

雷公藤提取农药用总生物碱工艺的优化

周琳^{1,2}, 冯俊涛^{1*}, 马志卿¹, 张兴¹

(1. 陕西省生物农药工程技术研究中心, 西北农林科技大学无公害农药研究服务中心, 杨凌 712100;

2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 为杀虫活性物质雷公藤生物碱的产业化开发利用奠定基础, 以雷公藤根皮中总生物碱提取率为评价指标, 综合考察 pH 值、提取时间、乙醇浓度、固液比和提取次数 5 个关键因素的影响, 以 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计优选了雷公藤总生物碱的提取工艺条件, 并利用人工神经网络进行仿真、评估和优化, 最终获得了雷公藤根皮中总生物碱的提取优化工艺: 根皮粉细度 30 目, pH2.5, 固液比 1:10, 乙醇浓度 65%, 提取时间 2 h, 提取 2 次。该优化工艺条件不仅可减少成本, 降低能耗, 而且使雷公藤总生物碱提取率略有提高, 在实际生产中具有较好的应用价值。

关键词: 提取工艺, 人工神经网络, 植物源农药, 雷公藤, 总生物碱

中图分类号: S482.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-6819(2008)-12-0287-04

周琳, 冯俊涛, 马志卿, 等. 雷公藤提取农药用总生物碱工艺的优化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(12): 287-290.

Zhou Lin, Feng Juntao, Ma Zhiqing, et al. Optimum technology for extracting total alkaloid from an insecticidal plant *Tripterygium wilfordii* Hook with ethanol[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(12): 287-290. (in Chinese with English abstract)

0 引言

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook) 为卫矛科雷公藤属植物, 又名黄藤根、霹雳木, 主要生长在中国长江中下游地区, 自然资源丰富, 具有很好的药用和农用价值。目前, 在医学上已广泛应用于类风湿性关节炎、肾病综合征、系统性红斑狼疮、器官移植排斥反应等各类免疫性疾病的治疗^[1]。中国民间很早以前就利用雷公藤防治各种害虫, 为著名的杀虫植物之一, 故又名“菜虫药”。据报道, 雷公藤总生物碱是该植物中主要的杀虫活性物质, 对多种害虫具有较强的胃毒、触杀、拒食、麻痹、种群抑制和生长发育抑制等作用, 在田间也有较好的应用效果^[2-5]。因此, 雷公藤总生物碱作为植物源农药进行全面研究及开发具有重要的意义。

目前雷公藤总生物碱主要用乙醇渗漉、回流提取或浸提。陈俊元等^[6]研究比较了雷公藤总生物碱的乙醇渗漉提取、氯仿加热回流提取和酸水渗漉提取三种工艺方法, 结果表明酸水提取工艺 (4% HCl 渗漉) 的总碱得率及含量较高。陈列忠等^[7]分别研究了雷公藤生物碱提取工艺中的提取溶剂、提取方法及酸碱选择等最为关键的 3 个因素对提取率的影响。本试验在前人研究的基础上, 为克服酸水渗漉的低效率和乙醇提取的低收率等缺点, 采用酸性乙醇提取雷公藤根皮中的总生物碱, 并考虑到其提取工艺受到许多因素的影响及各因素间还可能存在交互作用, 采用 5 因素 4 水平的正交试验设计, 得到了 16 组不同处理组合的总生物碱提取率, 从中获取了较优的酸性乙醇提取工艺条件。在正交试验的基础上, 应用人工神经网络技术, 对试验数据进行仿真优化, 分析各影响因素的变化规律, 从而获得了雷公藤总生物碱酸性乙醇提取的优化工艺, 为产业化开发利用雷公藤中的生物碱奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试样品、仪器设备与试剂

供试样品为采自福建省泰宁县的雷公藤新鲜根皮, 经 60℃ 烘干, 粉碎过 30 目筛, 用聚乙烯膜袋分装, 置于 4℃ 冰箱中备用; 雷公藤总生物碱对照品由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供, 生物碱含量为 98%, 酸不溶物 ≤ 0.1%。

试验仪器和设备: R 系列旋转蒸发仪和 W201 型数显恒温水浴锅 (上海申生科技有限公司), SHB-III 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), UV1100 紫外可见分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司), 精密电子天平 (瑞士梅特勒公司), PHS-25 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂), HL-18 型多功能食品粉碎机 (上海海菱电器有限公司), 101-2AB 型电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司), 温度计 (北京泰来仪器有限公司)。

试剂: 提取用溶剂乙醇、盐酸、氯仿、浓氨水等均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 雷公藤根皮中总生物碱提取率的测定

各称取 20 g 雷公藤根皮粉样品, 加入试验设计要求的一定数量和一定浓度的乙醇溶液, 在试验设计要求的酸度下, 加热回流提取一定时间。提取结束后, 将提取液在旋转蒸发仪中减压浓缩。再用 0.5 mol/L HCl 溶液 30 mL 提取 3 次, 合并酸液, 用 30 mL 氯仿分 2 次萃取酸水液, 弃去氯仿层, 酸水中加入浓氨水调节 pH 至 7 左右, 静置, 用滤纸过滤, 再加浓氨水调节 pH 至 9-11, 再用 90 mL 氯仿分 3 次萃取至水中无生物碱为止, 合并氯仿液, 在旋转蒸发仪中浓缩至干, 即得雷公藤总生物碱, 然后加入 5% 盐酸溶液并定容至 25 mL, 于紫外分光光度计上测定各提取物酸溶液在 268 nm 处的吸光度值, 对照标准曲线 $y = -0.001961 + 0.008599x$ ($r = 0.9999$), 得到总生物碱的含量, 按下列公式计算雷公藤根皮中总生物碱的提取率。为提高试验的可靠性, 每一处理组合均重复 2 次, 取其平均值进行统计分析。

$$\text{总生物碱提取率 (\%)} = \frac{\text{总生物碱含量 (mg/L)} \times 25(\text{mL})}{\text{根皮粉重 (mg)} \times 1000} \times 100$$

1.2.2 雷公藤总生物碱提取工艺设计

根据前期试验基础, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计^[8], 考察乙醇回流提取工艺中 A (pH 值)、B (提取时间)、C (乙醇浓

收稿日期: 2007-03-26 修订日期: 2007-11-29

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2002BA516A04)

作者简介: 周琳 (1971-), 女, 河南南阳人, 博士, 副教授, 主要从事生物农药及植物保护研究。郑州 河南农业大学植物保护学院, 450002。

Email: zhoulun0704@yahoo.com.cn

*通讯作者: 冯俊涛, 男, 博士, 副教授。杨凌 陕西省生物农药工程技术研究中心, 712100。Email: jtfeng@126.com

度)、D(固液比)和E(提取次数)5个关键因素对雷公藤总生物碱提取率的影响,以确定较优的雷公藤总生物碱提取工艺。根据相关参考文献和前期试验基础,并结合实际生产情况,每个因素选择4个水平,考察因素和水平见表1。在正交试验所得较优工艺的基础上,利用试验数据建立人工神经网络^[9],应用神经网络模型进行模拟、仿真和优化,得到优化的雷公藤总生物碱乙醇提取工艺条件。

表1 正交试验中影响总生物碱提取率的因素及水平					
Table 1 Extraction factors and their levels for orthogonal experiment					
水平	A pH 值	B 提取时间/h	C 乙醇浓度/%	D 固液比	E 提取次数
1	2.5	1	95	1: 5	1
2	3.5	2	85	1: 10	2
3	4.5	3	75	1: 15	3
4	5.5	4	65	1: 20	4

2 结果与分析

2.1 正交试验结果与分析

以雷公藤总生物碱提取率为考察指标,分析总生物碱提取工艺的正交试验结果(表2)。比较表2中5个因素的极差大小排列顺序为 $R_A>R_C>R_D>R_E>R_B$,从而得出影响雷公藤总生物碱提取效果各因素的主次顺序为:A(pH值)、C(乙醇浓度)、D(固液比)、E(提取次数)、B(提取时间)。其中pH值的极差最大,表明该因素对提取雷公藤根皮中总生物碱的影响最大。

应用极差分析的结果可以得出各因素的最优水平,直观分析结果见图1。本试验以雷公藤总生物碱的提取率为考核指标,A因素的最优水平是1,即pH值为2.5;B因素的最优水平是4,即提取时间为4h;C因素的最优水平是4,即乙醇浓度为65%;D因素的最优水平是4,即固液比为1:20;E因素的最优水平是4,即提取次数为4次。故得出较优试验组合为 $A_1B_4C_4D_4E_4$,即用酸性乙醇回流提取时,pH值为2.5,固液比为1:20,乙醇浓度为65%,提取时间为4h,提取4次。

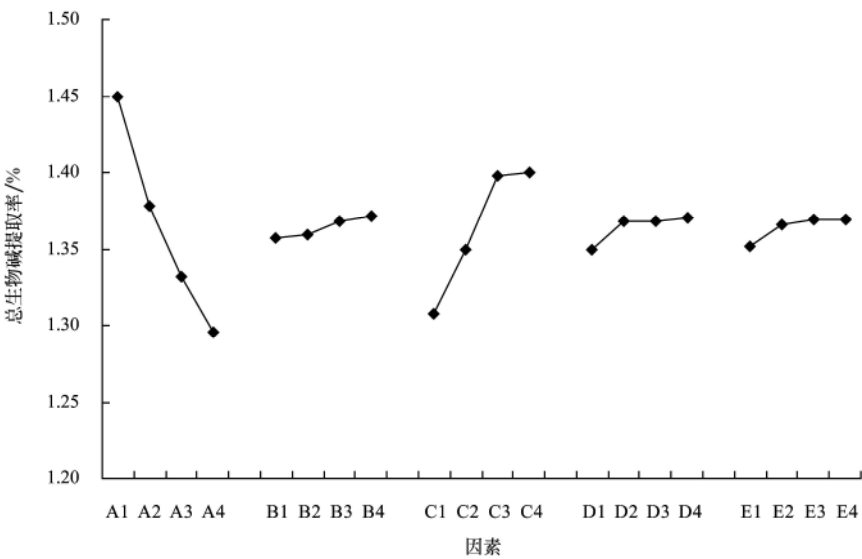


图1 正交试验中5因素与雷公藤总生物碱提取率关系图
Fig.1 Intuitive analysis of the relationship between 5 factors and the extraction rate of total alkaloid from *T. wilfordii*

2.2 最优雷公藤总生物碱提取工艺的确定

2.2.1 人工神经网络模型的应用

表2 雷公藤总生物碱提取工艺的正交试验数据分析
Table 2 Orthogonal data analysis of total alkaloid extraction in root bark of *T. wilfordii*

编号	处理组合					总生物碱 提取率 /%
	A pH 值	B 提取时间 /h	C 乙醇浓度 /%	D 固液比	E 提取 次数	
1	1 (2.5)	1 (1)	1 (95)	1 (1:5)	1 (1)	1.3598
2	1 (2.5)	2 (2)	2 (85)	2 (1:10)	2 (2)	1.4366
3	1 (2.5)	3 (3)	3 (75)	3 (1:15)	3 (3)	1.4977
4	1 (2.5)	4 (4)	4 (65)	4 (1:20)	4 (4)	1.5058
5	2 (3.5)	1 (1)	2 (85)	3 (1:15)	4 (4)	1.3663
6	2 (3.5)	2 (2)	1 (95)	4 (1:20)	3 (3)	1.3299
7	2 (3.5)	3 (3)	4 (65)	1 (1:5)	2 (2)	1.4061
8	2 (3.5)	4 (4)	3 (75)	2 (1:10)	1 (1)	1.4107
9	3 (4.5)	1 (1)	3 (75)	4 (1:20)	2 (2)	1.3664
10	3 (4.5)	2 (2)	4 (65)	3 (1:15)	1 (1)	1.3558
11	3 (4.5)	3 (3)	1 (95)	2 (1:10)	4 (4)	1.2895
12	3 (4.5)	4 (4)	2 (85)	1 (1:5)	3 (3)	1.3153
13	4 (5.5)	1 (1)	4 (65)	2 (1:10)	3 (3)	1.3342
14	4 (5.5)	2 (2)	3 (75)	1 (1:5)	4 (4)	1.3169
15	4 (5.5)	3 (3)	2 (85)	4 (1:20)	1 (1)	1.2785
16	4 (5.5)	4 (4)	1 (95)	3 (1:15)	2 (2)	1.2525
K_1	5.7999	5.4267	5.2317	5.3981	5.4048	
K_2	5.513	5.4392	5.3967	5.471	5.4616	
K_3	5.327	5.4718	5.5917	5.4723	5.4771	
K_4	5.1821	5.4843	5.6019	5.4806	5.4785	
k_1	1.4500	1.3567	1.3079	1.3495	1.3512	
k_2	1.3783	1.3598	1.3492	1.3678	1.3654	
k_3	1.3318	1.3680	1.3979	1.3681	1.3693	
k_4	1.2955	1.3711	1.4005	1.3702	1.3696	
极差 R	0.1545	0.0144	0.0926	0.0207	0.0184	
因素主次	1	5	2	3	4	
优水平	A1	B4	C4	D4	E4	

注:按 $L_{16}(4^5)$ 正交表安排的16个处理组合进行试验。 K_i 代表各因素*i*水平下雷公藤总生物碱提取率之和; k_i 代表 K_i 的平均值。

取正交试验中pH值、提取时间、乙醇浓度、固液比和提取次数的数据作为样本,部分数据见表3。将提取工艺中的4个因

素（即 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 ）的16个试验值（记为 k ）作为样本输入，即（ x_{1k} 、 x_{2k} 、 x_{3k} 、 x_{4k} ）为第 k 个输入样本。将第 k 次试验所得到的总生物碱含量作为第 k 个输入样本对应的教师，即将（ x_{11} 、 x_{21} 、 x_{31} 、 x_{41} ）作为第1个样本；（ x_{12} 、 x_{22} 、 x_{32} 、 x_{42} ）作为第2个样本， \cdots ，（ x_{116} 、 x_{216} 、 x_{316} 、 x_{416} ）作为第16个样本，对应的教师为 t^1 ， t^2 ， \cdots ， t^{16} 。

取精度 $\varepsilon=0.00001$ ，输入层节点数为5，隐含层节点数为5，输出层节点数为1，建立BP神经网络模型^[10]（见图2），用Matlab7.0工具箱中的trainbr训练函数训练网络，迭代256次后达到精度要求，得到输出值。

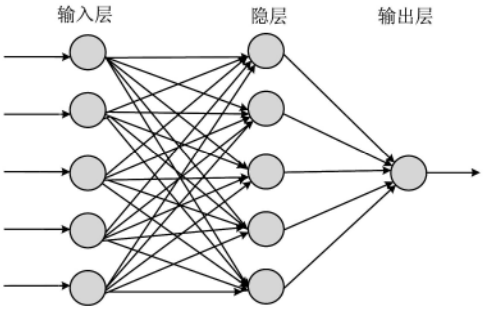


图2 BP神经网络模型
Fig.2 BP neural network model

应用神经网络模型计算仿真值^[11]，仿真值与实际值相比，误差均小于0.2%（见表3）。

表3 雷公藤总生物碱提取工艺样本指标及仿真结果
Table 3 Sample index and emulation results of alkaloid extraction process

编号	A pH 值	B 提取时间 /h	C 乙醇浓度 /%	D 固液比	E 提取次数	提取率 实测值	提取率 仿真值
1	1 (2.5)	1 (1)	1 (95)	1 (1:5)	1 (1)	1.3598	1.3598
2	1 (2.5)	2 (2)	2 (85)	2 (1:10)	2 (2)	1.4366	1.4362
3	1 (2.5)	3 (3)	3 (75)	3 (1:15)	3 (3)	1.4977	1.4982
4	1 (2.5)	4 (4)	4 (65)	4 (1:20)	4 (4)	1.5058	1.5056
5	2 (3.5)	1 (1)	2 (85)	3 (1:15)	4 (4)	1.3663	1.3660
6	2 (3.5)	2 (2)	1 (95)	4 (1:20)	3 (3)	1.3299	1.3312
7	2 (3.5)	3 (3)	4 (65)	1 (1:5)	2 (2)	1.4061	1.4061
8	2 (3.5)	4 (4)	3 (75)	2 (1:10)	1 (1)	1.4107	1.4102
9	3 (4.5)	1 (1)	3 (75)	4 (1:20)	2 (2)	1.3664	1.3646
10	3 (4.5)	2 (2)	4 (65)	3 (1:15)	1 (1)	1.3558	1.3555
11	3 (4.5)	3 (3)	1 (95)	2 (1:10)	4 (4)	1.2895	1.2916
12	3 (4.5)	4 (4)	2 (85)	1 (1:5)	3 (3)	1.3153	1.3170
13	4 (5.5)	1 (1)	4 (65)	2 (1:10)	3 (3)	1.3342	1.3327
14	4 (5.5)	2 (2)	3 (75)	1 (1:5)	4 (4)	1.3169	1.3171
15	4 (5.5)	3 (3)	2 (85)	4 (1:20)	1 (1)	1.2785	1.2787
16	4 (5.5)	4 (4)	1 (95)	3 (1:15)	2 (2)	1.2525	1.2525

2.2.2 对主要因素进行仿真和优化分析

在正交试验所获得的较优工艺的基础上，改变一种影响因素值，保持其它三种影响因素值不变，应用所建立的神经网络模型进行模拟，从而得到不同因素对雷公藤总生物碱提取率的影响曲线，如图3~7所示。

图3的曲线走势表明，雷公藤总生物碱的提取率随pH值的降低而升高，因此，最终确定适宜pH值为2.5。由图4可以看出，随着时间的延长，生物碱的提取效果逐渐提高，但超过2 h后变化趋于缓慢，综合考虑工艺成本、能源消耗和效率等因素，最终确定雷公藤总生物碱提取的适宜时间为2 h。图5表明，雷公藤

总生物碱的提取率在乙醇浓度为65%时达最大值，随着浓度的增加提取效果反而降低，因此，确定最佳提取乙醇浓度为65%。

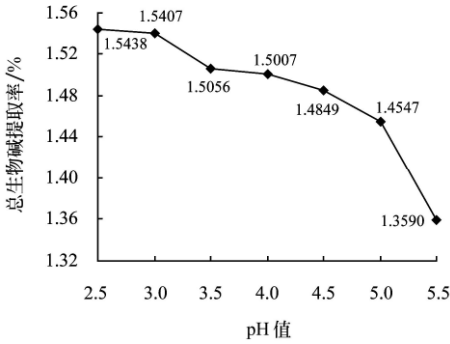


图3 pH值对雷公藤总生物碱提取率的影响
Fig.3 Influence of pH value on the extraction rate of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii*

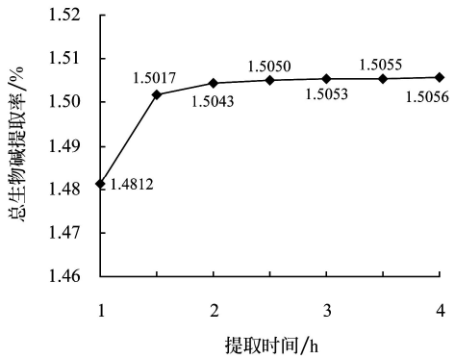


图4 提取时间对雷公藤总生物碱提取率的影响
Fig.4 Influence of extraction duration on the extraction rate of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii*

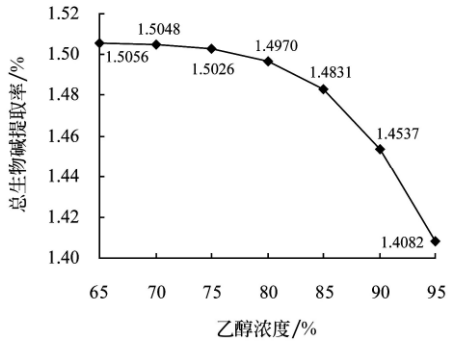


图5 乙醇浓度对雷公藤总生物碱提取率的影响
Fig.5 Influence of ethanol concentration on the extraction rate of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii*

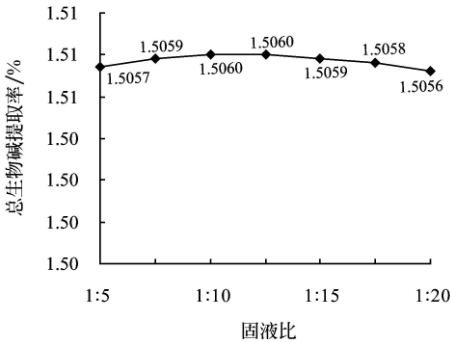


图6 固液比对雷公藤总生物碱提取率的影响
Fig.6 Influence of solid-liquid ratio on the extraction rate of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii*

从图 6 可见, 固液比达到 1:10 时, 雷公藤生物碱的提取率最高, 因此, 最终确定生物碱的提取适宜固液比为 1:10。图 7 表明, 当提取 2 次以后, 雷公藤生物碱的提取率升高缓慢, 考虑提取效率、成本, 最终确定提取次数为 2 次。从以上的综合分析可知, 雷公藤总生物碱酸性乙醇提取的优化工艺条件为: pH 值 2.5, 乙醇浓度 65%, 固液比 1:10, 提取时间 2 h, 提取 2 次。

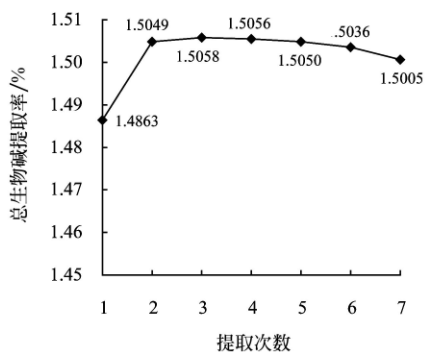


图7 提取次数对雷公藤总生物碱提取率的影响
Fig.7 Influence of extraction time on the extraction rate of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii*

2.2.3 优化结果的试验验证

经试验验证, 应用优化得到的最优工艺条件提取, 测得的雷公藤总生物碱提取率为1.5117%, 而按正交试验得出的较优试验组合 $A_1B_4C_4D_4E_4$ 提取, 得到的雷公藤总生物碱提取率为1.5058%。说明采用优化工艺条件的提取效果比正交试验较优组合的提取效果略有提高, 且前者可以较大程度地提高提取效率、降低工艺成本和能量消耗。因此, 应用人工神经网络得到的优化结果是合理可行的。

3 结 论

1) 采用正交试验设计研究了用乙醇提取雷公藤根皮中总生物碱的方法和工艺。正交试验结果表明, 影响雷公藤总生物碱

提取效果各因素的主次顺序为: pH值、乙醇浓度、固液比、提取次数和提取时间, 其较优的试验组合为 $A_1B_4C_4D_4E_4$, 即在用酸性乙醇回流提取时, 雷公藤根皮粉细度为30目, pH值2.5, 固液比1:20, 乙醇浓度为65%, 提取4h, 提取4次。

2) 利用人工神经网络和传统的正交试验相结合的分析方法, 充分挖掘正交试验数据的信息, 通过建立神经网络模型来仿真、评估和优化, 并结合生产实际, 综合考虑提取效果、提取成本及效率, 最终获得了实际可行的提取优化工艺为: pH值2.5, 固液比1:10, 乙醇浓度65%, 提取时间2 h, 提取2次。从模型的仿真结果看, 预测精度高, 相对误差均小于0.2%, 并经试验验证, 采用优化工艺后总生物碱提取率比正交试验较优组合高, 且可以节省成本, 降低能耗, 提高效率。

[参 考 文 献]

- [1] 向 明, 张程亮. 雷公藤免疫抑制作用研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(3): 458—461.
- [2] 罗都强, 张 兴, 冯俊涛. 杀虫植物雷公藤研究进展[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(3): 84—89.
- [3] 周 琳, 马志卿, 冯俊涛, 等. 雷公藤生物碱制品对小菜蛾和菜青虫的控制效果研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(12): 169—173.
- [4] 周 琳, 冯俊涛, 马志卿, 等. 雷公藤总生物碱对粘虫的生物活性[J]. 植物保护学报, 2006, 33(4): 401—406.
- [5] 周 琳, 冯俊涛, 张锦恬, 等. 雷公藤总生物碱对几种昆虫的生物活性研究[J]. 植物保护, 2007, 33(6): 60—64.
- [6] 陈俊元, 夏志林, 邓福孝. 雷公藤生物碱提取工艺引进[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20(11): 484—485.
- [7] 陈列忠, 王开金, 陈建明, 等. 雷公藤植物源农药的制备工艺和优化[J]. 现代农药, 2006, 5(1): 26—28.
- [8] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000, 467.
- [9] 张际先. 神经网络在农业工程中的应用[J]. 农业工程学报, 1995, 11(1): 28—34.
- [10] 蒋德云, 张 弓. 谷物识别中对神经网络的优化[J]. 农业工程学报, 2002, 18(5): 231—234.
- [11] Lacher R C. Back-Propagation Learning in expert networks[J]. IEEE Transaction on Neural Networks, 1992, 1(3): 62—72.

Optimum technology for extracting total alkaloid from an insecticidal plant *Tripterygium wilfordii* Hook with ethanol

Zhou Lin^{1, 2}, Feng Juntao^{1*}, Ma Zhiqing¹, Zhang Xing¹

(1. Technology and Engineering Center of Biopesticide, Shaanxi Province/Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China;

2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To make the best of the alkaloids, the main insecticidal components in *Tripterygium wilfordii* Hook. The extraction technology of the total alkaloid from root bark of *T. wilfordii* with acid ethanol was studied by method of orthogonal design. Combination artificial neural network with traditional orthogonal experiment, a new method for analyzing, processing and optimizing the test data was applied. By using this new method, the optimum extraction condition was obtained as follows: root bark powder 30 mesh, pH value 2.5, ethanol concentration 65%, solid-liquid ratio 1:10, duration of extraction 2h and extracting times 2. Applying this extracting technology, the costs of production was reduced, and the energy consuming was decreased, but the total alkaloid content was increased. The results show that this new method is reasonable and practicable.

Key words: extraction technology, artificial neural networks, botanical insecticides, *Tripterygium wilfordii* Hook, total alkaloid