

灰黄霉素超声波提取工艺研究

来源：中国论文下载中心 [08-03-20 11:50:00] 作者：王宁强 岑琴 周丽莉 编辑：studa20

【摘要】 目的 探讨超声波提取灰黄霉素的优化工艺条件。方法 用紫外分光光度法(UV)测定灰黄霉素的含量。以灰黄霉素的提取率为评价指标,在单一影响因素考察的基础上,采用正交实验确定超声波提取灰黄霉素的优化工艺条件。结果 超声波提取灰黄霉素的优化工艺条件为:10倍量的丙酮为提取溶剂,功率300W,单次辐射时间3s,间歇时间5s,提取时间40min,灰黄霉素提取率为85.58%。通过验证实验表明,本实验所得工艺条件为优化工艺条件。结论 本实验所得工艺条件可行,具有一定的实际应用价值。

【关键词】 灰黄霉素 超声提取 正交实验

Study on the ultrasonic extraction process of griseofulvin

ABSTRACT Objective To study the optimal extraction conditions of griseofulvin by ultrasonic extraction methods. Methods The content of griseofulvin in extractor is determined by UV spectrophotometry and the content of griseofulvin used as quality control criteria. Utilizing orthogonal test to gain an optimum extraction conditions, based on the result of single factor algorithm. Result The best extraction conditions are as follows: the extracting solvent is acetone (10V/W), the power is 300W, the extraction time is 40min, and the ultrasonic radiation time is 3s at a time. The validate experiment indicates that the condition gained by experiment is an optimum one. Conclusion The ultrasonic extraction process of griseofulvin is feasible, and could be used in routine operation.

KEY WORDS Griseofulvin; Ultrasonic extraction; Orthogonal experiment

灰黄霉素(griseofulvin)是1939年从灰黄青霉(Penicillium griseofulvin)培养液中得到的一种含氯代谢产物,1958年开始用于临床。1960年中国医学科学院抗生素研究所从我国土壤中得到灰黄霉素的生产菌,并研究试制成功灰黄霉素[1]。

灰黄霉素是非多烯类抗真菌抗生素,已广泛用于治疗皮肤及角质层的真菌感染。对红色发癣菌、断发癣菌、疏毛发癣菌、小孢子菌和絮状表皮菌等有抑制作用[1]。临床用于头癣、迭瓦癣、皮肤癣及手(足,甲)癣等体表真菌感染,特别对头癣的疗效显著,国内治愈率在90%以上[2]。灰黄霉素是存在于菌丝体内部的抗生素。目前工业上采用溶剂连续浸泡干菌体的提取方法,溶剂大多为丙酮[1,3,4]。考虑到常规提取所需时间较长,提取率较低,溶剂用量较大,本研究探讨采用超声波技术提取灰黄霉素的工艺,利用超声波的空化[5]作用、热效应、机械作用破坏菌体细胞壁,使溶剂易于渗透至细胞内,有效成分更多的转移到溶剂中,达到缩短提取时间,提高提取率的目的[6~8]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

U-1810型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司),ALC210.4型电子天平(德国Sartorius公司),JY92-IIID超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),HF-2.5B超声波循环提取器(北京宏祥隆生物技术开发有限公司)。

1.2 材料

灰黄霉素菌体(赤峰制药集团生产,编号:NI-88),对照品(中华制药厂产品,纯度为99.8%),丙酮(天津市博迪化工有限公司),95%乙醇(沈阳化学试剂厂),氯仿(天津市博迪化工有限公司),所用试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 标准曲线的制备

精密称取灰黄霉素对照品 25mg, 25ml 丙酮溶液定容, 配制标准溶液(初始浓度 1.0mg/ml)。精密量取标准溶液 2ml 于 25ml 容量瓶, 用 95%乙醇定容。取丙酮 2ml 置于 25ml 容量瓶中, 95%乙醇定容, 作为空白溶液。紫外光谱 200~400nm 全波长扫描, 在 326nm 处有最大吸收峰。

精密量取 0.2、0.3、0.4、0.5、1.0 和 1.2ml 的标准溶液分别置于 25ml 容量瓶中, 用 95%乙醇定容。取丙酮 0.2、0.3、0.5、0.4、1.0 和 1.2ml 分别置于 25ml 容量瓶中, 用 95%乙醇溶液定容, 作为空白对照。在 326nm 处测其吸光度 A 值, 测定结果计算得回归方程:

$$A=14.782C+0.0017 \quad r=0.9998$$

2.2 灰黄霉素含量测定

称取灰黄霉素菌体(含水<5%)1.0g 置于 250ml 烧瓶中, 加入丙酮 50ml, 磁力搅拌回流提取三次, 每次 1h。测得菌体中灰黄霉素含量为 30.67%。

2.3 灰黄霉素超声波提取影响因素考查

(1)超声提取溶剂 文献报道 [3, 9] 灰黄霉素易溶于二甲基甲酰胺、二氯乙烷(以上溶解度约为 10%~12%w/v), 可溶于丙酮、氯仿、乙醇(在丙酮中溶解度为 5.0%, 氯仿为 4.4%, 乙醇为 1.66%), 不溶于水和石油醚。考虑到二甲基甲酰胺价格较高, 二氯乙烷毒性较大, 本实验主要选取丙酮、氯仿及 95%乙醇为超声提取溶剂。

称取灰黄霉素菌体 5g, 共 3 份, 分别用丙酮、氯仿、95%乙醇 50ml 溶解, 超声条件设定为: 功率 400W, 单次辐射时间 3s, 提取时间 40min, 室温下进行提取, 分别测定灰黄霉素溶液的吸光度, 提取率分别为 83.71%、78.69%和 28.95%。由于丙酮对灰黄霉素的提取率较高, 因此本实验选取丙酮作为超声提取溶剂。

(2)溶剂用量 称取灰黄霉素菌体 5g, 共 6 份, 分别用 4、8、10、12、16、20 倍量丙酮溶解, 超声波条件不变。分别测定灰黄霉素溶液的吸光度, 计算提取率。溶剂 4 倍量时, 提取液中结晶析出太多, 故舍去该实验点。如 Fig.1 所示, 在溶剂倍量为 16 时有最大提取率。考虑到用较少的溶剂得到较高的提取率, 本实验确定溶剂倍量为 10。

(3)超声波提取功率 称取灰黄霉素菌体 5g, 共 3 份, 分别用丙酮 50ml 溶解, 超声波条件设定为: 功率分别为 200、300 和 400W, 单次辐射时间 3s, 提取时间 40min, 室温下进行提取。分别测定灰黄霉素溶液的吸光度, 计算提取率。如 Fig.2 所示, 在超声功率为 300W 时有最大提取率。

(4)超声波提取时间 称取灰黄霉素菌体 5g, 用丙酮 50ml 溶解, 超声波条件设定为: 功率 400W, 单次辐射时间 3s, 间歇时间 5s, 室温下进行提取。从提取时间 20min 开始, 每 10min 取样一次, 测定灰黄霉素溶液的吸光度, 计算提取率。如 Fig.3 所示, 在提取时间为 40min 时有最大提取率。

(5)超声波单次辐射时间 称取灰黄霉素菌体 5g, 共 4 份, 分别用 50ml 丙酮溶解, 超声波提取条件为: 功率 400W, 提取时间 40min, 间歇时间 5s, 单次辐射时间分别为 1、3、5 和 8s, 室温下进行提取。分别测定灰黄霉素溶液的吸光度, 计算提取率。如 Fig.4 所示, 单次辐射时间 5s 以后, 曲线趋于平缓。

2.4 正交实验

在单一影响因素考察的基础上, 确定以 10 倍量丙酮为提取溶剂, 选取超声波功率、单次辐射时间、提取时间作为考察指标, 采用四因素三水平 L₉(3⁴)的正交试验对灰黄霉素的超声波提取工艺进行优化。

因素水平及正交实验结果见 Tab.1 和 Tab.2。

由正交表, 根据 K 值确定灰黄霉素超声波提取的优化工艺条件为: 功率 300W, 单次辐射时间 3s, 提取时间 40min。根据 R 值判断, 各因素对实验结果的影响大小顺序为 B>A>C。

2.5 优化工艺的验证实验

按优化工艺条件重复 3 次实验进行验证，结果灰黄霉素的收率平均值为 85.58%，表明实验所确定的工艺条件为优化工艺条件。

2.6 超声波循环提取实验

超声波循环提取器中加入丙酮 2200ml(10 倍)，开启搅拌转子，调节转速为 1000r/min。缓慢加入菌体 220g，待料液完全循环后，开启超声波发射器，按正交实验确定的优化工艺条件(功率 300W，单次辐射时间 3s，提取时间 40min)进行实验，所得提取率为 87.65%，略高于验证实验所得提取率。循环放大实验表明该优化工艺条件可应用于灰黄霉素提取。

3 结论

本研究通过正交设计实验，对灰黄霉素的超声波提取工艺条件进行了优化。确定了超声波提取灰黄霉素的优化工艺条件为：10 倍量的丙酮为提取溶剂，功率 300W，单次辐射时间 3s，提取时间 40min。验证实验所得提取率为 85.58%，超声波循环放大提取实验所得提取率为 87.65%，表明了该优化工艺条件应用于灰黄霉素的提取是可行的。