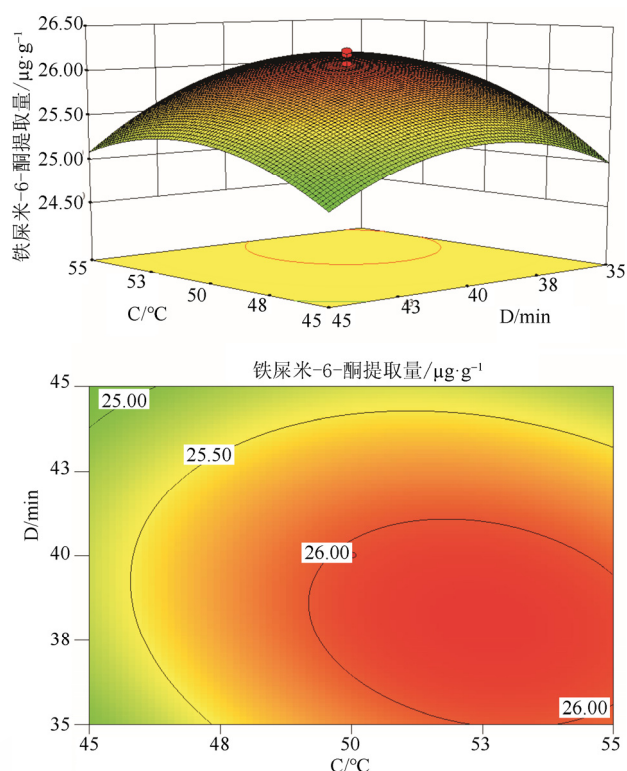


图4 超声温度与超声时间对铁屎米-6-酮提取量的响应面及等高线

Fig. 4 Response surface and contour plots of extraction temperature and time on the extraction rate of canthin-6-one

2.6 验证试验

利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对回归方程进行分析, 获得最佳提取工艺条件为乙醇浓度 68.28%, 液固比 32.21 mL·g⁻¹, 超声温度 54.21 °C, 超声时间 38.23 min, 铁屎米-6-酮生物碱提取量为 26.31 μg·g⁻¹。考虑实际操作, 将工艺条件修正为乙醇浓度 68%, 液固比 32 mL·g⁻¹, 超声温度 54 °C, 超声时间 38 min, 按该工艺进行验证试验, 结果铁屎米-6-酮生物碱提取量为 26.19 μg·g⁻¹ (RSD=2.3%), 与模型预测值较为接近, 表明建立的模型可靠, 具有较好的预测性。

3 讨论

相对于其他植物, 椿皮中的生物碱类化合物含量相对较低, 采用超声波辅助提取, 可节省时间, 提高效率, 并且工艺简单, 适合大批量生产。通过响应面法优化超声辅助提取椿皮生物碱工艺, 具有精确度高, 模型预测性好的特点, 得到了最佳工艺参数, 对臭椿植物资源的进一步开发利用具有重要的参考价值。

本试验只考察了同一批次椿皮药材的提取工艺优化, 由于药材的产地、采收时节、生长环境、

存储加工等因素, 椿皮中铁屎米-6-酮生物碱的含量可能存在较大的变化, 这些因素与椿皮铁屎米-6-酮生物碱含量之间的关系, 还需要进一步的研究。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2015: 354.
- [2] OHMOTO T, SUNG Y I. Antimycotic substances in the crude drugs II [J]. Shoyakugaku Zasshi, 1982, 36(4): 307-314.
- [3] HU M F, SONG X B, ZHANG L J. Research progress in indole alkaloids from *Ailanthus altissima* and their bioactivities [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2012, 35(6): 469-472.
- [4] QI X, CHEN Z H, GAO L, et al. Isolation and structure identification of alkaloid and quassinoids from root bark of *Ailanthus altissima* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(6): 1057-1060.
- [5] HU M F, SONG X B, ZHANG L J et al. Isolation of canthin-6-one from bark of *Ailanthus altissima* and its antibiotic tests *in vitro* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2013, 15(12): 75-77.
- [6] KIM H M, LEE J S, SEZIRAHIGA J, et al. A new canthinone-type alkaloid isolated from *Ailanthus altissima* Swingle [J]. Molecules, 2016, 21(5): 642. Doi: 10.3390/molecules20150642.
- [7] ANDERSON L A, HARRIS A, PHILIPSON J D. Production of cytotoxic canthin-6-one alkaloids by *Ailanthus altissima* plant cell cultures [J]. J Nat Prod, 1983, 46(3): 374-378.
- [8] LIU J M, ZHANG Z W, YAO J, et al. Chemical constituents of the branches of *Ailanthus altissima* Swingle [J]. Chem Indust Forest Prod(林产化学与工业), 2013, 33(4): 121-127.
- [9] 刘湘, 汪秋安. 天然产物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 16.
- [10] SHI Z, WANG J P, ZHANG J J, et al. Optimizing the extraction process of the total saponin of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* by response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(1): 68-71.
- [11] ZHAO W T. Optimization of extracting flavonoids from *Isatidis Radix* by response surface methodology and its antioxidant activity [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(3): 313-317.
- [12] LIU J S, LI S J, ZHANG D Y, et al. Optimization of extraction technology for total alkaloids from *Baphicacanthus cusia* by response surface methodology [J]. Chin J Exp Tradit Medl Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(9): 41-44.
- [13] YANG W G, XIE G H, YAN W H, et al. Optimization of wet-salting technology for *muraenesox cinereus* using response surface analysis [J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2010, 10(1): 133-139.
- [14] YANG J, ZHANG G W, WANG J R, et al. Response surface methodology as an approach to optimizing ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from navel orange peel [J]. Food Sci(食品科学), 2009, 30(16): 94-97.

收稿日期: 2017-10-30

(本文责编: 曹粤锋)