

Plackett–Burman 试验法结合 Box–Behnken 响应面法 优化蒙自藜芦总生物碱的提取工艺

时瑞梓¹, 赵 禹¹, 李 林¹, 尹子丽^{2*}, 许苑南³, 刘 媛⁴

(1. 云南经济管理学院, 云南 昆明 650106; 2. 云南中医药大学/云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南 昆明 650500;
3. 普洱学院生物与化学学院, 云南 普洱 665000; 4. 广州市荔湾区妇幼保健院, 广东 广州 510375)

摘要: 目的 探究蒙自藜芦中总生物碱的最佳提取工艺。方法 通过 Plackett–Burman 试验法筛选出影响蒙自藜芦总生物碱提取量的显著性因素, 运用 Box–Behnken 响应面法优选蒙自藜芦总生物碱提取的最佳工艺。结果 优化得到的提取工艺为粉碎度 3 号筛、液料比 40 mL/g、温度 70.0 °C、提取时间 2 h、提取次数 3 次。在此最佳工艺条件下, 蒙自藜芦总生物碱理论得率为 4.71%, 而实际得率为 4.47%, 实测值与预测值基本相符。结论 优化得到蒙自藜芦总生物碱的提取工艺合理, 可为其后续的应用研究提供参考。

关键词: 蒙自藜芦; 提取工艺; 总生物碱; Plackett–Burman 试验; Box–Behnken 响应面法

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 1000–2723(2025)06–0069–06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000–2723.2025.06.015

Optimization of Extraction Process for Total Alkaloids from *Veratrum mengtzeanum* Loes. by Plackett–Burman Design Combined with Box–Behnken Response Surface Methodology

SHI Ruizhi¹, ZHAO Yu¹, LI Lin¹, YIN Zili², XU Yuannan³, LIU Yuan⁴

(1. Yunnan College of Business Management, Kunming 650106, China; 2. Yunnan University of Chinese Medicine/Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Kunming 650500, China; 3. College of Biology and Chemistry, Pu'er University, Pu'er 665000, China; 4. Guangzhou Liwan District Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 510375, China)

ABSTRACT: **Objective** Exploring the optimal extraction process of total alkaloids from *Veratrum mengtzeanum* Loes. **Methods** Taking the total alkaloid content of *V. mengtzeanum* Loes. measured by acid dye colorimetry as the index, based on five single factor tests of pulverization degree, liquid–solid ratio, extraction temperature, extraction time and extraction times, Plackett–Burman (PB) test design was used to screen the significant factors affecting the extraction amount of total alkaloid. The Box–Behnken design (BBD) was used to optimize the significant factors affecting the extraction process, the multiple linear regression and binomial fitting were performed on the experimental data, and the effect surface method was used to predict and analyze the optimal extraction process. **Results** The optimized extraction process was as follows: grinding degree 3 sieve, liquid–solid ratio 40 mL/g, temperature 70.0 °C, extraction for 2 hours, extraction for 3 times. Under this optimal process, the theoretical yield of total alkaloids in *V. mengtzeanum* Loes. is 4.71%, while the actual yield is 4.47%. The measured values are basically consistent with the predicted values. **Conclusion** The optimized extraction process of total alkaloids from *V. mengtzeanum* Loes. is reasonable, which can provide reference for its subsequent application research.

KEY WORDS: *V. mengtzeanum* Loes.; extraction process; total alkaloid content; Plackett–Burman test; Box–Behnken response surface method

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2023J1491); 云南省科技厅–云南中医药大学应用基础研究联合专项 (202301AZ070001–034, 202101AZ070001–322, 202101AZ070001–196); 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题重点项目 (202210ZD2208)

作者简介: 时瑞梓 (1993–), 女, 讲师, E-mail: 452317089@qq.com

* **通信作者:** 尹子丽 (1982–), 女, 高级实验师, 研究方向: 中药、民族药资源开发与利用, E-mail: zccyzl197974@126.com

蒙自藜芦(*Veratrum mengtzeanum* Loes.)隶属百合科(Melanthiaceae)藜芦属(*Veratrum*)植物,又名披麻草、藜芦、小棕包等,主要分布于云南东南部至西北部,贵州部分地区也有分布^[1]。现代药理学研究证实,蒙自藜芦蕴含多种生物活性成分,其在防治心血管疾病及抗炎镇痛方面作用显著,具体表现为能够降低血压、抑制血小板聚集与血栓形成,并兼具抗炎镇痛及抗肿瘤等药理活性作用^[2]。据文献报道,蒙自藜芦根部含有大量的生物碱,总生物碱类作为众多药用植物的主要成分,具有显著的抗炎、镇痛活性^[3-4]。近年来,国内外学者对蒙自藜芦药材的研究主要集中在总生物碱含量的测定及其药理活性方面^[5-6]。蒙自藜芦生物碱活性明确,但目前所报道提取方法的得率较低。因此,构建一种能够高效提取蒙自藜芦生物碱类成分的方法,对推动蒙自藜芦有效成分在药物研发领域的进展以及拓展蒙自藜芦的应用范围而言,有着极为重要的现实价值。本研究首次采用 Plackett-Burman(PB)实验设计,旨在以较少的实验量,快速筛选出对蒙自藜芦总生物碱热回流提取工艺影响显著的关键参数。藉此,可避免在后续深入优化过程中,因过多关注次要因素而导致资源浪费。基于此,本研究采用 Box-Behnken(BBD)实验设计,针对上述筛选出的 3 个关键因素构建二次多项式回归模型。通过深入解析所得模型的回归方程,进而实现对提取工艺参数的系统优化^[7-9],以期为其后续的应用研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 EX225DZH 电子天平(奥豪斯仪器有限公司);pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);4500A 多功能粉碎机(永康市红太阳有限公司);HH-6 恒温水浴锅(江苏科析仪器有限公司);UV-1800PC-DS2 型紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司)。

1.2 材料 本实验所用蒙自藜芦药材采集于云南省蒙自市,其植物基原经云南中医药大学尹子丽高级实验师鉴定,确认为百合科植物蒙自藜芦(*Veratrum mengtzeanum* Loes.)的干燥根及根茎。芥芬胺对照品(德斯特有限公司,批号:P2387954,纯度:98%),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总生物碱含量的测定

2.1.1 对照品的选择及其溶液的制备 芥芬胺作为藜芦属植物中分离得到的异甾类生物碱,其化学结构具有生物碱的典型特征,与众多生物碱在结构上具有相似性和关联性,故可代表一类生物碱的结构特点^[10]。本研究首先精确称取 5.0 mg 芥芬胺对照品,溶解于三氯甲烷后转移至 5 mL 容量瓶中,并定容作为储备液。继而,精密移取该储备液 1 mL 至 10 mL 容量瓶,最终,经三氯甲烷定容并混匀,制得 $0.098\ 98\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 提取:精密称取供试品粉末 1 g,置于带塞锥形瓶内,先加入浓氨水溶液 2 mL,充分浸润 60 min;之后加入由三氯甲烷与甲醇按体积比 4:1 配制而成的混合溶液 40 mL,置于 70℃ 恒温水浴内,加热回流 2 h;转移与定容:待反应液冷却至室温后滤过,滤液收集于 50 mL 量瓶中,用药渣的洗涤液(三氯甲烷-甲醇溶液,洗涤 2 至 3 次)补足损失,最后加相同溶剂至刻度,摇匀,作为母液;浓缩与定容:从母液中精密量取 1 mL,转移至 25 mL 具塞试管中,于水浴上蒸干溶剂,残渣精密加入 10 mL 三氯甲烷使充分溶解,所得溶液即为供试品溶液^[11-13]。分别精密量取系列供试品溶液各 1 mL,置于分液漏斗中。首先依次加入 5 mL 蒸馏水与 2 mL 0.05% 溴甲酚绿缓冲液,随后再加入 10 mL 三氯甲烷,充分振摇 1 min。溶液经 30 min 静置分层后,分离所得下层三氯甲烷液,用于 415 nm 波长处的吸光度测定。

2.1.3 标准曲线的绘制 为制备系列浓度,分别精密移取“2.1.1”项下对照品溶液 0.2、0.5、1、2、3、4 mL 至 25 mL 具塞试管。经水浴蒸干后,各管精确加入 10 mL 三氯甲烷进行复溶。通过线性回归分析,建立了以对照品浓度(X)为自变量、吸光度(Y)为因变量的标准曲线,并获得其回归方程 $Y = 1.0788X - 0.0294$, $r^2 = 0.9992(n = 5)$ 。

2.2 蒙自藜芦总生物碱提取工艺的单因素试验

2.2.1 药材粉碎度 取蒙自藜芦粉末,过 1、3、5、7、9 号标准筛,分别精密称取不同粉碎度样品 1 g,选用三氯甲烷-甲醇(4:1)混作为提取溶剂,固定提取时间为 2 h,热回流提取 1 次,提取温度为 70℃,考察不同

粉碎度对蒙自藜芦总生物碱的影响,如图 1(a)所示总生物碱提取量过 3 号筛的最高,随着粒径的增加基本没有变化。

2.2.2 液料比 取 6 份蒙自藜芦药材,每份 1 g,精密称定,选用三氯甲烷-甲醇(4:1)混合溶液作为提取溶剂,固定提取时间为 2 h,热回流提取 1 次,实验设定提取温度为 70 ℃,并考察了 10 至 50 mL/g 的液料比范围。结果表明,总生物碱的提取量最初随液料比增大而增加。然而,在液料比达到 40 mL/g 后,继续提高比例对提取量的影响已不显著,表明此时已接近提取平衡。

2.2.3 提取时间 取 6 份蒙自藜芦药材(过 3 号筛),每份 1 g,精密称定,选用三氯甲烷-甲醇(4:1)混合溶液作为提取溶剂,固定液料比为 40 mL/g,热回流提取 1 次,提取温度为 70 ℃,考察提取时间为 0.5、1、1.5、2、3 h 对蒙自藜芦总生物碱提取量的影响,由图

1(c)可知总生物碱提取量呈现先升高后降低的趋势。

2.2.4 提取温度 取 6 份蒙自藜芦药材(过 3 号筛),每份 1 g,精密称定,选用三氯甲烷-甲醇(4:1)混合溶液作为提取溶剂,固定料液比 40 mL/g,提取时间 2 h,热回流提取 1 次,考察提取温度为 50、60、70、80、90 ℃对蒙自藜芦总生物碱的影响,由图 1(d)可知反应前期,随着超声温度的升高,总生物碱得率不断变化,超声温度为 70 ℃时,总生物碱得率达到最大值,之后总生物碱得率反而不断下降。

2.2.5 提取次数 取 6 份蒙自藜芦药材(过 3 号筛),每份 1 g,精密称定,选用三氯甲烷-甲醇(4:1)混合溶液作为提取溶剂,固定液料比 40 mL/g,提取时间 2 h,热回流提取 1 次,提取温度 70 ℃,考察提取次数为 1、2、3、4、5 次对蒙自藜芦总生物碱的影响,由图 1(e)可知提取 3 次总生物碱提取量最大,3 次后提取次数增加提取量趋于平稳。

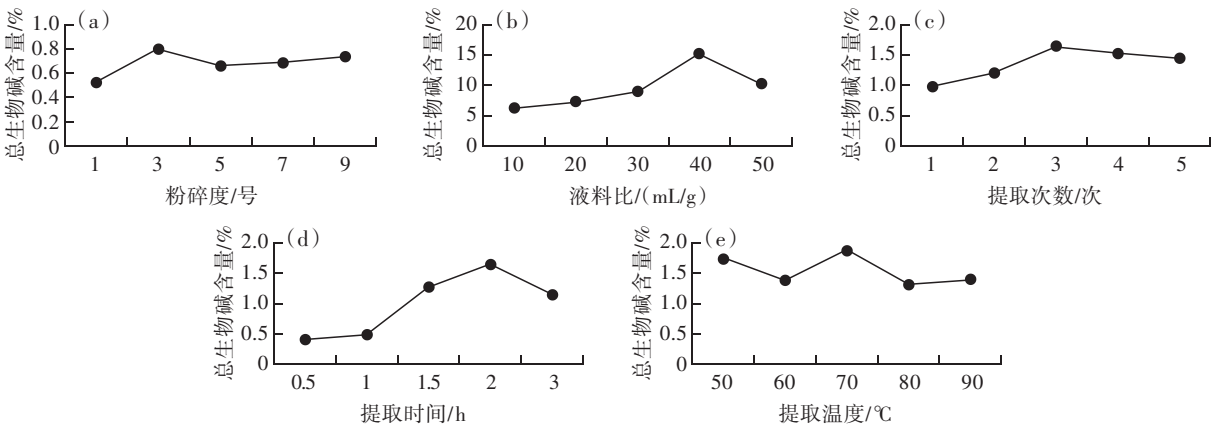


图 1 单因素的实验结果

2.3 Plackett-Burman 试验筛选显著性因素

2.3.1 Plackett-Burman 试验设计及结果 实验确定了 5 个主要影响因素:药材粉碎程度、液固比、提取时间、温度与次数。各因素的水平(-1,+1)根据预实验确定。研究采用 Design-Expert 8.0.6 软件,设计五因

素两水平的试验方案,共包含 12 个试验点,且均独立重复 3 次。相关因素水平与编码见表 1,总生物碱含量(响应值)的测定结果记录在表 2。

2.3.2 Plackett-Burman 试验结果分析 数据的处理通过 Design-Expert 8.0.6 软件完成,包括回归分析与显著性检验,其具体分析数据见表 3。由表 3 可知,所建模型具有显著性。各实验因素对蒙自藜芦总生物碱提取效果的影响程度由大到小依次为:X5(提取次数)> X3(提取时间)> X2(粉碎度)> X1(液料比)> X4(提取温度)。进一步分析表明,粉碎度、提取时间与提取次数对总生物碱含量具有显著影响($P<0.05$),而其余因素影响未达显著水平。根据 F 值比较,不显著因素的影响顺序为 X1(液料比)> X4(提取温度)。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素水平及编码			
因素	编码	低水平(-1)	高水平(+1)
液料比/mL·g ⁻¹	X1	30:1	50:1
粉碎度/号	X2	3	7
提取时间/h	X3	1	2
提取温度/℃	X4	60	80
提取次数/次	X5	1	3

表 2 Plackett–Burman 试验设计及响应值						
编号	X1	X2	X3	X4	X5	总生物碱含量/%
1	50	7	1	60	1	1.90
2	50	7	1	80	3	1.72
3	50	3	2	80	3	1.89
4	30	7	2	60	3	1.65
5	50	3	1	60	3	2.07
6	30	3	1	80	1	1.87
7	30	7	2	80	1	1.83
8	50	3	2	80	1	2.06
9	30	7	1	80	3	1.66
10	50	7	2	60	1	1.61
11	30	3	1	60	1	1.90
12	30	3	2	60	3	1.82

表 3 Plackett–Burman 试验设计各因素效应评价						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Modle	24.80	10	2.48	604.33	0.031 6	$P<0.05$
X1	0.24	1	247.16	34.37	0.083 3	
X2	1.01	1	0.34	0.047	0.040 5	$P<0.05$
X3	5.45	1	9.84	1.37	0.017 5	$P<0.05$
X4	6.406×10^{-3}	1	28.50	3.96	0.429 7	
X5	6.99	1	40.96	5.70	0.015 4	$P<0.05$
残差	4.104×10^{-3}	1				
总差	24.81	11		Z_z		

注:校正系数 $R^2=0.999\ 8$ $R^2_{\text{adj}}=0.998\ 2$

2.4 Box–Behnken 响应面法优化提取工艺

2.4.1 Box–Behnken 响应面法试验及结果 根据单因素实验及 Plackett–Burman 实验的结果,将液料比与提取温度分别设定为 40 mL/g 和 70 ℃作为固定条件。选取对蒙自藜芦总生物碱含量具有显著影响的 3 个因素——粉碎度(A)、提取时间(B)和提取次数(C)。作为响应面分析的自变量,依据 Box–Behnken 实验设计方法,确立了 3 个因素与 3 个水平,完成了包含 17 组试验(每组重复 3 次)的方案构建。实验以总生物碱含量为指标进行响应面分析,其具体因素水平设计与分析结果分别记录在表 4 和表 5 中。

2.4.2 响应面模型的建立及分析 基于表 5 中的实

表 4 Box–Behnken 试验设计因素水平			
因素	水平		
	−1	0	1
粉碎度(A)/号	3	5	7
提取时间(B)/h	1	1.5	2
提取次数(C)/次	1	2	3

表 5 Box–Behnken 试验设计及结果				
编号	(A)/号	(B)/h	(C)/次	总生物碱含量/%
1	3	1.5	3	3.87
2	5	1.5	2	2.65
3	7	2	2	2.18
4	5	2	1	2.84
5	7	1	2	2.62
6	5	1	3	2.94
7	3	1	2	2.68
8	5	1	1	2.76
9	3	2	2	3.93
10	5	2	2	2.77
11	5	2	2	2.55
12	5	2	2	2.64
13	7	1	1	2.01
14	5	3	3	3.94
15	3	1	1	3.55
16	5	2	2	2.72
17	7	2	3	3.55

验数据,利用 Design Expert 8.0.6 软件进行回归拟合,最终建立了以总生物碱含量(Y)为响应值,关于粉碎度(A)、提取时间(B)与提取次数(C)的三元二次回归方程, $Y=2.67-0.46A+0.24B+0.39C-0.42AB+0.31AC+0.23BC+0.16A^2+0.031B^2+0.42C^2$,所得回归方程的校正系数 r^2 为 0.985 9,证实了该模型具有良好的拟合优度。因此,该模型能够对蒙自藜芦总生物碱的提取工艺条件进行可靠的分析与预测。根据回归模型的显著性检验结果(表 6),模型 P 值低于 0.000 1,这证明该方程已达到极显著水平;方差分析显示,因素 A、C、AB、 C^2 的 P 值均小于 0.01,表明这些项对总生物碱含量(Y)均产生了极具显著性的影响。同时,失拟项的 P 值为 0.204 3(大于 0.05),说明模型

不存在显著的失拟因素,这佐证了该回归方程能够有效地替代真实试验点用于分析。此外,根据各因素的效应大小,其影响主次顺序确定为 $A>C>B$ 。

表6 回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	F值
Modle	5.57	9	0.62	54.38	<0.000 1
A	1.68	1	1.68	148.07	<0.000 1
B	0.45	1	0.45	39.27	0.000 4
C	1.23	1	1.23	108.39	<0.000 1
AB	0.71	1	0.71	62.80	<0.000 1
AC	0.37	1	0.37	32.72	0.000 7
BC	0.21	1	0.21	18.61	0.003 5
A2	0.10	1	0.10	8.98	0.020 0
B2	3.981×10^{-3}	1	3.981×10^{-3}	0.35	0.572 6
C2	0.75	1	0.75	66.33	<0.000 1
残差	0.080	7	0.011	失拟项	0.051
3	0.017	2.11	0.204 3	纯误差	0.028
4	7.030×10^{-3}			总差	5.64
16					

注:校正系数 $R^2=0.985\ 9$ $R_{Adj}^2=0.967\ 8$

2.4.3 蒙自藜芦总生物碱提取工艺条件的确定 应用 Design-Expert 8.0.6 软件,画出响应曲面,分析粉碎度(A)、提取时间(B)、提取次数(C)对总生物碱含量值(Y)的影响情况,结果见图2。根据图2所示,提取次数与提取时间二者之间的交互作用强度相对最弱;相比之下,粉碎度与提取时间之间的交互效应则最为显著。应用 Design-Expert 8.0.6 软件得出最佳工艺:粒径过3号筛、提取时间2 h、提取次数3次,在该条件下的蒙自藜芦总生物碱理论得率为4.71%。

2.4.4 验证实验 通过 Box-Behnken 法优化,经优化验证,确定蒙自藜芦中总生物碱的最佳提取工艺参数如下:原料粉碎后过3号筛,提取温度设定为70℃,液料比为40:1(mL/g),累计提取3次,每次2 h。在此条件下,总生物碱的理论得率可达4.71%。根据试验条件:粒径过3号筛、提取时间2 h、提取次数3次,对蒙自藜芦中总生物碱进行提取。结果表明,提取蒙自藜芦中总生物碱平均提取得率为4.47%,与模型得率接近,RSD为1.53(n=3)。以上结果证实,本研究构建的模型具备良好的预测能力,据此筛选出

的纯化工艺条件稳定可靠。

3 讨论

蒙自藜芦中生物碱是主要有效的活性成分,具有抗血栓、降血压、抗炎镇痛以及抗肿瘤作用^[14]。蒙自藜芦的主要生物碱成分为甾体生物碱,其结构与百合科贝母相似。因此,本研究参考《中国药典》(2020版)川贝母的提取流程,对冷浸法、超声提取法及热回流法进行了对比研究,最终确定热回流法的提取率最高。在前期工作基础上,本研究首先运用 Plackett-Burman 设计,从多项参数中筛选出对蒙自藜芦提取效果影响显著的5个因素。进而,联合采用 Box-Behnken 响应面法,以三因素三水平设计实验,构建回归模型。通过对效应面数据进行解析,并兼顾实验成本与操作可行性,最终优化得出最佳纯化工艺:原料过3号筛,提取时间2 h,提取3次,温度70℃,液料比40 mL/g。验证实验表明,总生物碱的平均提取得率与模型预测值高度吻合,证实了该模型的预测准确性及工艺的稳定性。本研究为其后续开发提供了坚实的理论与实验支撑。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》委员会. 中华本草[M]. 8版. 上海:上海科学出版社,1998:182-183,188.
- [2] 成孟华,饶高雄. 藜芦属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药,2021,52(18): 5758-5774.
- [3] YUE C, JIN H W, RUI W, et al. A study on the chemical constituents of *Veratrum nigrum* L. processed by rice vinegar[J]. Journal of Asian natural products research, 2008,10(7): 616-621.
- [4] 汤建,李慧梁,黄海强,等. 藜芦属植物化学成分的研究概况[J]. 药学进展杂志,2006,30(5): 206-212.
- [5] 薛兵. 藜芦植物中生物碱的提取纯化及抑菌活性研究[D]. 南昌:南昌大学,2013.
- [6] 王丹,于志晶,蔡勤安,等. 藜芦中甾体生物碱的研究进展[J]. 东北农业科学,2022,47(1): 151-155.
- [7] 赵玉荣,张乐,郭佳慧,等. Plackett-Burman 设计结合响应面法优化苦参中氧化苦参碱提取工艺[J]. 广州化工, 2021,49(9): 73-76.
- [8] 张鑫,孙敬蒙,宁劲涛,等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 响应面法优化5-氨基水杨酸固体脂质纳米粒的制备及表征[J]. 中国医院药学杂志,2021,41(22):2292-2299.

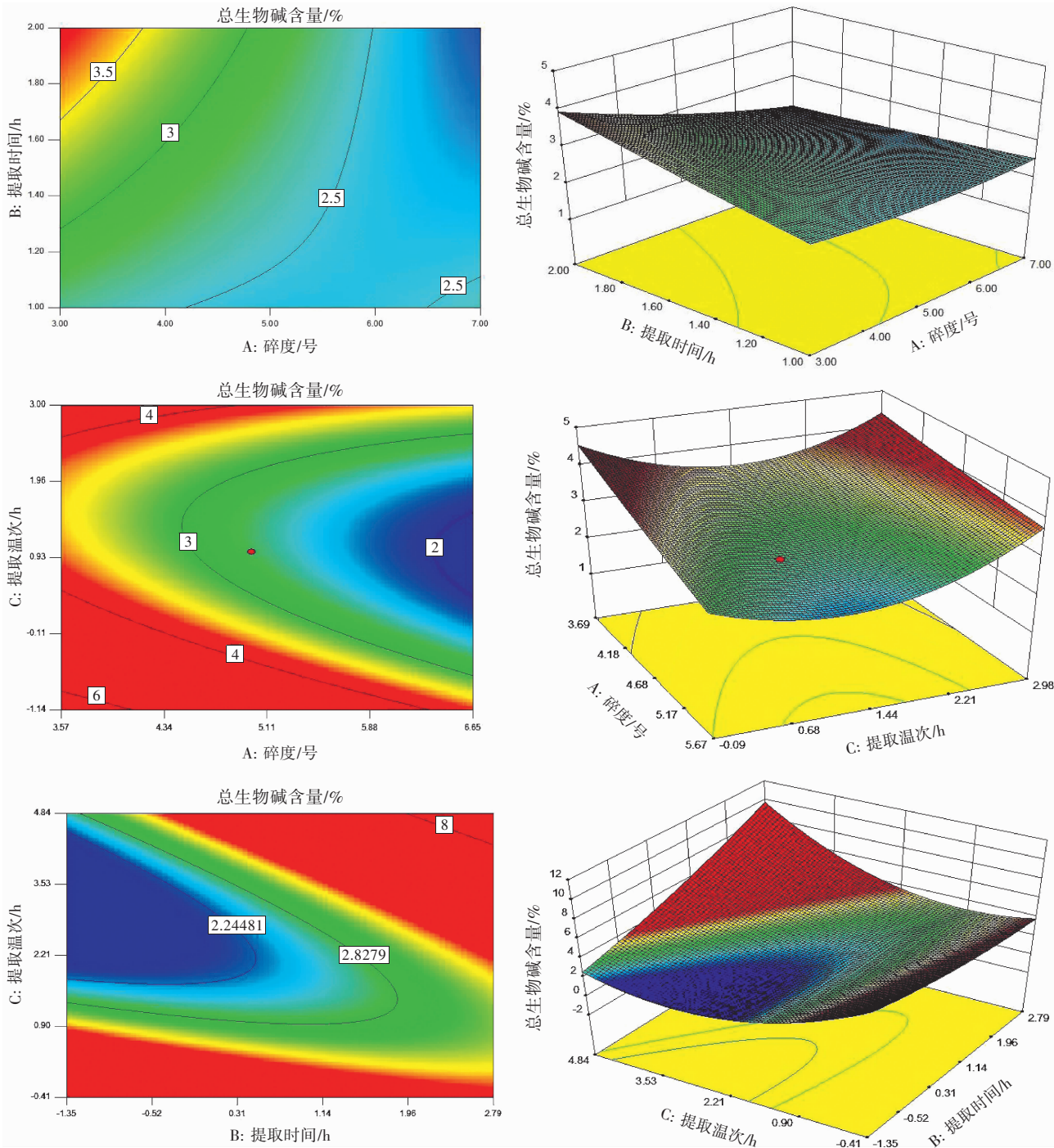


图 2 各因素间的交互作用对蒙自藜芦总生物碱得率影响的响应面图

[9] 李洁,石晓峰,叶倩女,等. Plackett–Burman 设计结合 Box–Behnken 响应面法优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2023,40(1):68–74.

[10] 朱花兰. 毛穗藜芦乙酸乙酯部位化学成分研究[D]. 郑州:河南大学,2014.

[11] 梁雨娜,程杰,张屏,等. 酸性染料比色法测定蒙药阿格希日嘎中生物碱含量[J]. 中国民族民间医药,2021,30(14):34–38.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:37–38.

[13] 林莉,刘奇. 制川贝母质量标准研究[J]. 中药与临床, 2016,7(6):5–9,12.

[14] 王丹,于志晶,蔡勤安,等. 藜芦中甾体生物碱的研究进展[J]. 东北农业科学,2022,47(1):151–155.

(收稿日期:2024–10–27)