



响应面设计法优化不同基源贝母中总生物碱的提取工艺

徐彦, 刘圆, 吕露阳, 曾锐, 张志锋*
(西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 为获得贝母总生物碱的最佳提取工艺参数, 以川贝母作为工艺参数研究对象, 运用响应面试验设计探讨以氯仿和甲醇体积比、液料比、提取时间作为提取工艺考察因素, 以总生物碱为考察指标, 用比色法测定不同基源贝母中总生物碱的含量, 优化出贝母的最佳提取工艺, 并比较不同基源贝母在该最佳工艺条件下总碱的含量差异。结果贝母总生物碱的最佳提取工艺参数为: 氯仿:甲醇4.2:1(V/V)、液料比30:1、提取4h, 此条件下, 四川松潘川贝母的总生物碱含量2.84mg/g。不同基源贝母中, 湖北贝母总生物碱的含量最高, 达5.379mg/g。本方法结果可靠、操作简便, 优化后的最佳提取条件适合贝母总碱的批量提取。

关键词: 贝母; 总生物碱; 响应面设计; 提取工艺

Extraction and Determination of Total Alkaloids from *Bulbus Fritillariae*

XU Yan, LIU Yuan, LÜ Lu-yang, ZENG Rui, ZHANG Zhi-feng*
(Ethnic Pharmaceutical Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: This study was carried out to establish optimum conditions for the extraction of total alkaloids from *Bulbus Fritillariae* and to compare the extraction efficiency of total alkaloids from *Bulbus Fritillariae* from different species and growing areas under optimum extraction conditions. Response surface methodology was used to optimize the extraction of total alkaloids from *Bulbus Fritillariae cirrhosae*. The optimal extraction conditions were found to be 4.2:1 (V/V), 30:1 and 4 h for CHCl₃/CH₃OH ratio, solid-to-solvent ratio and extraction time, respectively. The extraction efficiency of total alkaloids from *Bulbus Fritillariae cirrhosae* under these conditions was 2.84 mg/g compared to 5.379 mg/g from *Bulbus Fritillariae hupehensis*, highest among the five *Fritillaria* species investigated. The optimized extraction method was simple, reliable and allowed large-scale extraction of total alkaloids from *Bulbus Fritillariae*.

Key words: *Bulbus Fritillariae*; total alkaloids; response surface methodology; extraction

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)04-0032-05

贝母为百合科贝母属多种植物的干燥鳞茎, 具有止咳化痰、清热散结之功效。在民间常常用于制作具有保健作用的药膳食用, 如川贝冰糖汤、川贝酿梨、贝母炖猪肺等。贝母在我国分布较广, 《中国药典》(2010版)收录了川贝母、浙贝母、湖北贝母、新疆贝母、平贝母等5个品种, 近年来也有一些新种被发现^[1]。贝母的主要成分为生物碱, 生物碱不仅具有明显的镇咳作用^[2-5], 而且有其他多方面的药理活性^[2-4]。生物碱的含量常作为贝母类药物的指标成分, 其测定方法有比色法、两相滴定法、非水滴定法、薄层色谱法、反相离子对高效液相色谱法等^[5]。

近年来对于贝母总碱提取工艺的报道^[6-9]中, 大多是

对单一品种多采用乙醇渗漉提取或乙醇回流提取, 然后用氯仿进行萃取, 然而通过这些方法提取的贝母总碱操作较为复杂、收率较低, 并且目前尚未有关于多种不同来源的贝母在同一提取条件下进行总生物碱的比较研究报道。因此本研究考虑到氯仿对生物碱的溶解度比乙醇更大, 而甲醇提取比乙醇提取的杂质更少, 选择氯仿-甲醇的混合溶剂提取, 通过单因素试验和响应面设计试验, 以提取溶剂比例、液料比、提取时间等作为提取工艺考察因素, 优化贝母总生物碱的提取工艺, 得出最佳提取条件。作者收集了不同产地、不同基源的贝母, 在优化的最佳提取条件下提取贝母总生物碱, 以贝母乙素为对照品, 用酸性染料比色法测定其总生物碱的含量。

收稿日期: 2011-10-30

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAI27B07); 中央高校基本科研业务费专项(09NZYZJ01)

作者简介: 徐彦(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价。E-mail: 597451179@qq.com

*通信作者: 张志锋(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为药用植物资源品质评价及活性物质筛选。E-mail: zhangzhf99@gmail.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料、仪器与试剂

川贝母、平贝母、新疆贝母、湖北贝母和浙贝母的鳞茎，经笔者鉴定。贝母总生物碱提取工艺优化试验中所用的贝母材料为川贝母。贝母素乙 中国食品药品检定研究院；氯仿、甲醇、溴麝香草酚蓝等均为分析纯。

METTLER AE240电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司；W201B恒温水浴锅 上海申顺生物科技有限公司；Unicam UV-500紫外-分光光度仪 美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 贝母总生物碱的制备

将贝母鳞茎粉末在50℃恒温烘干至恒质量，精密称取粉末0.5g置于50mL圆底烧瓶中，加入适量氨水浸泡，浸泡一段时间后加入氯仿-甲醇混合溶剂，水浴加热回流提取，按照单因素考察和响应面设计表设定的条件进行提取，过滤，挥干溶剂，用甲醇定容至25mL，静置待测。

1.2.2 吸收波长的选择

精密吸取样品溶液1mL，置分液漏斗中，加氯仿14mL，邻苯二甲酸氢钾缓冲液缓冲液(pH5.0)5mL，溴麝香草酚蓝溶液2mL，充分振摇，静置0.5h使充分分层，取下层氯仿液，用干燥滤纸滤过，取滤液，在200~600nm波长范围内进行紫外吸收扫描。同时取贝母素乙对照液0.5mL，同上法测定，随行空白测定。结果显示，标准品溶液和样品溶液的最大吸收出现在(415±1)nm处，故选415nm处为贝母总生物碱的测定波长。

1.2.3 标准曲线的绘制

贝母素乙标准品溶液的配制：精密称取贝母素乙对照品5.0mg，用甲醇溶解定容至10mL，即得质量浓度0.5mg/mL标准品溶液。

精密吸取上述贝母素乙标准溶液母液2.5mL，用甲醇定容于25mL容量瓶，制成质量浓度为0.05mg/mL的标准液，再分别吸取1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0mL，按照1.2.2节所述的显色方法显色后，在415nm波长处进行紫外吸收度测定，以吸光度(Y)为纵坐标、贝母素乙质量浓度(X/(mg/mL))为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程： $Y=4.5262X-0.0777$ ， $R^2=0.9996$ 。结果表明，贝母素乙标准品质量浓度在0.05~0.25mg/mL范围内与吸光度呈良好线性关系。

1.2.4 贝母总生物碱的测定

精密吸取样品溶液1mL，按1.2.2节中的测定方法测定其吸光度，重复3次，取其平均值为最终吸光度。根据测得的吸光度，计算出其相应的质量浓度，得贝母总碱的计算公式如下：

$$\text{贝母总生物碱的含量}/(\text{mg/g})=\frac{CV}{m}$$

式中：C为贝母总生物碱的质量浓度/(mg/mL)；V为提取液定容体积/mL；m为贝母粉末质量/g。

1.2.5 单因素试验

将贝母粉末过60目筛，选择2倍体积量的氨水浸泡1h，20倍体积混合溶剂(氯仿:甲醇=4:1，V/V)，70℃水浴提取4h，提取1次，经显色后测定其吸光度，以吸光度为指标比较提取效果。固定其他条件，分别考察考察粉碎粒径、氨水浸泡量和浸泡时间、氯仿和甲醇的体积比和用量(液料比)、提取时间、提取次数作为贝母鳞茎总生物碱提取过程的影响^[9-11]。

1.2.6 响应面设计试验

从单因素试验结果分析可知，氯仿和甲醇的体积比、液料比和提取时间对提取效果的影响比较大，故在单因素试验的优化结果上，以贝母总生物碱的得率为指标，在选定贝母粉碎粒径为60目，2倍体积的氨水浸泡，浸泡时间2h、提取温度70℃、提取次数2次的前提下，根据Box-Behnken模型进行响应面试验，选取混合溶剂(氯仿:甲醇)的比例(A)、液料比(B)、提取时间(C)为自变量，试验因素及水平设计见表1。

表1 响应面分析因素及水平

Table 1 Factors and their coded levels used in response surface analysis			
水平	A 氯仿:甲醇(V/V)	B 液料比(mL/g)	C 提取时间/h
-1	3:1	25:1	3
0	4:1	30:1	4
1	5:1	35:1	5

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 贝母鳞茎粉碎粒径的影响

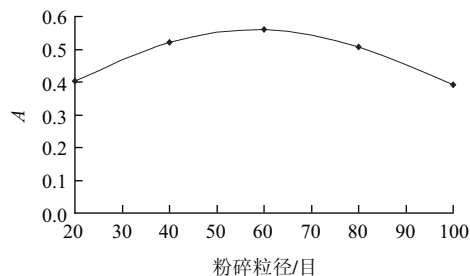


图1 粉碎粒径对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响

Fig.1 Effect of raw material particle size on the extraction efficiency of total alkaloids

从图1可知，粉碎粒径在20~60目范围内，提取效果随粉碎粒径的减小而提高，而在过80目筛后提取效果反而随着粒径的减小而降低，原因可能是粉碎粒径太小导

致原料表面张力增加,不利于有效成分的溶出。故选贝母粉末过60目筛为宜。

2.1.2 氨水浸泡量的影响

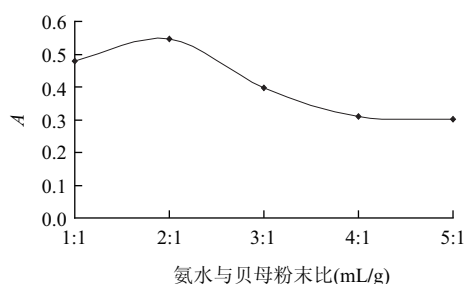


图2 氨水浸泡量对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响
Fig.2 Effect of ammonia water volume used to immerse *Bulbus Fritillariae* on the extraction efficiency of total alkaloids

由图2可知,当氨水浸泡量与贝母粉末质量比为2:1(mL/g)时,提取效果最好,之后随着氨水量的增加,提取效果反而下降,故选2倍体积的氨水浸泡贝母粉末为宜。

2.1.3 氨水浸泡时间的影响

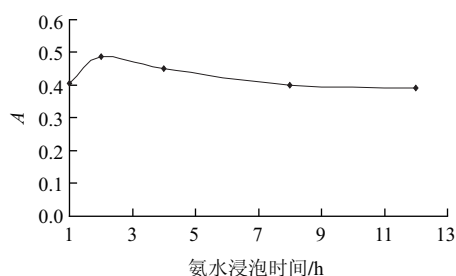


图3 氨水浸泡时间对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响
Fig.3 Effect of immersion time on the extraction efficiency of total alkaloids

由图3可知,在氨水浸泡1~2h期间溶液的吸光度增大,在2h后吸光度降低,因此选氨水浸泡2h为宜。

2.1.4 氯仿和甲醇体积比的影响

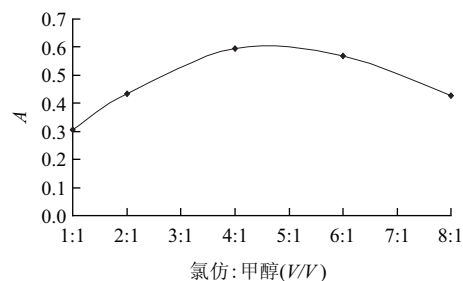


图4 氯仿和甲醇体积比对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响
Fig.4 Effect of $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ ratio on the extraction efficiency of total alkaloids

由图4可知,氯仿和甲醇体积比在1:1、2:1、4:1的范围内,随着氯仿比例的增加,溶液的吸光度也随之增

加,当氯仿的比例继续增大时,溶液的吸光度又随之减小,故混合溶剂比率选择氯仿:甲醇为4:1为宜。

2.1.5 液料比的影响

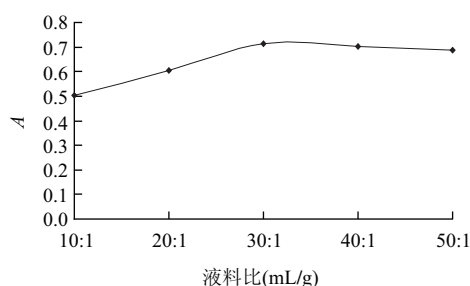


图5 液料比对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响
Fig.5 Effect of ratio of *Bulbus Fritillariae* to $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ on the extraction efficiency of total alkaloids

由图5可知,随着提取溶剂量增大,提取效率也随之增加,到液料比为30:1(mL/g)时,提取效率不再增加,而略有所降。其原因是溶剂量增多时,溶剂与材料的接触越充分,溶出率越大,当达到一定量时,贝母总生物碱的溶出已基本饱和,为节约成本及减小后续处理难度,故选择液料比为30:1为宜。

2.1.6 提取温度的影响

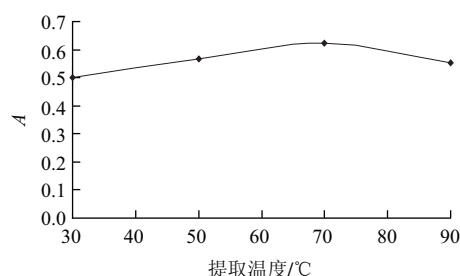


图6 提取温度对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响
Fig.6 Effect of temperature on the extraction efficiency of total alkaloids

由图6可知,在30~70℃范围,提取效率呈上升趋势。温度的升高有助于传质过程,使分子扩散运动激烈,加速贝母碱在溶液的扩散和提取溶剂的渗透,同时提取液黏度随温度升高而降低,加速贝母碱的溶出。然而,由于氯仿沸点61.7℃、甲醇沸点64.5℃,因此,当水浴温度超过65℃以后,将不会增加其提取效果,本实验结果也证实,当水浴温度大于70℃后,提取明显效率下降。故水浴温度控制在约65℃,溶液沸腾即可。

2.1.7 提取时间的影响

由图7可知,提取时间4h之前,提取效果呈上升趋势,当继续延长提取时间时,贝母碱的提取效果有下降趋势,可能是因为贝母碱在溶液中浸提时间过长,结构被破坏而导致贝母碱提取率减少,故选提取时间4h为宜。

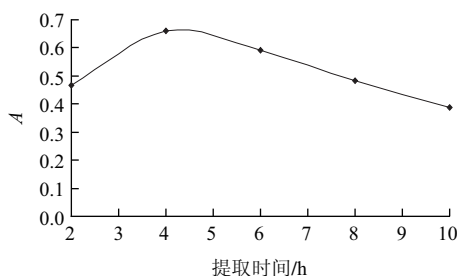


图7 提取时间对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响

Fig.7 Effect of extraction time on the extraction efficiency of total alkaloids

2.1.8 提取次数的影响

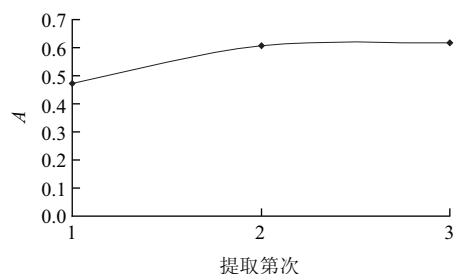


图8 提取次数对贝母鳞茎总生物碱提取效果的影响

Fig.8 Effect of number of extractions on the extraction efficiency of total alkaloids

从图8可以看出,提取2次贝母碱的提取率比提取1次的明显提高,增加提取次数到3次时,提取率略有增加。从降低成本和节约时间角度出发,故选提取2次为宜。

2.2 响应面设计试验结果与分析^[12-13]

2.2.1 模型的建立及显著性检验

表2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A氯仿:甲醇(V/V)	B液料比(mL/g)	C提取时间/h	总生物碱含量/(mg/g)	
				试验值	预测值
1	3:1	25:1	4	2.22	2.22
2	5:1	25:1	4	2.38	2.37
3	3:1	35:1	4	2.18	2.19
4	5:1	35:1	4	2.35	2.35
5	3:1	30:1	3	2.16	2.15
6	5:1	30:1	3	1.96	1.97
7	3:1	30:1	5	1.94	1.93
8	5:1	30:1	5	2.41	2.42
9	4:1	25:1	3	2.24	2.25
10	4:1	35:1	3	2.08	2.07
11	4:1	25:1	5	2.21	2.21
12	4:1	35:1	5	2.34	2.34
13	4:1	30:1	4	2.82	2.83
14	4:1	30:1	4	2.83	2.83
15	4:1	30:1	4	2.84	2.83
16	4:1	30:1	4	2.84	2.83
17	4:1	30:1	4	2.83	2.83

在单因素试验基础上,采用响应面设计试验对贝母碱的提取工艺进一步优化,Box-Behnken试验设计与结果如表2所示,试验1~12为析因试验,13~17为中心试验。

采用Design-Exper 7.0软件对响应值与各因素进行回归拟合,得到回归方程 $Y=2.83+0.075A-0.025B+0.057C+5.0\times10^{-3}AB+0.17AC+0.15BC-0.32A^2-0.90B^2-0.39C^2$ 。模型系数显著性结果和方差分析结果见表3。

表3 回归统计分析表

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

系数来源	平方和	自由度	均方	F比值	P值	显著性
模型	1.65	9	0.18	1375.81	<0.0001	**
A	0.045	1	0.045	199.09	<0.0001	**
B	1.25×10^{-3}	1	1.25×10^{-3}	9.41	0.0181	*
C	0.026	1	0.026	338.71	<0.0001	**
AB	2.5×10^{-5}	1	2.5×10^{-5}	0.19	0.6775	
AC	0.11	1	0.11	844.70	<0.0001	**
BC	0.021	1	0.021	158.25	<0.0001	**
A ²	0.44	1	0.44	3342.33	<0.0001	**
B ²	0.21	1	0.21	1600.85	<0.0001	**
C ²	0.64	1	0.64	4814.20	<0.0001	**
残差	9.300×10^{-4}	7	1.329×10^{-4}			
失拟项	6.500×10^{-4}	3	2.167×10^{-3}	3.10	0.1518	不显著
净误差	2.800×10^{-3}	4	7.000×10^{-4}			
总离差	1.65	16				
相关系数R ²	0.9964					
调整复相关系数R ² _{Adj}	0.9887					

注: **. 差异极显著, $P < 0.01$; *. 差异显著, $P < 0.05$ 。

该模型回归显著($P=0.0001$), $R^2=0.9964$, 说明该模型与实际试验拟合度较好,自变量和响应值之间关系显著。模型调整确定系数 $R^2_{Adj}=0.9887$,说明该模型能解释98.87%响应值的变化,拟合程度较好,模型失拟项 $P=0.1518$,不显著,表明该回归模型对试验结果拟合良好,试验误差小。

由表3表明,氯仿和甲醇的体积比一次项、提取时间一次项、混合溶剂比例和提取时间的交互项、液料比和提取时间的交互项、混合溶剂的比例二次项、液料比二次项、提取时间二次项达到极显著水平($P<0.01$)。液料比一次项达到显著水平($P<0.05$)。混合溶剂比例和液料比的交互项不显著。由表3的F值的大小可判断各因素对贝母总生物碱提取率的影响程度的大小次序为 $C>A>B$,即提取时间>氯仿和甲醇体积比>液料比。

2.2.2 最佳提取工艺条件的优化

由Design-Exper 7.0软件的岭脊分析得到贝母总生物碱最佳提取工艺条件,即氯仿:甲醇4.14:1、液料比29.95:1、提取时间4.1h,在此条件下提取贝母总生物碱,含量可达2.84mg/g。为检验响应面法所得的结果的可靠性,采用上述优化条件进行贝母总生物碱的提取,考虑到实际操作的便利,将最佳提取条件修正为氯仿:甲醇4.2:1、液料比30:1、提取时间4h,重复3次实验,结果



得出贝母总生物碱的含量的2.84mg/g, 与理论预测值相符。因此, 该方程能较真实地反映各因素对贝母总生物碱提取效果的影响情况。

2.3 贝母总生物碱的含量测定

依照最终优化的提取工艺, 对不同产地、不同种类的贝母进行总生物碱的提取, 测定吸光度, 根据1.2.3节标准曲线回归方程计算总生物碱的含量, 结果见表4。

表4 不同基源贝母总生物碱的含量
Table 4 Extraction efficiency of total alkaloids bulbs from different *Fritillaria* species

药材名	编号	来源	总生物碱含量/(mg/g)
湖北贝母	HBBM-01	湖北利川	5.34
	HBBM-02	湖北利川	4.99
	HBBM-03	湖北恩施	5.38
浙贝母	ZBM-01	浙江磐安	2.53
	ZBM-02	浙江磐安	2.56
	ZBM-03	江苏南通	2.66
平贝母	PBM-01	黑龙江五常	2.71
	PBM-02	吉林白山	2.54
	PBM-03	吉林白山	2.65
新疆贝母	XJBM-01	新疆塔城	2.69
	XJBM-02	新疆伊犁	2.34
	XJBM-03	新疆伊犁	2.39
川贝母	CBM-01	四川康定	3.07
	CBM-02	四川康定	3.44
	CBM-03	四川松潘	2.84

由表4可以看出, 这几种贝母中, 湖北贝母的总生物碱含量最高, 其次为川贝母、浙贝母、平贝母、新疆贝母总生物碱含量差异较小^[14-15]。

3 结论

3.1 本实验通过单因素试验以及响应面试验优化出了贝母总生物碱的最佳提取工艺为: 贝母鳞茎粉末过60目药典筛, 2倍体积的氨水浸泡2h, 混合溶剂氯仿-甲醇的体积比为4.2:1、液料比30:1、水浴回流提取4h、提取2次。在此条件下, 所用四川松潘川贝母的总生物碱含量2.84mg/g, 与响应面模型的预测值基本相符, 说明该优化条件可靠。

3.2 在优化条件下对收集的不同基源贝母进行总生物碱的提取和含量测定, 得出湖北贝母的总生物碱含量最高, 其次为川贝母、浙贝母、平贝母、新疆贝母。本研究选择的混合溶剂(氯仿-甲醇溶液)提取贝母总结, 减少文献研究中的因萃取步骤带来的含量损失。

3.3 响应面分析法由于试验次数少, 试验精度高, 并适合于多因素、多水平的试验, 并可研究因素间的交互作用, 根据综合指标得到最优的工艺结果, 比正交设计试验法更简化, 比均匀设计更全面, 且得到的关系式可以确定在试验范围内的任何试验点的预测值, 是用于优化和考察工艺条件的首选方法。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典: 第一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 34.
- [2] 董志远, 颜晓燕. 贝母化学成分及质量控制方法研究进展[J]. 西南军医, 2009, 11(2): 260-261.
- [3] 余世春, 肖培根. 中药贝母的药用历史及发展方向[J]. 中国中药杂志, 1990, 16(8): 454-456.
- [4] 李萍, 季晖, 徐国钧, 等. 贝母类中药的镇咳祛痰作用研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 20(6): 360-362.
- [5] 洪梅, 马戎, 李秀芬, 等. HPLC-ELSD测定平贝母中贝母素甲的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 1032-1033.
- [6] 蔡治纲, 赵宏, 毛晓敏, 等. 川贝母提取工艺研究[J]. 江西中医院学报, 2005, 17(1): 46-47.
- [7] 夏德豪, 程显隆, 肖新月, 等. 平贝母中总生物碱含量测定方法学研究[J]. 中国药事, 2007, 31(1): 756-758.
- [8] 赵德永. 4种川贝母的总皂苷、总生物碱及西贝素的含量测定[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(2): 71-72.
- [9] 张良, 袁瑜, 李玉锋. CO₂超临界萃取川贝母游离生物碱工艺研究[J]. 西华大学学报, 2008, 27(1): 39-41.
- [10] 魏金莹, 朱宏吉, 魏静娜, 等. 酶法提取贝母中总生物碱的工艺研究[J]. 中草药, 2007, 38(9): 1344-1346.
- [11] 周欢, 李敬芬, 戚肆朝, 等. 正交设计法选浙贝母总生物碱提取分离工艺[J]. 湖北师范学院学报, 2010, 32(2): 56-59.
- [12] 罗塔子, 孔永强, 张弘, 等. 响应面分析法优化超声波提取密蒙花黄酮素工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 352-356.
- [13] 冯颖, 陈巧红, 孟宪军, 等. 响应面法优化无梗五加果多糖超声波、微波法提取工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 265-272.
- [14] 马利琼, 王晓铭, 王化远. 17个不同产地川贝母总生物碱的含量测定[J]. 华西药杂志, 2001, 16(1): 60-61.
- [15] 范卓文, 金昌东, 陈彩霞. 3种贝母总生物碱含量的动态变化研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4): 211-213.