

# 附子甘草药对中总生物碱的提取工艺研究

刘宁芝,杜欣韵,宋云帆,蒋建兰\*

(天津市生物与制药工程重点实验室,天津大学化工学院制药工程系,天津 300072)

**摘要:**采用响应面法优化附子甘草药对中总生物碱的回流提取工艺。以总生物碱提取率为评价指标,通过单因素试验考察了浸泡时间、甘草质量、液料比、回流时间、回流次数等因素对总生物碱提取率的影响。在单因素试验的基础上,利用响应面设计优化试验。回流提取的最优工艺条件为:回流时间为 120 min; $m(\text{附子}):m(\text{甘草})$ 为 1:1.15;液料比为 30。验证试验表明,拟合得到的回归模型与实际符合较好。

**关键词:**附子;甘草;总生物碱;响应面法;回流提取

**中图分类号:**R284.2

**文献标志码:**A

**文章编号:**0253-4320(2017)01-0100-04

**DOI:**10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2017.01.023

## Study on extraction technology of effective ingredient in *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Glycyrrhizauralensis* Fisch

LIU Ning-zhi, DU Xin-yun, SONG Yun-fan, JIANG Jian-lan\*

(Tianjin Key Laboratory of Biological and Pharmaceutical Engineering, Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** Response Surface Methodology is used to optimize the extraction process of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Glycyrrhizauralensis* Fisch. The effects of soaking time, ratio of liquid to solid, extraction time, reflux extraction time, amount of *Glycyrrhizauralensis* Fisch on the extracting yield of total alkaloid are studied. The optimal extraction conditions are shown as follows: 120 minutes of extraction time, 23.05 g of *Glycyrrhizauralensis* Fisch and 30 of the ratio of liquid to solid. The results show that the fitting regression model is in good agreement with the practice.

**Key words:** *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; *Glycyrrhizauralensis* Fisch; alkaloids; response surface method; reflux extraction

附子为毛茛科植物乌头的子根的加工品,具有强心、抗心律失常、抗炎镇痛、抗肿瘤、免疫调节等功效<sup>[1]</sup>,因附子有一定的毒性,常配伍甘草以减毒增效,构成中医临床组方的常用药对。有研究者<sup>[2-3]</sup>发现甘草对附子的减毒机理主要为甘草可促使附子毒性生物碱转化为毒性较小或无毒性的物质,同时促进总生物碱的溶出,从而起到减毒增效的作用。因此,从附子甘草药对出发,研究总生物碱的提取工艺。目前,附子总生物碱的提取方法相关文献报道较多<sup>[4-6]</sup>,但仅仅针对于附子 1 种药材,未见有关附子甘草药对中总生物碱提取工艺的研究。此外,总生物碱提取工艺的研究中常采用正交设计和均匀设计<sup>[5-6]</sup>,而以响应面法优化总生物碱的提取则未见报道。邱颖等<sup>[7]</sup>对以上 3 种试验设计方法进行了比较,正交设计、均匀设计因受线性模型限制,而实际响应值与实验条件一般都不是简单线性关系,导致预测模型与实际值相差较大,而响应面设计有线性、

多项式等模型,预测精度高,并且可对未做过的试验进行预测,得到较优响应值。因此,响应面设计更适合于实际生产。

因此,笔者以蒸馏水作溶剂,选用响应面法优化附子甘草药对中总生物碱的回流提取工艺。

### 1 试剂与仪器

**试剂:**附子、甘草,产地四川江油,购买于四川道济堂,生产日期 2015 年;乌头碱对照品,批号为 MUST-15121111,成都曼思特生物技术有限公司生产;三氯甲烷、乙醚,分析纯,天津江天化工技术有限公司生产;冰醋酸,分析纯,天津康科德科技有限公司生产;氢氧化钠,分析纯,天津市元立化工有限公司生产;溴甲酚绿,分析纯,凯玛特(天津)化工科技有限公司生产;蒸馏水,天津大学自制。

**仪器:**电子天平(ME802型、ME204型),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;旋转蒸发仪

收稿日期:2016-07-15

**作者简介:**刘宁芝(1989-),女,硕士生,主要从事中药的质量研究,tjulnz@163.com;蒋建兰(1972-),女,博士,副教授,从事中药现代化研究工作,通讯联系人,(022)27400388,jljiang@tju.edu.cn。

(N-1100),日本东京理化 EYELA 生产;紫外可见分光光度计(TU1810型),北京普析通用仪器有限责任公司生产。

## 2 方法与结果

### 2.1 溴甲酚绿离子对萃取-分光光度法测定生物碱提取率

#### 2.1.1 对照品溶液的配制

精密称取乌头碱对照品适量,加入三氯甲烷使其溶解并制成质量浓度为0.1808 mg/mL的乌头碱对照品溶液。

#### 2.1.2 标准曲线的绘制

精密吸取乌头碱对照品溶液0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL,以第1份为空白对照,分别置于分液漏斗中,加入20 mL三氯甲烷、10 mL pH(6.1 ± 0.1)溴甲酚绿溶液,充分振摇,静置1 h后,取下层溶液于25 mL棕色容量瓶中,加入三氯甲烷定容。于411 nm下测定吸光度。以乌头碱质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标,吸光度A为纵坐标,绘制标准曲线。所得回归方程为 $y = 0.0311x - 0.0218$ ,相关系数 $r = 0.9995$ 。结果表明,乌头碱质量浓度在2.90 ~ 14.46  $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好<sup>[8]</sup>。

#### 2.1.3 附子甘草提取液的制备

准确称取附子、甘草饮片适量,置于1000 mL圆底烧瓶中,加入一定量蒸馏水,浸泡一段时间,加热回流一段时间和一定回流次数。回流结束后,趁热减压抽滤,滤液转移至茄形瓶,于75℃旋蒸浓缩至1 g/mL左右(相当附子生药浓度),即得附子甘草提取液。提取液装入棕色样品瓶,4℃保存备用。

#### 2.1.4 总生物碱提取率的测定

将提取液放至室温,称取适量(相当附子生药量为0.5 g),用氨水调节pH至9~10,用乙醚-三氯甲烷(体积比为3:1)的混合溶液萃取3次,将混合液转移至蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加三氯甲烷溶解,转移至10 mL棕色容量瓶中,加入三氯甲烷定容,即得供试品溶液。用移液管精密吸取1 mL供试品溶液,置于分液漏斗中,其他操作同2.1.2,411 nm下测定吸光度。空白对照不加供试品溶液,其他操作相同。计算总生物碱的提取率(mg/g):

总生物碱提取率(mg/g) = 生物碱质量mg / 附子药材质量g

## 2.2 单因素试验

### 2.2.1 浸泡时间的考察

准确称取附子、甘草各20.00 g,置于1000 mL圆底烧瓶中,加入400 mL蒸馏水,浸泡时间分别为

0、30 min,加热回流1 h,回流1次,其他操作同2.1.3。按照2.1.4中所述方法测定总生物碱提取率。结果表明,总生物碱提取率浸泡前为1.644 mg/g,浸泡后为2.471 mg/g,说明浸泡对于总生物碱的溶出有明显的促进作用,故浸泡时间设定为30 min。

### 2.2.2 甘草质量的考察

基于经典方剂中附子甘草药对比,按照 $m(\text{附子}):m(\text{甘草})$ 为3:1、2:1、1:1、1:2、1:3,以附子20.00 g为基准,改变甘草质量。准确称取附子、甘草饮片,置于1000 mL圆底烧瓶中,加入400 mL蒸馏水,浸泡30 min,加热回流1 h,回流1次,其他操作同2.2.1,计算总生物碱提取率。甘草质量对总生物碱提取率的影响如图1所示。

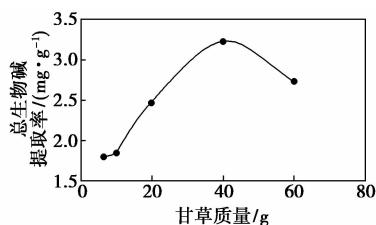


图1 甘草质量对总生物碱提取率的影响

由图1可知,在附子质量一定时,随着甘草质量的增加,生物碱提取率呈先增加后减小的趋势。由文献[9]可知,甘草中三萜皂苷类成分的增溶作用促进生物碱溶出,而溶出的酯型生物碱可与甘草中酸性成分形成大分子复合物,使其溶解度降低而析出,推测这是由于甘草的双重作用导致生物碱提取率呈先增加后减少的趋势。考虑到甘草质量对总生物碱溶出的影响,选择质量比为1:1~1:3,即甘草质量20~60 g作为优化的参考范围。

### 2.2.3 液料比的考察

准确称取附子、甘草各20.00 g,置于1000 mL圆底烧瓶中,按照附子的液料比10、15、20、25、30,分别加入蒸馏水200、300、400、500、600 mL,浸泡30 min,加热回流1 h,回流1次,其他操作同2.2.1,计算总生物碱提取率。液料比对总生物碱提取率的影响如图2所示。

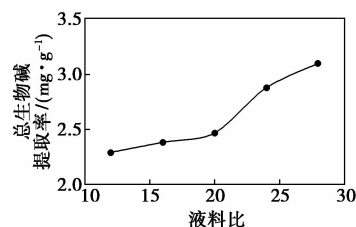


图2 液料比对总生物碱提取率的影响

由图 2 可知,液料比在 10~20 之间时,总生物碱提取率增加不明显;液料比超过 20 后,随着液料比增加,总生物碱提取率增加。综合考虑提取效果、生产成本,选择液料比 20~30 作为优化的参考范围。

#### 2.2.4 回流次数的考察

准确称取附子、甘草各 20.00 g,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 400 mL 蒸馏水,浸泡 30 min,加热回流 1 h,其他操作同 2.2.1,计算总生物碱提取率。回流次数对总生物碱提取率的影响如图 3 所示。

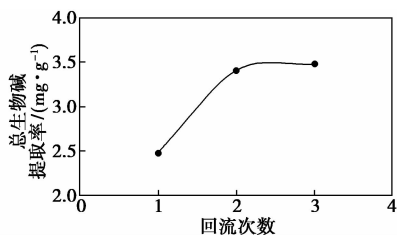


图 3 回流次数对总生物碱提取率的影响

由图 3 可知,随着提取次数的增加,总生物碱提取率逐渐提高,超过 2 次后,总生物碱提取率增加不明显。刘萍等<sup>[10]</sup>研究发现,中药煎煮以 2 次为佳。但考虑到操作的简便性,在响应面优化试验中仍选择回流次数为 1。

#### 2.2.5 回流时间的考察

准确称取附子、甘草各 20.00 g,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 400 mL 蒸馏水,浸泡 30 min,回流 1 次,其他操作同 2.2.1,计算总生物碱提取率。回流时间对总生物碱提取率的影响如图 4 所示。

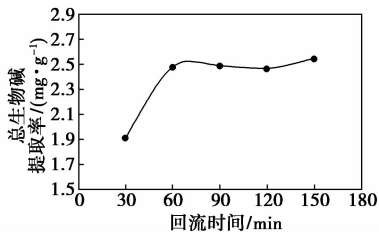


图 4 回流时间对总生物碱提取率的影响

由图 4 可知,总生物碱提取率随着提取时间增加而增加,但从 90 min 之后,增加趋势不明显。一般来说,提取的传质过程需要一定时间才能达到平衡,时间太短得率偏低,平衡后延长时间,提取率并没有显著增加。因此,选择回流时间 60~120 min 作为优化的参考范围。

### 2.3 响应面优化试验

#### 2.3.1 响应面设计及试验结果

根据单因素试验结果,选择影响提取工艺的主

要因素即回流时间(A)、液料比(B)、甘草质量(C)作为考察因素,以总生物碱提取率为响应值,利用 Design-expert 8.0.6 软件设计试验,得因素水平表如表 1 所示。设计得 20 组试验,按照 2.1.3、2.1.4 项下操作,每组试验平行 2 份,以总生物碱提取率的平均值作为响应值,试验结果如表 2 所示。

表 1 响应面试验设计的因素水平

因素	水平				
	-1.68	-1	0	1	1.68
回流时间(A)/min	39.55	60	90	120	140.45
液料比(B)	16.29	20	25	30	33.41
甘草质量(C)/g	6.36	20	40	60	73.64

表 2 响应面试验结果

序号	回流时间(A)/min	液料比(B)	甘草质量(C)/g	总生物碱提取率(R)/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	90	33.41	40.00	2.698
2	120	20.00	60.00	2.356
3	90	25.00	6.36	2.229
4	90	25.00	40.00	2.516
5	90	25.00	40.00	2.415
6	60	30.00	20.00	2.007
7	60	20.00	60.00	1.902
8	90	25.00	73.64	2.029
9	120	30.00	60.00	2.166
10	120	30.00	20.00	2.964
11	90	25.00	40.00	2.497
12	120	20.00	20.00	2.873
13	90	25.00	40.00	2.231
14	140.45	25.00	40.00	3.279
15	90	16.59	40.00	2.481
16	60	30.00	60.00	1.917
17	60	20.00	20.00	2.227
18	39.55	25.00	40.00	2.324
19	90	25.00	40.00	2.535
20	90	25.00	40.00	2.530

#### 2.3.2 数学模型建立及可信度分析

根据表 2 中的试验结果,拟合得到最佳模型是二次多项式模型,回归方程为:

$$R = 1.51909 - 9.62045E - 004A - 0.012402B + 0.042513C + 8.80083E - 005AB - 1.87240E - 004AC - 5.76625E - 005BC + 8.77716E - 005A^2 + 1.53586E - 004B^2 - 3.97191E - 004C^2$$

(相关系数  $R^2 = 0.8501$ )

对回归方程进行方差分析,结果如表 3 所示。

由表3可知,回归模型的 $P$ 值为0.0041(小于0.05),表明回归模型显著“significant”;失拟项的 $P$ 值为0.0719(大于0.05),说明失拟项不显著“not significant”;回归方程的相关系数 $R^2 = 0.8501$ ,说明该模型拟合程度较好,可信度高,可用该模型对结果进行预测。

显著性检验结果表明:该模型一次项 $A$ 、 $C$ 、二次项 $C^2$ 对响应值影响显著“significant”(  $P$  值小于0.05),即回流时间的一次项、甘草质量的一次项和甘草质量的二次项对生物碱提取率有显著影响。

表3 方差分析及显著性检验结果

方差来源	平方和	自由度	均方差	$F$ 值	$P$ 值	
模型	2.03	9	0.23	6.30	0.0041	significant
$A$	1.12	1	1.12	31.29	0.0002	significant
$B$	2.716E-004	1	2.716E-004	7.584E-003	0.9323	
$C$	0.31	1	0.31	8.71	0.0145	significant
$AB$	1.394E-003	1	1.394E-003	0.039	0.8475	
$AC$	0.10	1	0.10	2.82	0.1241	
$BC$	2.660E-004	1	2.660E-004	7.428E-003	0.9330	
$A^2$	0.090	1	0.090	2.51	0.1441	
$B^2$	2.125E-004	1	2.125E-004	5.933E-003	0.9401	
$C^2$	0.36	1	0.36	10.16	0.0097	significant
残差	0.36	10	0.036			
失拟项	0.29	5	0.058	4.16	0.0719	not significant
纯误差	0.069	5	0.014			
总误差	2.39	19				

通过残差分析对数据进行可靠性分析:数据应遵从标准正态分布,且应有95%的点在 $[-2, 2]$ 范围内,彼此独立且相近。由图5和图6可看出,数据遵从标准正态分布,且数据可靠,未出现异常点。

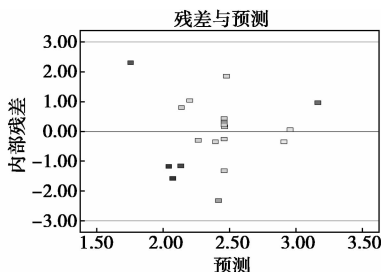


图5 残差分布图

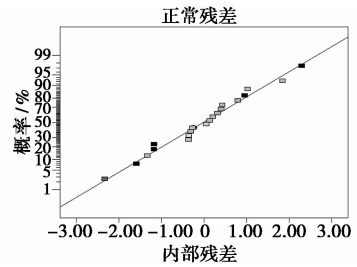


图6 残差正态分布概率图

2.3.3 最优提取工艺的预测与验证

根据回归方程,将回流时间、液料比、甘草质量对总生物碱提取率的影响绘制成响应面图,结果如图7~图9所示。由图7~图9可知,回流时间和甘草质量对总生物碱提取率影响显著,液料比次之。根据回归方程及响应面分析结果得最优工艺条件:回流时间为120 min,甘草质量为23.05 g,液料比为30。

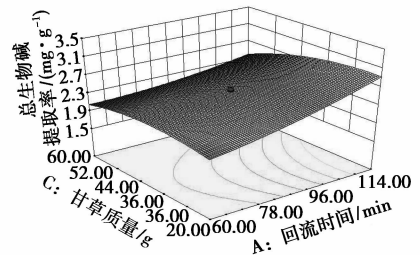


图7 回流时间与甘草质量对总生物碱提取率影响的响应曲面图

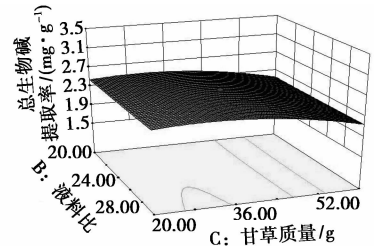


图8 液料比与甘草质量对总生物碱提取率影响的响应曲面图

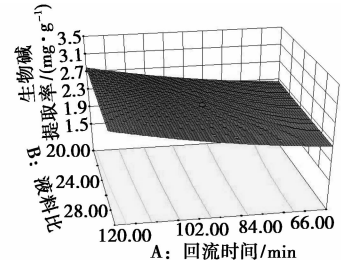


图9 回流时间与液料比对总生物碱提取率影响的响应曲面图

在选定条件下进行3批验证试验,结果如表4所示。3次验证试验的 $RSD$ 为1.3%,小于2%,说明该工艺重复性良好;实际总生物碱提取率为(下转第105页)

复合粉末和球磨制成的 CNTs/AgSnO<sub>2</sub> 微观形貌,对 2 种制备条件下制备的复合材料的密度、硬度进行了比较,并研究了碳管的质量分数对复合材料密度的影响。

## 1 实验

### 1.1 CNTs 的化学处理

取一定量的原始碳纳米管,加入浓硝酸和浓硫酸的混酸中进行净化,将混酸氧化过的碳纳米管加入 10 g/L SnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O + 40 g/L HCl 溶液中进行敏化处理,然后再放入 0.5 g/L PdCl<sub>2</sub> + 0.25 mL HCl 溶液中活化处理。

### 1.2 复合材料的制备

化学镀制备:以纳米 SnO<sub>2</sub> 作为化学镀的对象粉体,加入预处理过的 CNTs,先后经粉末预处理,在溶液中的预分散,化学镀银等过程,获得 CNTs 包覆 AgSnO<sub>2</sub> 的复合粉体,化学镀银采用银氨溶液为主盐溶液,以水合肼溶液为还原液。

球磨法制备:将质量分数为 1% 的 CNTs 与预先制备好的 AgSnO<sub>2</sub> 复合粉末放入行星式球磨机,采用无水乙醇作为球磨助剂,球料比为 10:1,球磨 5 h,获得 CNTs/AgSnO<sub>2</sub> 复合粉末。

### 1.3 复合材料的成型与烧结

将制备的 2 种混合粉末放入真空烧结炉中 700℃ 真空保温 2 h 预烧处理。将预烧后粉末 300 MPa 冷压成形并进行 880℃ 真空烧结 2 h 后,再经 4 种不同压力复压,复烧工艺仍为 880℃ × 2 h。

利用 HV-1000Z 型维氏硬度计测定材料硬度。

利用分度值为 0.1 mg 的 TG328B 分析天平,根据阿基米德原理测定复合材料压坯以及烧结密度,利用 Hitachi SU8020 场发射扫描电子显微镜进行形貌观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同的制备工艺对复合材料性能的影响

#### 2.1.1 粉末形貌的分析

化学镀所制备 Ag/SnO<sub>2</sub> 复合粉末的微观形貌如图 1 所示。从图 1 可以看出,复合粉末粒径分布较为均匀,其一次颗粒粒径约为 80 ~ 120 nm,且相邻颗粒之间相互结合或团聚,常规的粉体团聚会对后续粉末冶金制备块体材料的组织分散均匀性造成不利影响,但如果初始复合粉是核-壳状的包覆结构,即使复合粉之间呈粘连或部分团聚,对分散性的不利影响也不会太大,这正是采用包覆工艺制备复

(上接第 103 页)

2.992 mg/g,与预测值 2.962 mg/g 相比,只存在 0.1% 的偏差,说明该回归方程能较真实地反映各因素对总生物碱提取率的影响,可用于该工艺的优化。

表 4 最优工艺验证结果

项目	实验值/(mg·g <sup>-1</sup> )			平均值/ (mg·g <sup>-1</sup> )	RSD/ %	预测值/ (mg·g <sup>-1</sup> )	偏差/ %
	1	2	3				
响应值 R	2.940	3.036	2.999	2.992	1.33	2.962	1.03

## 3 结论

利用溴甲酚绿离子对萃取-分光光度法对附子甘草提取液中总生物碱进行含量测定。通过单因素试验,选出对总生物碱提取率影响较大的 3 个因素:回流时间、甘草质量、液料比;采用响应面法进行优化,以总生物碱提取率为响应值,得到了附子甘草配伍后总生物碱的回流提取最优工艺条件;在最优工艺条件下进行 3 批验证,验证结果与预测值基本一致。该提取工艺可为附子甘草药对中总生物碱的获取提供参考。

## 参考文献

- [1] 陈荣昌,孙桂波,张强. 附子及其复方中药的药理作用研究进展[J]. 中草药,2014,45(6):883-888.
- [2] 王律韵,杨洁红,张宇燕,等. 附子与甘草配伍减毒增效的物质基础初探[J]. 中国中医急症,2011,20(2):248-250.
- [3] 王彩云,万龙. 麻黄附子甘草汤的不同配伍方式对其毒性成分的影响[J]. 中国医药指南,2016,14(10):37-38.
- [4] 曾亦斌,张宇燕,杨洁红,等. 优化附子生物碱提取工艺的实验研究[J]. 中国中医急症,2011,20(3):413-414.
- [5] 罗一帆,吴伟康,陈学文,等. 正交试验优化附子生物碱提取条件的实验研究[J]. 中药材,2005,28(12):1109-1111.
- [6] 王健慧,李勇,孙玉柱,等. 均匀设计法提取附子总生物碱的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(26):15920-15921.
- [7] 邱颖,朱玲,孙晓英. 星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用[J]. 海峡药学,2011,23(2):18-19.
- [8] 李孝栋,李程勇,杨志琦,等. 酸性染料比色法测定附子理中片中总生物碱含量[J]. 福建中医学院学报,2007,17(6):25-26.
- [9] 丘小惠,何洁. 基于化学组份动态变化的附子配伍甘草煎煮条件研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):3015-3017.
- [10] 刘萍,王平. 影响中药煎煮质量的 因素分析[J]. 湖南中医学院学报,2010,12(5):44-46. ■