



均匀设计法优选湖北贝母生物碱提取工艺

万军梅 袁桥玉 蔡明凡

(武汉职业技术学院 生物工程学院 湖北 武汉 430074)

摘 要:目的 筛选湖北贝母生物碱提取最佳工艺条件。方法 采用均匀设计法,以乙醇浓度、液料比、提取时间、提取次数为考察因素,以浸膏得率和生物碱收率为考察指标,对湖北贝母生物碱乙醇提取工艺进行优化。结果 湖北贝母生物碱最佳提取工艺为 80%乙醇、液料比 10 倍、提取时间 1h、提取次数 3 次,生物碱收率为 0.5164%。

关键词: 湖北贝母 提取工艺 均匀设计法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2019) 05-0100-03

100

武汉职业技术学院学报。一九九八年第十八卷第五期(总第一百零三期)

湖北贝母为百合科植物湖北贝母(*Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia)的干燥鳞茎,具有清热化痰、止咳、散结的功效。原野生于湖北省恩施自治州,俗称“板贝”或“窑贝”,民间习作川贝药用,使用历史悠久。现已收载于《中国药典》2015 版中,发展为仅次于浙贝母的第二大贝母主流品种^[1-2]。目前中药的开发研制应用,均需要以有效成分为指标的提取工艺研究资料,以得到最佳提取工艺。提取工艺研究中的试验设计,常用的有正交试验设计与均匀试验设计。与正交设计法相比,均匀设计试验次数大为减少,因素、水平容量更大,利于扩大考察范围,因此,近年在中药研究中应用逐渐增多^[3]。目前有关湖北贝母提取工艺的研究报道采用的是正交设计法^[4],因素、水平考察范围有限,与实际生产的复杂性还有一定差距。本实验采用均匀设计法优选湖北贝母醇提工艺,为其深层开发与工业化生产提供参考依据。

一、试药、试剂与仪器

湖北贝母(*Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia)干燥鳞茎饮片,购于主产区湖北省恩施市,经湖北民族大学颜益志教授鉴定,符合《中国药典》

2015 年版(一部)湖北贝母项下规定的质量要求。

湖贝甲素对照品,由中国药品生物制品检定所提供,批号:110859-200503,供含量测定用;邻苯二甲酸氢钾缓冲液、氢氧化钠试液、溴甲酚绿溶液、稀盐酸等试液按照《中国药典》2015 年版附录方法配制;乙醇、乙酸乙酯、氯仿等化学试剂均为国产分析纯。

T6-新世纪紫外可见分光光度计,普析通用仪器有限公司;真空旋转蒸发仪,RE52CS-1 型,上海亚荣生化仪器厂;小型中草药粉碎机,LK-600A,温岭市创力药材器械厂;循环水真空泵,SHZ-IIID,上海亚荣生化仪器厂;电子天平(210g/0.1mg),AL-140,梅特勒。

二、方法与结果

(一)均匀试验设计

根据预试验的结果,选择乙醇浓度(X1)、液料比(X2)、提取时间(X3)、提取次数(X4)四个因素进行考察,各因素的考察水平与取值范围见表 1。根据文献资料^[4],以浸膏得率和生物碱收率为考察指标,运用 U12(43×21)均匀设计表安排试验^[5],见表 1。

收稿日期 2019-09-11

基金项目 武汉职业技术学院重点课题“均匀设计法优选湖北贝母提取工艺研究”(项目编号:2016YK041)。

作者简介:万军梅(1969-),女,湖北洪湖人,硕士,武汉职业技术学院教授,研究方向:药理学、职业教育;袁桥玉(1981-),女,湖北宜都人,硕士,武汉职业技术学院副教授,研究方向:天然药物化学;蔡明凡(1986-),女,湖北武汉人,硕士,武汉职业技术学院实验师,研究方向:制剂、化学工程。

(二)样品浸膏得率测定

将湖北贝母鳞茎研成粉末,过 20 目筛,分别称取该粉末 100g,按表 2 安排实验,乙醇回流提取,减压回收乙醇,得粗提物。按照文献方法^[4]对粗提物进行纯化处理,并浓缩成浸膏。将浸膏转移入已干燥至恒重的蒸发皿中,于 60℃烘箱中干燥 3h,取出,置干燥器中冷却 1h,迅速精密称重,计算各样品浸膏得率,结果见表 2。浸膏得率计算公式如下:浸膏得率(%)=浸膏净重(g)/药材重量×100%。

(三)生物碱含量测定

1.标准曲线的制作

精密称取湖贝甲素标准品适量,加氯仿溶解制成 0.228mg/ml 的对照品溶液。精密吸取湖贝甲素对照品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml 置 25ml 容量瓶中,按文献方法^[4],在 415 nm 波长处测吸光度。以吸光度为纵坐标(Y),湖贝甲素对照品浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得回归方程为: Y =

0.5055X +0. 0097(R² = 0. 9995),结果表明,湖贝甲素在 0.00456~0. 0228 mg·mL⁻¹ 与吸光度线性关系良好。

2.供试品溶液的制备与生物碱含量测定

精密称取上述各样品浸膏适量,用氯仿溶解定容至25ml,得供试液。精密吸取各供试液 0.2~0.4ml 于25 ml 容量瓶中,按上述标准曲线下操作方法测定各供试液的吸光度,将测得的吸光度值代入标准曲线的线性回归方程,得到供试液的浓度,并按下面的公式计算得到湖北贝母总生物碱含量(mg)和总生物碱收率(%)。结果见表 2。

(四)数据处理与结果分析

运用 Excel 对上述试验结果进行回归分析,结果见表 3、表 4。回归方程的表达式为:Y=-0.06911+0.003098X₁+0.02406 X₂-0.02955 X₃ +0.02921X₄。由于复相关系数 R=0.856,P 值<0.05,所以所建立的四元一次方程与试验数据拟合较好。根据分析结

表 1 湖北贝母提取工艺四因素拟 4 水平表

水 平	因 素			
	乙醇浓度 X1 (%)	液料比 X2(倍)	提取时间 X3 (h)	提取次数 X4(次)
1	50	4	0.5	2
2	60	6	1	2
3	70	8	1.5	3
4	80	10	2	3

表 2 U12(43× 21)均匀设计试验方案与结果

试验号	X1 (%)	X2(倍)	X3 (h)	X4(次)	浸膏得率 (%)	生物碱收率 (%)
1	70	8	1.5	3	0.4310	0.4279
2	80	10	1	3	0.6759	0.5164
3	60	10	0.5	2	0.4604	0.4496
4	80	8	2	2	0.4102	0.3610
5	60	4	2	3	0.4087	0.2670
6	70	6	1	3	0.4538	0.3344
7	70	6	1.5	2	0.6386	0.3083
8	80	4	0.5	2	0.3758	0.2549
9	50	10	2	3	0.3792	0.2745
10	60	8	1	2	0.4545	0.3058
11	50	6	0.5	3	0.3894	0.2905
12	50	4	1.5	2	0.4434	0.2511

表 3 湖北贝母均匀设计试验方差分析结果表

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
回归分析	4	0.05900	0.01475	4.7820	0.03546
残差	7	0.02159	0.003085		
总计	11	0.08059			

表4 湖北贝母均匀设计试验回归分析结果表

因素	系数	标准误差	t 检验值	P 值
截距	-0.06911	0.1404	-0.4921	0.6377
乙醇浓度 X1 (%)	0.003098	0.001458	2.1254	0.07115
液料比 X2(倍)	0.02406	0.007282	3.3039	0.01305
提取时间 X3 (h)	-0.02955	0.02904	-1.01761	0.3427
提取次数 X4(次)	0.02921	0.03319	0.8800	0.4080

果中各偏回归系数对应的 t 检验值,影响因素最大的是液料比(X2),其次是乙醇浓度(X1),最后是提取时间(X3)和提取次数(X4)。根据 P 值可知,料液比对试验结果有显著的影响,乙醇浓度有较大的影响。

对回归方程进行规划求解,得到湖北贝母生物碱提取的较优工艺条件为:乙醇浓度为 80%、液料比为 10 倍、提取时间为 0.5h、提取次数为 3 次,此时生物碱收率为 0.4922%。经验证试验,该工艺条件的实际提取得率平均为 0.4989%,小于表 2 中第 2 号试验结果。采用直观分析法,第 2 号试验设计的提取得率最大,所以可以确定第 2 号试验对应的试验条件作为湖北贝母醇提的较优工艺条件:乙醇浓度 80%、液料比 10 倍、提取时间 1 小时、提取次数 3 次,此时生物碱收率最大为 0.5164%。

三、讨论

均匀设计是近年来解决多因素多水平问题较好的方法,在中药工艺研究中日益受到重视。可用较少的试验次数,完成复杂的科研课题和新产品的研究和开发,从而使实验研究周期大大缩短,节省人力、时间和科研经费^[3]。

本试验考察了乙醇浓度(50%~80%)、液料比(4~10 倍)、提取时间(0.5~2.0h)、提取次数(2~3 次)四个因素对湖北贝母生物碱提取率的影响,前三个因素设 4 个水平,提取次数设 2 个水平,采用拟水平混合均匀设计安排实验。得到湖北贝母生物碱最佳乙醇回流提取条件为:乙醇浓度 80%、液料比 10 倍、提取时间 1 小时、提取次数 3 次,此时生物碱收率为 0.5164%,高于文献结果^[4]。所建立的醇提工艺稳定、可行,为湖北贝母进一步的研究和开发提供了参考。

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,2015:348-349.
- [2] 徐定平,吴晶晶,周鑫堂,等.湖北贝母化学成分和药理作用研究进展[J].中国药业,2015,(6):92-94.
- [3] 孙晓英,吴莹,徐庆辉.均匀设计及其在中药学领域中的应用[J].安徽医药,2009,(7):822-824.
- [4] 徐仿周,陈昶,阮汉利,等.湖北贝母有效部位提取工艺的研究[J].时珍国医国药,2009,(5):1033-1034.

[责任编辑:董巍]

Optimum Extraction Process of Alkaloids from Hubei Fritillaria by Uniform Design

WAN Jun-mei YUAN Qiao-yu CAI Ming-fan

(Biological Engineering College ,Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract : In order to screen out the optimum conditions for the extraction of alkaloids from *Fritillaria chinensis* Maxim., the uniform design method was used. The ethanol concentration, liquid-to-liquid ratio, extraction time and extraction times were taken as the investigation factors, and the extraction yield and alkaloid yield were taken as indicators. To optimize the ethanol extraction process of the *Fritillaria* alkaloids in Hubei. The results showed that the best extraction process of alkaloids from *Fritillaria chinensis* was 80% ethanol, the ratio of liquid to liquid was 10 times, the extraction time was 1 hour, the extraction times were 3 times, and the alkaloid yield was 0.5164%.

Key words : Hubei *Fritillaria*; extraction process; uniform design method