

# 响应曲面法优化伸筋草总生物碱的微波辅助提取工艺

黄鹤, 刘有平, 王鑫, 邸欣\*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** **目的:**优化微波辅助提取伸筋草总生物碱的工艺条件。**方法:**采用酸性染料比色法测定总生物碱含量,以石松灵碱为指标成分。在单因素试验基础上,以总生物碱提取率为评价指标,选取液料比、提取温度和提取时间 3 个因素进行 Box-Behnken 中心组合设计,采用响应曲面法优化伸筋草总生物碱的微波辅助提取工艺。**结果:**伸筋草总生物碱的最佳提取工艺为加 17 倍量甲醇-水-盐酸(85:15:1)于 72 °C 提取 8 min;总生物碱提取率 4.092 mg·g<sup>-1</sup>,与预测值 4.070 mg·g<sup>-1</sup>的偏差较小。**结论:**与传统提取工艺相比,优选的微波辅助提取工艺具有时间短、提取率高、能量消耗低等优点。

**[关键词]** 伸筋草;微波辅助法;总生物碱;响应曲面法;石松灵碱

**[中图分类号]** R283.6;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0034-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180034

## Optimization of Microwave-assisted Extraction Technology for Total Alkaloids from Lycopodii Herba by Response Surface Methodology

HUANG He, LIU You-ping, WANG Xin, DI Xin\*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize microwave-assisted extraction process conditions of total alkaloids from Lycopodii Herba. **Method:** Acid dye colorimetry was employed to determine the content of total alkaloids with lycodoline as index component. Based on single factor tests, effects of liquid-solid ratio, extraction temperature and time on yield of total alkaloids were investigated with a three-factor and three-level Box-Behnken central composite design, microwave-assisted extraction conditions of total alkaloids from Lycopodii Herba was optimized by response surface methodology and compared with traditional extraction technique. **Result:** Optimum conditions were as follows: extracted 8 min with 17 times the amount of methanol-water-hydrochloric acid (85:15:1) at 72 °C; yield of total alkaloids was 4.092 mg·g<sup>-1</sup> under these conditions, which was consistent with the theoretic value of 4.070 mg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** Microwave-assisted extraction process has many advantages over conventional methods, such as time saving, high extraction ratio and low solvent consumption.

**[Key words]** Lycopodii Herba; microwave-assisted extraction; total alkaloids; response surface methodology; lycodoline

伸筋草性温,味苦、辛,具有祛风除湿、舒筋活络的功效<sup>[1]</sup>,临床主要用于治疗风寒湿痹、关节肿痛、筋脉拘急、跌打损伤、关节屈伸不利等证,主要化学成分包括石松生物碱<sup>[2-4]</sup>和石杉型三萜类<sup>[5]</sup>。石松生物碱具有复杂多变的化学结构和多种重要的生物活性,其中最具有代表性的石杉碱甲<sup>[6]</sup>具有抑制乙酰

胆碱酯酶活性、增强学习记忆作用和改善空间记忆障碍的功能,已成功应用于老年痴呆症的临床治疗<sup>[7]</sup>。微波辅助提取法是利用微波快速加热的特性结合传统溶剂提取法形成的一种提取技术<sup>[8]</sup>,与传统提取方法相比,具有提取效率高、溶剂用量少、重复性好等优点。本实验采用响应面法优化伸筋草

**[收稿日期]** 20140113(007)

**[第一作者]** 黄鹤,在读硕士,从事药物分析学研究,Tel:024-23986269,E-mail:hh19870425@126.com

**[通讯作者]** \*邸欣,博士,教授,从事药物分析学研究,Tel:024-23986342,E-mail:dixin63@hotmail.com

总生物碱的微波辅助提取工艺,为该类成分的开发利用和工业化生产提供参考。

## 1 材料

Ethos A 型微波萃取仪(意大利 Milestone 公司),UV2310 II 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),BT25S 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),JA2003 型电子天平(上海精科天平),pHS-2C 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

伸筋草购于北京同仁堂沈阳中街店,经沈阳药科大学路金才教授鉴定为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草;石松灵碱对照品(上海信裕生物科技有限公司,批号 xy-0419),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 精密称取经干燥后粉碎过 20 目筛的伸筋草粉末约 1.0 g,置于微波萃取罐中,加入适量提取溶剂,按设定工艺条件进行提取,提取液于  $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,取上清液,即得,备用。

### 2.2 总生物碱的含量测定

**2.2.1 提取率的测定** 采用酸性染料比色法测定。将适量的对照品或供试品溶液置于分液漏斗中,加入  $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$  缓冲液(pH 7) 10 mL,三氯甲烷 10 mL 和 0.05% 溴麝香草酚蓝甲醇溶液 1.0 mL,振摇 5 min,静置分层,以相应试剂为空白,于 420 nm 处测定吸光度(A),按  $C \times V/W$  计算总生物碱提取率,式中 C 为伸筋草总生物碱的质量浓度,V 为溶剂换算体积,W 为伸筋草样品质量。

**2.2.2 线性关系考察** 精密称取石松灵碱对照品 16.24 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得  $1.624\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  储备液。精密量取该储备液 2.5 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得  $0.406\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  对照品溶液。分别精密量取该对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL 置于分液漏斗中,按 2.2.1 项下方法显色,于 420 nm 处测定 A,以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程  $A = 2.85 \times 10^{-2}C + 8.10 \times 10^{-3}$  ( $r = 0.999\ 2$ ),表明石松灵碱在  $4.06 \sim 20.3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  与 A 呈良好线性关系。

**2.2.3 精密度试验** 精密吸取石松灵碱对照品溶液 0.3 mL,按 2.2.1 项下方法重复测定 6 次,计算 A 的 RSD 0.38%,表明仪器精密度良好。

**2.2.4 重复性试验** 按 2.1 项下方法平行制备 6

份供试品溶液,各精密移取 0.5 mL 按 2.2.1 项下方法测定 A,计算总生物碱提取率的 RSD 1.2%,表明该方法重复性良好。

**2.2.5 稳定性试验** 取供试品溶液 0.5 mL,按 2.2.1 项下方法分别于显色后 0,10,20,30,40,50,60 min 测定 A,计算 RE 在  $\pm 1.8\%$  内,RSD 1.0%,表明供试品溶液在显色后 1 h 内稳定。

**2.2.6 加样回收试验** 精密称取已知含量的伸筋草样品约 0.5 g,共 6 份,各精密加入适量对照品溶液,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,移取 0.5 mL 按 2.2.1 项下方法测定 A,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 伸筋草总生物碱含量测定的加样回收试验

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.498 2	2.028	4.018	102.1		
0.503 2	2.048	3.964	98.3		
0.492 1	2.003	3.884	96.5	99.5	3.0
0.494 4	2.012	4.036	103.8		
0.508 3	2.069	4.002	99.2		
0.505 0	2.055	3.943	96.9		

注:加入量均为 1.949 mg。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 提取溶剂** 固定液料比 20:1,提取时间 10 min,提取温度 70 ℃,分别选择甲醇、无水乙醇或丙酮为提取溶剂,以伸筋草总生物碱提取率为评价指标,结果表明甲醇明显优于其他 2 种溶剂。考察不同甲醇体积分数(65%,75%,85%,95%,100%)对总生物碱提取率的影响,结果表明 85% 甲醇的提取率最高。考虑到目标提取物为弱碱性,在提取溶剂中加入少量酸可增加生物碱在提取溶剂中溶解度,故考察在 85% 甲醇中分别加入 0.5%,1%,1.5%,2% 的盐酸对总生物碱提取率的影响,结果表明盐酸加入量由 0.5% 增至 1% 时,总生物碱提取率显著提高,进一步增大盐酸加入量则不能显著提高提取率,故最终选择甲醇-水-盐酸(85:15:1)为提取溶剂。

**2.3.2 提取温度** 固定液料比 20:1,提取时间 10 min 和提取溶剂,考察不同温度(50,60,70,80,90 ℃)对伸筋草总生物碱提取率的影响。结果表明随温度升高,提取率先逐渐增大,至 70 ℃ 时达最大值,继续升高温度,总生物碱提取率却有所下降,这可能是由于在高温下伸筋草中某些生物碱不稳定造成的。

**2.3.3 提取时间** 固定液料比 20:1, 提取温度 70 ℃ 及提取溶剂, 考察不同提取时间 (2.5, 5, 7.5, 10, 15 min) 对伸筋草总生物碱提取率的影响。结果表明提取率先随提取时间的延长而增大, 至 7.5 min 时达最大值, 继续延长提取时间, 提取率反而有所下降, 这可能是由于提取时间过长导致热效应增大, 致使部分生物碱降解或异构化。

**2.3.4 液料比** 固定提取温度 70 ℃, 提取时间 7.5 min 及提取溶剂, 考察不同液料比 (10:1, 15:1, 20:1, 25:1) 对总生物碱提取率的影响。结果表明液料比由 10:1 增大至 15:1 时, 总生物碱提取率显著提高, 再增大液料比则不能明显提高提取率。

**2.3.5 提取次数** 固定料液比和提取温度、时间、溶剂, 考察不同提取次数 (1, 2, 3 次) 对总生物碱提取率的影响, 结果表明重复 2, 3 次提取并未显著提高提取率, 故确定提取数为 1 次。

**2.4 响应面试验** 在单因素试验基础上, 选择提取温度、提取时间和液料比为考察因素, 采用三因素三水平的响应曲面法对微波辅助提取工艺参数进行优化。精密称取伸筋草粉末 17 份, 每份约 1.0 g, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 共设计 17 个试验点, 包括 12 个分析点, 5 个零点以估计误差, 试验设计方案及结果见表 2。

表 2 伸筋草总生物碱微波辅助提取工艺  
Box-Behnken 中心组合试验安排

No.	A 提取时间 /min	B 提取温度 /℃	C 液料比 /mL·g <sup>-1</sup>	总生物碱 提取率/mg·g <sup>-1</sup>
1	7.5	70	15	4.088
2	10	70	20	3.879
3	5	80	15	3.416
4	7.5	70	15	4.034
5	5	70	20	3.561
6	7.5	60	10	3.271
7	5	70	10	3.083
8	7.5	70	15	4.122
9	7.5	70	15	4.033
10	5	60	15	3.113
11	10	60	15	3.471
12	7.5	60	20	3.699
13	10	70	10	3.479
14	7.5	80	20	3.774
15	7.5	80	10	3.739
16	7.5	70	15	4.065
17	10	80	15	3.752

利用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 中试验数据进行二次多项式回归拟合, 得生物碱提取率 (Y) 与各自变量的二次多元回归方程  $Y = 4.07 + 0.18A + 0.14B + 0.17C - 5.425 \times 10^{-3} AB - 0.020AC - 0.099BC - 0.38A^2 - 0.26B^2 - 0.19C^2$ , 对该模型进行方差分析, 结果见表 3。

表 3 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.80	9	0.20	51.28	<0.000 1
A	0.25	1	0.25	63.45	<0.000 1
B	0.16	1	0.16	40.58	0.000 4
C	0.23	1	0.23	57.59	0.000 1
AB	$1.177 \times 10^{-4}$	1	$1.177 \times 10^{-4}$	0.030	0.867 2
AC	$1.537 \times 10^{-3}$	1	$1.537 \times 10^{-3}$	0.39	0.550 6
BC	0.039	1	0.039	9.96	0.016 0
A <sup>2</sup>	0.59	1	0.59	151.91	<0.000 1
B <sup>2</sup>	0.27	1	0.27	70.16	<0.000 1
C <sup>2</sup>	0.16	1	0.16	39.79	0.000 4
残差	0.027	7	$3.910 \times 10^{-3}$		
失拟项	0.022	3	$7.239 \times 10^{-3}$	5.13	0.141 0
纯误差	$5.650 \times 10^{-3}$	4	$1.412 \times 10^{-3}$		
总和	1.83	16			

由表 3 可知,  $P < 0.000 1$ , 说明该模型极显著; 失拟项  $P > 0.05$ , 说明模型失拟度不显著。回归系数 0.985 1, 表明该模型相关度好; 模型的校正决定系数 0.965 9, 表明该模型能解释 96.59% 响应值的变化, 故可采用此模型进行分析和预测。根据回归模型作各因素交互作用的响应曲面图, 见图 1。结果发现总生物碱的提取率随 3 个因素水平的增大均呈现先增大后减小的趋势, 存在极值的地方在等高线图的圆心处; 因素 A, C 对提取率的影响程度大于因素 B。等高线的形状可反映各因素交互作用的强弱, 椭圆形表示交互作用显著, 而圆形则相反, 说明因素 B 和 C 的交互作用最强。

通过 Design-Expert 8.0 软件对模型极值进行求解和分析, 得最佳提取条件为提取时间 8.06 min, 提取温度 72.01 ℃, 液料比 16.87:1, 此条件下总生物碱提取率的预测值 4.070 mg·g<sup>-1</sup>。结合实际操作考虑, 将最佳提取条件调整为以甲醇-水-盐酸 (85:15:1) 为提取溶剂, 提取时间 8 min, 提取温度 72 ℃, 液料比 17:1。精密称取伸筋草粉末 3 份, 每

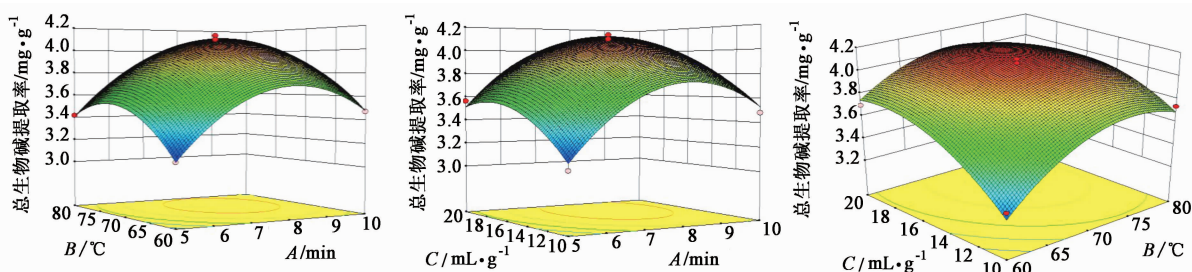


图1 提取温度、提取时间和液料比的交互作用对伸筋草总生物碱提取工艺的影响

份约 1.0 g,按该工艺条件进行验证试验,以检验模型预测的准确度,结果伸筋草总生物碱的平均提取率  $4.092 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD 1.2%),与预测值的偏差较小,说明优选的提取条件准确可靠。

**2.5 提取方法比较** 精密称取伸筋草粉末 6 份,每份约 1.0 g,等分为 2 组,分别采用加热回流法(液料比 30:1,提取时间 80 min)、超声法(提取时间 40 min)提取,其他工艺参数与微波提取法保持一致,结果表明传统提取方法的总生物碱平均提取率分别为 2.237 (RSD 1.9%),2.885 (RSD 1.5%)  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,说明微波辅助法具有省时、低耗、提取率高等优点。

### 3 讨论

伸筋草中含有一些弱碱性生物碱,如果只用中性醇溶液提取可能会提取不完全,本文选用酸性甲醇进行提取,使这部分生物碱以盐的形式溶解于提取溶剂里,提高了总生物碱的收率。考虑到甲醇的眼毒性,曾尝试用不同体积分数(60%~90%)且含 1% 盐酸的乙醇溶液作为提取溶剂,但总生物碱提取率较酸性甲醇相差很多。与传统的回流法、超声法及文献报道的浸提法相比,微波辅助法提取伸筋草总生物碱可明显提高提取率,大大缩短提取时间,减少溶剂用量,具有良好的经济效益前景。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:165.
- [2] Li X L, Zhao Y, Cheng X, et al. Japonicumins A-D: Four new compounds from *Lycopodium japonicum* [J]. *Helv Chim Acta*, 2006, 89(7):1467.
- [3] Yan J, Zhang X M, Li Z R, et al. Three new triterpenoids from *Lycopodium japonicum* Thunb [J]. *Helv Chim Acta*, 2005, 88(2):240.
- [4] 刘慧杰,汪治. 石松生物碱化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(4):475.
- [5] 史利利,何永志. 伸筋草石松三萜化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(9):90.
- [6] 张建胜,杨阳,董秀华,等. HPLC 法测定 4 种云南产石松中石杉碱甲的含量[C]. 昆明:2008 年云南生物多样性与社会和谐发展论坛暨首届青年科技论坛,2008.
- [7] 严伟民. 石杉碱甲国内临床应用研究进展[J]. *上海医药*, 2009, 30(10):457.
- [8] 吴龙琴,李克. 微波萃取原理及其在中草药有效成分提取中的应用[J]. *中国药业*, 2012, 21(12):110.

[责任编辑 刘德文]