

响应面法优化捆仙绳总生物碱提取工艺*

黄仕其¹ 郭琳² 李玉泽¹ 樊浩¹ 黄文丽¹ 邓翀¹ 王薇^{1,3**} 宋小妹^{1,3***}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 71200;

3. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 利用响应面法优化捆仙绳总生物碱提取工艺。方法 在单因素考察实验基础上, 选择乙醇提取浓度、提取时间、液料比为自变量, 以捆仙绳总生物碱提取率为响应值, 进行三因素三水平的响应面分析, 优化捆仙绳总生物碱的提取工艺。结果 通过响应面分析给出最佳提取工艺为: 乙醇浓度 80%、提取时间 70 min、液料比为 20: 1, 捆仙绳总生物碱最佳总生物碱提取含量 0.363%。结论 响应面法可以有效优化捆仙绳总生物碱的提取工艺。

关键词:捆仙绳; 总生物碱; 响应面; 单因素考察; 含量测定

中图分类号:R282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1340(2021)05-0069-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2021.05.014

捆仙绳为黄杨科板凳果属植物顶花板凳果 (*Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc.) 的干燥全草^[1-8], 全国各地均有分布, 其主要产地集中于陕西、湖北、云南等地区, 又名顶花板凳果、转筋草、捆仙七。捆仙绳作为陕西秦巴山一带特色药材, 为“陕西七药”之一^[9], 具有祛风止咳、舒筋活络、调经止带等功效, 主要用于治疗风湿性关节炎、慢性支气管炎、妇科白带等病症^[10-15], 现代科学研究发现捆仙绳中主要含有甾体类生物碱成分^[16-21], 然而对于捆仙绳总生物碱的含量测定和提取工艺则未发现报道。目前用于总生物碱总成分含量测定的方法主要包括化学分析法和分光光度法等, 其中最为常用的是分光光度法结合酸性染料比色法^[22-23]。响应面法对于药材中总生物碱提取工艺的研究方法成熟可靠, 是一种解决提取过程中多因素多变量交叉问题的科学方法^[24-26], 能够通过科学合理的计算机实验设计方法通过回归方程和拟合系数给出最佳的提取工艺参数。因此, 本实验采用酸性染料比色法测定捆仙绳中总生物碱含量, 采用响应面法优化总生物碱提取工艺, 以此实验为后续研究捆仙绳药材提供文献参

考价值。

1 仪器与试药

1.1 仪器 AL204 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度为 0.1 mg); BT25S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司, 精度为 0.01 mg); UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司); GZX-9240MBE 电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 回流冷凝管、电热套、漏斗、分液漏斗、玻璃棒、250 mL 圆底烧瓶、25 mL 容量瓶、10 mL 容量瓶、500 mL 容量瓶、移液管、蒸发皿。

1.2 试药 捆仙绳药材收集于陕西太白, 经陕西中医药大学王薇教授鉴定为黄杨科板凳果属植物顶花板凳果 (*Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc.) 的干燥带根全草。spiropachysine B 对照品(分离自制, 纯度≥98%), 试剂: 氢氧化钠、溴甲酚绿、邻苯二甲酸氢钾, 实验用水为娃哈哈纯净水, 乙醇等其它试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取 spiropachysine

* 基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2019ZDLSF04-03-02); 陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YL12)

** 共同通讯作者: 王薇, 博士, 教授。E-mail: 2051003@sntcm.edu.cn

*** 通讯作者: 宋小妹, 博士, 教授。E-mail: 2051087@sntcm.edu.cn

B 5 mg,加三氯甲烷溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,即得浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

2.1.2 供试品溶液制备 按照单因素试验及响应面试验设计方案的方法提取,将干燥的捆仙绳药材粉碎,过四号筛,称取 10 g,置于 250 mL 规格圆底烧瓶内,加入乙醇回流提取,过滤,溶液在水浴锅蒸干,三氯甲烷溶解定容至 25 mL 容量瓶,加三氯甲烷至刻度,摇匀,作为供试品溶液,备用。

2.1.3 溴甲酚绿缓冲液的制备 首先精密称取溴甲酚绿 250 mg,加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 25 mL 使溶解;再精密称取邻苯二甲酸氢钾 5.10 g 放入 100 mL 的烧杯中,加入约 40 mL 的蒸馏水并用玻璃棒搅拌使其充分溶解。然后将两种溶液混合,移入 500 mL 的容量瓶中,用蒸馏水定容,调 pH 至 5,备用。

2.2 捆仙绳总生物碱测定方法的建立

2.2.1 最大吸收波长的确定 精密吸取样品溶液和对照品溶液各 1 mL 分别置于已放入 10 mL 三氯甲烷的分液漏斗中,然后分别各加入 3 mL 溴甲酚绿缓冲液,振摇 1 min,静置待三氯甲烷液澄清后取三氯甲烷层,在 200 ~ 800 nm 波长范围扫描,结果在 410 nm 处有最大吸收。

2.2.2 溴甲酚绿用量的选择 显色剂用量选择 1,2,3,4,5 mL 进行显色测定,结果吸光度随着用量的增大而先增大后减小,3 mL 时吸光度达到最大,所以显色剂选择 3 mL 时最佳。

2.2.3 三氯甲烷萃取用量的选择 三氯甲烷、显色剂、生物碱三者之间在分液漏斗进行萃取时的比例对吸光度有一定影响,对三氯甲烷 5,10,15,20 mL 时进行考察,发现在 10 mL 时吸光度最大,所以选择三氯甲烷萃取时选择 10 mL 最佳。

2.2.4 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液 0.3,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6 mL 分别置于 5 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,各取 1 mL 按“2.2.1 测定方法”项下测定。以吸收度(A)为纵坐标,对照品浓度(c)为横坐标绘制标准曲线,计算得回归方程: $Y=44.014X+0.0679$, $R^2=0.9995$ 结果表明捆仙绳对照品浓度在 $0.003 \sim 0.016 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取样品溶液 1 mL,按优化后的三氯甲烷 10 mL 和溴甲酚绿 3 mL 用量,在“2.2.1 测定方法”项下测定,取三氯甲烷层溶液于 410 nm 波长处测定吸光度,连续测定 6 次, $RSD=0.55\%$,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性实验 取同一批陕西产捆仙绳药材,按照响应面优化得出最佳提取工艺,通过“2.1.2 制备方法”项下制备,平行制备 5 份供试品溶液,按“2.2.1 测定方法”项下测定,结果 $RSD=0.69\%$,表明重现性良好。

2.2.7 稳定性实验 按响应面工艺优化后提取条件制备样品溶液,精密吸取样品溶液 1 mL,在“2.2.1 测定方法”项下分别于 30,60,90,120,150 和 180 min 进行测定,记录吸光度值,1 h 之内测出的吸光度差异较小,结果 $RSD=7.40\%$,超出 1 h 后测吸光度显著降低,表明供试品溶液在 1 h 内基本稳定,所以样品要在 1 小时之内测完。

2.3 单因素实验

2.3.1 回流提取时间的考察 称取捆仙绳药粉 10 g,100% 浓度乙醇,50 mL 乙醇,按“2.1.2 制备方法”制备和“2.2.1 测定方法”同时在 30,45,60,75 和 90 min 条件下提取,测其吸光度。对捆仙绳总生物碱进行单因素实验分析。

2.3.2 乙醇浓度的考察 称取捆仙绳药粉 10 g,50 mL 乙醇,提取时间 60 min,按“2.1.2 制备方法”制备和“2.2.1 测定方法”同时在 60%、70%、80%、90%、100% 条件下提取,测其吸光度,对捆仙绳总生物碱进行单因素实验分析。

2.3.3 液料比的考察 称取捆仙绳药粉 10 g,提取时间 60 min,80% 乙醇,按“2.1.2 制备方法”制备和“2.2.1 测定方法”,在液料比 5:1,10:1,15:1,20:1,25:1 条件下提取,测其吸光度。对捆仙绳总生物碱进行单因素实验分析。

2.4 响应面设计 根据单因素实验结果及参考相关文献,选取影响捆仙绳总生物碱提取率的 3 个主要影响因素:提取时间、乙醇浓度、液料比,以捆仙绳药材总生物碱含量为响应值,采用 Design Expert 8.06 软件设计的三因素三水平实验方案进行研究。因素水平见表 1,设计方案和结果见表 2。

表 1 响应面因素水平设计

水平	提取时间(min)	乙醇浓度(%)	液料比
	A	B	C
-1	45	70	15:1
0	60	80	20:1
1	75	90	25:1

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果实验表明 随着时间的延长,吸光度不断增高,在 60 min 时吸光度达到最大,提取时间再延长后,吸光度反而有所下降。80% 乙醇吸光度最大,90% 以后吸光度值下降且趋于平缓。在液料比 15:1 和 20:1 时吸光度值最大,且20:1大于 15:1。

3.2 捆仙绳总生物碱提取工艺结果 见表 2。

3.3 回归方程的建立和方差分析 通过 Design-Expert 8.06 软件对表 2 数据进行拟合分析,得到二项多次回归方程: $P=0.39-0.014A+8.750E-003B+0.015C-7.500E-003AB-5.000E-003AC+0.000BC-0.049A^2-0.069B^2-0.041C^2$, $R^2=0.9533$,方差分析结果见表 3。由表中数据可以得到,回归模型 $P=0.0007$,表明该模型具有良好的显著性。失拟项大于 0.05,不显著,表明回归方程与实际情况的拟合程度良好,可以用于预测和筛选捆仙绳药材的提取工艺。模型的相关系数

$R^2=0.9533$,说明整体模型比较可靠。对回归模型进行显著性分析,得到模型的一次项 C 显著 ($P<0.05$),A,B 不显著 ($P>0.05$),二次项 B^2 极显著 ($P<0.0001$), A^2 、 C^2 显著 ($P<0.01$),各因素对捆仙绳总生物碱含量测定的影响大小:液料比 > 提取时间 > 乙醇浓度。

表 2 响应面分析法优化捆仙绳总生物碱提取工艺

编号	A	B	C	总生物碱(%)
1	1	1	0	0.25
2	-1	1	0	0.32
3	0	0	0	0.40
4	0	0	0	0.40
5	0	1	1	0.30
6	0	0	0	0.39
7	-1	0	-1	0.28
8	1	0	1	0.31
9	0	1	-1	0.27
10	0	0	0	0.37
11	0	-1	-1	0.26
12	1	-1	0	0.24
13	0	0	0	0.39
14	1	0	-1	0.29
15	0	-1	1	0.29
16	-1	0	1	0.32
17	-1	-1	0	0.28

表 3 响应面方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
回归模型	0.045	9	5.044E-003	15.87	0.0007
A	1.513E-003	1	1.513E-003	4.76	0.0655
B	6.125E-004	1	6.125E-004	1.93	0.2077
C	1.800E-003	1	1.800E-003	5.66	0.0489
AB	2.250E-004	1	2.250E-004	0.71	0.4280
AC	1.000E-004	1	1.000E-004	0.31	0.5924
BC	0.000	1	0.000	0.000	1.0000
A ²	0.010	1	0.010	31.48	0.0008
B ²	0.020	1	0.020	62.61	0.0001
C ²	7.164E-003	1	7.164E-003	22.54	0.0021
剩余	2.225E-003	7	3.179E-004		
失拟项	1.625E-003	3	5.417E-004	3.61	0.1234
误差	6.000E-003	4	1.500E-004		
总和	0.048	16			

3.4 多因素间交互作用分析

3.4.1 乙醇浓度和提取时间的交互作用 图 1 显

示在液料比为 20:1 时乙醇浓度和回流提取时间对捆仙绳总生物碱含量测定的相互作用的 3D 模型。

由图1可见,固定A或B的任一值,含量曲线都会随着其中单个因素的增大而先升高后降低,并且

提取时间坡度较为平缓,而乙醇浓度坡度较陡,A与B交互作用较为显著。

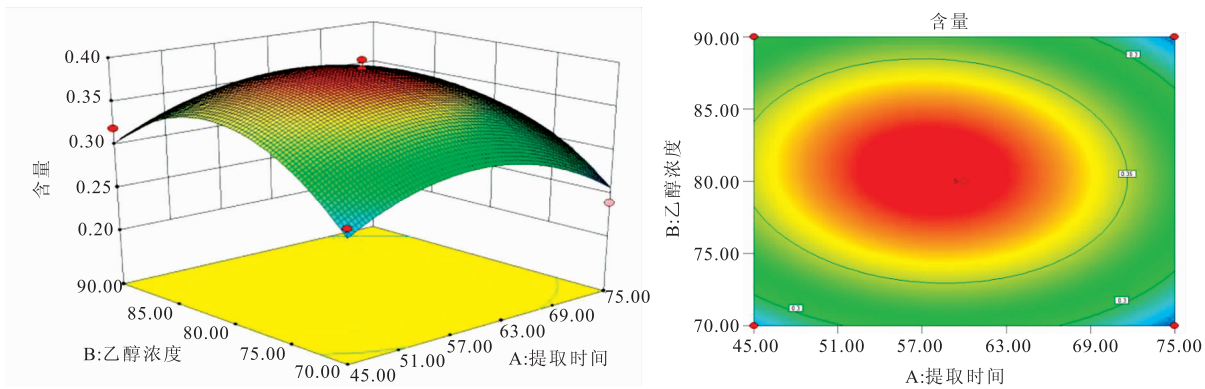


图1 乙醇浓度和提取时间作用响应面(左)和等高线图(右)

3.4.2 乙醇浓度和液料比的交互作用 图2在回流提取时间为60 min时,乙醇浓度与液料比对捆仙绳总生物碱含量测定的交互作用的3D模型如图2所示。固定B或C中任一值,含量曲线都会

随着其中单个因素的增大而先升高后降低,并且液料比坡度较为平缓,而乙醇浓度坡度较陡,B与C交互作用较为显著。

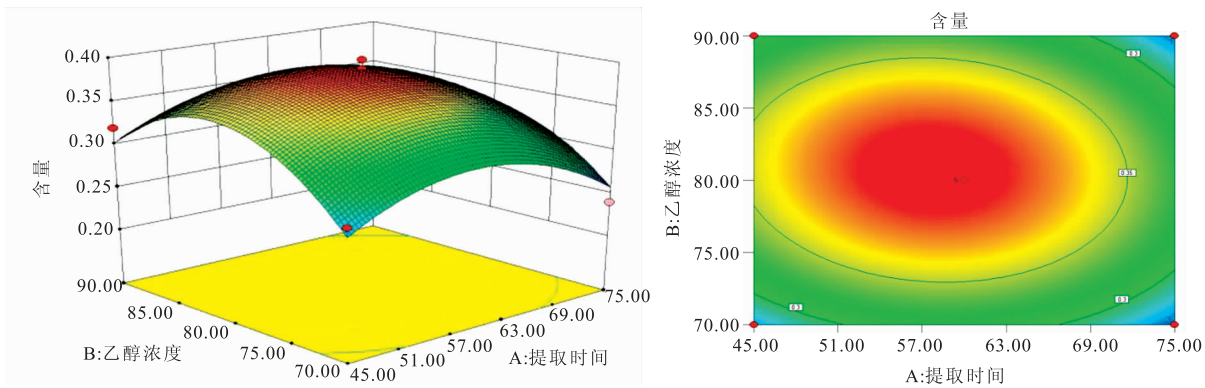


图2 乙醇浓度和液料比作用响应面(左)和等高线图(右)

3.4.3 提取时间和液料比的交互作用 图3表示当乙醇浓度为80%时回流提取时间及液料比对捆仙绳总生物碱含量测定的交互作用的3D模型。由图3可见,固定A或C中任一值,含量曲线都会

随着其中单个因素的增大而先升高后降低,但是A与C在各自范围内的曲面均较为平坦,因此,A与C交互作用不显著。

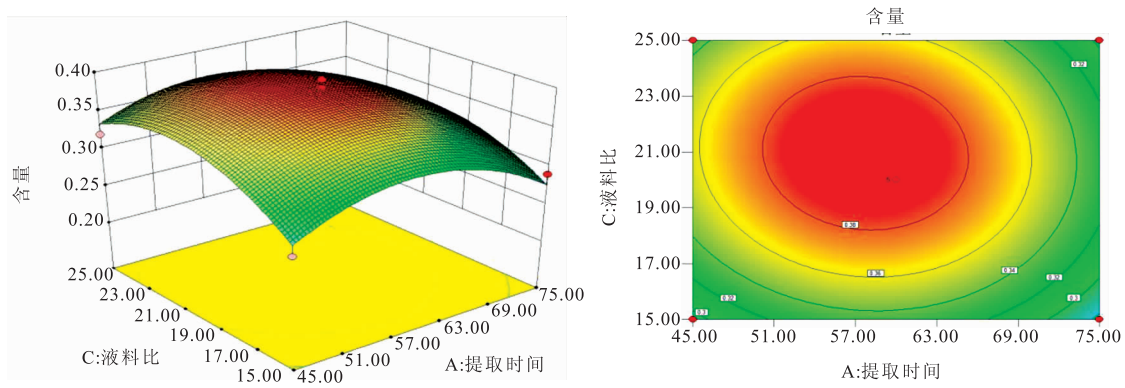


图3 提取时间和液料比作用响应面(左)和等高线图(右)

3.5 最佳提取工艺条件确认 通过回归模型,依据响应面分析法对捆仙绳总生物碱含量测定选择

maximize 模式进行优化,进而得到捆仙绳总生物碱最优的提取工艺参数为:液料比为20.72:1

($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、乙醇浓度为 80.29%,回流提取时间为 69.40 min。根据实际操作情况,设置液料比、乙醇浓度、回流提取时间依次为 20:1、80%、70 min。总生物碱含量预期值为 0.363%。

3.6 验证实验 采用上述确定的工艺条件,每次称取捆仙绳约 10 g,进行 3 次验证实验。结果显示,最佳工艺条件下捆仙绳总生物碱含量的平均值能达到 0.35% ($n=3$, $\text{RSD}=0.79\%$),由此可见该模型合适有效。

4 讨论

萃取溶剂的选择、酸性染料的选择和其用量程度大小,以及 pH 值大小是影响测定结果灵敏度和准确性的重要因素。它要求酸性染料与生物碱在一定的 pH 下定量结合,并且结合的生物碱-酸性染料离子对在有机相中有较大的溶解度,而酸性染料在有机溶剂中不溶或很少溶解,同时在特定波长下有较强的吸收。对于生物碱而言,三氯甲烷是较理想而最为常用的溶剂。只有在适当的 pH 值溶液中,酸性染料才能完全地与生物碱阳离子结合成能被有机溶剂萃取的离子对络合物,缓冲液的 pH 过低或过高均会对离子对的稳定性产生很大的影响,甾体类生物碱一般使用邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠缓冲液, pH 为 4~5^[23],故在本文中未对 pH 值的大小进行筛选,选取 pH 为 5。

参考文献

- [1] 仙靛,李梦怡,薛璇玑,等.顶花板凳果化学成分及药理活性研究进展[J].西北药学杂志,2017,32(4):534-538.
- [2] 黄泰康.现代本草纲目上[M].北京:中国医药科技出版社,2001:569-570.
- [3] 谭祖纯,谭敏枝.谭氏土家伤科本草[M].北京:中国医药科技出版社,2007:104-105.
- [4] 曾育麟,李星炜.中国民族药志第4卷[M].成都:四川民族出版社,2007:394-397.
- [5] 彭再生主编.湖北苗药[M].北京:中医古籍出版社,2006:272-273.
- [6] 湖北省革命委员会卫生局主编.湖北中草药志2[M].武汉:湖北人民出版社,1982:605-608.
- [7] 甘肃省革命委员会卫生局编.甘肃中草药手册第3册[M].兰州:甘肃人民出版社,1973:1388.
- [8] 林余霖,陈士林.中草药大典[M].北京:军事医学科学出版社,2006:251.
- [9] 郭增军.陕西七药[M].西安:陕西科学技术出版社,2003.
- [10] 邱文清.常用中草药汇编原植物彩色图鉴[M].北京:

中医古籍出版社,2012.

- [11] 赵川.转筋草生物碱成分及抗肿瘤转移活性研究[D].天津:天津医科大学,2013.
- [12] 王啸洋.三种太白山药用植物的活性成分研究[D].西安:第四军医大学,2014.
- [13] 李晨阳,翟慧媛,唐生安,等.转筋草化学成分及其活性研究[J].中药材,2010,33(5):729-732.
- [14] Yokoi T, Kikuchi T. Neutral constituents of *Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc. Identification of friedelan-3 β ,28-diol[J]. Yakugaku Zasshi, 1985, 105(7):690-693.
- [15] 邱明华,聂瑞麟,李忠荣. *Pachysandra* 型生物碱的化学结构及活性筛选[J].云南植物研究,1994(3):296-300.
- [16] Zhao C, Gan CC, Jin MN, et al. Antitumor metastasis pregnane alkaloids from *Pachysandra terminalis* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2014, 16(5):440-446.
- [17] 邱明华,李德铎.黄杨科植物化学分类学初探[J].应用与环境生物学报,2002,8(4):387-391.
- [18] 张敏.抑菌活性植物筛选及顶花板凳果抑菌活性有效成分研究[D].广州:华南农业大学,2008.
- [19] 任茜,陈国联,李万波.80种秦岭七药原植物抗菌作用的实验研究[J].国土与自然资源研究,2013,(1):86-88.
- [20] Zhao H, Wang X, Li M, et al. A Novel Pregnane-Type Alkaloid from *Pachysandra terminalis* Inhibits Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo [J]. Phytotherapy Research, 2015, 29(3):373-380.
- [21] 翟慧媛,李晨阳,唐生安,等.转筋草中的酚类成分及其抗氧化活性[J].中国中药杂志,2010,35(14):1820-1823.
- [22] 国家药典委员会,中华人民共和国药典(3部)[S].北京:中国医药科技出版社,2020:451-452.
- [23] 李丽,龚晓莹,姜蔓菁,等.酸性染料比色法测定总生物碱含量的研究进展[J].中南药学,2019,17(8):1242-1246.
- [24] 薛彦斌,周浓,韩林,等.响应面法优化延胡索地上部分总生物碱提取工艺的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2017,60(13):191-195.
- [25] 赵胜男,李瑞海,贾天柱,等.响应面法优化白屈菜中总生物碱酸水提取的工艺[J].中国药师,2019,22(3):541-545.
- [26] 韩素芹,张强,张翼敏,等.白英中甾体类总生物碱的含量测定研究[J].山西中医学院学报,2014,15(6):32-34.

(收稿日期:2020-05-20 编辑:宋蓓)