

鬼臼甘草配伍有效成分提取工艺的研究

山金凤, 刘宁芝, 杜欣韵, 蒋建兰*

(天津市生物与制药工程重点实验室, 天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要:利用响应面法优选鬼臼和甘草共提的最优提取工艺。采用回流法提取鬼臼毒素, 考察了液料比、乙醇体积分数、回流时间、回流温度、鬼臼与甘草质量比等因素对鬼臼毒素提取率的影响, 在单因素实验的基础上通过响应面法对提取工艺进行优化。回流提取的最优工艺条件为: 液料比为 10:1, 乙醇体积分数为 70%, 甘草与鬼臼质量比为 11.5:1, 100℃ 水浴提取 3 h。验证试验表明, 拟合得到的模型与实际符合较好。

关键词: 鬼臼; 甘草; 鬼臼毒素; 响应面法; 回流提取

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)12-0047-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2016.12.011

Extraction technology of effective ingredient in *Dysosmaversipellis* and *Glycyrrhizauralensisfisch*

SHAN Jin-feng, LIU Ning-zhi, DU Xin-yun, JIANG Jian-lan*

(Tianjin Key Laboratory of Biological and Pharmaceutical Engineering; Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) is used to optimize the co-extraction of podophyllotoxin in *Dysosmaversipellis* and *Glycyrrhizauralensisfisch*. The effects of ratio of liquid to solid, ethanol concentration, extraction time, water-bath temperature and mass ratio of *Glycyrrhizauralensisfisch* and *Dysosmaversipellis* on extraction of podophyllotoxin are investigated. The optimal extraction parameters are shown as follows: 70% of ethanol, 10:1 of ratio of liquid to solid, 11.5:1 of mass ratio of *Glycyrrhizauralensisfisch* and *Dysosmaversipellis*, 3 hours of extraction time and 100℃ of water-bath temperature. The results show that the fitted model is in good agreement with the practice.

Key words: podophyllum; *Glycyrrhizauralensisfisch*; podophyllotoxin; response surface method; reflux extraction

鬼臼属于小檗科, 包括八角莲属 (*Dysosma*)、桃儿七属 (*Sinopodophyllum*) 和山荷叶属 (*Diphylleia*)^[1-2]。近年来人们发现八角莲属植物具有抗肿瘤活性, 而鬼臼毒素是主要的抗肿瘤活性成分。以鬼臼毒素为原料, 对其进行结构修饰与改造, 可合成多种疗效好、毒性小的抗肿瘤新药, 已成功应用于临床的属依托泊苷 (Vp-16) 和替尼泊苷 (Vm-26)。因此对鬼臼毒素的大批量提取就显得至关重要。

鬼臼毒素主要是从鬼臼类中药材的根、茎中提取得到, 而在已有的研究中, 多以桃儿七属研究居多。综合来看, 提取鬼臼毒素主要采用回流法^[3]、超声法^[4]和超临界 CO₂ 萃取法^[5], 溶剂主要是甲醇、乙醇及他们与水的混合溶液。相对来说, 甲醇毒性大, 因此不宜采用。溶剂回流提取是经典的中药材提取方法, 具有提取效率高, 易于工业化应用等特点。综合考虑, 笔者选用乙醇回流法对鬼臼甘草组合物进行提取。

1 试剂与仪器

试剂: 八角莲药材, 批号 151228, 安徽亳州生

产; 甘草药材, 批号 150106, 产地宁夏; 鬼臼毒素对照品, 20 mg, HPLC ≥ 98%, YY90067, 上海源叶生物科技有限公司生产; 甲醇, 色谱纯, 天津康科德科技有限公司生产; 无水乙醇, 分析纯, 天津江天化工技术有限公司生产; 磷酸, 色谱纯, 批号 20160121, 天津市元立化工有限公司生产; 蒸馏水, 天津大学自制; 娃哈哈纯净水。

仪器: 美国 LabAlliance 公司高效液相色谱仪, 二元高压梯度泵 Series III, 二极管阵列检测器 UV6000LP, 柱温箱 OV-2001, 自动进样器 As3000; 三维解析软件 EZChrom Elite (Microsoft Windows XP2000 操作系统); Waters Atlantis T₃ C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定鬼臼毒素含量

2.1.1 色谱条件

Waters Atlantis T₃ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.1% 磷酸水 (体积比为 60:40), 流速

为 1 mL/min, 检测波长为 292 nm, 柱温为 25℃, 进样量为 20 μL。

2.1.2 标准曲线的绘制

精密称取鬼臼毒素对照品 0.010 0 g 置于 10 mL 容量瓶中, 加入少量甲醇, 溶解后定容至 10 mL, 制成每 1 mL 含 1 mg 鬼臼毒素的对照品储备液。

精密吸取对照品储备液 2.5 mL, 置于 5 mL 的棕色容量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 摇匀, 依次稀释, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 各取 20 μL 进样。以样品质量浓度 (mg/mL) 为横坐标, 以色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。所得回归方程为 $y = 4 \times 10^7 x - 101\ 067$, 相关系数 $R^2 = 0.999\ 3$ 。结果表明, 鬼臼毒素质量浓度在 0.001 95 ~ 0.25 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.3 提取率的测定

取 0.5 mL 鬼臼甘草提取液置于 5 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度线, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液用 HPLC 进行分析。测定每次试验所得鬼臼甘草提取液中鬼臼毒素的峰面积, 计算鬼臼毒素的提取率 [mg/(g 生药材)]:

$$\text{鬼臼毒素提取率 (mg/g)} = \frac{\text{鬼臼毒素质量}}{\text{八角莲药材的质量}}$$

2.2 单因素试验

2.2.1 液料比的考察

准确称取 10.0 g 粉碎的药材 (八角莲为 1.0 g, 甘草为 9.0 g), 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 分别加入 30、50、70、90、100、110、150、200 mL 80% 乙醇, 浸泡 30 min, 90℃ 水浴提取 3 h, 真空抽滤, 滤液体积不足 100 mL 的补足体积至 100 mL, 滤液体积超过 100 mL 的补足体积至 250 mL。提取液稀释 10 倍后计算鬼臼毒素提取率。液料比对提取率的影响如图 1 所示。

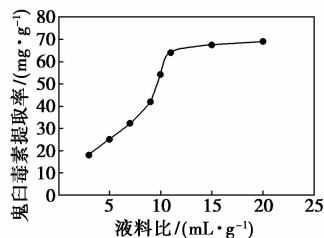


图 1 液料比对提取率的影响

由图 1 可以看出, 鬼臼毒素的提取率随着液料比的增大呈先上升后趋于平缓的趋势, 而当液料比增大到 15 mL/g 以后, 提取率增加缓慢。中药提取实质是有效成分从固相向液相转移的过程, 由 Fick 第二扩散定律可知, 液料比越大, 两相浓度差越大,

则扩散就越剧烈。因此, 随着液料比的增大, 提取率逐渐增大。考虑到实际生产中节约溶剂的问题, 液料比不能无限增大, 因此选择料液比为 1:7 ~ 1:15 进一步优化。

2.2.2 乙醇体积分数的考察

分别选择 100 mL 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇, 在操作条件同 2.2.1 的条件下, 计算鬼臼毒素提取率。乙醇体积分数对提取率的影响如图 2 所示。

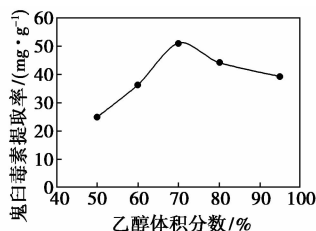


图 2 乙醇体积分数对提取率的影响

由图 2 可以看出, 乙醇体积分数在 50% ~ 70% 范围内, 随着乙醇体积分数的增高, 提取率呈上升趋势; 在乙醇体积分数为 70% 时, 提取率达到最大; 在 70% ~ 90% 范围内, 随着乙醇体积分数的增大, 提取率反而降低。鬼臼毒素属于脂溶性物质, 增大乙醇的体积分数, 提取溶剂的极性降低, 因此乙醇体积分数越高, 鬼臼毒素的提取率越高。在 70% ~ 90% 范围内鬼臼毒素提取率下降的原因是当乙醇体积分数过大时, 提取液中除了鬼臼毒素以外的其他低极性物质的溶出量增加过快, 导致鬼臼毒素的提取率降低^[4]。

2.2.3 回流时间的考察

在操作条件同 2.2.1 的条件下, 提取时间 (1、2、3、4 h) 对鬼臼毒素提取率的影响如图 3 所示。

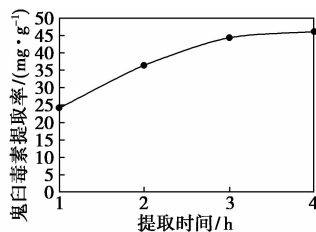


图 3 提取时间对提取率的影响

由图 3 可以看出, 随着提取时间的延长, 鬼臼毒素提取率在 3 h 达到峰值后趋于平缓。在实际生产中, 生产周期在一定程度上决定了生产成本, 综合考虑, 选择提取时间为 3 h。

2.2.4 回流温度的考察

分别选择 60、70、80、90、100℃ 水浴, 在其他操作条件同 2.2.1 的条件下, 回流温度对鬼臼毒素提

取率的影响如图4所示。

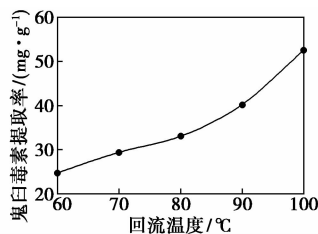


图4 回流温度对提取率的影响

由图4可以看出,随着回流温度的升高,鬼臼毒素提取率增大明显。在实际操作中,60℃和70℃水浴下无回流液滴滴下;80℃水浴时有回流液滴滴下,但回流不明显;90℃水浴时可看到液体处于微沸状态,100℃时液体沸腾明显。因此,选择回流温度为100℃。

2.2.5 鬼臼与甘草质量比的考察

准确称取10.0 g粉碎的药材,其中八角莲和甘草的质量比分别为5:5、3:7、2:8、1:9、0.8:9.2、0.6:9.4,在其他操作条件同2.2.1的条件下,甘草与鬼臼的质量比对鬼臼毒素提取率的影响如图5所示。

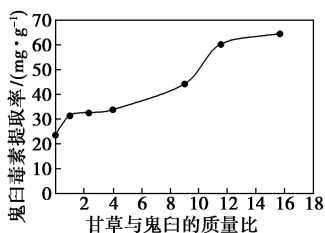


图5 甘草与鬼臼质量比对提取率的影响

由图5可以看出,当甘草与鬼臼的质量比为1:1时,相对于单味鬼臼提取液来看,鬼臼毒素的提取率明显增大;继续增大甘草在配伍药材中的比例,鬼臼毒素的提取率不断增大;在甘草与鬼臼的质量比为4~11.5的范围内,提取率增加明显;当甘草与鬼臼的质量比达11.5之后,提取率增加缓慢。由此可见,甘草的加入能够明显提高鬼臼毒素的提取率。由文献[6]可知,甘草在中药复方中是常用的配伍药材,多是利用其所具有的减毒增效能力。甘草中的甘草酸在提取液中可起到表面活性剂的作用,有利于脂溶性成分的溶出,而鬼臼中的鬼臼毒素恰好是脂溶性成分,这与实验结果相一致。综合考虑,选择甘草、鬼臼的质量比为4~15作为进一步优化的范围。

2.3 响应面优化试验

2.3.1 响应面设计与回归模型分析

根据单因素试验的结果,选取对鬼臼毒素提取

率影响较大的3个因素:液料比(A)、乙醇体积分数(B)、甘草与鬼臼的质量比(C)为考察对象,选择合适的范围,利用Design-expert 8.0.6软件并根据Central Composite Design设计试验,具体因素水平如表1所示。得到3因素5水平构成的20组试验,其中立方体点有8个,中心点有6个,星点有6个。试验结果如表2所示。

表1 鬼臼甘草提取试验设计

因素	水平				
	-1.68	-1	0	1	1.68
A	4.95	7	10	13	15.05
B/%	53.18	60	70	80	86.82
C	5.61	8	11.5	15	17.39

表2 响应面试验结果

序号	A	B/%	C	鬼臼毒素提取率 (R)/(mg·g ⁻¹)
1	13.00	60.00	8.00	39.37
2	7.00	60.00	8.00	33.70
3	10.00	70.00	11.50	62.99
4	10.00	70.00	11.50	62.57
5	10.00	70.00	11.50	63.07
6	13.00	60.00	15.00	52.40
7	10.00	70.00	11.50	62.30
8	13.00	80.00	15.00	53.16
9	10.00	86.82	11.50	43.55
10	10.00	70.00	5.61	45.54
11	10.00	70.00	17.39	58.07
12	15.05	70.00	11.50	56.30
13	10.00	70.00	11.50	62.60
14	7.00	60.00	15.00	49.65
15	7.00	80.00	8.00	41.27
16	10.00	70.00	11.50	62.65
17	4.95	70.00	11.50	47.16
18	7.00	80.00	15.00	57.96
19	13.00	80.00	8.00	52.93
20	10.00	53.18	11.50	54.63

利用Design-expert 8.0.6软件进行回归分析,拟合得到的方程表达式为:

$$R = -418.14328 + 11.52255 \times A + 9.28649 \times B + 13.85781 \times C - 6.45875 \times 10^{-3} \times A \times B - 0.23066 \times A \times C - 0.043046 \times B \times C - 0.36029 \times A^2 - 0.061730 \times B^2 - 0.29665 \times C^2$$

2.3.2 数学模型分析

对所得回归方程进行方差分析,结果如表3所示。结果表明,该数学模型拟合程度较好,随机误差

影响较小,模型可信度高,可以用该模型描述自变量与响应值之间的关系。

表 3 鬼臼毒素回归模型系数的显著性检验结果

来源	平方和	自由度	均方差	F 值	Pr > F	
模型	1511.33	9	167.93	3.54	0.0307	显著
A-A	180.54	1	180.54	3.81	0.0795	
B-B	9.80	1	9.80	0.21	0.6591	
C-C	492.12	1	492.12	10.38	0.0091	极显著
AB	0.30	1	0.30	6.34E-03	0.9381	
AC	46.93	1	46.93	0.99	0.3432	
BC	18.16	1	18.16	0.38	0.5498	
A ²	151.53	1	151.53	3.20	0.1041	
B ²	549.15	1	549.15	11.59	0.0067	极显著
C ²	190.31	1	190.31	4.02	0.0729	
残差	473.95	10	47.39			
失拟项	368.87	5	73.77	3.51	0.0972	不显著
纯误差	105.07	5	21.01			
总离差	1985.28	19				

该模型一次项 C、二次项 B² 对模型影响极显著 (Pr > F 值小于 0.01), 即鬼臼与甘草质量比的一次项和乙醇体积分数的二次项对鬼臼毒素的提取率有显著影响。主要影响因素为鬼臼与甘草的质量比, 其次是液料比。

2.3.3 等高线图和响应曲面图分析

液料比和乙醇体积分数交互作用等高线图和响应曲面图如图 6 所示。

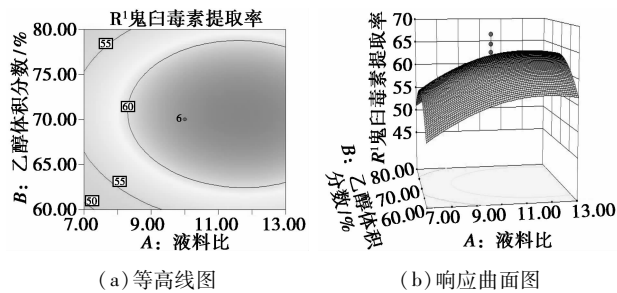


图 6 液料比和乙醇体积分数交互作用等高线图和响应曲面图

由图 6 可知, 当甘草与鬼臼的质量比为 11.5 时, 随着乙醇体积分数的增加, 鬼臼毒素提取率先增大, 乙醇体积分数为 70% 时达到最大值, 然后开始减小。随着液料比的增大, 鬼臼毒素提取率先增大后趋于平缓。这与单因素试验结果一致。因此, 乙醇体积分数的最优值为 70%。

液料比与甘草、鬼臼质量比交互作用的等高线图和响应曲面图如图 7 所示。

由图 7 可以看出, 当乙醇体积分数为 70% 时,

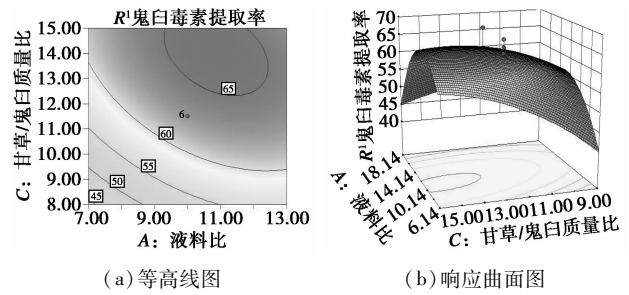


图 7 液料比和甘草、鬼臼质量比交互作用等高线图和响应曲面图

随着甘、草鬼臼质量比的增加, 鬼臼毒素提取率先增大后趋于平缓, 与单因素试验一致。随着液料比的增大, 鬼臼毒素提取率先增大后减小, 当液料比在 9~12 之间时, 鬼臼毒素的提取率较高。

乙醇体积分数和甘草、鬼臼质量比交互作用等高线图和响应曲面图如图 8 所示。

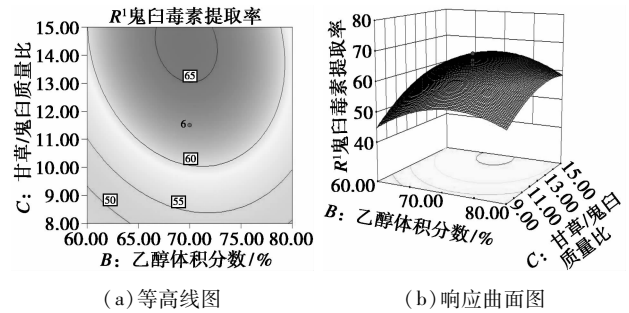


图 8 乙醇体积分数和甘草、鬼臼质量比交互作用的等高线图和响应曲面图

由图 8 可以看出, 当液料比为 10 时, 随着甘草、鬼臼质量比的增加, 鬼臼毒素提取率先增大后趋于平缓。随着乙醇体积分数的增大, 鬼臼毒素提取率先增大后减小, 当乙醇体积分数为 70% 时, 鬼臼毒素的提取率较高。这与单因素试验结果一致。

2.3.4 最优提取工艺的确定与验证

根据响应值所模拟的数学方程, 结合响应曲面图及等高线图, 即可预测出响应值达到最大时所对应的各参数的取值: 液料比为 10:1, 乙醇体积分数为 70%, 甘草、鬼臼质量比为 11.5:1 时, 响应值最大为 63.06 mg/mL。

按照最优工艺条件进行 3 批验证。计算实际平均值与预测值的偏差, 结果如表 4 所示。

差异 (%) = [(平均值 - 预测值) / 预测值] × 100

表 4 最优工艺验证结果

项目	响应值/(mg·g ⁻¹)			RSD/ %	预测值/ (mg·g ⁻¹)	偏差/ %	
	1	2	3				
响应值 R	62.99	62.27	62.60	62.62	0.57	63.06	-0.70

率等指标。而微球具有磁性,可以使微球从体系中快速分离,简单环保。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

六水合三氯化铁、柠檬酸钠、重铬酸钾,分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司生产;正硅酸乙酯(TEOS),天津市化学试剂研究所生产;*N*-乙炔基咪唑(NVC)、*N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM),梯希爱化成工业公司生产;3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS)、二乙烯基苯(DVB),阿法埃莎化学有限公司生产;偶氮二异丁腈(AIBN),天津市科密欧化学试剂有限公司生产。

1.2 Fe₃O₄ 磁球的制备

Fe₃O₄ 磁球通过水热法制备^[12-13]:将 2.7 g 六水合三氯化铁溶于 80 mL 乙二醇,超声溶解完全,随后加 0.5 g 柠檬酸钠、3.6 g 无水乙酸钠。混合液快速搅拌 1~2 h,然后装入聚四氟乙烯不锈钢反应釜中,移至 200℃ 烘箱反应 12 h。反应完成后取出反应釜冷却至室温,产物用无水乙醇洗涤数次,磁分离。然后放入真空干燥箱中干燥至恒重。

1.3 Fe₃O₄/SiO₂ 微球的制备与表面修饰

利用溶胶-凝胶法制备 Fe₃O₄/SiO₂ 微球^[14-20]:
①配置溶液 A:将 140 mL 无水乙醇和 3 mL 质量分数为 28% 氨水加入到 250 mL 三口瓶中,之后加入 0.30 g Fe₃O₄,超声同时机械搅拌;②配置溶液 B:将 10 mL 乙醇和 0.50 mL TEOS 加入到烧杯中,超声混

匀;③将溶液 B 以 0.4 mL/min 的速度滴入溶液 A 中,边超声边机械搅拌 2 h 后停止超声,继续搅拌 6 h。之后加入 2 mL MPS,继续反应 24 h。反应完成后,用无水乙醇清洗 3~4 次,真空干燥至恒重,即得表面具有双键的磁性复合微球 Fe₃O₄/SiO₂。

1.4 IFMMs 微球的制备

利用蒸馏沉淀聚合法制备 IFMMs^[21-22]:量取 20 mL 乙腈加入到三口瓶中,再用移液枪取 0.5 mL 不同浓度 Cr(VI) 溶液加入其中,超声并随后加 1 mmol NIPAM 和 0.5 mmol NVC。超声混均之后加 0.1 g Fe₃O₄/SiO₂,再补加 20 mL 乙腈,边超声边加入 1.6 mmol DVB 和 0.015 g AIBN,超声均匀后,组装蒸馏沉淀反应装置,通 15 min N₂ 以除去反应体系中的空气。加热使其在 25~30 min 内由室温升至沸腾,并开始蒸出乙腈,控制 1.5 h 内蒸出 20 mL 乙腈,停止反应。所得混合液离心分离,弃去上清液,分别用四氢呋喃、丙酮、无水乙醇超声洗涤各 3 次。将产物置于真空干燥箱中干燥。将一定量的上述微球分散于 3 mol/L HCl 溶液中,置于摇床振荡器中反应 12 h 洗脱 Cr(VI);二次水洗涤数次,磁分离,至 pH 显中性,干燥后得到 IFMMs 微球。

1.5 IFMMs 的 Cr(VI) 离子吸附性能

荧光增强率和淬灭率分别为:

$$\text{荧光增强率}(\%) = [(f_1 - f_2)/f_2] \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{荧光淬灭率}(\%) = [(f_1 - f_3)/f_1] \times 100\% \quad (2)$$

其中: f_1 为除去 Cr(VI) 后微球的荧光强度; f_2 为未除去 Cr(VI) 时微球的荧光强度; f_3 为将微球用于吸附后的荧光强度。

(上接第 50 页)

验证结果表明,鬼臼毒素提取率的 RSD 值为 0.57%,与模型预测值偏差为 -0.70%,均小于 2%,说明最优工艺的合理性和可重复性,也证明 CCD 模型可信度较高,可用于工艺优化。

3 结论

采用 HPLC 法对鬼臼毒素进行分析,确定了 HPLC 检测条件,系统适用性试验符合要求,方法重复性良好。通过单因素试验选出对鬼臼毒素提取率影响较大的 3 个因素:液料比、乙醇体积分数、鬼臼与甘草的质量比,并进行进一步的优化;采用 CCD 设计响应曲面法对 3 个因素进行优化,以鬼臼毒素提取率为响应值,得到了鬼臼甘草配伍回流法的最优工艺条件。在最优工艺条件下进行 3 批验证,验证结果与预测值相符较好。

参考文献

- [1] 张杰. 小八角莲活性成分提取分离、质量控制及药效研究[D]. 长沙:中南大学,2010.
- [2] 陈毓亨. 我国鬼臼类植物资源的研究[J]. 药学学报,1979,14(2):101-107.
- [3] 石磊岭,魏鸿雁,夏提古丽. 阿不利孜,等. 正交试验优选八角莲中鬼臼类化合物的提取工艺研究[J]. 中国医药指南,2011,33(9):45-47.
- [4] 杨磊,唐晓溪,赵春建,等. 响应面法优选桃儿七中的鬼臼毒素的超声提取工艺[J]. 化工进展,2009,28(2):297-304.
- [5] 杜微,李唯,杨德龙,等. 响应面分析法在优化桃儿七鬼臼毒素 CO₂ 超临界萃取工艺中的应用[J]. 甘肃农业大学学报,2011,46(1):144-150.
- [6] 欧小群,杨秀梅,谭茂兰,等. 星点设计-效应面法辅助优选姜黄和甘草的提取方法[J]. 成都中医药大学学报,2015,38(3):32-34. ■