

Box-Behnken 响应面法优化荜茇总生物碱的提取工艺研究^Δ

杨家强^{1*}, 车万莉², 彭红艳¹, 王 维¹(1. 遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义市第二人民医院药剂科, 贵州 遵义 563000)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1802-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.18

摘要 目的: 优化荜茇总生物碱的提取工艺, 为荜茇的深入开发和综合利用提供参考。方法: 以总生物碱(指标性成分为胡椒碱)的提取率为考察指标, 药材粉碎度、液料比、提取时间、提取次数为考察因素, 采用单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化荜茇总生物碱的提取工艺, 并进行 3 次(荜茇用量分别为 1.00、10.00、100.00 g)验证试验。结果: 最优提取工艺为粉碎度 90 目, 加入 32 倍量的无水乙醇提取 3 次, 每次提取 170 min。最优工艺条件下, 在荜茇用量为 1.00、10.00、100.00 g 时荜茇总生物碱的提取率分别为 5.015、5.028、5.041 mg/g, 与预测值 5.025 mg/g 的相对误差分别为 0.20%、0.06%、0.26%, 差异较小。结论: 本研究优选的荜茇总生物碱的提取工艺合理、稳定、可行。

关键词 荜茇; 总生物碱; Box-Behnken 响应面法; 提取率; 提取工艺

Study on the Optimization of Extraction Technology of Total Alkaloids from *Piper longum* by Box-Behnken Response Surface Methodology

YANG Jiaqiang¹, CHE Wanli², PENG Hongyan¹, WANG Wei¹ (1. School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Zunyi Second People's Hospital, Guizhou Zunyi 563000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total alkaloids from *Piper longum*, and to provide reference for deep development and comprehensive utilization of *P. longum*. METHODS: With the extraction rates of total alkaloids (the target component for piperine) as reference index, using comminution degree of medicinal materials, liquid-solid ratio, extraction time and extraction times as factors, single factor test and Box-Behnken response surface methodology were adopted to optimize the extraction technology of total alkaloids from *P. longum*. The validation tests were conducted for 3 times (the amounts of *P. longum* were 1.00, 10.00, 100.00 g). RESULTS: The optimal extraction technology was that comminution degree of 90 mesh, 32-fold absolute ethanol, extracting for 3 times, lasting for 170 min each time. Under optimal technology, the extraction rates of

- [19] 凌宗全. 白术化学成分及药理作用研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(35): 105-106.
- [20] 王红勋. 枳实与枳壳的现代药理与临床应用研究[J]. 中国卫生标准管理, 2014, 5(16): 39-40.
- [21] 张霄潇, 李正勇, 马玉玲, 等. 中药枳实的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 185-190.
- [22] 吕景山. 施今墨对药[M]. 3 版. 北京: 人民军医出版社, 2005: 158.
- [23] 田亚汀, 张玉平, 田小菲, 等. 环氧化酶在肠道运动功能障碍中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(4): 1124-1127.
- [24] SHI XZ, LIN YM, POWELL DW, et al. Pathophysiology of motility dysfunction in bowel obstruction: role of stretch-induced COX-2[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(1): G99-G108.
- [25] JIN J, LI Y, WANG Y, et al. SCF/C-KIT signaling modulates tryptase expression in acute myeloid leukemia cells [J]. *Int J Hematol*, 2014, 99(6): 750-757.
- [26] LEE S, GIM H, SHIM JH, et al. The traditional herbal medicine, Ge-Gen-Tang, inhibits pacemaker potentials by nitric oxide /cGMP dependent ATP-sensitive K(+) channels in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.05.025.
- [27] FAN YH, XU GP, FENG W. Effects of zhizhu tongbian decoction on the colon ink propelling rate, GDNF, and NOS mRNA expression in rats with slow transit constipation[J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2012, 32(4): 486-489.
- [28] 陈斌. 开胃进食汤超微配方颗粒调节胃肠动力作用的临床及实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2007.
- [29] 李旻昊, 张国志, 袁梅, 等. 慢传输型便秘大鼠胃肠组织中 PI3K/AKT/eNOS 信号通路相关标志物的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2015, 55(19): 27-29.

^Δ 基金项目: 贵州省科技厅国际科技合作计划项目(No. 黔科合外 G 字[2014]7013 号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No. QZyy-2014-088)

* 教授, 硕士。研究方向: 新药研究与开发。电话: 0851-28609461。E-mail: yjqcn@126.com

(收稿日期: 2018-01-02 修回日期: 2018-03-09)
(编辑: 林 静)

total alkaloids from *P. longum* were 5.015, 5.028, 5.041 mg/g when the amount of *P. longum* were 1.00, 10.00, 100.00 g; relative errors of them to predicted value 5.025 mg/g were 0.20%, 0.06%, 0.26%, respectively. There was small difference.

CONCLUSIONS: The optimal extraction technology of total alkaloids of *P. longum* is reasonable, stable and feasible.

KEYWORDS *Piper longum*; Total alkaloids; Box-Behnken response surface methodology; Extraction rate; Extraction technology

荜茇为胡椒科植物荜茇(*Piper longum* L.)的干燥近成熟或成熟果穗,味辛、热,具有温中散寒、下气止痛之功效,用于脘腹冷痛、呕吐、寒凝气滞、胸痹心痛、头痛、牙痛等^[1]。现代研究表明,荜茇具有抗氧化、抗血小板聚集、抗高血脂和抗菌等多种作用^[2-4]。荜茇中生物碱种类较多、含量高,具有多种生物活性,在医药和农业中的应用均较广泛^[5]。研究显示,荜茇总生物碱对多种实体肿瘤和血液病均有抑制作用,具有很好的清除自由基能力^[6];对6-羟基多巴胺诱导的帕金森病模型大鼠的黑质细胞具有保护作用^[7];此外,还具有杀虫、杀螨作用^[8]等。Box-Behnken 响应面法是一种优化工艺条件的有效方法,已被广泛地用于多因素的试验优化^[9-10]。本研究拟采用 Box-Behnken 响应面法优化荜茇总生物碱的提取工艺,为荜茇的质量控制以及对其深入开发和综合利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BS224S 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);510 酸度计(北京中西远大科技有限公司);XS-04B 多功能粉碎机(东莞市隆鑫机电设备有限公司);TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

荜茇药材(遵义中药材公司,批号:160056,由遵义医学院杨建文主任药师鉴定为真品);胡椒碱对照品(上海雅吉生物科技有限公司,批号:16041311,纯度:99.99%),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 荜茇总生物碱的提取

取荜茇药材切成小段,粉碎机粉碎,过筛,取一定量的粉末,置于圆底烧瓶中,再加入无水乙醇,加热回流提取,过滤,合并滤液,浓缩,收集备用。

2.2 荜茇总生物碱的含量测定

采用酸性染料比色法^[11]测定荜茇总生物碱的含量。精密称取 0.010 0 g 胡椒碱对照品,置于 25 mL 棕色量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。取适量上述溶液,再用无水乙醇分别稀释制成质量浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/L 的对照品溶液。精密量取 0.5 mL 上述各对照品溶液,置于 6 个分液漏斗中,分别加入 6.0 mL 溴百里香酚蓝溶液和 pH 6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液 4.0 mL,摇匀;加入 20 mL 二氯甲烷,振摇,静置 30

min。然后在 418 nm 波长处测定其吸光度,以吸光度为纵坐标(y)、质量浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得到标准曲线的方程为 $y = 49.694x - 0.0213$ ($r^2 = 0.9992$),结果表明,胡椒碱质量浓度在 0.053~20.65 mg/L 范围内线性关系良好。根据标准曲线计算荜茇总生物碱的提取率:总生物碱提取率 = $CV_1V_2/V_3W \times 100\%$ (C = 测量液总生物碱的浓度; V_1 = 测量液定容的体积; V_2 = 提取液定容的体积; V_3 = 测量时量取的体积; W = 样品的质量)。

2.3 单因素试验考察

在对中药材生物碱提取的过程中,药材粉碎度、溶剂种类、提取的料液比、提取时间以及提取次数等因素对提取率有着重要影响^[12-13]。因此,在本工艺优化试验中,笔者选择如下因素进行考察。

2.3.1 药材粉碎度 取荜茇粉末,过 20、40、60、80、100 目标准筛,分别精密称取不同粉碎度样品 1.00 g,置于圆底烧瓶中,在室温下用 10 倍量体积的无水乙醇浸提 2 h,计算出不同粉碎度样品中总生物碱的提取率。结果显示,过 20、40、60、80、100 目标准筛样品中荜茇总生物碱的提取率分别为 2.92、3.12、3.21、3.30、3.22 mg/g,故确定 80 目荜茇细粉为最优提取粉碎度。

2.3.2 液料比 精密称取 6 份荜茇细粉(过 80 目标准筛),每份 1.00 g,分别置于圆底烧瓶中,依次加入 10、20、30、40、50、60 倍量的无水乙醇,浸润 30 min 后,加热回流提取 2 h,计算不同液料比下样品总生物碱的提取率。结果显示,加入 10、20、30、40、50、60 倍量的无水乙醇提取后荜茇总生物碱的提取率分别为 3.30、3.41、3.59、3.43、3.42、3.31 mg/g,故确定液料比 30:1 为最优提取条件。

2.3.3 提取时间 精密称取 6 份荜茇细粉(过 80 目标准筛),每份 1.00 g,分别置于圆底烧瓶中,加入 30 倍量的无水乙醇,浸润 30 min 后,分别加热回流提取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 h,计算不同提取时间下样品总生物碱的提取率。结果显示,加热回流 0.5、1、2、3、4、5 h 后荜茇总生物碱的提取率分别为 3.05、3.26、3.59、3.75、3.66、3.58 mg/g,故确定加热回流提取 3 h 为最优提取时间。

2.3.4 提取次数 精密称取 4 份的荜茇细粉(过 80 目标准筛),每份 1.00 g,分别置于圆底烧瓶中,加入 30 倍量的无水乙醇,浸润 30 min 后,分别回流提取 1、2、3、4 次,每次提取时间为 3 h,计算出不同提取次数下样品总生物碱的提取率。结果显示,提取 1、2、3、4 次后荜茇总生物碱的提取率分别为 3.75、4.16、4.93、4.96 mg/g,故确定最优提取次数为 3 次。

2.4 响应面试验优化

2.4.1 Box-Behnken 试验设计 在单因素试验的基础上,选择粉碎度(X_1)、液料比(X_2)、提取时间(X_3)、提取次数(X_4)作为考察因素,采用四因素三水平的响应曲面法进行试验。因素与水平见表1,Box-Behnken 试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-----------------|-------------------|----------------|--------------|
| | X_1 (药材粉碎度),目 | X_2 (液料比),mL/mg | X_3 (提取时间),h | X_4 (提取次数) |
| -1 | 60 | 20 | 2 | 2 |
| 0 | 80 | 30 | 3 | 3 |
| 1 | 100 | 40 | 4 | 4 |

表2 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab 2 Design and result of Box-Behnken test

| 实验号 | 因素 | | | | 总生物碱提取率,mg/g |
|-----|-------|-------|-------|-------|--------------|
| | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 | |
| 1 | 0 | 0 | 1 | -1 | 4.06 |
| 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 5.03 |
| 3 | -1 | 0 | -1 | 0 | 4.91 |
| 4 | 0 | 0 | -1 | -1 | 4.35 |
| 5 | -1 | -1 | 0 | 0 | 4.66 |
| 6 | 0 | -1 | 0 | -1 | 4.24 |
| 7 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4.12 |
| 8 | 0 | 1 | -1 | 0 | 3.29 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.08 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.02 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.06 |
| 12 | 0 | -1 | 1 | 0 | 3.68 |
| 13 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4.16 |
| 14 | 0 | 1 | 0 | -1 | 4.95 |
| 15 | -1 | 0 | 0 | -1 | 4.1 |
| 16 | 0 | -1 | -1 | 0 | 3.99 |
| 17 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3.86 |
| 18 | 1 | 0 | -1 | 0 | 5.01 |
| 19 | 0 | -1 | 0 | 1 | 3.76 |
| 20 | 0 | 0 | -1 | 1 | 3.95 |
| 21 | -1 | 1 | 0 | 0 | 3.4 |
| 22 | 1 | -1 | 0 | 0 | 5.05 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.76 |
| 24 | 0 | 0 | 1 | 1 | 4.42 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.16 |
| 26 | -1 | 0 | 1 | 0 | 3.29 |
| 27 | -1 | 0 | 0 | 1 | 4.63 |
| 28 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3.26 |
| 29 | 1 | 0 | 0 | -1 | 4.74 |

2.4.2 模型建立与方差分析 通过 Design Expert 8.06 软件对上述试验结果进行多元回归拟合,得到回归方程:总生物碱提取率(Y)= $5.01+0.22X_1-0.26X_2-0.28X_3-0.15X_4-0.18X_1^2-0.43X_2^2-0.31X_3^2-0.23X_4^2+0.29X_1X_2+0.17X_1X_3-0.15X_1X_4+0.17X_2X_3+0.19X_2X_4+0.27X_3X_4$ ($R^2=0.9913$)。方差分析结果见表3。

由表3可知,葶苈总生物碱提取模型的 $P<0.05$,表明该回归模型是显著的,用该模型对葶苈总生物碱的提取工艺进行分析试验是合理的。根据表3中 F 值的大

小,推测影响本试验提取率大小的因素为 $X_1>X_2>X_3>X_4$ 。从表3中还可以看出,二次项 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对响应值的影响显著($P<0.05$)。

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方差 | F | P |
|----------|-------|-----|-------|------|--------|
| 模型 | 8.870 | 14 | 0.660 | 2.78 | 0.0361 |
| X_1 | 1.820 | 1 | 1.820 | 7.63 | 0.0152 |
| X_2 | 1.410 | 1 | 1.410 | 5.96 | 0.0288 |
| X_3 | 1.260 | 1 | 1.260 | 5.26 | 0.0379 |
| X_4 | 0.087 | 1 | 0.087 | 0.36 | 0.5562 |
| X_1^2 | 0.220 | 1 | 0.220 | 1.01 | 0.3110 |
| X_2^2 | 1.650 | 1 | 1.650 | 6.96 | 0.0231 |
| X_3^2 | 1.250 | 1 | 1.250 | 5.24 | 0.0384 |
| X_4^2 | 1.210 | 1 | 1.210 | 5.08 | 0.0412 |
| X_1X_2 | 0.660 | 1 | 0.660 | 2.73 | 0.1237 |
| X_1X_3 | 0.320 | 1 | 0.320 | 1.34 | 0.2497 |
| X_1X_4 | 0.410 | 1 | 0.410 | 1.71 | 0.2306 |
| X_2X_3 | 0.029 | 1 | 0.029 | 0.12 | 0.7515 |
| X_2X_4 | 0.510 | 1 | 0.510 | 2.16 | 0.1703 |
| X_3X_4 | 0.170 | 1 | 0.170 | 0.68 | 0.1659 |

2.4.3 响应面分析 用 Design Expert 8.06 软件分析,得出影响葶苈总生物碱提取率的各因素交互作用的响应面图,结果见图1。

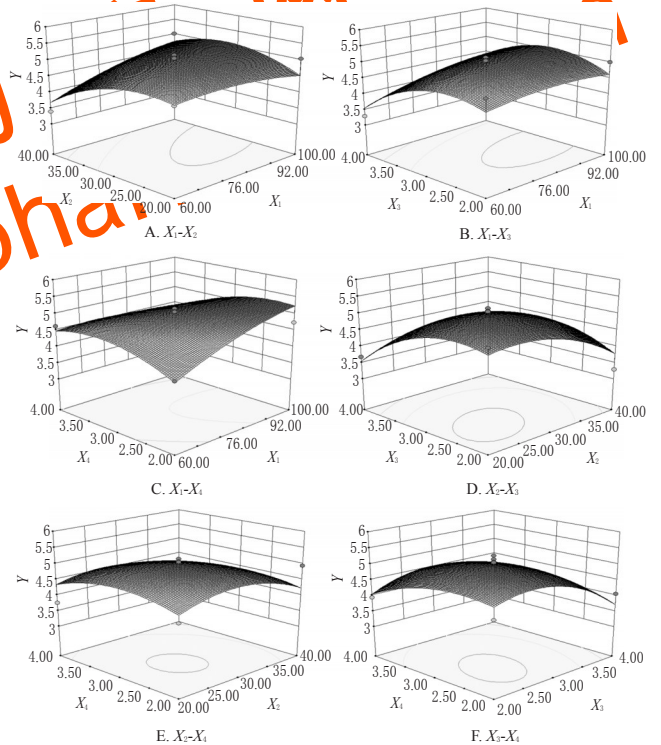


图1 各自变量间交互作用对葶苈总生物碱提取率的响应面图

Fig 1 Response surface diagram of independent variable interaction effect to extraction rate of total alkaloids from *P. longum*

由图1可知,随着液料比的增大,葶苈总生物碱的提取率先呈缓慢上升趋势,达到最大值后开始下降;随着提取时间的增加,能增大葶苈总生物碱的提取率,但是

时间过长其提取率有所下降;随着提取次数的增加,提取率有先上升后下降的趋势;从图中也可知,粉碎度的改变对提取率的影响较大,随着粉碎度的增加,提取率逐渐增大,当达到一定程度时,提取率上升缓慢;同时,随着液料比的增大,荜茇总生物碱的提取率也呈现先缓慢上升然后降低的趋势,两者交互影响较显著。

根据上述所得结果,由 Design Expert 8.06 软件分析得出:在稳定状态下荜茇提取量的最大值为 5.021 mg/g,相对应的粉碎度 90.26 目、液料比 32.16:1、提取时间 2.86 h,提取次数 2.91 次。以实际操作的方便考虑,将其修正为粉碎度 90 目,液料比 32:1,提取时间 170 min,提取次数 3 次。

2.4.4 验证试验 根据优化提取工艺,分别取荜茇样品 1.00、10.00 和 100.00 g 进行 3 次平行试验,结果荜茇总生物碱的平均提取率分别为 5.015、5.028 和 5.041 mg/g (RSD 分别为 1.5%、2.2%、2.7%, $n=3$),与预测值 5.025 mg/g 的相对误差分别为 0.20%、0.06%、0.26%。3 次平行试验的提取率差异较小,说明该工艺稳定可靠。

3 讨论

中药荜茇的化学成分中含有大量的生物碱,而胡椒碱作为其中主要存在的生物碱^[4],含量高、结构明确、性质稳定、有明显的紫外吸收,故本研究以胡椒碱作为指标性成分考察荜茇总生物碱的提取工艺,具有可行性和科学性。

为了优化荜茇总生物碱的提取工艺,笔者通过预试验先后考察了提取溶剂的种类、药材粉碎度、提取时间、提取次数、提取温度、溶剂的浓度、液料比等对总生物碱提取率的影响。在溶剂方面,笔者首先分别选择了无水乙醇、无水乙酸乙酯和水为溶剂,结果以无水乙醇为溶剂提取效果最好;接着,笔者又分别考察了无水乙醇、90%乙醇和 80%乙醇的提取效果,结果随着乙醇体积分数的降低,荜茇总生物碱提取率明显减小,故在本研究中选用无水乙醇为提取溶剂。在提取温度方面,预试验中笔者分别设置提取温度为 50、60、70、80℃,结果发现,当温度为 50、60℃时,总生物碱的提取率很低,而将温度从 70℃升高至 80℃时,总生物碱的提取率变化不大,故在本研究中未将提取温度作为考察因素。而同时进行的预试验结果显示,药材粉碎度、提取时间、液料比、提取次数的改变对荜茇总生物碱提取率的影响较大。因此,在本研究中笔者选取上述 4 个因素对荜茇总生物碱的提取工艺进行优化。

本研究结果显示,将荜茇粉碎太细时总生物碱的提取率会下降,这可能是由于过细的粉末使得其吸附作用增强,导致扩散速度而降低,最后影响其浸出效果;也可能是因为粉碎太细使得药材的细胞破裂,致使大量不溶物增加。而较粗的粉末也会导致提取率较低,这可能是与溶剂的接触面小,影响扩散速度和浸出效果有关。荜茇的化学成分中包含的胡椒碱、荜茇明宁碱等生物碱的

化学性质比较稳定,故较长的提取时间能获得较高的提取率。合适的料液比能有效除去中药荜茇中的脂质、鞣质等杂质,有助于提高总生物碱的提取率。随着提取次数的增加,在一定次数范围内能提高其提取率,但是随着提取次数的继续增加,溶液中残留的生物碱含量降低,由于提取时间的延长,可能破坏酰胺类生物碱等化学成分的结构,最终导致提取率降低。

综上所述,笔者采用 Box-Behnken 响应面法优化了荜茇中总生物碱提取工艺,且优化后的提取工艺合理可行。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015 年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:235.
- [2] REDDY NJ, VALI DN, RANI M, et al. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 34(34):115-122.
- [3] 毕赢, 吴霞, 陈筱清. 荜茇化学成分及药理活性研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(22):1697-1699.
- [4] 乔佛晓, 禹玉洪, 李燕. 荜茇的药理作用与毒性作用研究概述[J]. *环球中医药*, 2015, 8(4):507-512.
- [5] 李丹, 杨异卉, 赖睿智, 等. 荜茇化学成分和药理活性研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(6):565-569.
- [6] 滕文静, 李洪霖, 李雁. 基于 Cytoscape 等生物信息学分析软件预测荜茇明碱抗肿瘤靶基因[J]. *广州中医药大学学报*, 2017, 34(5):785-789.
- [7] 康大伟, 包玉敏, 王书妍, 等. 蒙药材荜茇中生物碱的含量测定及抗氧化性研究[J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2017, 32(1):20-23.
- [8] SINGH NK, SAINI SPS, SINGH H, et al. In vitro assessment of the acaricidal activity of Piper longum, Piper nigrum, and Zingiber officinale extracts against Hyalomma anatolicum ticks[J]. *Exp Appl Acarol*, 2017, 71(3):303-317.
- [9] 邹骏, 杨家强. 响应面分析法优化吴茱萸中去氢吴茱萸碱的提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(14):59-61.
- [10] 黄潇, 刘婧, 彭水梅, 等. 响应面法优化栀子中总多酚、总黄酮的提取工艺[J]. *中国药房*, 2017, 28(28):3964-3968.
- [11] 李文静, 徐进, 景霞, 等. 酸性染料比色法测定咳喘口服液中盐酸麻黄碱的含量方法改进[J]. *中国药房*, 2013, 24(37):3534-3536.
- [12] 贺胜, 周杏子, 何海, 等. 响应面法优化桑叶总生物碱超声提取工艺[J]. *中国药房*, 2015, 26(25):3537-3540.
- [13] 徐仁生. 天然产物化学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2004:117-119.
- [14] SARWAR AH, NIRALA RK, ARIF M, et al. Spermicidal activity of the hexane extract of Piper longum: an in vitro study[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(12):1166-1169.

(收稿日期:2018-01-19 修回日期:2018-04-10)

(编辑:林静)