

# 星点设计-响应面法优化维吾尔药刺山柑果生物碱提取工艺<sup>Δ</sup>

薛桂蓬<sup>1,2\*</sup>, 宋选宗<sup>3</sup>, 满尔哈巴·海如拉<sup>2</sup>, 再娜布·吐合达洪<sup>2</sup>, 王新春<sup>1#</sup>, 杨伟俊<sup>2</sup>(1.石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2.新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004; 3.新疆维吾尔自治区胸科医院, 乌鲁木齐 830001)

中图分类号 R283;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)01-0096-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.01.31

**摘要** 目的:优化维吾尔药刺山柑果总生物碱的提取工艺。方法:以乙醇体积分数、加醇倍量、提取时间为自变量,以刺山柑果中总生物碱(以甜菜碱为对照)含量为因变量,应用Design-Expert 8.0.5软件,通过对自变量各水平的多元线性回归及二项式拟合,用响应面法优化出最佳提取工艺,同时进行预测值与实测值比较分析。结果:二项式拟合复相关系数 $R^2=0.9558$ ,回归方程代表性较好;确定最佳提取工艺为10倍量90%的乙醇提取2次,每次1.5h;经5次验证试验,最佳工艺提取的刺山柑果总生物碱含量为77.99 mg/g(RSD=0.95%, $n=5$ ),与预测值78.33 mg/g比较偏离率小于2%。结论:星点设计-响应面法优化刺山柑果总生物碱的提取工艺方法简单,精密度高,模型可靠,可预测性趋势良好。

**关键词** 刺山柑果;星点设计-响应面法;总生物碱含量;提取工艺

## Optimization of Extraction Technology for Total Alkaloids from Uygur Medicine *Capparis spinosa* Fruit by Central Composite Design-Response Surface Methodology

XUE Gui-peng<sup>1,2</sup>, SONG Xuan-zong<sup>3</sup>, HAIRULA Maner<sup>2</sup>, TOTAHON Zainap<sup>2</sup>, WANG Xin-chun<sup>1</sup>, YANG Wei-jun<sup>2</sup> (1.School of Pharmacy, Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832002, China; 2.Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute for Materia Medica Research, Key Laboratory of Xinjiang Uyghur Medicine, Urumqi 830004, China; 3.Chest Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction process of total alkaloids from Uygur medicine *Capparis spinosa* fruits. METHODS: The ethanol concentration and amount, extraction time as independent variables, and the content of total alkaloids from *C. Spinosa* fruits (oxyneurine as control) as dependent variable were regressed multiple linearity and fitted by binomial expression using Design-Expert 8.0.5 statistical software. Response surface methodology was used to optimize the extraction process. Meanwhile, predicted and measured values were compared. RESULTS: The correlation coefficient  $R^2$  fitted by binomial expression was equal to 0.9558, and regression equation was good in representativeness. The optimum extraction progress was as follows: 10-fold 90% ethanol, extracting for 2 times, lasting for 1.5 h each time. After 5 times of validation tests, the content of total alkaloids from *C. spinosa* fruits extracted by optimal extraction technology was 77.99 mg/g (RSD=0.95%,  $n=5$ ), and bias ratio was lower than 2%, compared with predicted value of 78.33 mg/g. CONCLUSIONS: The extraction technology of total alkaloids from *C. spinosa* fruits optimized by central composite design-response surface methodology is simple and reliable with high precision and good predictability.

**KEYWORDS** *Capparis spinosa* fruits; Central composite design-response surface methodology; Total alkaloid content; Extraction technology

刺山柑果为山柑科植物刺山柑 *Capparis spinosa* L.的干燥果实<sup>[1]</sup>,我国仅产于新疆、甘肃、西藏,具有祛风除湿散寒的功效<sup>[2]</sup>。维吾尔医以其干燥根皮或成熟及未成熟的果实入药,其疗效显著,用药历史悠久,广泛用于治疗急慢性风湿性关节炎<sup>[3]</sup>。刺山柑果中含有挥发油类、生物碱类、脂类、聚戊烯醇类、黄酮类及吡啶类和脂肪族类芥子油苷类<sup>[4-5]</sup>,并含有大量的粗蛋白、粗纤维、脂类、淀粉、糖类以及类胡萝卜素、维生素C等营养成分,同时还含有Na、K、P、Ca、Mn、Mg、Cu、Zn等矿物质

元素。笔者在前期研究中发现,刺山柑果实中含有总生物碱类成分,且其含量大于刺山柑果中总酚酸和总黄酮的含量。因此,本研究采用星点设计-响应面法,对刺山柑果中总生物碱的提取工艺进行优化,为后期制剂工艺奠定一定的基础。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

UV-2401分光光度计(上海精科仪器有限公司);BS124S型十万分之一电子天平(北京赛多利斯公司);DFT-100粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

#### 1.2 药品与试剂

刺山柑果药材(购自安徽亳州药材有限公司,批号:20100702,经新疆药物研究所何江副研究员鉴定);甜菜碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110894-200503,高效液

<sup>Δ</sup> 基金项目:新疆维吾尔自治区科技计划项目(No.200933123)

\* 助理研究员,硕士研究生。研究方向:新药研究与开发。E-mail: xueguipengxx@126.com

# 通信作者:主任医师,博士。研究方向:药物新制剂。E-mail: cwjwxc@163.com

相色谱法测纯度:  $\geq 98\%$ ); 甲醇、乙醇、雷氏盐、盐酸等试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 刺山柑果提取液制备

将刺山柑果粉碎成粗粉, 加入不同体积分数的乙醇溶液, 提取不同时间及次数, 过滤, 合并滤液, 定容至 1 000 ml, 即得。

### 2.2 刺山柑果提取液中总生物碱分析方法的建立<sup>[6]</sup>

2.2.1 供试品溶液的制备。取刺山柑果粗粉 30 g, 精密称定, 然后加入不同体积分数的乙醇溶液, 加热回流提取 2 次, 每次 1.0 h, 滤过, 合并滤液, 用相应体积分数乙醇稀释至刻度, 摇匀。

2.2.2 对照品溶液的制备。精密称取甜菜碱对照品适量, 加水超声使溶解, 然后稀释至刻度, 得到每 1 ml 含 0.94 mg 的对照品溶液。

2.2.3 标准曲线的制备。精密吸取甜菜碱对照品溶液 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 精密加入新制的 2% 雷氏盐溶液 2.0 ml, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 制成不含对照品的雷氏盐空白试剂及含甜菜碱 0.094、0.141、0.188、0.235、0.282、0.329 mg/ml 的对照品溶液。将溶液置于冰浴中放置 1 h, 用干燥滤纸过滤, 取续滤液, 以 0.1 mol/L 盐酸溶液为空白, 在 520 nm 波长处测定吸光度, 用空白试剂的吸光度减去对照品的吸光度, 计算, 即得。以甜菜碱对照品的质量浓度 ( $c$ , mg/ml) 为横坐标, 吸光度 ( $A$ ) 为纵坐标进行回归, 得标准曲线方程:  $A = 1.118 8c - 0.031 0$  ( $r = 0.999 5$ )。结果表明, 甜菜碱检测质量浓度线性范围为 0.094~0.329 mg/ml。

2.2.4 稳定性试验。取同一样品用 90% 乙醇提取按“2.2.3”项下方法制备后, 每隔 0.5 h 测定吸光度值, 连续测定 6 次, 结果吸光度值的 RSD = 1.68% ( $n = 6$ ), 表明样品在 3 h 内稳定性良好。

2.2.5 精密度、重复性、回收率试验。根据相应要求操作, 结果精密度、重复性试验的 RSD 分别为 1.56% ( $n = 5$ )、1.43% ( $n = 6$ ), 回收率平均值为 97.28%, RSD = 1.89% ( $n = 6$ ), 表明该方法符合要求。

2.2.6 供试品含量测定方法。精密吸取供试品溶液 1.0 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 按照“2.2.3”项下方法加入新制的 2% 雷氏盐溶液 2.0 ml 开始操作, 依法测定供试品溶液的吸光度。用空白试剂的吸光度减去供试品的吸光度, 代入标准曲线中, 计算提取液中总生物碱的含量, 最终计算刺山柑果药材中总生物碱的含量。

### 2.3 提取次数单因素试验

对提取次数进行单因素试验, 以总生物碱的含量为评价指标。结果, 提取 1、2、3、4 次的总生物碱含量依次为 72.531、76.521、78.762、78.921 mg/g。由于提取 2 次和 3 次时总生物碱的含量仅次于 4 次, 且提取 2 次时含量已达到了最高值的 96.9%, 结合工业化成本考虑, 最终选择提取次数为 2 次。

### 2.4 星点设计试验与结果<sup>[7-9]</sup>

对影响提取效率的乙醇体积分数和加醇倍量进行了预试验研究, 确定了星点设计试验的范围, 加醇倍量为 6~14 倍, 乙醇体积分数为 80%~100%, 固定提取次数为 2 次, 提取时间为 1~3 h。在此基础上, 对刺山柑果中总生物碱提取效率影响因素即乙醇体积分数、加醇量、提取时间进行优选, 根据星点设计的原理, 每个因素设 5 水平, 用代码  $-\alpha$ 、 $-1$ 、 $0$ 、 $+1$ 、 $+\alpha$  来表示, 实际操作物理量见表 1。

表 1 星点设计因素与水平

Tab 1 Factor and levels of central composite design

水平	$X_1$ , 乙醇体积分数 (%)	$X_2$ , 加醇倍量 (倍)	$X_3$ , 提取时间 (h)
-1.682	81.59	6.64	1.16
-1	85.00	8.00	1.5
0	90.00	10.00	2
1	95.00	12.00	2.5
1.682	98.41	13.36	2.84

取刺山柑果粗粉约 30 g, 精密称定, 提取, 过滤, 定容后按“2.2.3”项下方法操作, 测定总生物碱含量, 试验安排与结果见表 2。

表 2 星点试验设计及结果

Tab 2 Program and results of central composite design

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	总生物碱含量, mg/g
1	85.00	8.00	1.5	67.38
2	95.00	8.00	1.5	70.81
3	85.00	12.00	1.5	69.28
4	95.00	12.00	1.5	74.82
5	85.00	8.00	2.5	68.33
6	95.00	8.00	2.5	70.47
7	85.00	12.00	2.5	67.82
8	95.00	12.00	2.5	74.04
9	81.59	10.00	2.0	63.01
10	98.41	10.00	2.0	69.22
11	90.00	6.64	2.0	70.79
12	90.00	13.36	2.0	77.31
13	90.00	10.00	1.16	74.98
14	85.00	10.00	2.84	79.07
15~20	90.00	10.00	2.0	78.275

注: 15~20 为重复试验, 结果为平均值

Note: 15-20 mean repeated test, and the result is average value

以刺山柑果中总生物碱含量为因变量进行多元线性回归和二项式拟合, 绘制出响应面图。使用统计分析软件 Design-Expert 8.0.5, 得二项式拟合复相关系数  $R^2 = 0.955 8$ ,  $P < 0.000 1$ , 各项方差分析结果见表 3。

表 3 回归模型方差分析

Tab 3 ANOVA analysis for regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$
模型	433.85	9	48.21	24.03	<0.000 1
$X_1$	56.48	1	56.48	28.16	0.000 3
$X_2$	29.10	1	29.10	14.51	0.003 4
$X_3$	2.02	1	2.02	1.01	0.339 6
$X_1X_2$	4.79	1	4.79	2.39	0.153 3
$X_1X_3$	0.047	1	0.047	0.023	0.882 0
$X_2X_3$	1.02	1	1.02	0.51	0.493 1
$X_1^2$	311.86	1	311.86	155.46	<0.000 1
$X_2^2$	49.13	1	49.13	24.49	0.000 6
$X_3^2$	9.10	1	9.10	4.54	0.059 0
残差	20.06	10	2.01		
失拟项	18.64	5	3.73	13.10	0.006 7
纯误差	1.42	5	0.28		
总差	453.91	19			

各因素中一次项、二次项都有显著性差异, 表明各具体实验因子对效应值的影响不是简单的线性关系, 所以选择二项式拟合模型为成功模型。二项式拟合方程为:  $Y = -1 476.182 57 + 33.187 68X_1 + 3.710 89X_2 + 19.790 27X_3 - 0.186 08X_1^2 - 0.461 61X_2^2 -$

$$3.17854X_3^2 + 0.077375X_1X_2 - 0.030500X_1X_3 - 0.35625X_2X_3$$

由表3可知,回归模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,能准确地预测实际情况。其校正决定系数为0.9160,表明91.60%的试验数据的变异性可用此回归模型来解释,试验过程中存在一定的误差。信噪比为16.553,表明有很强的信号。综上表明所建立的模型能较好地解释响应值的变化。根据回归分析结果,作出相应曲面图和等高线图,见图1、图2、图3。

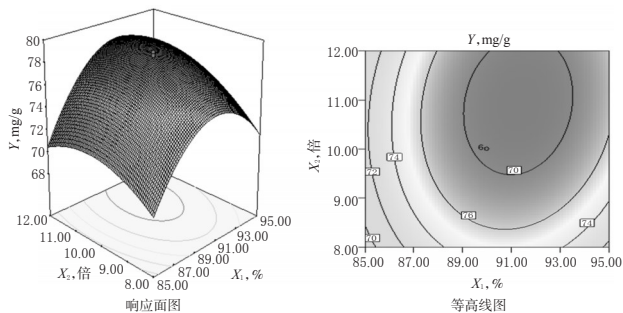


图1  $X_1$ 与 $X_2$ 对总生物碱提取效果影响的等高线和响应面图  
Fig 1 Contour and response surface plot of the effect of  $X_1$  and  $X_2$  on the extraction rate of total alkaloids

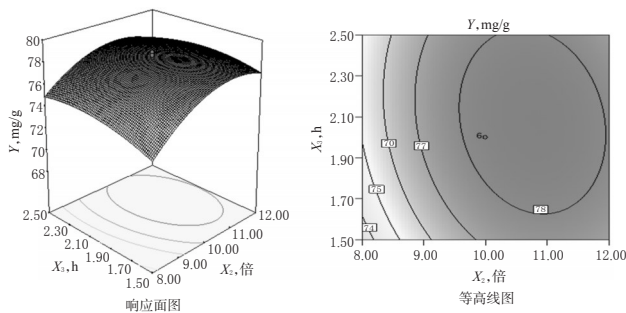


图2  $X_2$ 与 $X_3$ 对总生物碱提取效果影响的等高线和响应面图  
Fig 2 Contour and response surface plot of  $X_2$  and  $X_3$  on the extraction rate of total alkaloids

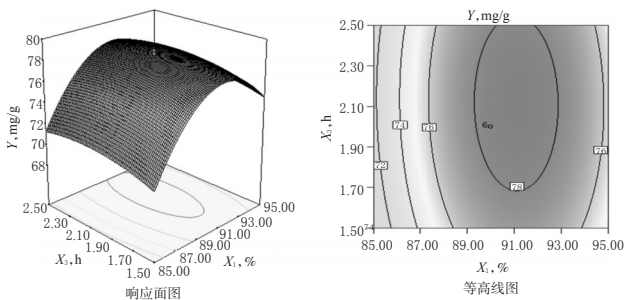


图3  $X_1$ 与 $X_3$ 对总生物碱提取效果影响的等高线和响应面图  
Fig 3 Contour and response surface plot of  $X_1$  and  $X_3$  on the extraction rate of total alkaloids

由图1、图2、图3可知,乙醇体积分数对总生物碱含量影响显著;随着加醇体积分数的增大,总生物碱含量呈现逐渐升高的趋势;总生物碱含量与提取时间呈正相关关系。即当乙醇体积分数达到90%左右、加醇倍量为10倍时,总生物碱含量相对较高。

### 2.5 验证试验

对模型的可靠性进行进一步验证试验,各因素取值为乙醇体积分数为90%、加醇倍量为10倍、提取时间为1.5 h。结果,5次实测值总生物碱含量分别为77.22、78.62、78.63、77.29、

78.01 mg/g,平均值为77.99 mg/g(RSD=0.95%, $n=5$ ),与模型预测值(78.33 mg/g)间的偏离率[(预测值-实测值)/预测值×100%]为0.43%(小于2%),表明该模型比较可靠。

### 3 讨论

前期试验中本课题组分别对影响刺山柑果中总生物碱提取效率的提取溶媒和加醇倍量进行了预试验,在其基础上确定各因素的取值范围;然后对非连续变量即提取次数进行单因素试验,确定了提取次数为2次;最后对影响总生物碱提取效果的乙醇体积分数、加醇倍量、提取时间进行考察。由试验结果可知,星点设计的理论优化结果与试验值相差不大,采用非线性拟合模型接近客观事实,采用效应面三维图可更为直观、方便地表现各因素对测定指标的影响<sup>[9]</sup>。

通过本课题组对维吾尔药刺山柑新的药用部位刺山柑果进行研究<sup>[10]</sup>,发现其中主要含酚酸类、生物碱类和黄酮类成分,通过对酚酸类成分和生物碱类成分的提取工艺研究进行对比,发现刺山柑果中总生物碱类成分含量(77.99 mg/g)远大于总酚酸类成分的含量(7.34 mg/g),初步表明刺山柑果中生物碱类成分含量较高,从而为后续药效学试验研究奠定基础。在测定总生物碱含量时,可以选择以盐酸水苏碱和甜菜碱为对照。笔者通过预试验发现以甜菜碱为对照时,试验结果重复性较好,因此选择后者为对照测定样品中总生物碱含量<sup>[6]</sup>。

本试验采用星点设计-效应面法,充分考虑到影响刺山柑果总生物碱提取效果的乙醇体积分数、加醇倍量和提取时间的交互作用,在反映出来的效应面上寻求优势的区间,以推导所列因素数值取向范围<sup>[11]</sup>,最终确定最优提取工艺为10倍量90%乙醇提取2次,每次1.5 h。

### 参考文献

- [1] 刘勇民.维吾尔药志:下册[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:868.
- [2] Rivera D, Inocencio C, Obón C, et al. Archaeobotany of capers (Capparis) (Capparaceae) [J]. *Veget Hist Archaeobot*, 2002, 11(4): 295.
- [3] 高莹莹, 敖明章, 万军梅, 等. 维吾尔药刺山柑醇提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. *中药材*, 2007, 30(6): 702.
- [4] 赵军, 杨伟俊, 任远, 等. 刺山柑化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(1): 52.
- [5] Feng X, Lu J, Xin H, et al. Anti-arthritis active fraction of *Capparis spinosa* L. fruits and its chemical constituents [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2011, 131(3): 423.
- [6] 刘志刚, 钱捷, 杨明康. 甜菜碱含量测定方法研究进展[J]. *江西化工*, 2012, 9(3): 9.
- [7] 马丽娜, 白曼, 王景媛, 等. 星点设计-响应面法优化川芎生物碱提取工艺[J]. *中南药学*, 2013, 11(2): 95.
- [8] 阮洪生, 曹玲, 陈志宝, 等. 星点设计-响应面法优选金荞麦提取工艺[J]. *医药导报*, 2013, 32(2): 226.
- [9] 银玲, 张杰红, 彭月, 等. 星点设计-效应面法优化川麦冬总黄酮提取工艺[J]. *中药与临床*, 2012, 3(4): 20.
- [10] 满尔哈巴·海如拉, 薛桂莲, 杨伟俊, 等. 星点设计-响应面法优化维吾尔药刺山柑果总酚酸提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(18): 36.
- [11] 果秋婷, 张小飞. Box-Behnken 效应面法优化多西他赛微乳注射液制备工艺[J]. *中国药房*, 2013, 24(29): 2742.

(收稿日期:2014-02-27 修回日期:2014-10-08)

(编辑:刘萍)