

· 中药工业 ·

星点设计-响应面法优选苦参总生物碱水提醇沉工艺

覃辉*

湖北省荆州市中心医院 药学部, 湖北 荆州 434020

[摘要] 目的: 优化苦参水提醇沉提取工艺, 获取苦参总生物碱最佳的工业化提取工艺条件及技术参数。方法: 采用 Box-Behnken 中心组合设计, 以苦参总生物碱提取率和浸膏得率的总权重为评价指标, 对液料比、提取时间和醇沉浓度 3 个影响因素进行考察, 以 Design-Expert 8.05 软件对实验数据作统计处理, 优选确定最佳提取条件。结果: 优化得到最佳工艺条件为加苦参饮片 9 倍量的水, 回流提取 2 次, 3 h/次, 醇沉浓度为 70%, 此工艺条件下苦参中总生物碱的提取率可达 1.62%, 干膏得率为 22.51%。结论: 优选得到的工艺稳定、可行, 可作为苦参工业化提取提供参考。

[关键词] 苦参; 提取工艺; 星点设计-响应面法

[中图分类号] R282.71; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)08-1084-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20181107007

Optimization of water Extraction and Alcohol Precipitation Total Alkaloid in *Sophora flavescens* by Star Point Design-response Surface Method

QIN Hui

Jingzhou Central Hospital of Hubei Province, Jingzhou 434020, China

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction process of *Sophora flavescens* water extraction and alcohol precipitation, and obtain the best industrial extraction conditions and technical parameters of total alkaloids in *S. flavescens*. **Methods:** Box-Behnken center combination design was used to evaluate the total weight of the total alkaloid extraction rate and the extraction yield. The factors including the liquid-to-liquid ratio, extraction time and alcohol concentration were investigated. The Design-Expert 8.05 software was applied to process the experimental data, and obtain the optimal extraction conditions. **Results:** The optimal process conditions were 9 times of water, decoction for 2 times, 3 hours/time, and the concentration of alcohol was 70%. At this condition, the extraction rate of total alkaloids in *S. flavescens* could arrived 1.62%, the dry paste yield was 22.51%. **Conclusion:** the preferred process is stable and feasible, and can be used for industrial extraction of *S. flavescens*.

[Keywords] *Sophora flavescens*; extraction technology; central composite design-response surface method

苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 具有清热燥湿、杀虫、利尿的功效。临床多用于热痢、便血、黄疸尿闭、赤白带下、阴肿阴痒、湿疹、湿疮、皮肤瘙痒、疥癣麻风; 外治滴虫性阴道炎等^[1]。苦参主要含苦参碱、槐定碱、氧化苦参碱、羟基苦参碱等多种生物碱类成分^[2], 而以上各种药理活性的发挥很大程度上依赖于苦参中所含的总生物碱类成分^[3-4]。故采取较好的工艺参数条件, 将苦参中总生物碱类成分尽可能地从苦参饮片中提取出来, 对于苦参药用资源的进一步开发利用有着积极的意义。仝燕等^[5]的研究表明, 水煎煮提取法

对苦参总生物碱提取效率相对更高, 但经水提取后的提取液包含了大部分水溶性杂质, 如多糖类。结合涂瑶生等^[6]的研究结果可知, 65%左右的乙醇对苦参总生物碱具有较好的选择性。故本研究充分结合上述二者各自的优点采用水煎煮法提取苦参总生物碱, 结合醇沉法对提取物进行纯化, 获取其最佳提取工艺, 以总生物碱得率和干膏得率的加权评分值为响应, 结合响应面法优化苦参总生物碱的提取工艺, 通过液料比、提取时间、醇沉浓度等因素水平考察及多因素间的重叠交互作用考察, 综合评判苦参总生物碱提取率和干膏得率, 为苦参中总生物

* [通信作者] 覃辉, 主管药师, 研究方向: 临床药理学, Tel: (0716)8499617, E-mail: 57780532@qq.com

碱提取工艺的优化及其开发应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

水浴锅(天津泰斯特, XMTD-2M); 电热套(天津泰斯特-IB); 分光光度计(北京通用仪器, TU-1221); 电子秤(上海万宝, ACS-30); 旋转蒸发器(上海亚荣, RE-52A)。

1.2 试剂

苦参碱对照品(上海融禾医药科技有限公司, 批号: 10035, 纯度大于 98%); 所用试剂均为分析纯; 水为纯化水。

苦参购于武汉天济中药材有限公司, 批号为 171025, 药材经湖南中医药大学中药鉴定教研室刘安平教授鉴定为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 苦参提取物中总生物碱含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取经 120 °C 干燥至恒质量的苦参碱对照品适量, 以无水乙醇溶解, 配制成每 1 mL 含 10 mg 的溶液作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取苦参饮片适量, 精密称定, 加提取用水回流, 按规定的时间提取(提取所用液料比、所需时间和乙醇沉淀浓度, 分别按照表 4 进行), 提取液趁热滤过, 合并滤液, 浓缩至相对密度为 1.15~1.20 后, 加入 95% 工业乙醇搅拌均匀至醇沉所需浓度, 静止 24 h, 取上清液, 滤渣再加 95% 工业乙醇醇沉 12 h, 合并两次上清液置于旋转蒸发器中回收乙醇, 得苦参流浸膏, 流浸膏转入蒸发皿中, 以少量乙醇润洗烧瓶, 洗液转入蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 烘 3 h, 干燥器中放冷即得干膏。取苦参干膏 0.2 g, 精密称定, 置于烧杯中, 加入 10 mL 2% 盐酸溶液, 调 pH 3~4^[7-8], 滤过, 液中加入 5% NaOH 溶液调节 pH 10~11^[7], 以三氯甲烷萃取 3 次, 分段萃取(依次为滤液体积的 1 倍、1/2 倍、1/2 倍), 合并三氯甲烷层, 水浴蒸干, 残渣加无水乙醇溶解, 定容至 10 mL, 摇匀, 作为供试液备用。

2.1.3 重复性试验 取同一批苦参干膏粉(批号: 1606001) 5 份, 照 2.1.2 项下, 自“取苦参干膏 0.2 g, 精密称定, 置于烧杯中”起依法操作, 制备供试品溶液, 按 2.1.5 项下方法测定, 结果见表 1。

表 1 重复性试验结果

取样量/g	总生物碱含量/mg	平均含量/mg	RSD/%
0.202 5	3.017 3	3.01	0.195
0.201 8	3.006 8		
0.202 0	3.009 8		
0.201 5	3.002 4		
0.202 3	3.014 3		

2.1.4 加样回收试验 各取 6 份已知含量的同一批次(批号: 1606001) 苦参干膏粉, 每份供试样品约 0.15 g, 精密称定。分别向各供试样品中准确加入近等质量的苦参碱对照品, 照 2.1.5 项下条件逐一进行测定。加样回收率计算结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果(n=6)

样品质量/g	总生物碱含量/mg	实测值/mg	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.151 2	2.222 6	3.960 8	2.000	98.04	99.59	0.855 8
0.150 8	2.216 8	3.990 6	2.000	99.53		
0.151 5	2.227 1	4.001 1	2.000	100.06		
0.150 5	2.212 4	4.010 7	2.000	100.54		
0.151 8	2.231 5	3.989 5	2.000	99.48		
0.151 0	2.219 7	3.997 8	2.000	99.89		

2.1.5 总生物碱含量测定 取上述供试品 5 mL, 精密加硫酸滴定液 20 mL, 摇匀置水浴上加热, 使残渣完全溶解并除尽乙醇, 放冷加蒸馏水 30 mL, 甲基红指示液 4 滴, 用氢氧化钠滴定液滴定至溶液显微黄色, 30 s 不褪色即达到滴定终点, 按下式计算苦参碱总生物碱含量。

$$\text{总生物碱含量(mg)} = \frac{(20 - \frac{C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}}{2C_{\text{H}_2\text{SO}_4}}) \times T}{V_{\text{取样}} \times 1000} \times V_{\text{总}} \quad (1)$$

$$\text{总生物碱提取率(\%)} = \frac{\text{总生物碱含量}}{\text{干膏质量}} \times 100 \quad (2)$$

其中: $V_{\text{总}}$ 为样品溶液的总体积, mL; $V_{\text{取样}}$ 为滴定时供试品的取样体积, mL; V_{NaOH} 为氢氧化钠滴定液的消耗体积, mL; T 为氢氧化钠滴定液相对总生物碱的滴定度, 5.529 mg·mL⁻¹。

2.2 干膏得率

取干燥至恒重的蒸发皿, 精密加入流浸膏 100 mL, 水浴蒸干, 于 105 °C 烘 3 h, 干燥器中放冷, 精密称质量, 计算即得。

2.3 苦参中总生物碱的优选提取工艺设计

2.3.1 试验设计 通过对多个影响综合评分因素全面考察之后,本研究最终选取液料比(A)、提取时间(B)、提取次数和醇沉浓度(C)等4个关键影响因素作为本次实验研究的自变量,鉴于提取次数为非连续型变量,试验设计过程中可不考虑该因素的回归分析^[8],结合实际生产及有关文献^[7],暂定提取次数为2次。依据 Box-Behnken 中心组合的设计基本原理,取液料比 A(倍)、提取时间 B(h)、醇沉浓度 C(%)3个因素,每个因素下各设定低、中、高3个水平,依次赋值为-1、0、+1。实验组中心组合设计因素和各自水平见表3,采用加权评分法计算苦参浸膏得率和总生物碱的得率两者总权重评分,以总评分值为评价指标,按 Box-Behnken 中心设计方案进行试验,结果见表4。

表3 Box-Behnken 设计中心组合因素水平

水平	因素		
	A 液料比/倍	B 提取时间/h	C 醇沉浓度/%
-1	6	1	60
0	8	2	75
+1	10	3	90

表4 Box-Behnken 试验方案结果

试验组	A	B	C	干膏得率/%	总生物碱得率/%	总权重评分/分
1	-1	-1	0	17.87	1.29	89.40
2	+1	-1	0	19.97	1.49	101.90
3	-1	+1	0	17.78	1.35	91.70
4	+1	+1	0	22.35	1.63	112.50
5	-1	0	-1	17.52	1.35	91.20
6	+1	0	-1	22.21	1.47	105.40
7	-1	0	+1	17.75	1.19	84.90
8	+1	0	+1	19.76	1.23	90.50
9	0	-1	-1	20.02	1.33	95.30
10	0	+1	-1	21.38	1.42	101.70
11	0	-1	+1	19.45	1.28	92.00
12	0	+1	+1	21.94	1.26	96.10
13	0	0	0	22.15	1.55	108.70
14	0	0	0	22.02	1.59	110.10
15	0	0	0	21.95	1.54	107.90
16	0	0	0	22.13	1.57	109.50
17	0	0	0	22.05	1.61	111.00

注:总权重评分值=苦参干膏得率评分值+苦参总生物碱得率评分值;苦参干膏率评分值=(苦参干膏率测得值/苦参干膏率测得平均值)×40;苦参总生物碱提取率评分值=(苦参总生物碱提取率/苦参总生物碱提取率平均值)×60。

2.3.2 模型拟合与方差分析 运用 Design-Expert 设计软件对表4中的试验数据进行回归分析,计算3个自变量提取液料比(A)、提取时间(B)和乙醇浓度(C)同应变量总权重评分值(Y)之间的线性拟合回归方程: $Y = 109.44 + 6.64A + 2.93B - 3.76C + 2.07B - 2.15AC - 0.58BC - 6.92A^2 - 3.65B^2 - 9.52C^2$ 。从软件系统方差分析给出的结果可知:本实验拟合度极为显著($P = 0.0003 < 0.01$),表明本次建立的试验模型在选定的因素范围内具有较好的统计学意义;设计模型的平方和为 $F = 1273.31$,表明该模型具有显著性。回归方程中自变量以 A、C、 A^2 、 C^2 等对总权重评分(Y)的线性效应最为突出($P < 0.01$),一次项即单因素中,以液料比(A)对因变量的总权重评分影响最为突出,醇沉浓度(C)次之;其中液料比(A)对总权重评分的影响为正相关,醇沉浓度(C)对总权重评分的影响为负相关;而提取时间(B)对总权重评分的影响差异不具有统计学意义;回归方程二次项中以 A^2 、 C^2 对总权重评分的线性效应最为突出($P < 0.01$),其中以乙醇浓度(C)的影响最为突出,液料比(A)影响次之;响应面模型方差分析结果见表5。

表5 响应面模型方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1273.31	9	141.48	20.54	0.0003
A	352.45	1	352.45	51.18	0.0002
B	68.44	1	68.44	9.94	0.0161
C	113.25	1	113.25	16.45	0.0048
AB	17.22	1	17.22	2.50	0.1578
AC	18.49	1	18.49	2.69	0.1453
BC	1.32	1	1.32	0.19	0.6744
A^2	201.63	1	201.63	29.28	0.0010
B^2	55.94	1	55.94	8.12	0.0247
C^2	381.60	1	381.60	55.41	0.0001
残差	48.20	7	6.89		
失拟项	42.41	3	14.14	9.76	0.0260
误差	5.79	4	1.45		
总离差	1321.52	16			

本试验模型拟合极显著($P = 0.0003 < 0.01$)、 $R^2 = 0.9635$ 、失拟项 $P = 42.41$ 值 > 0.05 表明,回归方程拟合度高,试验测定值与模型的预测值二者较为接近,模型不存在显著失拟,故能够应用该模型对该提取工艺进行响应面分析。将数据代入

Design-Expert 软件运算, 系统生成液料比、提取时间和乙醇浓度因素对于响应值的三维曲面, 见图 1~3, 响应值的等高线分别见图 4~6。

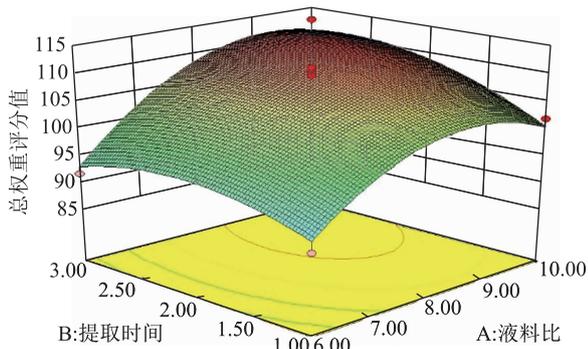


图 1 提取时间、液料比对响应值三维图

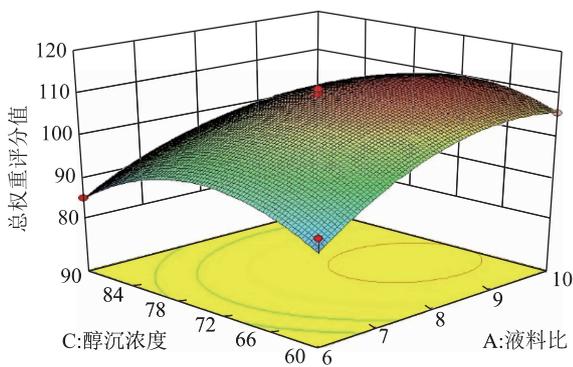


图 2 醇沉浓度、液料比对响应值三维图

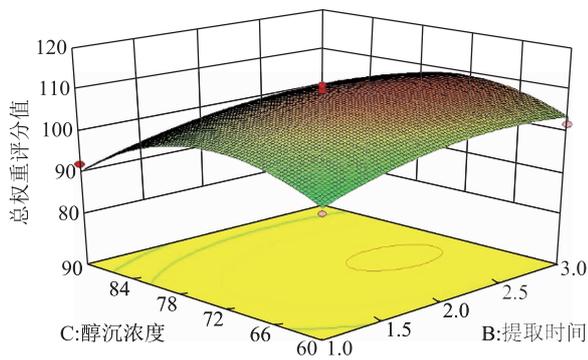


图 3 醇沉浓度、提取时间对响应值三维图

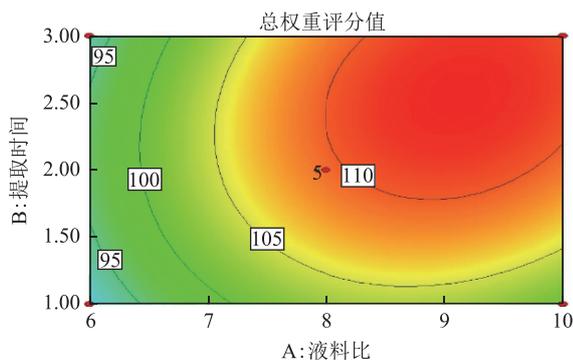


图 4 提取时间、液料比对响应值等高线图

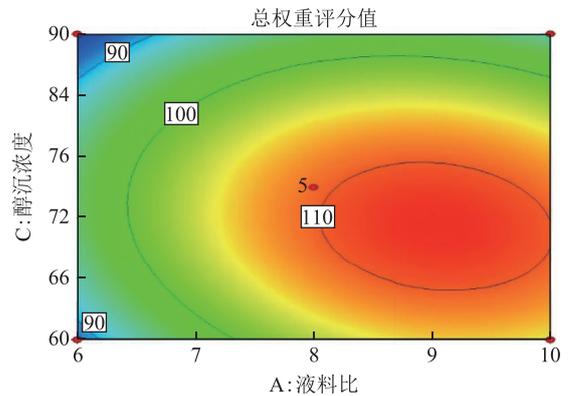


图 5 乙醇浓度、液料比对响应值等高线图

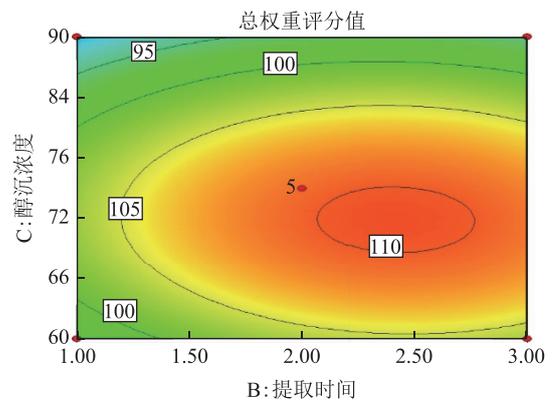


图 6 醇沉浓度、提取时间对响应值等高线图

直观对比以上 3 组曲面响应图可知, 自变量 A (液料比) 与自变量 B (提取时间) 的响应曲面三维图像呈一个陡峭的曲面, 故液料比与提取时间的交互作用对应变变量 Y (总权重评分的影响较大); 提取液料比(A) 醇沉浓度(C) 两个交互作用对总权重评分的影响较小, 图 1~3 的均是向下开口的凸面, 结合回归方程可知, 本次实验所考察的范围内存在响应值的最大值; 等高线图为圆形至椭圆形, 响应面为高度卷曲而规则的曲面, 表明自变量与因变量之间的函数关系不能完全采用一元线性方程描述, 而采用多元线性方程则能够更全面地表述液料比(A)、提取时间(B)、醇沉浓度(C)与总权重评分值(Y)之间的线性关系。

经过 Design-Expert 软件统计数据分析, 系统预测和推荐的最佳参考工艺为: 液料比 9.23 倍、提取时间 2.60 h, 醇沉浓度 70.72%, 该工艺条件下理论最优评分可达 112.89 分, 总生物碱提取率可达 1.63%、干膏率达 22.51%。为贴近工业实际操作, 将该工艺参数调整为: 液料比 9 倍量、提取时间为 3 h、乙醇浓度为 70% 进行验证实验。

2.3.3 验证实验 准确称取苦参饮片 3 份, 每份

100.0 g, 按优选的工艺条件进行总生物碱提取, 结果见表6。

表6 验证实验结果

实验号	总生物碱提取率	平均提取率	RSD
1	1.59	1.62	2.23
2	1.66		
3	1.61		

由表5中数据可知, 结果与回归方程的预测值基本接近, 从而更加证实了该数学模型预测的准确性, 故采用中心组合星点设计-响应面法优化苦参中总生物碱提取工艺是具有实践和理论可行性的。

3 讨论

本次研究采用了星点-设计响应面中心组合法优化苦参中总生物碱提取工艺, 对液料比、提取时间和醇沉浓度等自变量及自变量之间的交互作用进行考察。将响应面三维图结合系统给出多元线性回归方程发现, 一次项中对苦参中总生物碱提取有极显著性影响的主要是液料比和醇沉浓度, 其中以液料比(A)对总权重评分的影响最大, 醇沉浓度(C)次之; 液料比(A)对总权重评分的影响为正相关, 而醇沉浓度(C)对总权重评分的影响为负相关, 从而提示醇沉浓度并不是越大越好, 乙醇浓度在达到78%以后, 总评分显著下降; 而提取时间(B)为不显著的影响因素($P > 0.01$), 在一定范围内可以适当调整以满足生产需求即可。二次项中, 以 A^2 、 C^2 对总权重评分的线性效应最为显著($P < 0.01$), 其中以醇沉浓度(C)的影响最大、液料比(A)影响次之, 从而提示醇沉浓度对浸膏的收率及浸膏中生物碱的含量有较大影响, 是生产中应该监控的重要因素; 响应面三维曲面图提示, 交互项中液料比(A)和提取时间(B)的交互作用对苦参总生物碱提取率有较大影响。

综合本次实验优化结果可知, 提取液料比控制在8倍以上、提取时间2 h以上、乙醇浓度范围在66%~78%时, 总权重评分值均大于110分, 说明66%~78%乙醇对苦参总生物碱具有良好的选择性, 实际操作时可根据生产需求进行合理选择; 考虑到工业上提取液料比大于10倍后, 提取液的浓缩体积较大对提取、浓缩所需设备及耗能提出更高的要求; 虽然单因素中醇沉浓度对总生物碱提取率影响虽占其次, 但醇沉不需要额外耗能(乙醇可回收利用), 并且能够沉淀大部分杂质成分, 故在保障干膏率的基础上可采取适当延长醇沉时间以提高苦参总生物碱提取率。提取时间为不显著因素, 同时考虑到工业上提取2次基本上满足生产效益的需要, 结合本次所优化的工艺参数, 得苦参总生物碱提取的最优工艺条件为: 液料比9倍量, 提取2次、3 h/次, 醇沉浓度为70%。

参考文献

- [1] 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, 2015: 202.
- [2] 战渤玉, 李东霞, 高明. 苦参的现代研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 23-25.
- [3] 殷祚伟, 聂蕾, 傅宣英, 等. 苦参碱治疗包虫病后小鼠免疫功能及部分氧化还原酶、转氨酶的变化及意义[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(8): 660-665.
- [4] 苏利波, 张西臣. 苦参抗寄生虫的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(6): 471.
- [5] 仝燕, 王锦玉, 张锴镔, 等. 苦参总生物碱提取纯化工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(1): 19-22.
- [6] 涂瑶生, 李绍林, 孙冬梅, 等. 星点设计-效应面法优选苦参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 34-37.
- [7] 刘涛, 王罗, 吴南轩, 等. 苦参提取物质量标准研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2014, 33(3): 197-199.
- [8] 罗婷, 周坤, 叶宏俊, 等. 响应面法优化苍耳子中绿原酸的提取工艺[J]. 中国现代中药, 2017, 19(11): 1620-1624.

(收稿日期: 2018-11-07 编辑: 王笑辉)