

· 中药工业 ·

止泻木子中锥丝碱的提取工艺[△]郑光杰¹, 邱娜¹, 刘凡凡², 晋敦青¹, 孙博航^{1*}

(1. 沈阳药科大学 中药学院/基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016;

2. 郑州市中心医院 药学部, 河南 郑州 467000)

[摘要] 目的: 优化止泻木子中锥丝碱的提取工艺, 为止泻木子质量控制标准的建立奠定基础。方法: 在单因素试验基础上, 以提取时间、甲醇浓度、料液比为因素, 以止泻木子中锥丝碱提取得率为响应值, 采用三因素三水平响应曲面试验设计法, 确定最佳提取工艺。结果: 最佳提取工艺为提取时间 70 min、甲醇浓度 75%、料液比 1:9。结论: 该提取工艺稳定、合理、预测性良好。

[关键词] 止泻木子; 锥丝碱; 响应曲面; 提取工艺; 高效液相色谱法

Study on Extraction Technology of Conessine from *Holarrhena antidysenterica*ZHENG Guang-jie¹, QIU Na¹, LIU Fan-fan², JIN Dun-qing¹, SUN Bo-hang^{1*}

(1. School of Key Laboratory of Structure Based Drug Design & Discovery of Ministry of Education, School of Tradition Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; China;

2. Zhengzhou Central Hospital Pharmacy Department, Zhengzhou 467000, China)

[Abstract] **Objective:** The process of extracting conessine from *Holarrhena antidysenterica* optimized for establishing the quality control standards of *Holarrhena antidysenterica*. **Methods:** Based on the results of single factor tests, we selected extraction time, methanol concentration and solid/liquid ratio as the experimental factors and used the extraction yield of conessine from as the response value. **Results:** The optimal extraction parameters were as follows: extraction time 70 min, methanol concentration 75%, solid/liquid ratio 1:9. **Conclusion:** The extraction method is reliable, reasonable and highly predictable.

[Keywords] *Holarrhena antidysenterica*; conessine; response surface method; extraction technology

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20181026002

止泻木子为夹竹桃科止泻木属止泻木的干燥种子, 其主要产于我国西藏、新疆、青海、广西等海拔地区以及印度、尼泊尔等南亚国家与地区^[1]。止泻木子具有较大的药用价值, 民族医药中主要用其治疗赤巴病、腹泻、痢疾等疾病^[2-3]。近年来研究表明, 止泻木子中的甾体生物碱是其主要生物活性成分^[4], 在这些生物碱中锥丝碱的含量较大^[1], 且进一步研究发现, 锥丝碱具有较好的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 在杀灭寄生虫、抗菌等作用方面也具有较好的药理活性^[4,9]。但是关于止泻木子活性部位提取工艺和质量控制研究方面尚未见到相关报道,

因此本课题以止泻木子为研究对象, 以锥丝碱为指标性成分, 采用响应曲面法优化止泻木子中锥丝碱的提取工艺^[10-11], 为进一步研究其质量控制方法、开发利用止泻木子的药用经济价值具有重要的意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AB135-S 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); HH-S 型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司); UV-1700 型紫外分光光度计[岛津

[△] [基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究项目(201610163120)

* [通信作者] 孙博航, 副教授, 研究方向: 天然药物化学成分的分离纯化; Tel: (024)23986482, E-mail: sunbohang1978@163.com

国际贸易(上海)有限公司]; R-1001N 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司); LC-Net II/ADC 高效液相色谱分析仪(日本分光株式会社); DZTW 调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 分析色谱柱 YMC-Pack ODS-A(日本 YMC 公司)。

1.2 试药

锥丝碱对照品(自制, HPLC 测定含量 $\geq 98\%$); 甲醇(色谱纯, 山东禹王化工有限公司); 超纯水; 其他试剂均为分析纯。

干燥的止泻木子 2015 年 7 月购于安国市新辉药业有限公司, 产地新疆, 经沈阳药科大学路金才教授鉴定为止泻木子, 药材留样保存于本研究室。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

精密称取干燥的止泻木子粉末 4.5 g 至圆底烧瓶中, 按照实验设计要求进行加热回流提取, 趁热抽滤得滤液, 合并滤液, 减压浓缩, 将浓缩液用甲醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中, 摇匀, 制成供试品溶液, 备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取锥丝碱对照品 4 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 即制成质量浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的锥丝碱对照品溶液。

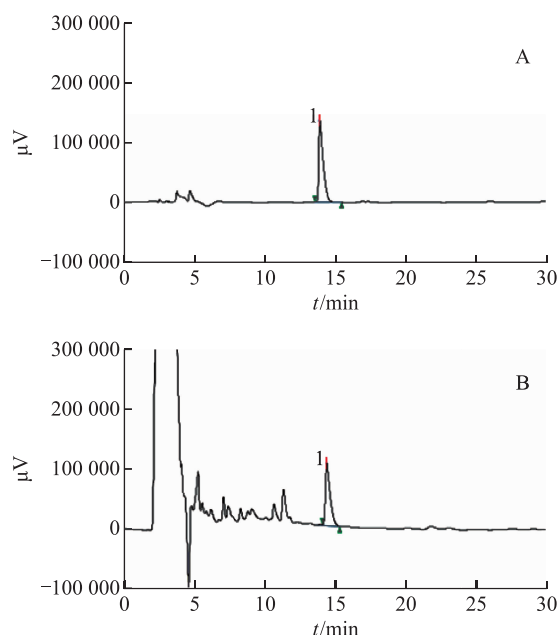
2.3 色谱条件

流动相 95% 甲醇(含二乙胺 2‰), 检测波长 215 nm, 柱温 25°C , 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 10 μL , 供试品、对照品 HPLC 图见图 1。

2.4 标准曲线的制定

精密配制锥丝碱储备液(质量浓度为 $1.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 分别精密量取该储备液 1、2、4、6、8 mL 于 10 mL 容量瓶中, 甲醇稀释到刻度, 摇匀, 分别进样。以色谱峰峰面积(Y)与对照品溶液浓度(X)进行线性回归分析, 得线性回归方程 $Y = 6780324.63X + 8404.85$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 锥丝碱在 $0.101 \sim 0.808 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 色谱峰峰面积与对

照品浓度线性关系良好。



注: A. 锥丝碱对照品; B. 供试品。

图1 锥丝碱对照品、供试品液相色谱图

2.5 单因素试验

分别选取提取时间、甲醇浓度、料液比作为影响止泻木子中锥丝碱提取工艺的 3 个因素, 进行单因素试验, 结果表明, 提取时间在 0.5 ~ 2.5 h、甲醇浓度 60% ~ 100%、料液比 1:6 ~ 1:14 存在极值。

2.6 提取条件的响应面法优化分析

通过响应曲面法对影响锥丝碱提取效果较大的 3 个因素提取时间、甲醇浓度、料液比进行优化, 以锥丝碱含量为响应值, 设计了三因素三水平的试验方案。通过单因素试验确定了 3 个因素的取值范围。

采用 Box-Behnken Design (BBD) 设计三因素三水平共 17 组试验, 以锥丝碱的含量(Y)为响应值, 经回归拟合后, 各因素与响应值的回归方程为 $Y = 2.61 + 0.12A - 0.030B + 62.5 - 0.03C - 0.043AB + 0.020AC - 0.022BC - 0.19A^2 + 0.076B^2 - 0.034C^2$ 。实验设计及结果见表 1~2。

由方差分析可知, 该回归模型 $P < 0.0001$, 表明回归方程模型极其显著; 失拟项 $P = 0.1600 > 0.05$, 表明失拟不显著, 从而说明该模型能够对止

表 1 止泻木子中锥丝碱提取工艺 BBD 设计因素

组号	因素			锥丝碱含量/ mg·g ⁻¹
	A: 时间/ min	B: 甲醇浓度 (%)	C: 料液比	
1	60	100	10	2.45
2	90	60	8	2.55
3	60	60	6	2.51
4	90	80	6	2.45
5	30	60	8	2.18
6	60	80	8	2.63
7	60	80	8	2.58
8	60	100	6	2.48
9	60	80	8	2.59
10	90	100	8	2.42
11	60	80	8	2.64
12	30	80	6	2.31
13	30	100	8	2.22
14	30	80	10	2.28
15	90	80	10	2.50
16	60	60	10	2.57
17	60	80	8	2.62

泻木子中锥丝碱的提取率进行准确的预测和分析。从回归方程系数显著性检验可知：一项式 A、B 极其显著；二项式 A²、B² 极其显著；交互项 AB 具有一定的显著性，AC 和 BC 不显著。说明不同的提取工艺对止泻木子中锥丝碱提取率并非简单的线性关系。

对拟合方程求解，得最优提取参数：甲醇浓度 73.14%；提取时间 70.63 min；液料比 1:8.63，预测止泻木子中锥丝碱的质量分数为 2.638 72 mg·g⁻¹。考虑到实验的可操作性，将工艺优化为料液比 1:9，提取时间为 70 min，甲醇浓度为 75%。

根据所拟合的回归方程，作相应曲面图，考察所拟合的响应曲面形状，分析甲醇浓度、料液比、提取时间对止泻木子中锥丝碱提取率的影响。其等高线图和 3D 响应曲面图见图 2~4。3 组图直观地反应了各因素对响应值的相互影响，甲醇浓度和提取时间的相互作用较显著。等高线的形状可反应出交互效应的强弱大小，椭圆形表示两因素交互作用显著，而圆形则表明因素间交互作用较弱。

表 2 止泻木子中锥丝碱提取工艺 BBD 设计结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型数	0.330 00	9	0.036 000	29.25	<0.000 1	显著
A	0.110 00	1	0.110 000	87.44	<0.000 1	
B	0.007 20	1	0.007 200	5.82	0.046 6	
C	0.000 31	1	0.000 310	0.25	0.630 6	
AB	0.007 30	1	0.007 300	5.84	0.046 3	
AC	0.001 60	1	0.001 600	1.29	0.292 7	
BC	0.002 00	1	0.002 000	1.64	0.241 4	
A ²	0.160 00	1	0.008 600	127.51	<0.000 1	
B ²	0.024 00	1	0.005 200	19.67	0.003 0	
C ²	0.004 70	1	0.004 700	3.82	0.091 5	
参差数	0.008 70	7	0.000 150			
失拟项	0.006 00	3	0.000 083	2.97	0.160 0>0.05	不显著
纯误差	0.002 70	4	0.000 200			
总变差	0.330 00	16				

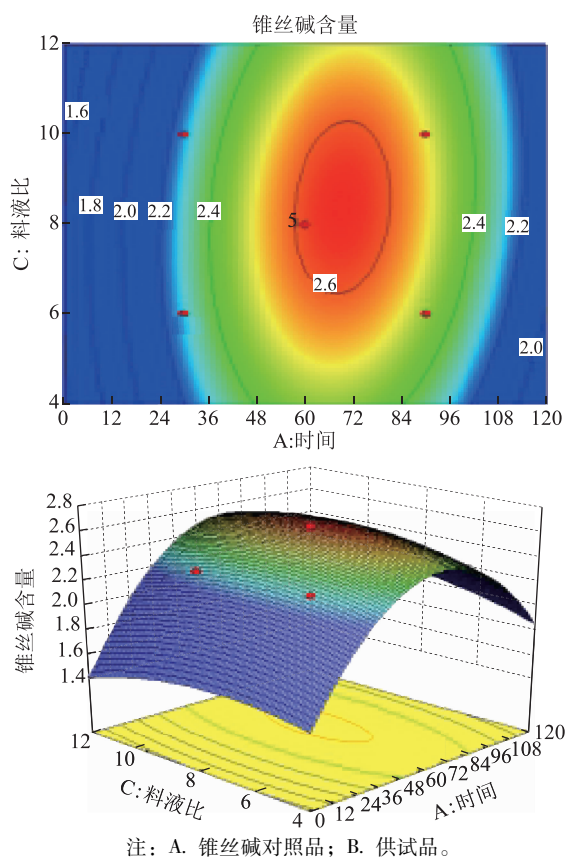


图2 提取时间与料液比的等高线图和3D响应曲面图

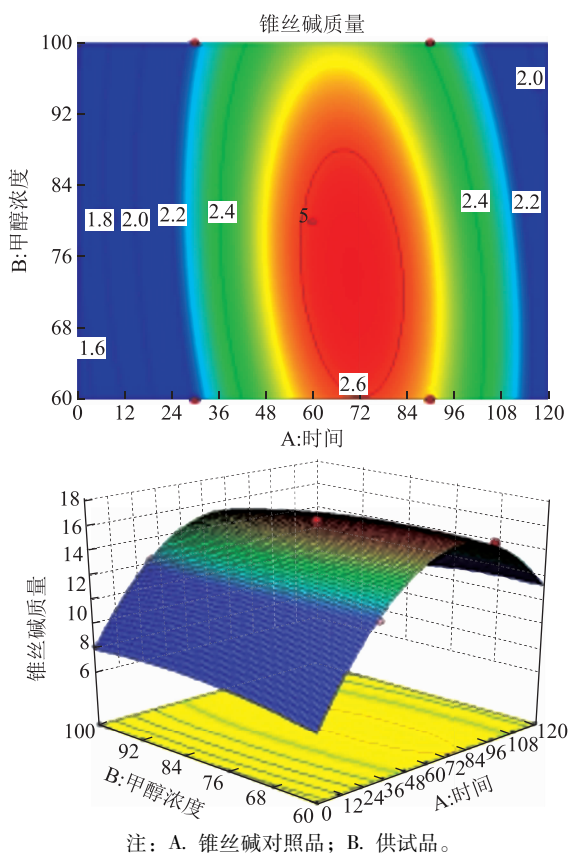


图3 甲醇浓度和提取时间的等高线图和3D响应曲面图

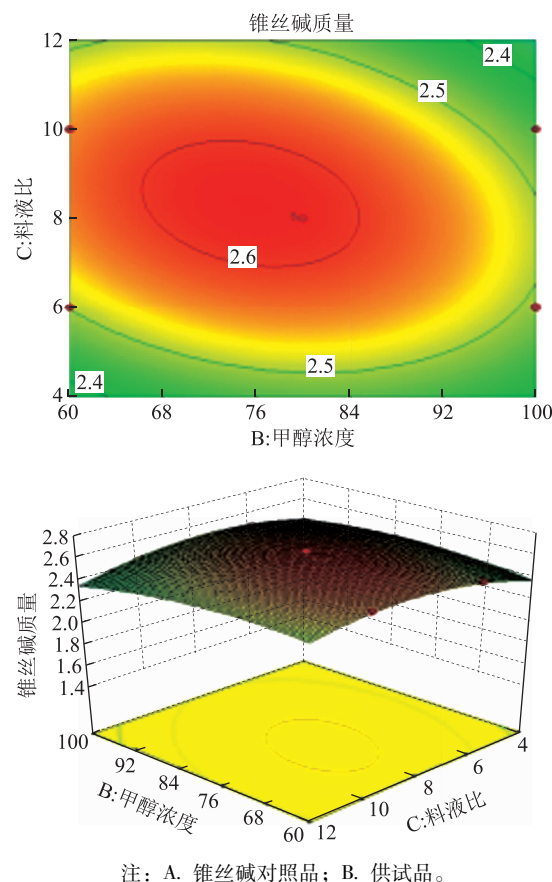


图4 料液比与甲醇浓度的等高线图和3D响应曲面图

2.7 优化工艺的验证

平行3次验证试验, 锥丝碱质量分数分别为2.65、2.63、2.67, RSD为0.75%, 方程预测结果与实测值之间差距较小, 表明建立的数学模型具有较好的预测性。

3 结论

本研究在单因素试验的基础上通过响应曲面法得到了止泻木子中锥丝碱的最佳提取工艺条件: 甲醇浓度75%; 提取时间70 min; 料液比1:9。验证试验表明, 在该工艺条件下对锥丝碱具有较高的提取率, 这为止泻木子质控标准的建立和进一步开发利用提供了依据。

参考文献

- [1] 葛晓磊, 范冬立, 孙博航. 藏药止泻木子的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(12): 950.
- [2] 孙绪丁, 权富家, 任松鹏, 等. 藏药材止泻木子质量标准研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(8): 20.

- [3] 吴香杰,金昌. 蒙药止泻木的生药鉴定[J]. 中国民族民间医药杂志,2001,2(49):111.
- [4] 耿金峰. 止泻木子的活性物质研究[D]. 大连:大连轻工业学院,2008.
- [5] 耿金峰,钱斯日古楞,王红英,等. 止泻木子活性物质的提取工艺及抑菌作用[J]. 食品科技,2007(7):145.
- [6] 段东柱. 三种药用植物中乙酰胆碱酯酶抑制活性成分的研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2011.
- [7] Dua V K, Verma G, Singh B, et al. Anti-malarial property of steroidal alkaloid conessine isolated from the bark of *Holarrhena antidysenterica* [J]. *Malaria Journal*, 2013, 12:194.
- [8] Patrice B K, Veronique P B, David L, et al. Antibacterial activities of the extracts and conessine from *Holarrhena floribunda* G. Don. (Apocynaceae) [J]. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, 2007,4(3):352.
- [9] Santra V J, Covell J A, Hayashi R, et al. A new family of H-3 receptor antagonists based on the natural product Conessine [J]. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(4):1490.
- [10] 冯玉康,赵伯友,姜国志. 响应曲面法优化黄芩苷精制工艺研究[J]. 中国现代中药,2013,15(06):490-495.
- [11] 冯玉康,王文鹏,郝鹏彬,等. 响应曲面法优化银杏叶提取物柱层析精制工艺[J]. 中国现代中药,2015,17(12):1321-1326.

(收稿日期 2018-10-26)

(上接第1543页)

- [2] 姜昕琰,商鼎. 地氯雷他定口崩片处方及工艺研究[J]. 上海医药,2014,35(7):58-59.
- [3] 柯学,王小琼,平其能. 口腔崩解片及其制备技术进展[J]. 中国药理学杂志,2005,40(11):801-805.
- [4] 林伟豪,朱新华. 阿司匹林口崩片的制备[J]. 华西药理学杂志,2012,27(5):547-549.
- [5] 喻樊,徐小刚,汤新慧,等. 白藜芦醇口崩片制备工艺及质量评价研究[J]. 中草药,2016,47(2):227-232.
- [6] 陈建琴. UPLC 双波长切换法测定银黄连口服液中原儿茶、黄芩苷、连翘苷的含量[J]. 中国药师,2014,17(12):2010-2012.
- [7] 丁淑敏,朱粉霞,施亚琴,等. UPLC 同时测定灯心草中绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和木犀草素的含量[J]. 中药材,2013,36(2):246-248.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:221.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:357-358.
- [10] 王欢欢. 银花清咽片的研制及药效学研究[D]. 张家口:河北北方学院,2012.
- [11] 赛西雅拉图. 清咽利喉胶囊的急性咽喉炎和抗炎镇痛药效试验研究[D]. 通辽:内蒙古民族大学,2013.
- [12] 王君. 鱼腥草注射液对急性咽炎治疗作用的实验研究[J]. 中国药业,2016,25(3):35-37.
- [13] 俞洁东,袁术妹,陈晓阳,等. 虎射利咽方治疗湿热型咽喉炎的实验研究[J]. 中医研究,2010,23(6):17-19.
- [14] 于晶,邱宇虹,邹凤玉. 中药口服泡腾片的制备工艺[J]. 中国现代中药,2006,8(4):33.
- [15] 睿仁芝,金丽娜,邹梅娟. 苦参总碱肠溶片制备和体外分析方法建立[J]. 中国现代中药,2007,9(9):26-28.
- [16] 邱宇虹,邹凤玉,于晶,等. 口腔崩解片研究现状[J]. 中国现代中药,2006,8(2):31.
- [17] 蔡刚. 复方丹参口腔崩解片的制备及质量标准研究[D]. 广州:广州中医药大学,2015.

(收稿日期 2018-05-21)