

星点设计-响应面法优选龙钻通痹方总生物碱大孔树脂纯化工艺

蒋 林¹, 米阿娜¹, 罗宇东², 吴玉强², 李芳婵¹, 周雅琪¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001

2. 广西中医药大学制药厂, 广西 南宁 530001

摘要: 目的 优选龙钻通痹方(LTR)总生物碱的最佳纯化工艺。方法 采用 5 种型号的大孔树脂对 LTR 总生物碱进行吸附与解吸, 以总生物碱的吸附量、吸附率和解吸率为指标, 筛选出较大孔树脂; 然后通过单因素考察和星点设计-效应面法优选 LTR 总生物碱的最佳纯化工艺参数。结果 HPD100 树脂纯化龙钻总生物碱的最佳工艺条件为 pH 值 1.7 的生药质量浓度 0.17 g/mL, 以 1 mL/min 体积流量上样, 9 倍柱体积 80%乙醇以 1 mL/min 洗脱。在该条件下, LTR 总生物碱提取物中总生物碱的质量分数达到了 22.23%, 产品得率为 173.27 mg/g。结论 HPD100 型大孔树脂能较好地用于分离纯化 LTR 总生物碱, 为进一步的药效学研究提供依据。

关键词: 龙钻通痹方; 总生物碱; 大孔树脂; 星点设计-效应面法; 青藤碱; 氯化两面针碱

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)02-0337-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.012

Optimization of purification process for total alkaloids from Longzuan Tongbi Recipe with macroporous resin by central composite design and response surface method

JIANG Lin¹, MI A-na¹, LUO Yu-dong², WU Yu-qiang², LI Fang-chan¹, ZHOU Ya-qi¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Pharmaceutical Factory of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To optimize the optimal purification technology for total alkaloids from Longzuan Tongbi Recipe (LTR).

Methods Five types of macroporous resins were used to adsorb and desorb the total alkaloids in LTR, and the adsorption capacities, adsorption ratios and desorption ratios of total alkaloids were regarded as the indexes to screen out the suitable resin. The purification technology for total alkaloids was optimized from LTR by single factor investigation and central composite design and response surface method. **Results** The best purification technology of total alkaloid from LTR were determined as follows: the concentration of sample solution of 0.17 g/mL (crude drug) with pH 1.7, sample flow rate at 1 mL/min, washing impurity with 9-column volume of 80% ethanol at a flow rate of 1 mL/min. The mass scores of total alkaloids was 22.23% and the yield of that was 173.27 mg/g. **Conclusion** HPD100 resin has good purification effect on total alkaloids from LTR, which could provide reference for the further study of pharmacodynamics.

Key words: Longzuan Tongbi Recipe; total alkaloids; macroporous resin; central composite design and response surface method; sinomenine; nitidine chloride

壮药龙钻通痹方(Longzuan Tongbi Recipe, LTR)由飞龙掌血、大钻、两面针、青风藤、九龙藤、鸡血藤、五指毛桃根和八角枫组成, 临床上可以明显降低患者的血沉, 改善患者的晨僵、关节疼

痛、关节肿胀等症状, 以及改善关节压痛和关节功能, 对类风湿性关节炎有较好的疗效^[1]。文献资料分析发现龙钻通痹方中主药飞龙掌血、大钻及帮药八角枫、两面针、青风藤中生物碱类成分具有抗风

收稿日期: 2017-08-15

基金项目: 广西高校壮医药基础与应用研究重点实验室课题(桂教科研[2014]6号 zyfy201503, 桂教科研[2016]6号 zyfy201608); 南宁市科技局项目(20163353); 广西壮族自治区科技厅项目(桂科 AB16380186)

作者简介: 蒋 林, 男, 教授级高级工程师, 主要研究方向为药品及保健食品的新产品研发。

Tel: 18677155109 E-mail: 1009100482@qq.com

湿的作用,为其抗风湿的有效成分之一^[2]。目前,已有报道采用星点设计-效应面法(central composite design and response surface method, CCD-RSM)优选 LTR 总生物碱的最佳提取工艺^[3-5]。本实验开展龙钻通痹方总生物碱提取物的制备工艺及含量测定方法研究,为研发高效的龙钻通痹方有效部位新药提供依据,也为生物碱提取纯化工艺提供研究依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

752 型紫外-可见分光光度仪,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;ME104E 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;SG250HE 超声仪,40 kHz,200 W,上海冠特超声仪器有限公司;LC-2030C 3D 高效液相色谱仪,岛津企业管理有限公司;色谱柱(500 mm×10 mm、800 mm×50 mm),上海银泽仪器设备有限公司;SIN-pH100 便携式 pH 计,杭州联测自动化技术有限公司。

1.2 试剂与材料

甲醇,批号 2016121201,分析纯,成都市科龙化工试剂厂;柠檬酸(批号 1507071)、柠檬酸钠(批号 1503131),分析纯,西陇化工股份有限公司;溴百里香酚蓝(20121229,分析纯)及大孔树脂 D101、AB-8,天津市光复精细化工研究所;三乙胺,批号 20151209,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;大孔树脂 NKA-9、HPD100、X-5,河北省沧州宝恩吸附材料科技有限公司;乙腈、甲醇,色谱纯,Fisher 公司。

1.3 对照品与样品

对照品青藤碱(批号 110774-200507,质量分数≥98%)、氯化两面针碱(批号 110848-200603,质量分数≥98%),购自中国食品药品检定研究院;LTR 总生物碱浸膏(批号 20160501,自制,每克相当于生药 7.78 g)。

2 方法与结果

2.1 评价指标的确定

在上柱工艺研究过程中,考虑到损失率,在泄漏时即停止上样,上样流出液中生物碱类成分量较低,无法测定单一生物碱的量,因此以总生物碱的比吸附量为指标优选上柱工艺参数。

比吸附量=(上样液总生物碱含量-上柱流出液总生物碱含量)/湿树脂质量

在洗脱工艺研究中,本课题主要是研究总生物碱的富集纯化工艺,因此总生物碱在洗脱工艺中占

较大的比重,而单一成分在洗脱工艺研究中也占有一定的权重,青藤碱为方中帮药青风藤抗风湿的主要有效成分,氯化两面针碱为方中主药飞龙掌血、两面针的指标性成分,因此选用总生物碱、青藤碱和氯化两面针碱的比解吸量(总生物碱比解吸量=洗脱液中总生物碱质量/湿树脂质量)为指标进行洗脱工艺优选^[6]。

2.2 总生物碱定量测定^[3]

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取青藤碱对照品 5.14 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,摇匀,制成 0.514 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 称取飞龙掌血 4 g、大钻 6 g、八角枫 2 g、两面针 2 g、青风藤 3 g,加入 8 倍量 80%乙醇。回流提取 2 次,每次 120 min,滤过,洗净滤纸,合并滤液蒸干。取 1/10 浸膏,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声(200 W,40 kHz)30 min,放冷,补足减失的质量,滤过,取续滤液即为供试品溶液(每毫升相当于原生药 0.17 g)。

2.2.3 测定方法 精密吸取供试品溶液 0.1 mL 于分液漏斗中,挥干甲醇,加入 3 mL pH 值 4.2 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,再加 4 mL 溴百里香酚蓝试液摇匀,用 20 mL 氯仿(7、7、6 mL)萃取,氯仿液定容于 20 mL 量瓶中,于 415 nm 波长下,以随行氯仿液为空白,测定吸光度(*A*)值,计算供试品中总生物碱量。

2.2.4 方法学考察 按“2.2.3”项下方法测定,精密吸取对照品溶液 1、2、4、6、8、10、12 μL 于 415 nm 波长下,测定 *A* 值。以质量为横坐标(*X*),*A* 值为纵坐标(*Y*),进行线性回归,总生物碱(以青藤碱计)在 2.57~12.90 μg/mL,线性关系良好,回归方程为 $Y=60.506X+0.0003$, $r=0.9995$;精密度 RSD 为 0.94%;重复性 RSD 为 2.05%;方法在 4 h 内稳定性良好,RSD 为 1.89%;平均加样回收率为 100.57%,RSD 为 1.91%。

2.3 青藤碱定量测定^[3]

2.3.1 对照品溶液制备 按“2.2.1”项下方法配制对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液制备 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1%三乙胺水溶液(50:50),体积流量 1 mL/min,检测波长 246 nm,进样量 10 μL,理论塔板数按青藤碱

峰计算不低于 1 500^[7]。

2.3.4 方法学考察 精密吸取青藤碱对照品溶液 1、2、4、6、8、10、12 μL 注入高效液相色谱中，按“2.3.3”项下方法操作，记录峰面积。以质量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，结果青藤碱专属性良好，青藤碱在 0.489~5.868 μg ，线性关系良好，回归方程为 $Y=780\,725\,X-7\,768.5$ ， $r=0.999\,9$ ；平均加样回收率为 100.61%，RSD 为 2.31%；重复性 RSD 为 3.16%；精密度 RSD 为 1.23%；样品在 24 h 内稳定性良好，RSD 为 1.10%。

2.4 氯化两面针碱定量测定^[8-9]

2.4.1 对照品溶液制备 精密称取氯化两面针对照品 8.04 mg 于 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解稀释至刻度，摇匀，制成 160.8 $\mu\text{g/mL}$ 氯化两面针碱对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液制备 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液。

2.4.3 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)，流动相为乙腈-水-磷酸-三乙胺 (25:75:1:1)，体积流量 1 mL/min，检测波长 272 nm，进样量 10 μL 。

2.4.4 方法学考察 精密吸取氯化两面针碱对照品溶液 1、2、3、4、5 μL 注入高效液相色谱仪中，按“2.4.3”项下方法操作，记录峰面积。以质量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，氯化两面针碱专属性良好，氯化两面针碱在 106.8~534.0 ng，线性关系良好，回归方程为 $Y=4\times 10^6\,X-18\,564$ ， $r=0.999\,8$ ；平均加样回收率为 101.05%，RSD 为 2.49%；重复性 RSD 为 3.14%；精密度 RSD 为 0.96%；供试品溶液在 24 h 内稳定性良好，RSD 为 1.23%。

2.5 上柱工艺研究^[10-13]

2.5.1 大孔树脂预处理 用 95%乙醇将树脂浸泡 24 h，使其充分膨胀，然后用乙醇清洗至流出液与水混合 (体积比 1:5) 无白色浑浊后，用蒸馏水洗去乙醇，备用。

2.5.2 上样液的制备 取 LTR 总生物碱浸膏 0.64 g 按实验所需要的质量浓度、pH 配制，备用。

2.5.3 大孔树脂型号的筛选

(1) 静态吸附率考察：分别取约 2 g 的 D101、AB-8、X-5、NKA-9、HPD100 型预处理好的树脂，精密称定，置于 100 mL 锥形瓶中，精密加入龙钻上样液 (生药 0.204 g/mL、pH 5.80) 25 mL，称定

质量，每隔 5 min 振摇 10 s，持续 2 h，静置 24 h，以达到饱和吸附，补充减失的质量^[14]。测定龙钻上样液初始总生物碱质量浓度、吸附平衡后总生物碱质量浓度，根据测定结果，计算各树脂的静态吸附率。平行 3 次，计算平均值，结果见表 1。

(2) 静态解吸率考察：将上述静态吸附饱和的树脂用蒸馏水洗净，挥干水分，将树脂倒回 100 mL 锥形瓶中，精密加入 80%乙醇 20 mL，称定质量，每隔 5 分钟振摇 10 s，持续 2 h，静置 24 h，使其充分解析，补充减失的质量，测定解析液中生物碱的量。根据测定结果，计算各树脂的静态解吸率。平行 3 次，计算平均值，结果见表 1。结果表明，HPD100 树脂对 LTR 总生物碱的吸附和解吸效果优于其他树脂，因此本实验选用 HPD100 树脂纯化 LTR 总生物碱。

吸附量=(初始质量浓度-平衡质量浓度) $\times$ 龙钻上样液体积/湿树脂质量

吸附率=1-平衡质量浓度/初始质量浓度

解吸率=解吸液总生物碱质量/(吸附量 $\times$ 湿树脂质量)

表 1 大孔树脂对龙钻通痹方中总生物碱的吸附能力 ($n=3$)
Table 1 Adsorption capability of total alkaloids from LTR ($n=3$)

树脂型号	吸附量/(mg $\cdot$ g ⁻¹)	吸附率/%	解吸率/%
AB-8	8.91	55.76	37.17
D101	9.12	57.18	39.50
NKA-9	8.32	52.02	52.56
HPD100	10.52	65.95	73.08
X-5	11.05	69.04	67.70

2.5.4 单因素考察上柱工艺

(1) 上样液 pH 值考察：取预处理好的 HPD100 树脂约 6 g，精密称定，湿法装柱，取 LTR 总生物碱浸膏 0.64 g，分别配制成 pH 值约为 1.5、3.5、5.5、7.5 的 50 mL 龙钻上样液，抽滤，控制上样体积流量为 1 mL/min 上样。测定上样液、上柱流出液中总生物碱的量，计算比吸附量，平行 3 次，计算平均值。结果比吸附量分别为 2.19、2.48、1.96、0.91 mg/g，RSD 分别为 1.65%、1.23%、1.02%、1.10%，表明上样液的最佳 pH 值为 3.5。

比吸附量=(上样液总生物碱质量浓度-上样流出液总生物碱质量浓度)/湿树脂质量

(2) 上样液质量浓度考察：取预处理好的 HPD100 树脂约 6 g，精密称定，湿法装柱，取 LTR

总生物碱浸膏 0.64 g, 调 pH 值为 5.5, 分别配制成 100、50、25 mL (质量浓度分别为 6.4、12.8、25.6 mg/mL, 对应生药质量浓度分别为 50.4、100.8、201.5 g/L), 抽滤, 控制上样体积流量为 1 mL/min 进行上样。测定上样液、上样流出液中总生物碱的量, 计算比吸附量, 平行 3 次, 计算平均值。结果比吸附量分别为 4.04、4.02、3.80 mg/g, RSD 分别为 0.65%、0.66%、0.70%, 表明上样液的最佳浓度为生药 0.1 g/mL。

(3) 上样体积流量考察: 取预处理好的 HPD100 树脂约 6 g, 精密称定, 湿法装柱, LTR 总生物碱提取物 0.64 g, 配制成 pH 值 5.5 的 50 mL 的龙钻上样液, 抽滤, 分别控制上样体积流量为 0.5、1.0、1.5 mL/min 上样, 测定上样液、上样流出液中总生

物碱的量, 计算比吸附量, 平行 3 次, 计算平均值。结果比吸附量分别为 4.07、4.02、3.44 mg/g, RSD 分别为 0.65%、0.66%、0.29%, 考虑成本, 上样最佳体积流量为 1.0 mL/min。

2.5.5 CCD-RSM 考察上柱工艺

(1) 星点试验设计: 影响上柱工艺的主要因素有上样液 pH 值 (A)、上样液质量浓度 (以生药计, B)、上样体积流量 (C)。根据星点设计原理, 采用 3 因素 5 水平试验, 水平用代码值 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α 来表示。因素水平见表 2。依据因素水平表, 称取 LTR 总生物碱浸膏 0.9 g, 按表 2 分别制备上样液, 按表 4 体积流量上柱。测定上样液、上样流出液中总生物碱量, 计算比吸附量, 平行 3 次, 计算平均值, 结果见表 2。

表 2 LTR 总生物碱上柱工艺星点设计试验及结果 ($n=3$)

Table 2 Results of on column process of total alkaloids by central composite design ($n=3$)

试验号	A	B/(g·mL ⁻¹)	C/(mL·min ⁻¹)	比吸附量/(mg·g ⁻¹)	试验号	A	B/(g·mL ⁻¹)	C/(mL·min ⁻¹)	比吸附量/(mg·g ⁻¹)
1	2.35 (-1)	0.08 (-1)	0.7 (-1)	5.80	11	3.50 (0)	0.05 ($-\alpha$)	1.0 (0)	5.61
2	4.65 (1)	0.08 (-1)	0.7 (-1)	4.86	12	3.50 (0)	0.20 (α)	1.0 (0)	6.20
3	2.35 (-1)	0.17 (1)	0.7 (-1)	7.07	13	3.50 (0)	0.10 (0)	0.5 ($-\alpha$)	5.67
4	4.65 (1)	0.17 (1)	0.7 (-1)	5.87	14	3.50 (0)	0.10 (0)	1.5 (α)	5.52
5	2.35 (-1)	0.08 (-1)	1.3 (1)	5.74	15	3.50 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	5.57
6	4.65 (1)	0.08 (-1)	1.3 (1)	4.77	16	3.50 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	5.55
7	2.35 (-1)	0.17 (1)	1.3 (1)	6.95	17	3.50 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	5.06
8	4.65 (1)	0.17 (1)	1.3 (1)	5.93	18	3.50 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	5.11
9	1.50 ($-\alpha$)	0.10 (0)	1.0 (0)	8.49	19	3.50 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	4.96
10	5.50 (α)	0.10 (0)	1.0 (0)	6.94	20	3.50 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	5.08

(2) 效应面法数据处理: 采用 Design-Expert.V 8.0.6 软件, 以 A、B、C 为自变量, 比吸附量为因变量 (Y), 进行多元线性回归和二项式拟合, 结果多元线性回归为 $Y=5.835\ 90-0.485\ 96\ A+0.406\ 95\ B-0.033\ 533\ C$ ($r=0.591\ 7$, $P=0.068\ 8$); 二项式拟合为 $Y=5.219\ 5-0.485\ 96\ A+0.406\ 95\ B-0.033\ 533\ C-0.037\ 625\ AB+0.018\ 625\ AC+0.012\ 875\ BC+0.730\ 8\ A^2+0.126\ 97\ B^2+0.022\ 802\ C^2$ ($r=0.938\ 1$, $P=0.001\ 5$)。

从方程的 P 值来看, 多元线性模型的 $P>0.05$, 而二次多项式拟合模型的 $P<0.05$, 说明二次多项式拟合模型具有显著性。从拟合方程的相关系数可知二项式拟合方程的相关系数 ($r=0.938\ 1$) 明显高于多元线性拟合方程的相关系数 ($r=0.591\ 7$), 表明自变量与 Y 之间线性相关性比较差, 所以不宜使

用线性回归模型, 而二次多项式模型 $r=0.938\ 1$, 接近 1, 说明二次多项式方程模型能够对数据进行很好的拟合, 表明该上柱工艺各项指标采用二次多项式方程拟合更为恰当, 故选择二次多项式拟合方程优选工艺参数。并对模型采用 F 检验进行方差分析, 结果见表 3。由表 3 可知二项式拟合模型具有显著性 ($P<0.05$), 说明该模型预测与实验的实际拟合较好。方程中一次项 A、B, 交互项 A^2 对比吸附量有显著性影响 ($P<0.05$), 因此各因素与指标之间不是简单的线性关系, 而是具有二次关系, 且相关系数 r 值高于多元线性拟合的相关系数, 二项式拟合的可信度及预测性更好, 可利用该模型分析预测最佳工艺条件。

(3) 上柱工艺优化和预测: 根据上述二次多项式拟合模型, 分别固定一个自变量为中间值, 绘制

表 3 上柱条件方差分析结果

Table 3 Regression analysis of column condition

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值	方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值
模型	14.17	9	8.15	0.001 5	A ²	8.41	1	43.52	<0.000 1
A	3.31	1	17.11	0.002 0	B ²	0.25	1	1.31	0.278 4
B	2.32	1	12.00	0.006 1	C ²	8.189×10 ⁻³	1	0.042	0.841 1
C	0.016	1	0.081	0.781 2	残差	1.93	10		
AB	0.011	1	0.059	0.813 6	失拟项	1.58	5	4.42	0.064 4
AC	2.775×10 ⁻³	1	0.014	0.907 0	纯误差	0.36	5		
BC	1.326×10 ⁻³	1	6.861×10 ⁻³	0.935 6	总差	16.11	19		

因变量比吸附量随自变量变化的三维效应面图和二维等高线图, 见图 1。通过等高线图, 可知壮药 LTR 总生物碱 HPD100 大孔树脂上柱的较佳工艺范围为 pH 值 1.5~1.78、生药质量浓度 0.15~0.20 g/mL、体积流量 0.5~1.0 mL/min。综合考虑生产成本及操作可控性, 该试验选取的最佳上柱工艺应为 pH 值为 1.7 的生药 0.17 g/mL 的上样液以 1 mL/min 体积流量上样。

(4) 验证实验: 取 LTR 总生物碱浸膏 9 g, 配制成 pH 值 1.7 的生药 0.17 g/mL 的龙钻上样液, 以

1 mL/min 体积流量上样, 测定上样液、上样流出液中总生物碱量, 计算比吸附量, 平行 3 次, 计算平均值。结果 3 次验证试验的比吸附量分别为 6.41、6.54、6.49 mg/g, 平均值为 6.48 mg/g。与按照拟合方程计算得到的预测值结果(6.590 5 mg/g)偏差[偏差=(预测值-实际值)/预测值]为 1.67%, 表明优选的上柱工艺预测性良好, 所选工艺条件重现性好。

2.6 洗脱工艺研究^[15]

2.6.1 单因素考察洗脱工艺

(1) 洗脱液体积考察: 取预处理好的 HPD100

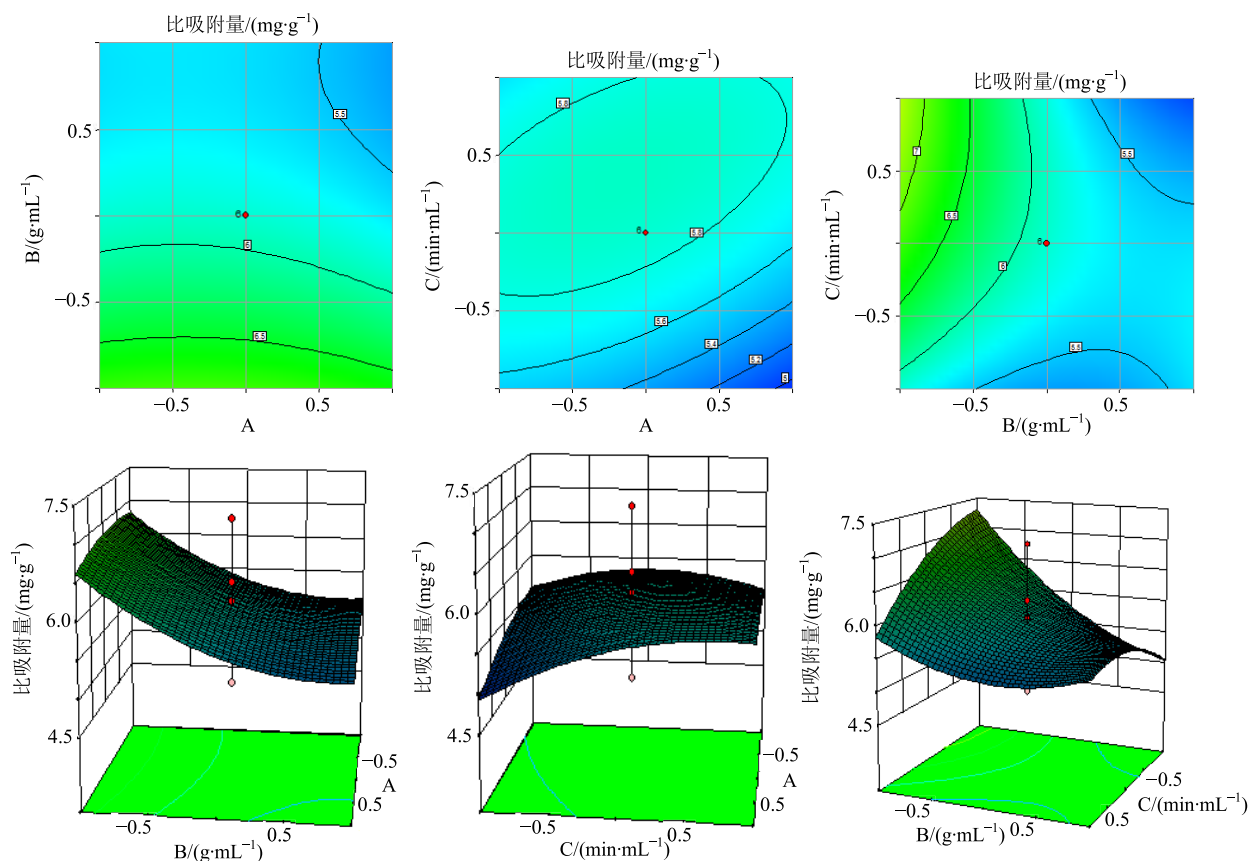


图 1 上样液质量浓度、pH 值和上样体积流量对比吸附量的影响

Fig. 1 Effects of concentration of sample solution, pH value, and sample flow rate on adsorption capability

树脂约 6 g, 精密称定, 湿法装柱, 取 50 mL pH 值 1.7 的生药 0.17 g/mL 的龙钻上样液, 以 1 mL/min 体积流量上样, 再分别用 4、6、8、10 倍柱体积的 95%乙醇以 1 mL/min 的体积流量洗脱, 测定洗脱液中总生物碱的量, 计算比解吸量, 平行 3 次, 计算平均值。结果比解吸量分别为 1.93、3.62、4.30、4.11 mg/g, RSD 分别为 1.04%、0.73%、0.62%、0.64%, 结果表明洗脱液用 8 倍柱体积即可。

总生物碱比解吸量=洗脱液中总生物碱质量/湿树脂质量

(2) 洗脱液体积分数考察: 取预处理好的 HPD 100 树脂约 6 g, 精密称定, 湿法装柱, 取 50 mL pH 值 1.7 的生药 0.17 g/mL 的龙钻上样液, 以 1 mL/min 体积流量上样, 再分别用 6 倍柱体积的 15%、35%、55%、75%、95%乙醇以 1 mL/min 的体积流量洗脱, 测定洗脱液中总生物碱的量, 计算比解吸量, 平行 3 次, 计算平均值。结果比解吸量分别为 1.03、1.79、2.61、3.48、3.52 mg/g, RSD 分别为 0.97%、1.12%、1.01%、0.57%、0.75%, 表明洗脱液体积分数为 75%, 洗脱效果最好。

(3) 洗脱液体积流量考察: 取预处理好的 HPD 100 树脂约 6 g, 精密称定, 湿法装柱, 取 50 mL pH 值 1.7 的生药 0.17 g/mL 的龙钻上样液, 以 1 mL/min 体积流量上样, 再分别用 8 倍柱体积的 95%乙醇以 0.5、1.0、1.5 mL/min 的体积流量洗脱, 测定洗脱液中总生物碱的量, 计算比解吸量, 平行 3 次, 计算平均值。结果比解吸量分别为 3.65、3.58、1.88 mg/g, RSD 分别为 0.42%、0.28%、0.92%, 考虑成本, 洗脱液的最佳体积流量为 1 mL/min。

2.6.2 CCD-RSM 考察洗脱工艺

(1) 星点试验设计: 影响洗脱工艺的主要因素有洗脱剂用量 (A)、洗脱剂乙醇体积分数 (B) 和洗脱体积流量 (C)。根据星点设计原理, 采用 3 因素 5 水平试验, 水平用代码值 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α 来表示。因素水平见表 4。依据因素水平表, 取 50 mL pH 值为 1.7 的生药质量浓度 0.17 g/mL 的龙钻上样液, 以 1 mL/min 的体积流量上样, 然后按表 4 进行洗脱, 洗脱液蒸干, 测定洗脱液中总生物碱、青藤碱及氯化两面针碱的量, 计算比解吸量, 平行 3 次,

表 4 LTR 总生物碱洗脱工艺星点设计试验和结果 ($n=3$)

Table 4 Results of elution process of total alkaloids by central composite design ($n=3$)

试验号	A/BV	B/%	C/(mL·min ⁻¹)	比解吸量/(mg·g ⁻¹)			OD 值
				总生物碱	青藤碱	氯化两面针碱	
1	6.85 (-1)	63.45 (-1)	0.7 (-1)	3.10	1.18	0.07	0.322 8
2	9.15 (1)	63.45 (-1)	0.7 (-1)	3.57	1.11	0.07	0.417 9
3	6.85 (-1)	86.55 (1)	0.7 (-1)	4.56	1.09	0.09	0.762 2
4	9.15 (1)	86.55 (1)	0.7 (-1)	4.87	1.13	0.09	0.897 1
5	6.85 (-1)	63.45 (-1)	1.3 (1)	4.44	1.03	0.07	0.509 6
6	9.15 (1)	63.45 (-1)	1.3 (1)	4.36	1.23	0.07	0.721 8
7	6.85 (-1)	86.55 (1)	1.3 (1)	4.07	1.03	0.09	0.508 6
8	9.15 (1)	86.55 (1)	1.3 (1)	4.51	1.05	0.09	0.678 5
9	6.00 (- α)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.48	1.16	0.06	0.623 4
10	10.00 (α)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.69	1.14	0.07	0.748 0
11	8.00 (0)	55.00 (- α)	1.0 (0)	2.65	0.99	0.05	0.000 0
12	8.00 (0)	95.00 (α)	1.0 (0)	3.79	1.09	0.07	0.463 5
13	8.00 (0)	75.00 (0)	0.5 (- α)	3.87	1.15	0.09	0.622 9
14	8.00 (0)	75.00 (0)	1.5 (α)	3.70	1.03	0.09	0.439 7
15	8.00 (0)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.36	1.07	0.09	0.692 7
16	8.00 (0)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.41	1.04	0.09	0.647 0
17	8.00 (0)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.25	1.00	0.09	0.474 0
18	8.00 (0)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.51	1.06	0.09	0.704 7
19	8.00 (0)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.45	1.05	0.09	0.678 0
20	8.00 (0)	75.00 (0)	1.0 (0)	4.57	1.05	0.09	0.696 0

计算平均值。另外将表 4 中的总生物碱（以青藤碱计）、青藤碱和氯化两面针碱提取量的数值标准化为 0~1 的归一值（desirability, d ）， $d=(Y_i-Y_{\min})/(Y_{\max}-Y_{\min})$ 。并将归一值求加权算术几何平均数，得加权总评归一值（overall desirability, OD）。 $OD=d_1^{0.6}\times d_2^{0.2}\times d_3^{0.2}$ 。结果见表 4。

青藤碱比解吸量=洗脱液青藤碱质量/湿树脂质量

氯化两面针碱比解吸量=洗脱液氯化两面针碱质量/湿树脂质量

（2）效应面法数据处理：采用 Design-Expert.V 8.0.6 软件，以 A、B、C 为自变量，以总生物碱（以青藤碱计）、青藤碱和氯化两面针碱比解吸量的 OD 为因变量进行多元线性回归和二项式拟合，结果多元线性回归为 $Y=-0.520\ 87+0.050\ 595\ A+0.010\ 313\ B-0.076\ 411\ C$ ， $r=0.589\ 0$ ， $P=0.071\ 4$ ；二项式拟合为 $Y=-5.998\ 41-0.439\ 09\ A+0.176\ B+2.505\ 26\ C+0.000\ 070\ 312\ 5\ AB+0.060\ 788\ AC-0.035\ 734\ BC+0.026\ 477\ A^2-0.000\ 870\ 107\ B^2-0.193\ 97\ C^2$ ， $r=0.923\ 6$ ， $P=0.003\ 7$ 。

从方程的 P 值看，多元线性模型的 $P>0.05$ ，而二次多项式拟合模型的 $P<0.05$ ，说明二次多项式拟合模型具有显著性。从拟合方程的 r 可知，二项式拟合方程的相关系数（ $r=0.923\ 6$ ）明显高于多元线性拟合方程的相关系数（ $r=0.589\ 0$ ），表明自变量与 Y 之间线性相关性比较差，所以不宜使用线性回归模型，而二次多项式模型 $r=0.923\ 6$ ，接近 1，说明二次多项式方程模型能够对数据进行很好的拟合，说明该洗脱工艺各项指标采用二次多项式方程拟合更为恰当，故选择二次多项式拟合方程优选工艺参数。并对模型采用 F 检验进行方差分析，结果见表 5。

由表 5 可知二项式拟合模型具有显著性（ $P<0.05$ ），说明该模型预测与实验的实际拟合较好。方程中 1 次项 B，交互项 BC、 B^2 对 OD 值有显著性影响（ $P<0.05$ ），因此各因素与指标之间不是简单的线性关系，而是具有二次关系，且 r 值高于多元线性拟合的相关系数，二项式拟合的可信度及预测性更好，可利用该模型分析预测最佳工艺条件。

表 5 洗脱条件方差分析结果

Table 5 Variance analysis of elution condition

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值	方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.62	9	6.45	0.003 7	A^2	0.020	1	1.83	0.205 8
A	0.048	1	4.46	0.060 9	B^2	0.21	1	19.77	0.001 2
B	0.20	1	18.52	0.001 6	C^2	4.115×10^{-3}	1	0.38	0.549 4
C	6.812×10^{-3}	1	0.64	0.443 9	残差	0.11	10		
AB	7.031×10^{-6}	1	6.559×10^{-4}	0.980 1	失拟项	0.069	5	1.77	0.272 9
AC	3.285×10^{-3}	1	0.31	0.592 1	纯误差	0.039	5		
BC	0.11	1	10.59	0.008 7	总差	0.73	19		

（3）优化和预测：根据上述二次多项式拟合模型，分别固定一个自变量为中间值，绘制因变量 OD 随自变量变化的三维效应面图和二维等高线图，见图 2。通过等高线图，可知洗脱的较佳工艺范围为 A 8.73~9.15 BV、B 77.50%~86.55%、C 0.71~1.29 mL/min。综合考虑生产成本及操作可控性，该试验选取的最佳洗脱工艺应为 9 倍柱体积的 80%乙醇以 1 mL/min 的体积流量洗脱。

（4）纯化工艺验证与放大实验：取 LTR 总生物碱浸膏 9 g，配制成 pH 值 1.7 的生药 0.17 g/mL 的龙钻上样液，以 1 mL/min 体积流量上样。然后用 9 倍柱体积 80%乙醇以 1 mL/min 体积流量洗脱，测定洗脱液总生物碱、青藤碱及氯化两面针碱的量，

分别计算比解吸量。平行 3 次，计算平均值，并计算 OD 值。与按照拟合方程计算得到的预测值结果（OD 值 0.756 0）偏差 1.64%，结果见表 6。结果表明优选的洗脱工艺预测性良好，所选工艺条件重现性好，且产物得率 173.27 mg/g。

3 讨论

在上柱条件考察过程中，考虑到损失率，在泄漏时即停止上样，因此上样流出液中生物碱成分量较低，在 HPLC 上无法测定其氯化两面针碱和青藤碱的量，所以在星点设计-效应面法考察上柱条件过程中仅以总生物碱的比吸附量作为考察指标。在纯化工艺研究中单一成分在综合评价中占有一定的权重，根据壮医药理论，LTR 为主、帮、带组方结构，

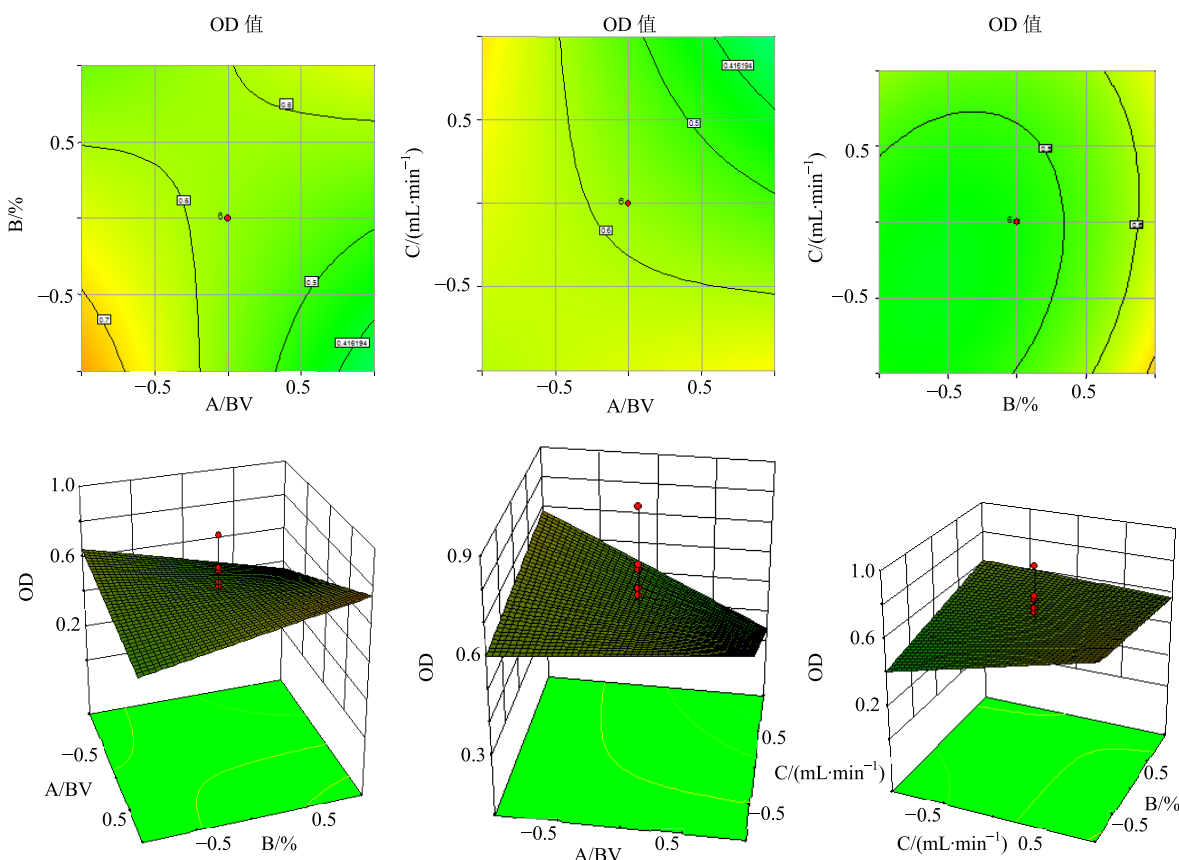


图 2 洗脱液用量、洗脱液质量浓度和洗脱体积流量对比解吸量的影响

Fig. 2 Effects of concentration of eluant solution, pH value, elution flow rate on adsorption capability

表 6 洗脱工艺验证实验结果 ($n = 3$)Table 6 Results of verification test of elution process ($n = 3$)

编号	总生物碱比解吸量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	青藤碱比解吸量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	氯化两面针碱比解吸量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	OD 值	平均值	预测值	偏差率/%
1	4.86	1.07	0.08	0.730 3	0.768 4	0.756 0	1.64
2	4.87	1.09	0.08	0.784 8			
3	4.87	1.07	0.09	0.790 1			

青藤碱^[16-17]为方中帮药青风藤抗风湿的主要有效成分,氯化两面针碱为方中主药飞龙掌血、两面针抗风湿的主要成分^[18-19]。本实验是 LTR 总生物碱的提取富集研究,因此在质量综合评价体系中选择总生物碱、氯化两面针碱、青藤碱的权重比为 6:2:2,能够比较全面反映提取物的内在质量。

本实验通过静态吸附和解析比较了 AB-8、D101、NKA-9、X-5、HPD100 5 种类型的大孔吸附树脂,结果表明 HPD100 树脂对 LTR 总生物碱的吸附和解吸效果好。本实验通过 CCD-RSM 考察了上柱工艺和洗脱工艺,在最佳条件下,LTR 总生物碱提取物中总生物碱的量仅达到 22.23%,未达到有效

部位富集纯化纯度要求 ($>50\%$),因此 LTR 有效部位的富集纯化工艺还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 庞宇舟,邢沙沙,方刚,等.壮药龙钻通痹方治疗类风湿关节炎的临床观察[J].中国民族医药杂志,2013,19(1):1-2.
- [2] 米阿娜,李芳婵,蒋林.龙钻通痹方各药味抗风湿作用及有效部位研究进展[J].中国民族民间医药,2016,25(19):105-108.
- [3] 谭安蕾,刘源焕,庞宇舟,等.星点设计-效应面法优选壮药龙钻通痹颗粒的提取工艺[J].广西中医药,2014(1):74-76.

- [4] 米阿娜, 蒋林, 李芳禅. 星点设计-效应面法优选龙钻通痹方总生物碱提取工艺 [J]. 中国药师, 2017, 20(4): 629-634.
- [5] 李艺丹, 张婷婷, 熊瑞, 等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化雪胆炮制工艺 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 913-917.
- [6] 温羚玲, 郑润生, 许雅萍. 飞龙掌血根的质量研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(1): 136-140.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 赵丽恋, 刘韶, 罗杰英. RP-HPLC 法测定飞龙掌血中氯化两面针碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4): 26-28.
- [9] 覃兰芳, 赖茂祥, 梁威. RP-HPLC 法测定不同产地两面针中氯化两面针碱含量 [J]. 广西科学, 2006(4): 297-299.
- [10] 慕杨娜, 赵森, 贺玲, 等. 两面针总生物碱的纯化研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(1): 51-54.
- [11] 郑孟凯, 何昱, 万海同, 等. 响应面法优化大孔树脂纯化麻黄总生物碱的工艺研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(6): 2079-2084.
- [12] 李岩, 赵欣, 李晓静, 等. 大孔树脂分离纯化天仙子总生物碱的研究 [J]. 中成药, 2015, 37(1): 89-94.
- [13] 杨欣欣, 包永睿, 王帅, 等. 防己生物碱类成分提取纯化工艺研究 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1306-1309.
- [14] 何立巍, 吴晓培, 杨婧妍, 等. 板蓝根总生物碱的提取纯化工艺及其抗病毒药理作用研究 [J]. 中成药, 2014, 36(12): 2611-2614.
- [15] 慕杨娜, 赵森, 贺玲, 等. 两面针总生物碱的纯化研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(1): 51-54.
- [16] 刘微微, 朱尧, 汪悦. 青风藤生物碱的活性成分及药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(8): 1765-1769.
- [17] 王娟, 郑杭生, 魏燕, 等. 盐酸青藤碱挥发油边缘活化 PEG 修饰传递体的离体皮肤渗透研究 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3602-3609.
- [18] 刘志刚, 王翔宇, 毛北萍, 等. 飞龙掌血化学成分研究 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1600-1603.
- [19] 樊洁, 李海霞, 王炳义, 等. 两面针中化学成分的分 离鉴定及活性测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(2): 100-105.