

响应面法优化一叶萩种子壳中一叶萩碱的提取工艺

昌妍希¹ 张 屏¹ 包保全^{1,2}

(1 内蒙古医科大学药学院,呼和浩特,010100; 2 内蒙古民族大学蒙医药学院,通辽,028000)

摘要 目的:利用响应面分析法优化一叶萩种子壳中一叶萩碱的提取工艺参数。方法:采取酸水浸泡提取法、离子交换法及索氏抽提法结合的方法对一叶萩种子壳中一叶萩碱提取进行优化。经过单因素法与响应面 Box-Behnken 法选择初始参数,之后利用 Design-Expert 软件进行二次回归分析对参数进一步优化。结果:最优参数为提取次数 3 次,乙醇浓度 85%,酸浓度 4.7%。结论:所优选的提取工艺具有良好的可行性。

关键词 一叶萩碱;提取工艺;优化设计;响应面法;最优参数

Extraction Optimization of Securinine from Suffrutescent Securinega Seeds by Response Surface Method

Chang Yanxi¹, Zhang Ping¹, Bao Baoquan^{1,2}

(1 College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2 College of Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract Objective: To optimize the extraction of securinine from the seeds of Suffrutescent securinega by response surface method. **Methods:** The seeds were soaked and extracted by acid water, and the extraction was subjected to ion exchange column. Crude securinine was further condensed by Saxhlet extraction method. Single factor experiment and Box-Behnken Design method were used to determine the arrangement of parameters. Quadratic regression analysis were used to optimize the data by Design-Expert software. **Results:** The optimal parameter of production technology is finally determined as three times of extraction, with 85% ethanol concentration and 4.7% acid concentration. **Conclusion:** The optimized extraction technology is practicable.

Key Words Securinine; Extraction Technology; Optimized design; Box-Behnken design; Optimal parameter

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.03.031

一叶萩(*Suffrutescent Securinega Twig*)又名叶底珠,狗杏条,为大戟科叶下珠族白饭树属植物。其主要生物活性成分为一叶萩碱,属于吲哚里西啶类生物碱,具有良好的抗肿瘤活性和兴奋中枢神经作用,应用前景十分广阔^[3]。一叶萩总碱主要从一叶萩种子中用溶剂法提取获得,传统的提取工艺周期长,有机溶剂用量多,而得率仅为万分之四左右^[4]。并且一叶萩种子壳中也含有一叶萩碱,传统提取将其作为废料处理。我们从一叶萩种子壳中提取一叶萩碱,采用新的提取方法,用 Box-Behnken 法设计试验并利用 Design-Expert 软件进行分析,得到了优化的提取方案。该方法对一叶萩种子壳中一叶萩碱的提取进行了条件优化,提高了一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率,降低了生产成本,为大规模化提取生物碱奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 一叶萩植物种子 2012 年 10 月采摘自吉林省集安市,自然晾干,取种子壳。732 磺酸型阳

离子树脂(河北华众化工有限公司);乙醇;冰醋酸;乙酸乙酯;碘化铊钾;浓盐酸;氢氧化钠;乙酸乙酯;石油醚;硅钨酸;苦味酸;氯仿;甲醇(均购自北京鼎国试剂有限公司)。数显恒温水浴锅 H-88(国华电器有限公司);电子天平 METTLER TOLEDO(上海托利多仪器有限公司);HL-2B 恒流泵(上海实业精科有限公司);旋转蒸发仪 RE52-99(上海亚荣生化仪器);FW177 微型植物粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);电热恒温鼓风干燥箱 GZX-9240(上海博迅实业有限公司);KQ-50B 超声仪(上海司乐仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 对 732 磺酸型阳离子树脂的预处理 将新树脂用蒸馏水反复清洗,每隔约 10 min 换水 1 次,水洗至水不带颜色且泡沫很少时为止。之后用 5% 的盐酸浸泡,浸泡 1 h 后用蒸馏水洗至中性。再用 5% 氢氧化钠浸泡,浸泡 1 h 后用蒸馏水洗至中性。用 5% 的盐酸将树脂转成氢型,用蒸馏水洗至中性,备

基金项目:教育部留学回国人员科研启动项目“基于四味土木香散药效物质基础的新剂型开发”(编号:2010LXHG21)

作者简介:昌妍希,内蒙古医科大学药学院研究生,E-mail:316646637@qq.com

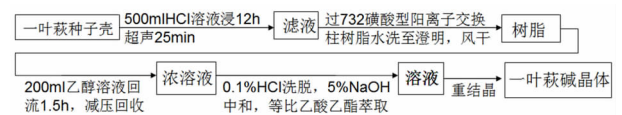
通信作者:包保全,博士,教授,研究方向:蒙药活性物质基础及资源研究,E-mail:baobaoquan@aliyun.com

用。

1.2.2 对一叶萩种子壳的预处理 将植物一叶萩种子壳晾干,放置干燥箱,75 ℃干燥 11 h 后用粉碎机粉碎成一叶萩种子壳粉末,过 40 目筛备用。

1.2.3 对树脂柱的装柱流程 本实验采用湿法装柱。将柱子垂直放置,在交换柱底部筛板上部放入一片小滤纸,用漏斗将树脂以一定的速度加入交换柱中,等到树脂颗粒充分下沉后,在交换柱的上面再覆盖一层脱脂棉,最后在交换柱的上部加入含有一叶萩碱的酸液并且控制酸液流速 1 mL/min。

1.3 一叶萩种子壳中一叶萩碱提取工艺流程 粉碎后过 40 目筛的一叶萩种子壳用 500 mL 盐酸溶液浸润 12 h 后超声 25 min,过滤,取滤液。将酸水液通过 732 磺酸型阳离子交换柱,交换完全后将树脂水洗至澄明状态,室温风干备用。风干后的树脂放入索氏提取器中用 200 mL 乙醇溶液回流洗脱 1.5 h,减压回收溶剂,浓溶液用少量 0.1% 盐酸溶液洗脱后再用 5% 氢氧化钠溶液中和,等比乙酸乙酯萃取。重结晶精制提纯得一叶萩碱晶体。



1.4 单因素试验 取一叶萩种子壳粉末 100 g,以一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率为指标,采用单因素实验研究萃取次数,乙醇浓度,酸浓度 3 个因素对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的影响。

1.5 响应面法优化试验 根据响应面 Box-Behnken 设计原理,将单因素试验中对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率影响明显的因素进行分析试验,以萃取次数,乙醇浓度,酸浓度 3 个因素为自变量,一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率为响应值,设计三因素三水平的响应面分析试验。各参数所代表因素及其水平编码表见表 1。

表 1 响应面 Box-Behnken 试验设计因素编码表及水平值				
代码	因素	水平		
		-1	0	1
A	萃取次数(次)	2	3	4
B	乙醇浓度(%)	80	85	90
C	酸浓度(‰)	3.5	4.7	5.9

1.6 模型验证 通过响应面法优化一叶萩种子壳中一叶萩碱的提取条件进行提取试验,比较模型预测值和试验值,验证模型的有效性。

1.7 数据分析 采用 Design Expert 7.0 软件设计 3 因素 3 水平响应面分析试验,试验结果采用 Design

Expert 7.0 软件进行数据处理和分析,确定最佳试验条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析 实验分别考察了萃取次数,乙醇浓度,酸浓度 3 个因素对一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率影响,如图 1 至图 3 所示。

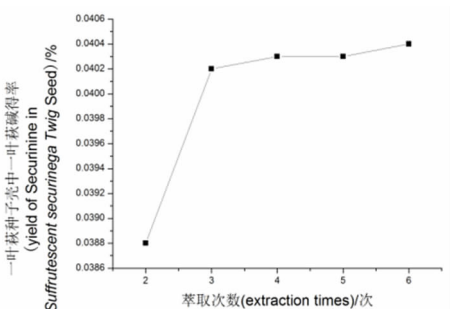


图 1 萃取次数对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的影响

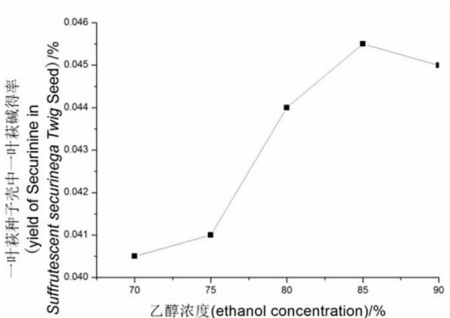


图 2 乙醇浓度对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的影响

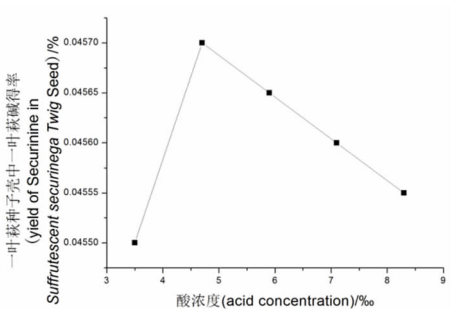


图 3 酸浓度对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的影响

如图 1 所示,随着萃取次数的增加,一叶萩种子壳中一叶萩碱得率也在增加,萃取 3 次一叶萩碱得率增长的幅度很大。当萃取次数超过 3 以后,得率增加量微乎其微,原因是随着萃取次数的增加,一叶萩碱几乎全部溶解在萃取液中,所以对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的增加没有明显的作用。

如图 2 所示,随着乙醇浓度的增加,一叶萩种子壳中一叶萩碱得率不断增加,当乙醇浓度为 85% 的时候一叶萩种子壳中一叶萩碱得率几乎不再增加,85% 是其浓度的最大值点。

如图 3 所示,随着酸水液浓度的增加,一叶萩种

子壳中一叶萩碱得率明显增加,但在酸水液的浓度大于 4.7‰后,一叶萩种子壳中一叶萩碱得率随着酸水液浓度的增大而降低。说明在 4.7‰时一叶萩种子壳中一叶萩碱得率最高,浓度在增大一叶萩种子壳中一叶萩碱得率反而减小可能原因是酸水使一叶萩碱发生了变化。

表 2 响应面 Box-Behnken 实验设计及相应的实验结果

试验号	因素 A 萃取次数	因素 B 乙醇浓度%	因素 C 酸浓度‰	一叶萩碱含量 g
1	-1	0	-1	0.06
2	1	0	-1	0.05
3	-1	-1	0	0.0349
4	0	1	-1	0.0296
5	0	0	0	0.0678
6	0	0	0	0.0654
7	1	0	1	0.065
8	0	0	0	0.0653
9	0	-1	1	0.033
10	-1	1	0	0.0428
11	0	0	0	0.0689
12	0	-1	-1	0.0482
13	0	1	1	0.0398
14	1	1	0	0.0289
15	1	-1	0	0.048
16	-1	0	1	0.038
17	0	0	0	0.0664

表 3 响应面 Box-Behnken 方差分析表

项目	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F	显著性
模型	3.375E-003	9	3.750E-004	52.58	<0.0001	***
A	3.281E-005	1	3.281E-005	4.60	0.0691	
B	6.612E-005	1	6.612E-005	9.27	0.0187	*
C	1.800E-005	1	1.800E-005	2.52	0.1562	
AB	1.823E-004	1	1.823E-004	25.55	0.0015	**
AC	3.423E-004	1	3.423E-004	47.99	0.0002	**
BC	1.613E-004	1	1.613E-004	22.62	0.0021	**
A ²	1.647E-004	1	1.647E-004	23.10	0.0020	**
B ²	2.011E-003	1	2.011E-003	282.00	<0.0001	***
C ²	2.216E-004	1	2.216E-004	31.08	0.0008	**
残差	4.992E-005	7	7.132E-006			
失拟项	4.015E-005	3	1.338E-005	5.48	0.0670	
净误差	9.772E-006	4	2.443E-006			
总离差	3.425E-003	16				

注:($P<0.05$) * 为差异有统计学意义;($P<0.01$) ** 为差异有显著性意义;($P<0.0001$) *** 为差异有非常显著性意义

2.2 响应面法优化试验结果分析

2.2.1 二次回归模型拟合以及方差分析 根据试验结果,利用响应面分析软件对实验数据进行分析,以一叶萩种子壳中一叶萩碱得率为因变量,以提取次数、乙醇浓度,酸浓度为自变量建立回归方程:

$$Y = 0.067 + 2.025 \times 10^{-3} A - 2.875 \times 10^{-3} B -$$

$$1.500 \times 10^{-3} C - 6.750 \times 10^{-3} AB + 9.250 \times 10^{-3} AC + 6.350 \times 10^{-3} BC - 6.255 \times 10^{-3} A^2 - 0.022B^2 - 7.255 \times 10^{-3} C^2$$

回归方程的决定系数 R^2 为 0.9854。并对实验结果进行方差分析,结果见表 3,当 $P<0.05$,表示该项指标显著, $P<0.01$,表示该项指标差异有显著性意义, $P<0.0001$,表示该项指标差异有非常显著性意义。表 3 表明,一叶萩种子壳中一叶萩碱与试验中 3 个因素的回归方程 F 值为 52.58,整体模型“Prob > F”值 <0.0001 ,表明该方程模型差异有非常显著性意义。

萃取次数对一叶萩种子壳中一叶萩碱产量影响不显著,乙醇浓度对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率影响显著,酸浓度对一叶萩种子壳中一叶萩碱产量影响不显著;在交互相中萃取次数和乙醇浓度的交互影响极显著,萃取次数和酸浓度的交互影响极显著;乙醇浓度与酸浓度交互影响极显著;在二次项中,萃取次数,酸浓度的影响极显著,乙醇浓度的影响差异极显著。同时,表 3 在响应面优化结果条件下,反映了各因素显著性对响应值的影响。失拟项“Prob > F”值 >0.05 ,说明模型方程拟合度良好,能够很好的反映真实的实验值,所以可以使用本模型来分析响应值的变化。

2.2.2 响应曲面交互作用分析 由图 4 可以看出,萃取次数和乙醇浓度的交互作用对一叶萩种子壳中一叶萩碱含量的影响极显著。实验中通过控制萃取次数和乙醇浓度来获得较高一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率,当萃取次数控制在 3 次,乙醇浓度控制在 85% 时,可以获得一叶萩种子壳中一叶萩碱的最大得率。

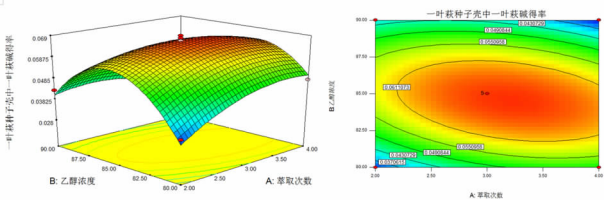


图 4 萃取次数与乙醇浓度的交互作用对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的响应面和等高线图

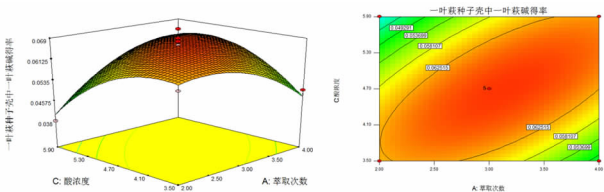


图 5 萃取次数与酸浓度的交互作用对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的响应面和等高线图

由图5可以看出,萃取次数和酸浓度的交互作用对一叶萩种子壳中一叶萩碱含量的影响极显著。实验中通过控制萃取次数和浓度酸来获得较高一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率,当萃取次数控制在3次,酸浓度控制在4‰时,可以获得一叶萩种子壳中一叶萩碱的最大得率。

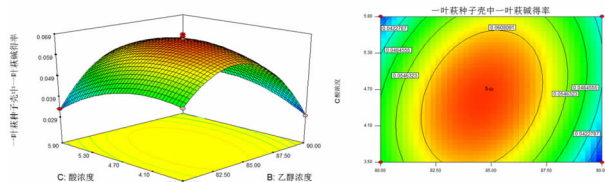


图6 乙醇浓度与酸浓度的交互作用对一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的响应面和等高线图

由图6可以看出,乙醇浓度和酸浓度的交互作用对一叶萩种子壳中一叶萩碱含量的影响极显著。实验中通过控制乙醇浓度和酸浓度来获得较高一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率,当乙醇浓度控制在85%时,酸浓度控制在4‰,可以获得一叶萩种子壳中一叶萩碱的最大得率。

3 讨论

中药一叶萩具有活血舒筋、健脾益肾之功效,用于治疗风湿腰痛,四肢麻痹和小儿疳积等^[5],最新研究表明其对老年痴呆症也有潜在的治疗作用。其主要活性成分一叶萩碱具有中枢兴奋作用,适量剂量注射到人体中能提高人体神经元反射的兴奋性,加强人体神经系统的条件反射区域,有效的缩短神经系统从感知外界刺激到相应做出反应的时间,能增强学习新事物的能力并相应的提高记忆力,也能显著改善饮酒之后对大脑造成的记忆重新再现性障碍。一叶萩碱还具有一定的抑制肿瘤作用,一叶萩碱与环磷酰胺 (CTX) 结合之后使用有明显的抗肿瘤效果^[6]。鉴于以上临床药用价值,优化一叶萩碱的提取工艺并提高其得率有着重要意义。

响应面是研究几种因素间交互作用的回归分析方法,其优点是可不连续进行多次试验^[7],用最少的实验组合数得出因素与响应值的回归方程,本试验选择该设计方法进行一叶萩种子壳中一叶萩碱的提取工艺优化试验设计,并通过回归方程绘制出了响应面与等高线图^[8],可以直接得出影响因素的变化规律,清晰准确^[9]。该方法与传统的溶剂提取法相比,达到了有效节约溶剂,节省能源,减少工作量,

提高工作效率并提高了一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的目的。

实验过程中,在用乙醇溶液水浴回流提取一叶萩种子壳中的一叶萩碱时,可能有部分一叶萩碱随着乙醇溶液混合蒸发,导致了一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的下降。此问题在大规模化生产时仍需考虑解决方案。

本试验通过单因素试验和响应面试验方法,以一叶萩种子壳中一叶萩碱的得率为指标,得出提取的最优条件:萃取次数3.49次,乙醇浓度83.49%,酸浓度4.63‰,模型预测得率为0.06676%。考虑到实际操作可行性,条件变更为:提取次数3次,乙醇浓度85%,酸浓度4.7‰。为验证结果的可靠性,将一叶萩种子壳中一叶萩碱在修正后的条件下提取3次,测得一叶萩种子壳中一叶萩碱得率的平均值为0.067%,与模型预测值基本一致,证实响应面 Box-Behnken 法在优化一叶萩种子壳中一叶萩碱提取工艺中具有良好的可行性^[10]。

参考文献

- [1] 刘卫军,顾振纶,周文轩,等. 一叶萩碱的抑瘤和拮抗环磷酰胺毒性作用[J]. 中国药理学通报,1997,13(6):529-530.
- [2] Yuan W, Lu ZM, Liu Y, et al. Three new podocarpane-type diterpenoids from callus of *Securinega suffruticosa*[J]. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 2005, 53(12):1610-1612.
- [3] 加列西·马那甫,吐力吾汗·阿米汗,景伟文. 甘草籽黄酮、多糖复合提取工艺参数优化及抗氧化性研究[J]. 药物分析志, 2014, 34(4):686-692.
- [4] 鲍娇琳,陆金健,陈修平,等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2012(03):369.
- [5] 董宁征,顾振纶,周文轩,等. 一叶萩碱诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡[J]. 中国药理学报, 1999, 20(3):267-268.
- [6] 赵艳,杜静. 一叶萩碱的临床新用途[J]. 中国临床医生, 2004, 32(09):40-41.
- [7] 赵强,余四九,王廷璞,等. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究[J]. 草业学报, 2012, 21(4):206-214.
- [8] 吕佳佳,李俊生,王兴慧,等. 响应面法优选红豆杉枝叶中有效成分的提取工艺[J]. 中成药, 2014, 36(2):280-285.
- [9] 郑林龙,蒋剑平,许海顺,等. 响应面法优化土茯苓多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3):918-922.
- [10] 任丹丹,陈谷. 响应面法优化黄秋葵多糖超声提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(8):143-146.

(2014-11-04 收稿 责任编辑:张文婷)