

响应面法优化水提白附片中的总生物碱

魏海柳, 李琳, 马明松, 余可越, 胡松青

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以白附片为原料, 利用酸水法提取, 在单因素实验基础上根据 Box-Behnken 实验设计原理, 采用四因素三水平的响应面分析法对总生物碱的提取工艺进行了优化。通过响应面实验, 建立了白附片中总生物碱提取率与四个因素变化的二次回归方程。同时依据回归模型进行了计算机模拟实验及绘制曲面图, 了解白附片中总生物碱提取率随主要因素水平的变化方向及优化点。结果表明: 白附片中总生物碱提取的最佳工艺条件为 pH 3.4, 液料比 11 mL/g, 温度 30 °C, 时间 4.6 h, 在此条件下, 白附片中总生物碱的提取率为 48.5%±1.7%。

关键词: 白附片; 生物碱; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2012)3-309-312

Optimization of Water Extraction Process of Total Alkaloid from Aconite by Response Surface Methodology

WEI Hai-liu, LI Lin, MA Ming-song, YU Ke-yue, HU Song-qing

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Total alkaloid was extracted from white prepared lateral root of Aconite by acidic water method, which was optimized by response surface designs. Based on the results of one-factor test, response surface methodology with 4 factors and 3 levels was adopted according to box-behnken experimental design principle. Two regression equations for the influence relationships of the extraction rate and four variational factors were established by response surface experiments. On the basis of regression models, the results with surface were simulated to give optimized result and influencing trends of the main factors on the extraction rate. The optimum extracting conditions are as follows: pH 3.4, liquid-to-solid ratio 11 mg/g, extraction time 4.6 h and temperature 30 °C. Under these conditions, the extraction rate was 48.5%±1.7%.

Key words: white prepared lateral root of aconite; alkaloid; response surface methodology

白附片为毛茛科植物乌头 (*Aconitum carmichaeli* Debx) 的子根的加工品, 为中医临床常用的中草药。现代药理研究证实, 大多数乌头类药材都具有抗炎^[1]、麻醉止痛^[2,3]、调节免疫作用^[4]、抗肿瘤作用^[5,6], 对心血管系统则表现为强心作用^[7], 除此之外研究还发现乌头类药材还具有抗病毒^[8]、抗吗啡成瘾^[9]和缓解哮喘^[10]等作用。白附片药效的成分主要为其富含的双酯型乌头类, 其在低剂量时可以用来镇痛、抗炎、强心等; 高剂量时会产生毒性, 如乌头碱口服 0.2 mg 即可中毒, 3~5 mg 可以致死, 肌注 0.2~0.3 mg 可致死^[11]。双酯型生物碱性质不稳定, 在酸性、加热等条件下易降解为亲水性较强的单酯型生物碱苯甲酰乌头胺等, 毒性仅为乌头碱的 1/200, 进一步降解为胺醇类生物碱后, 毒性

收稿日期: 2011-12-13

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划资助 (NCET-10-0362)

作者简介: 魏海柳 (1985-), 男, 硕士研究生

通讯作者: 胡松青 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物分离纯化及蛋白质结构生物学

可减小为乌头碱类的 1/2000^[12], 仍保持很高的药效。可见乌头类生物碱具有很高的药用价值, 从白附片中分离获得高纯度的乌头类生物碱具有很高的经济意义。

生物碱的提取方法有很多, 主要有: 酸水提取法、醇提法、半仿生提取法 (SBE)、酶法等^[13]。酸水法具有环境友好、污染小、成本低等优点, 并且可以将生物碱转变为生物碱盐以提高其水溶性, 进而提高其提取率。考虑到生产成本和操作方便等方面, 酸水法相对简单易行、污染小。响应面分析法 (RSM)^[14]是采用多元二次回归方法作为函数估计的工具, 将多因子实验中因素与指标的相互关系用多项式近似拟合。本文应用响应面法考察酸水法提取白附片中生物碱工艺中各因素对提取率的影响, 对提取工艺进行了优化, 旨在为白附片中乌头类生物碱进一步开发利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

白附片(产地:四川),购自广州市清平中药市场;氯仿、氨水、无水乙醇、甲基红、酚酞、无水碳酸钠、盐酸、硫酸、氢氧化钠、邻苯二甲酸氢钾(广州化学试剂厂),均为分析纯。

PB-10型pH计、BS224S电子分析天平, Sartorius, 德国; KR25i型高速冷冻离心机, 法国Jouan公司; RE-52AA旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; THZ-82A恒温振荡器, 金坛富华仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 白附片中总生物碱的提取

白附片粉碎,过40目筛。准确称取20 g白附片粉末于250 mL三角瓶中,加入一定量的溶剂,在一定温度下恒温水浴振荡提取一定时间,离心取上清液得乌头类生物碱类物质的粗提液待测。

1.2.2 总生物碱提取率测定

含量测定参照《中国药典》2010版^[15]对本品进行含量测定。将提取液(相当于白附片药材20 g),加氨水调pH至10~12,再用氯仿萃取3次,每次30 mL,合并氯仿提取液,减压浓缩蒸干。加入5 ml无水乙醇将残渣充分溶解,依次加入硫酸滴定液(0.01 mol/L) 15 mL、15 mL去离子水、甲基红指示液3滴,用氢氧化钠(0.01 mol/mL)滴定至黄色。每1 mL 硫酸滴定液(0.01 mol/L)相当于12.9 mg的乌头碱(C₃₄H₄₇NO₁₁)。

1.3 实验设计

实验方法采用Design Expert 8.0.5对提取工艺条件进行最优化实验设计并进行数据分析。选择单因素实验中对响应值(总生物碱量)有显著影响的因素,采用中心复合模型^[16](Box-Behnken)建立实验数学模型。由软件失拟项测试推荐的二次模型拟合实验数据,应用二次模型对结果进行变异分析。

2 结果与讨论

2.1 响应面实验

表1 响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	+1
A (pH)	3	4	5
B [液料比/(mL/g)]	5	9	13
C (温度/°C)	30	50	70
D (时间/h)	2	4	6

在单因素实验基础上,根据Box-Behnken的中心组合试验设计原理,综合单因素影响试验结果,选取提取pH、液料比、提取温度、提取时间对总生物碱提取率影响显著的4个因素,在单因素试验基础上采用四因

素三水平的响应面分析方法,因素与水平见表1。

2.2. 响应面试验设计及结果分析

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of RSM

实验号	A	B	C	D	预测值/%	Y 总生物碱提取率/% *
1	0	0	-1	-1	41.9	41.1±2.0
2	0	1	-1	0	45.1	47.8±5.3
3	0	0	0	0	40.4	40.4±3.1
4	0	1	0	-1	35.3	35.0±2.2
5	-1	0	-1	0	46.3	45.8±1.2
6	1	-1	0	0	31.5	32.7±2.2
7	1	1	0	0	33.1	31.6±3.1
8	0	0	0	0	40.4	40.4±3.1
9	0	0	0	0	40.4	40.4±3.1
10	0	0	1	1	32.4	32.7±2.2
11	0	-1	0	-1	28.0	25.9±1.2
12	1	0	0	1	34.4	37.0±4.3
13	0	-1	-1	0	38.0	39.7±2.3
14	-1	-1	0	0	25.7	26.6±8.6
15	0	0	-1	1	45.5	44.4±1.2
16	-1	0	0	-1	33.3	34.0±2.5
17	-1	0	1	0	30.6	30.0±2.3
18	0	0	1	-1	34.6	35.0±0.0
19	0	0	0	0	40.4	40.4±3.1
20	0	1	1	0	34.8	36.4±1.2
21	0	1	0	1	35.7	35.0±4.2
22	1	0	1	0	36.6	34.3±6.2
23	0	-1	0	1	29.0	26.6±4.9
24	1	0	-1	0	41.2	39.1±2.0
25	0	-1	1	0	28.0	28.6±2.0
26	1	0	0	-1	34.4	36.4±1.2
27	-1	1	0	0	38.1	36.4±4.3
28	-1	0	0	1	34.7	36.0±3.1
29	0	0	0	0	40.4	40.4±3.1

注: *表示3次重复试验

酸水提取白附片中总生物碱提取率响应面试验结果如表2。采用Design Expert 8.0.5软件中的Box-Behnken对实验结果进行响应面分析,得出回归模型方差分析表和响应曲面图,分别见表3和图1。从表3可以看出,拟合模型的显著水平远远小于0.01,此时Quadratic回归方差模型极显著。还可以看出,对提取率影响的大小依次为温度(C)>液料比(B)>时间(D)>pH(A)。采用spss16.0软件对表2中的实测值与预测值两组数据进行统计分析,两组间的数据比较采用配对T-

检验, 结果表明两组数据没有显著差异 (P=0.990), 证明了模型的可靠性。

通过拟合可求出影响因素的一次效应、二次效应及其交互效应的关联方程^[17], 多元回归拟合分析得到白附片中总生物碱提取率 Y 与各因素变量 (A pH, B 液料比, C 温度/°C, D 时间/h) 的二次方程模型为: $Y=0.40+1.964\times 10^{-3}A+0.035B-0.051C+3.648\times 10^{-3}D-0.027AB+0.028AC-3.367\times 10^{-3}AD-8.418\times 10^{-4}BC-1.684\times 10^{-3}BD-0.014CD-0.031A^2-0.052B^2+0.013C^2-0.031D^2$ 。

表 3 响应面方差分析结果

Table 3 ANOVA of response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	
Model	0.082	14	5.83×10^{-3}	14.57	<0.0001	**	
A-pH	4.63×10^{-5}	1	4.63×10^{-5}	0.12	0.7389		
B-液料比	0.02	1	0.02	36.86	<0.0001	**	
C-温度	0.03	1	0.03	77.29	<0.0001	**	
D-时间	1.60×10^{-4}	1	1.60×10^{-4}	0.40	0.5379		
AB	2.90×10^{-3}	1	2.90×10^{-3}	7.25	0.0175	*	
AC	3.09×10^{-3}	1	3.09×10^{-3}	7.71	0.0149	*	
AD	4.54×10^{-5}	1	4.54×10^{-5}	0.11	0.7415		
BC	2.83×10^{-6}	1	2.83×10^{-6}	7.08×10^{-3}	0.9341		
BD	1.13×10^{-5}	1	1.13×10^{-5}	0.028	0.8688		
CD	8.19×10^{-4}	1	8.19×10^{-4}	2.05	0.1746		
A ²	6.07×10^{-3}	1	6.07×10^{-3}	15.15	0.0016	**	
B ²	0.02	1	0.02	44.60	<0.0001	**	
C ²	1.13×10^{-3}	1	1.13×10^{-3}	2.82	0.1154		
D ²	6.41×10^{-3}	1	6.41×10^{-3}	16.00	0.0013	**	
总残差	5.61×10^{-3}	14	4.00×10^{-4}				
失拟误差	5.61×10^{-3}	10	5.61×10^{-4}				
纯误差	0.000	4	0.000				
总和	0.087	28					
R ² =93.6%		R ² _{adj} =87.2%					

注: **, P<0.01, 差异极显著; *, P<0.05, 差异显著

从表3中方差分析结果可知方程一次项、二次项的影响均极显著, 说明分析结果可靠; 从试验所得的响应面分析结果可以找到它们在提取过程中的交互作用, 如表3和图1可知pH和液料比、pH和温度之间的交互作用显著, 其余项间的交互作用不明显。根据Design Expert 8.0.5软件对实验结果进行最优化分析, 确定最佳的提取条件为: pH 3.34, 液料比11.03 mL/g, 温度30.00 °C, 时间4.62 h, 在此条件下预测总生物碱提取率为48.8%。

2.3 验证实验

根据模型预测结果进行近似验证实验, 考虑到实际操作的便利, 将最佳工艺条件修正为 pH 3.4, 液料

比 11 mL/g, 提取温度 30 °C, 提取时间 4.6 h, 在此条件下总生物碱提取率为 47.8%±1.7% (n=3)。

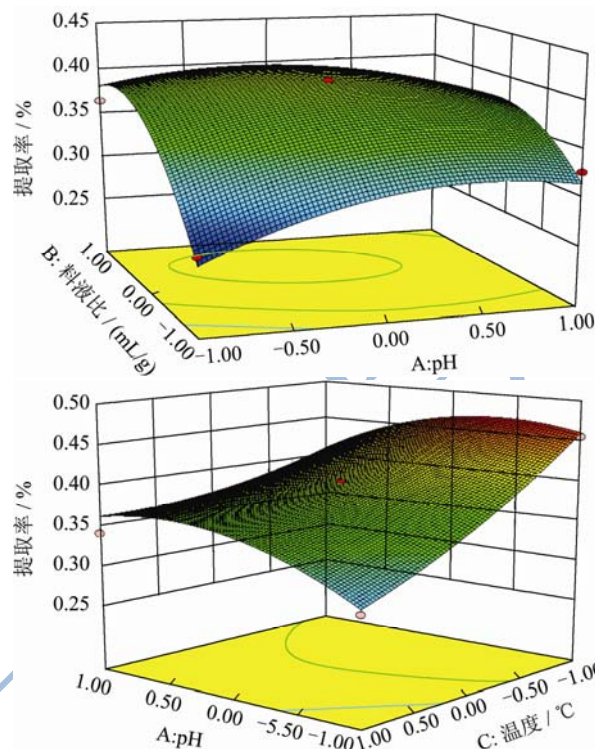


图 1 各两因素交互作用对总生物碱提取率影响的响应面图

Fig.1 Response surface showing pairwise interactive effects of extraction conditions on the extraction rate

3 结论

3.1 采用酸水法提取白附片中的总生物碱, 根据单因素实验结果, 采用Box-Behnken试验设计以及响应面分析对酸水法提取工艺进行优化, 得出最优工艺条件为 pH 3.4, 液料比11 mL/g, 提取温度30 °C, 提取时间4 h, 在此工艺条件下, 白附片中总生物碱的提取率为 47.8%±1.7% (n=3)。

3.2 得到白附片总生物碱提取率与酸水法提取各因素变量的二次方程模型, 该模型回归极显著, R²=93.6% (spss V16.0), 对试验拟合较好, 为今后大规模的应用提供一定的参考和依据。

参考文献

- [1] 刘建磊, 李宝丽. 制附子对类风湿关节炎抗炎作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 184-187
- [2] Shorong-Shii Liou, I-Min Liu, Mei Chou Lai, et al. Comparison of the antinociceptive action of crude Fuzei, the root of Aconitum, and its processed products [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 99: 379-383
- [3] Jutta Friese, Johannes Gleitz, Ulrike T Gutser, et al. Aconitum sp. alkaloids: the modulation of voltage-dependent

- Na⁺ channels, toxicity and antinociceptive properties [J] European Journal of Pharmacology, 1997, 337(2-3): 165-174
- [4] 马健,陆平成,牧野充弘等.乌头碱对小鼠腹腔巨噬细胞 Ia 抗原表达影响的研究[J].中国药理学通报,1997,13(4):341-344
- [5] Koji Wada, Masaharu Hazawa, Kenji Takahashi et al. Inhibitory effects of Diterpenoid alkaloids on the growth of A172 Human malignant cells [J]. J Nat Prod, 2007, 70 (12) :854-858
- [6] Masaharu Hazawa, Koji Wada, Kenji Takahashi et al. Suppressive effects of novel derivatives prepared from Aconitum alkaloids on tumor growth [J]. Invest New Drugs, 2009, 27 (2): 111-119
- [7] 徐墩海,赵洪峰,徐雅娟,等.四川江油生附子强心成分的研究[J].中草药, 2004, 35(9) : 964-966
- [8] 张春江,李薇,孙振鹏,等.藏药甘青乌头抗单纯疱疹病毒 II 型体内外作用研究[J].中国药理学杂志,2009,44 (1):26-31
- [9] 薛永志,杨玉梅,刘和莉,等.紫花高乌头总碱对吗啡依赖大鼠氯唑沙宗药动学的影响[J].中国医院药学杂志, 2007, 27 (11):1522-1525
- [10] Bai Gang, Yang Yang, Qian SHI, et al .Identification of higenamine in *Radix Aconiti Lateralis Preparata* as a beta-2-adrenergic receptor agonist [J]. Acta Pharmacol Sinica, 2008, 29(10): 1187-1194
- [11] 王育珊,任连荣,刘忠良等.急性乌头碱中毒导致的严重心律失常与休克(附 4 例报告)[J].白求恩医科大学学报, 1996, 22(5):521-523
- [12] 吴荣祖.附子减毒与增效-中药附子传统加工工艺创新研究[J].药品评价,2005,2(5):380-382
- [13] 吴平.附子生物碱提取分离与水解规律研究[D].成都中医药大学,2007
- [14] 赵江,胡松青.响应曲面法优化非水相酶催化合成乳酸乙酯[J].现代食品科技,2009,25(11):1320-1322
- [15] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社, 2010
- [16] R V Muralidhar, R R Chirumamila, R Marchant et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9(1): 17-23
- [17] S J Kalila, F Maugerib, M I Rodrigues. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization [J]. Process Biochemistry, 2000, 35(6): 539-550