

响应面优化提取山莨菪生物碱的工艺及其抗炎活性研究

丁金^{1,2}, 铁芳芳¹, 胡娜¹, 王洪伦¹, 董琦^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室 青海省藏药研究重点实验室, 西宁 810008;

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:以山莨菪(*Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher)的根为实验材料,以总生物碱的含量为检测指标,应用响应面法对山莨菪根中总生物碱的提取工艺进行了优化。结果显示,当提取条件为液料比61 mL/g,乙醇浓度78%,温度80℃,提取时间2 h,提取2次,山莨菪根提取物中总生物碱的理论含量值可达1.687%,总生物碱含量达到最高值。按照最佳提取工艺条件提取山莨菪根、种子和地上部分的总生物碱,总生物碱的含量分别为(1.639 ± 0.033)%、(0.950 ± 0.019)%、(0.852 ± 0.031)%。通过检测山莨菪生物碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠腹腔巨噬细胞(RAW 264.7)的一氧化氮(NO)的影响,发现20~80 μg/mL的根部和地上部分的生物提取物能够显著抑制RAW 264.7细胞内NO的产生,并呈剂量依赖效应。本研究为山莨菪药材中生物碱提取分离的工业化生产提供理论指导,为明确山莨菪抗炎作用提供了数据支撑,为山莨菪的开发与利用提供了依据。

关键词:山莨菪;总生物碱;提取工艺;响应面法;抗炎

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)Suppl-0073-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.S.011

Study on optimization of the extraction process of total alkaloids in *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher by response surface methodology and its anti-inflammatory activity

DING Jin^{1,2}, TIE Fang-fang¹, HU Na¹, WANG Hong-lun¹, DONG Qi^{1*}

¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology Qinghai Provincial & Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

²University of Chinese Academy Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In this study, the root of *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher was used as the experimental material and the content of total alkaloids was considered as the detection index. The optimum extraction conditions of total alkaloids in *A. tanguticus* roots were investigated using response surface methodology (RSM). The optimum extraction conditions were: liquid-solid ratio of 61:1, ethanol concentration of 78%, extraction temperature of 80℃, extraction times of 2, and extraction time of 2 h, with a theoretical total alkaloid content of 1.687%. According to the optimal extraction process conditions, the total alkaloids from the roots, seeds and above-ground parts of *Anisodus henryi* were extracted, and the total alkaloid contents were (1.639 ± 0.033)%, (0.950 ± 0.019)% and (0.852 ± 0.031)%, respectively. By detecting the effect of anisodus alkaloids on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) in mouse peritoneal macrophages (RAW 264.7), biological extracts of 20-80 μg/mL roots and aerial parts were found it can significantly inhibit the production of NO in RAW 264.7 cells with a dose-dependent effect. This study provides theoretical guidance for the industrial production of the extraction and separation of alkaloids from *A. tanguticus* medicinal materials, provides data support for clarifying the anti-inflammatory effects of *A. tanguticus*, and provides a basis for the development and utilization of *A. tanguticus*.

Key words: *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher; total alkaloids; extraction; response surface methodology; anti-inflammatory

山莨菪(*Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher) 为茄科(Solanaceae)山莨菪属(*Anisodus*)多年生宿根草本。主要分布于青海、西藏、云南和甘肃等地^[1]。藏医常以山莨菪种子和根入药,其根的藏药名为“唐冲那保”或“唐冲纳波”,具有麻醉镇痛、杀虫、镇惊、解毒作用,主要用于治疗病毒恶疮、虫病、皮肤炭疽病及癫狂等症^[2-5]。

目前,山莨菪的化学成分研究主要以生物碱为主,其生物碱结构主要是莨菪烷类生物碱。根据《藏药志》《中国藏药》和相关文献记载^[2,6-10],山莨菪中含有山莨菪碱、莨菪碱、樟柳碱、东莨菪碱、红古豆碱、托品碱、阿托品和去水阿托品等生物碱。

本研究以山莨菪的根为材料,以根提取物中总生物碱的含量为检测指标,应用响应面法优化山莨菪根中总生物碱的提取工艺,获得山莨菪根中总生物碱的最佳提取工艺,并以这种工艺提取山莨菪的种子和地上部分,同时建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 RAW 264.7 巨噬细胞体外炎症模型评价山莨菪三个部位生物碱的抗炎效果,以期为山莨菪药材中生物碱提取分离的工业化生产提供理论指导,并为其抗炎功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

山莨菪根于2020年9月采摘于青海省三江源国家公园,经高庆波研究员鉴定为山莨菪(*Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher),根部自然干燥,粉碎并过120目筛。RAW 264.7小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库);LPS(北京索莱宝科技有限公司,批号:818E035);噻唑蓝(MTT,批号:715F0525)、NO试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:022421210606);硫酸阿托品(国药集团药业股份有限公司,纯度大于等于98%);氨水、氢氧化钠、盐酸、三氯甲烷、磷酸、乙醇(上海展云化工有限公司)均为分析纯;溴甲酚绿、邻苯二甲酸氢钾、甲醇(上海阿拉丁生化股份有限公司)。T6新世纪型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);PHS-3C型pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);P300超声提取器(天鹏电子新技术有限公司);Epoch 2多功能酶标仪(Bio Teck);EB-9010微孔板孵育振荡器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);SW-CJ-1C超净工作台(上海沪净医疗器械有限公司);CO₂培养箱(Memmert)。

1.2 方法

1.2.1 生物碱提取工艺

将经过预处理的山莨菪根部样品1.000 g置于250 mL锥形瓶中,加入乙醇溶液,充分混匀后放入超声提取器中提取,按照设定的条件提取,抽滤,旋转蒸发仪回收溶剂,水浴蒸干,取干样加水10 mL使溶解,调节pH至2~3,过滤,滤液用氨水调pH至9~10,再用氯仿萃取4次,每次6 mL,合并定容至25 mL,于420 nm处测定吸光值。

1.2.2 生物碱含量测定

采用比色法测定总生物碱的含量^[11,12],并在此基础上略做改动。取103 °C干燥至恒重的硫酸阿托品10 mg,置100 mL容量瓶中,加蒸馏水溶解定容到刻度。

精密量取硫酸阿托品对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于5个分液漏斗中,各依次加0.500 g/mL酸性染料溴甲酚绿溶液3 mL,三氯甲烷10 mL,用水补充至等体积,振摇提取2 min,静置5 min,分取三氯甲烷层溶液,再加入0.5 g无水硫酸钠脱水,放置20 min,取另一精密加入三氯甲烷10.0 mL的分液漏斗,精密加入水1.0 mL,同时制成空白对照溶液,于波长420 nm处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,硫酸阿托品含量为横坐标作标准曲线,计算回归方程为 $y = 0.4516x - 0.0106$,相关系数 $R^2 = 0.9953$ 。结果质量在0.001~0.100 mg范围内线性关系良好。根据标准曲线计算溶液中生物碱的浓度,然后根据公式计算出样品中总生物碱的提取率,按式(1)计算:

$$\text{总生物碱提取率} = \frac{C \times d \times V}{1000 \times M} \times 100\% \quad (1)$$

其中,C:根据标准曲线计算溶液中生物碱的质量浓度(mg/mL);d:稀释倍数;V:定容体积(mL);M:称取的样品质量(g)。

1.2.3 实验设计方法

以参考文献^[13,14]和预实验确定的实验条件范围,设置4组单因素实验,分别是:乙醇浓度(20%、40%、60%、80%、100%)、液料比(20:1、40:1、60:1、80:1、100:1 mL/g)、温度(20、40、60、80、100 °C)、提取次数(1、2、3次)、提取时间(0.5、1、2、3 h)。

根据单因素实验结果,确定对山莨菪生物碱提取率影响显著的液料比(A)、温度(B)、乙醇浓度(C)3个因素,各设置3个水平,结合Box-Behnken原理设计响应面实验。

1.2.4 抗炎活性的研究

1.2.4.1 样品来源

利用“1.2.3”最优实验条件对山莨菪的根部、种子和地上部分进行提取,所得到的提取物为抗炎活性的受试物。

1.2.4.2 RAW 264.7 细胞培养

RAW 264.7 细胞接至含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(含双抗),于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养至对数生长期,按 2 × 10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板,继续培养 12 h 后弃去培养液。

1.2.4.3 山莨菪 3 个部分和 LPS 对 RAW 264.7 细胞的毒性作用

分别设对照组(control, CON)、不同浓度 LPS 组和不同浓度山莨菪根部、种子和地上部分生物碱提取物。CON 组:加入高糖 DMEM 培养基, LPS 组:加入不同浓度(0、0.1、0.5、1、2、5、8、10 μmol/L)的 LPS,生物碱组:加入不同浓度(0、1、5、10、20、50、100、200 μg/mL)的 3 个部位的生物碱提取物,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 后,依据 MTT 检测试剂盒测定。

1.2.4.4 NO 含量的测定

根据“1.2.4.2”培养方法和“1.2.4.3”的给药方法培养 24 h 后,吸取上层培养基至新的 96 孔板,按试剂盒说明书测定 NO 浓度。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 液料比对生物碱提取率的影响

如图 1 所示,山莨菪生物碱的提取率在液料比 60:1 (mL/g) 时达到最大,超过 60:1 (mL/g),生物碱的提取率略有下降。所以在响应面条件优化时选择 40:1、60:1、80:1 (mL/g) 3 个水平。

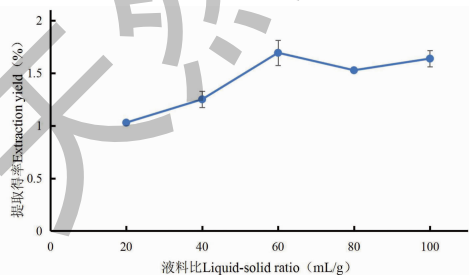


图 1 液料比对山莨菪生物碱提取率的影响

Fig. 1 The effects of liquid-solid ratio on the yield of alkaloids from *A. tanguticus*

2.1.2 温度对生物碱提取率的影响

如图 2 所示,在温度区间 20 ~ 60 °C,提取得率

逐渐提高;80 ~ 100 °C 时,得率的变化平缓;100 °C 时,生物碱提取得率有所下降。60 ~ 100 °C 是保证生物碱得率的合适区间,为确保山莨菪生物碱的得率,故选用 60、80、100 °C。

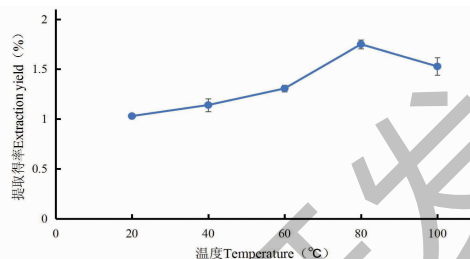


图 2 温度对山莨菪生物碱提取率的影响

Fig. 2 The effects of temperature on the yield of alkaloids from *A. tanguticus*

2.1.3 提取次数对生物碱提取率的影响

如图 3 所示,虽然随着提取次数的增加,生物碱的含量会增加,但提取 2 次和提取 3 次对生物碱含量的增加影响不大,所以在后续的响应面优化中不考虑次数的影响,并且提取次数控制在 2 次。

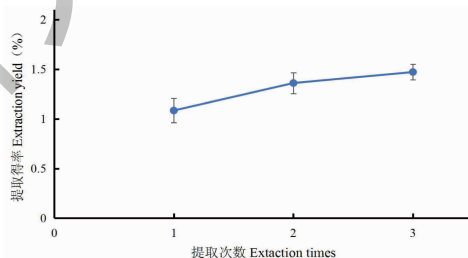


图 3 提取次数对山莨菪生物碱提取率的影响

Fig. 3 The effects of extraction times on the yield of alkaloids from *A. tanguticus*

2.1.4 提取时间对生物碱提取率的影响

如图 4 所示,虽然随着提取时间的增加,生物碱的含量最大在 2 h,超过 2 h 时,含量有所下降,但下降得并不明显。所以在响应面优化时不考虑时间的

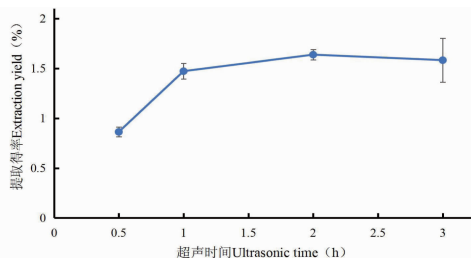


图 4 超声时间对山莨菪生物碱提取率的影响

Fig. 4 The effects of ultrasonic time on the yield of alkaloids from *A. tanguticus*

影响,并选择提取时间为 1 h。

2.1.5 乙醇浓度对生物碱提取率的影响

如图 5 所示,在乙醇浓度区间 20% ~ 80%, 提取率逐渐提高;80% ~ 100% 乙醇浓度时,得率的变化平缓;100% 乙醇浓度时,生物碱提取率有所下降。60% ~ 100% 乙醇浓度是保证生物碱得率的合适区间,为确保山莨菪生物碱的得率,故选用 60%、80%、100% 的乙醇浓度。

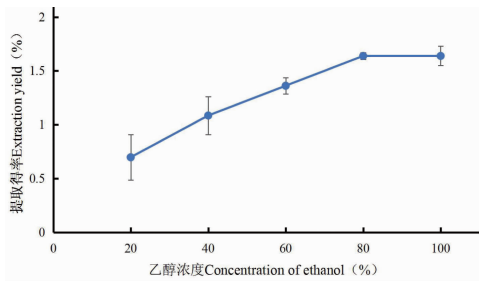


图 5 乙醇浓度对山莨菪生物碱提取率的影响

Fig. 5 The effects of concentration of ethanol on the yield of alkaloids from *A. tanguticus*

2.2 响应面实验设计与结果

2.2.1 响应面实验设计

单因素实验的结果显示,山莨菪生物碱提取率受液料比、乙醇浓度、温度三个因素的影响较明显。借助实验设计软件 Design Expert 8.0, 设置响应值为生物碱提取率 (Y), 设计进一步优化液料比 (A)、温度 (B) 和乙醇浓度 (C) 的 3 因素 3 水平响应面实验(因素与水平见表 1), 共计 17 组实验, 表 2 所列为设计方案与结果, 其他条件与单因素实验结果一致。

表 1 响应面实验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平 Level	因素 Factor		
	A: 液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	B: 温度 Temperature (°C)	C: 乙醇浓度 Concentration of ethanol (%)
-1	40	60	60
0	60	80	80
1	80	100	100

2.2.2 回归模型与统计学分析

使用 Design Expert 8.0 对响应面实验结果进行拟合, 建立数学模型, 二次回归方程为: $Y = 1.68 - 0.014A - 0.00007B - 0.076C - 0.14AC + 0.014BC - 0.043A^2 - 0.31B^2 - 0.33C^2$ 。表 3 为该模型的方

表 2 响应面实验设计方案与结果

Table 2 Design and results of response surface

运行序 Run	因素 Factor			Y: 提取率 Extraction Yield (%)
	A (mL/g)	B (°C)	C (%)	
1	40	60	80	1.251
2	80	80	100	1.030
3	60	100	100	0.919
4	60	80	80	1.639
5	40	100	80	1.306
6	60	80	80	1.694
7	60	60	100	0.974
8	60	100	60	1.085
9	60	80	80	1.805
10	60	80	80	1.639
11	40	80	100	1.473
12	80	80	60	1.417
13	60	60	60	1.196
14	60	80	80	1.639
15	80	60	80	1.362
16	40	80	60	1.306
17	80	100	80	1.417

差分析。

模型的相关系数 $R^2 = 0.9364$, 说明二次回归方程的拟合度良好, 预测值与真实值的相关性较强。此回归模型达极显著水平 ($P < 0.01$), 失拟不显著 ($P > 0.05$), 表明模型是可行的。比较回归方程一次项系数的绝对值大小, 各因素对山莨菪总生物碱提取率影响的顺序为: 乙醇浓度 > 温度 > 液料比。

2.2.3 响应面趋势分析

保持其中一个变量在中心值, 其他两个变量变化对生物碱得率的影响绘制成 3D 响应面图和等高线图。3 组响应面图开口向下且存在最高点, 生物碱提取率从最高点向四周边缘逐渐下降。由图 6 可知, Y 值在 X_2 轴方向上变化明显, 提取率受乙醇浓度的影响比液料比、温度明显。等高线表明, 等高线呈椭圆形, 交互作用明显, 椭圆的短轴与 X_2 轴平行, 说明曲面在 X_2 轴上弯曲明显, 中心附近等高线闭合, 说明最高点位于区域内部。

2.2.4 模型预测与验证实验

使用 Design Expert 8.0 软件对二次回归方程中各自变量求偏导, 计算并比较所有极值点和边界点对应的预测值, 最优解为: 液料比 60.72 mL/g、温度

表3 模型的方差分析

Table 3 ANOVA of mathematic model

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	1.06	9	0.12	11.44	0.002 0	显著 Significant
A	1.513E-003	1	1.513E-003	0.15	0.713 2	-
B	3.920E-004	1	3.920E-004	0.038	0.851 0	-
C	0.046	1	0.046	4.48	0.072 1	-
AB	4.441E-016	1	4.441E-016	4.304E-014	1.000 0	-
AC	0.077	1	0.077	7.44	0.029 5	-
BC	7.840E-004	1	7.840E-004	0.076	0.790 8	-
A ²	7.822E-003	1	7.822E-003	0.76	0.412 8	-
B ²	0.39	1	0.39	38.23	0.000 5	-
C ²	0.47	1	0.47	45.41	0.000 3	-
残差 Residual	0.072	7	0.010	-	-	-
失拟 Lack of fit	0.051	3	0.017	3.29	0.139 8	不显著 Not significant
误差 Pure error	0.021	4	5.203E-003	-	-	-
总变异 Cor total	1.13	16	-	-	-	-

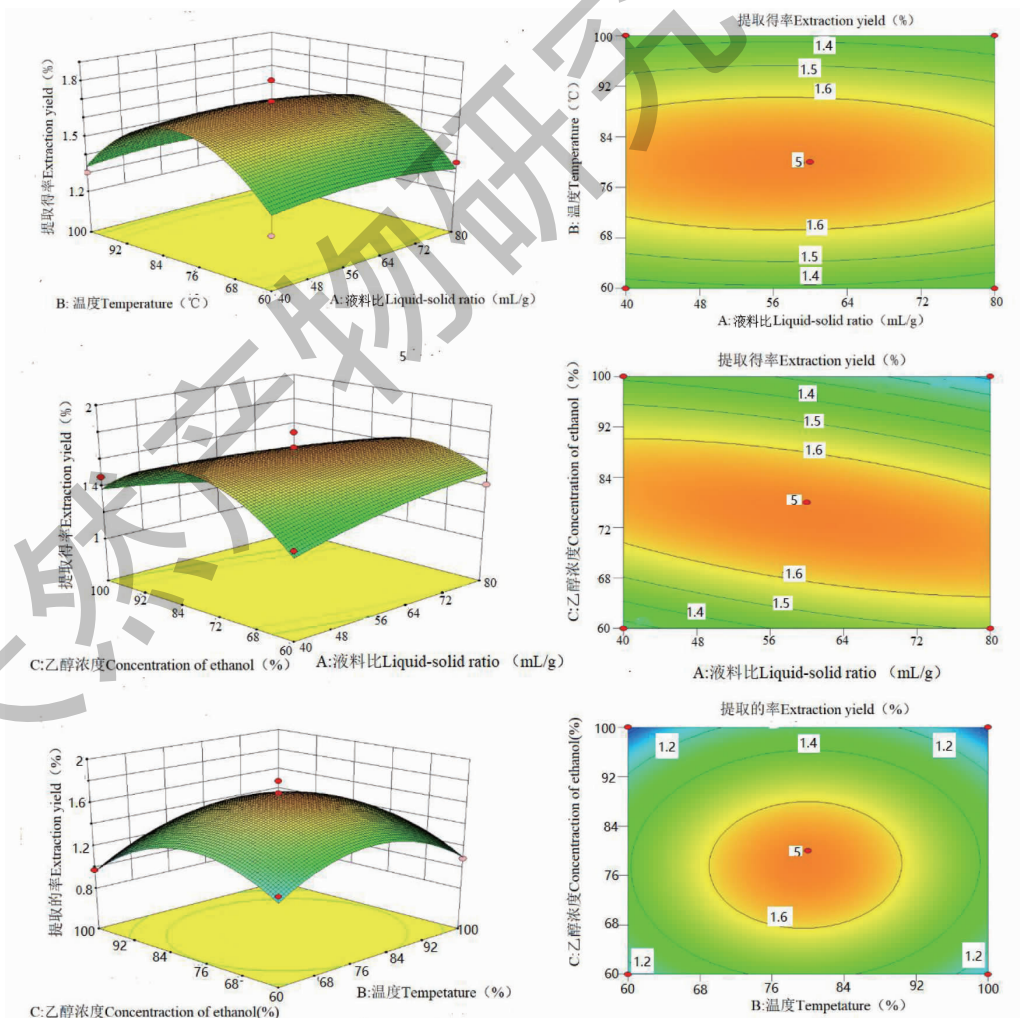


图6 因素交互作用对山莨菪根部生物碱提取得率的影响

Fig. 6 Factors interaction effects on total alkaloids extraction yield from *A. tanguticus*

79.73 ℃、乙醇浓度 77.56% 预测得率为 1.687%。结合实际可控性,确定采用:液料比 61 mL/g,乙醇浓度 78%,温度 80 ℃,提取时间 2 h,提取 2 次。称取山茛菪根 1.000 g,进行提取验证,平行 3 组。测得该条件下,实际生物碱提取得率 (1.639 ± 0.033)%,与预测值 1.687% 接近。说明实际结果与预测值比较差异性较小,表明此响应面法得到的回归模型具有较好的可靠性。

2.2.5 山茛菪种子和地上部分生物碱的提取

根据 2.2.4 最优提取工艺分别称取山茛菪种子和地上部分 1.000 g,进行提取,平行 3 组。测得该条件下,实际山茛菪种子和地上部分生物碱提取得率分别为: $(0.950 \pm 0.019)\%$ 、 $(0.852 \pm 0.031)\%$ 。

2.2.6 LPS 对 RAW 264.7 细胞生成 NO 的影响

如图 7 所示,当脂多糖浓度高于 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 时能显著刺激 RAW 264.7 细胞分泌 NO ($P < 0.01$),随着脂多糖浓度的升高,RAW 264.7 细胞分泌 NO 量呈递增趋势,结果表明,脂多糖在正常情况下呈浓度依赖性刺激 RAW 264.7 细胞致使 NO 的过量产生。

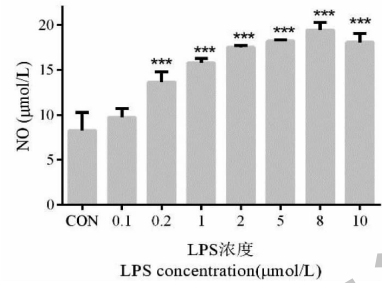


图 7 不同浓度 LPS 对 RAW 264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig. 7 Effects of LPS at different concentrations on the secretion of NO in RAW 264.7 cells

注:与 CON 比较,*** $P < 0.001$ 。Note: Compared with CON, *** $P < 0.001$ 。

2.2.7 山茛菪 3 个部分生物碱提取物对 RAW 264.7 细胞的影响

采用上述建立的细胞炎症模型对山茛菪提取物进行了抗炎活性的比较,实验结果表明如图 8 所示,与空白对照组相比,山茛菪种子提取物对细胞活力均无影响。而地上提取物在细胞活力大于或等于 $50 \mu\text{g/mL}$ 时,能显著降低细胞活力。

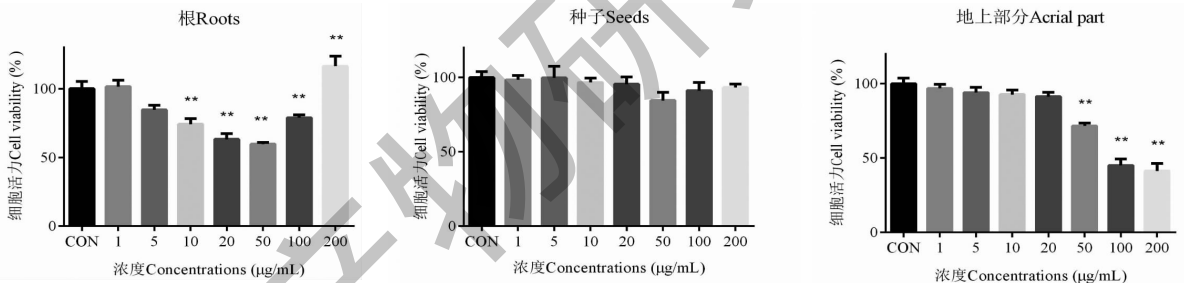


图 8 山茛菪种子、地上部分以及根提取物对 RAW 264.7 细胞活力的影响

Fig. 8 Effects of the extracts from seeds, aerial part and roots of *A. tanguticus* on RAW 264.7 cell viability

注:与 CON 组比较,** $P < 0.01$ 。Note: Compared with CON, ** $P < 0.01$ 。

2.2.8 山茛菪生物碱提取物对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 NO 的影响

如图 9 所示,NO 产生实验表明,根部分和地上

提取物在较高浓度 ($80 \mu\text{g/mL}$) 时均能显著抑制 LPS 对巨噬细胞的激活,并呈现浓度依赖性。而种子提取物不能抑制 LPS 诱导的 NO 的产生。该实验

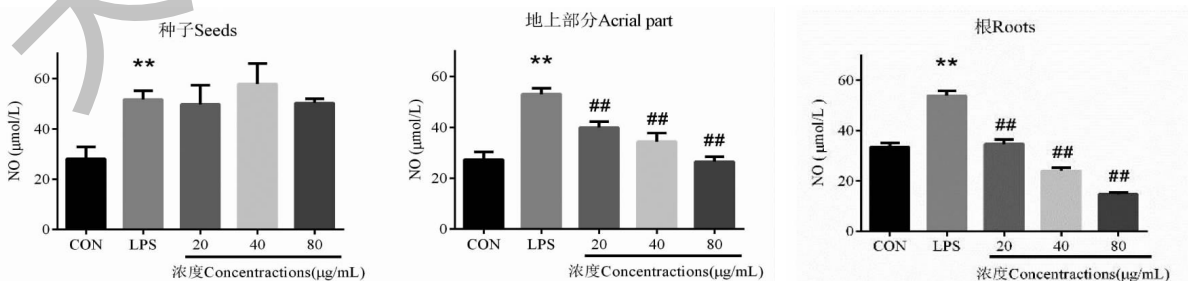


图 9 山茛菪种子、地上部分以及根提取物对细胞活力的影响

Fig. 9 Effects of the extract from seeds, aerial part and roots of *A. tanguticus* on the secretion of NO in RAW 264.7 cells

注:与 CON 比较,** $P < 0.01$;与 LPS 组比较,## $P < 0.01$ 。Note: Compared with CON, ** $P < 0.01$. Compared with LPS, ## $P < 0.01$ 。

结果表明根部分和地上提取物可能具有很好的抑制炎症作用,并且根部分抑制活性强于地上提取物。

3 讨论与结论

本研究通过查阅相关文献,选取了超声提取法、冷浸提取法、热回流提取法等 3 种方法来提取总生物碱,结果表明超声辅助提取法最佳。本研究对影响山莨菪生物碱提取得率的液料比、温度、乙醇浓度、提取次数、提取时间等 5 个单因素进行筛选,其中,液料比(A)、温度(B)和乙醇浓度(C)3 个因素的影响较明显。根据 Box-Behnken 原理设计响应面实验,建立数学模型 $Y = 1.68 - 0.014A - 0.00007B - 0.076C - 0.144AC + 0.014BC - 0.043A^2 - 0.31B^2 - 0.33C^2$,得到山莨菪生物碱最优提取工艺参数:液料比 61 mL/g,乙醇浓度 78%,温度 80 ℃,提取时间 2 h,提取 2 次。验证实验结果表明生物碱提取得率可达 $(1.639 \pm 0.033)\%$,接近数学模型预测值 1.687%。通过此模型,检测出实际山莨菪种子和地上部分生物碱提取得率分别为 $(0.950 \pm 0.019)\%$ 、 $(0.852 \pm 0.031)\%$ 。同时建立脂多糖(LPS)诱导小鼠腹腔巨噬细胞(RAW 264.7)的炎症模型,研究发现 20~80 μg/mL 的根部和地上部分的生物提取物能够显著抑制 RAW 264.7 细胞内 NO 的产生,并呈剂量依赖效应,而种子部位的山莨菪提取物没有抑制效果。因此本研究为山莨菪根部和地上部分总生物碱潜在的药理应用和质量标准研究提供切实可行的参考。

参考文献

- Zhang Y, Xia MZ, Zhang FQ. Transcriptome analysis for medicinal plant *Anisodus tanguticus*[J]. Bull Bot Res(植物研究),2020,40:458-467.
- Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan Medicine Chronicle(藏药志)[M]. Xining:Qinghai People's Press,1991.
- Qi XZ, Xing YY, Qin HB. Protective effect of anisodamine on SK-N-SH cell injury induced by MPP⁺ through lncRNA LINC00657/miR-496 pathway[J]. J New Chin Med(新中医),2021,53:7-12.
- Song YG. Clinical application value of compound anisodine in the treatment of ocular ischemic lesions[J]. Chin J Control Endemic Dis(中国地方病防治),2017,32:1316.
- Sichuan Medical Products Administration. Standard of Tibetan medicinal materials in Sichuan Province;2014(四川省藏药材标准:2014版)[M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press,2014.
- Lei TX, Cai XJ, Zhou DW, et al. Preliminary establishment of propagation system of aseptic seedlings of three Solanaceae plants[J]. J Chin Med Mater(中药材),2015,38:447-450.
- Zang EH, Li QY, Xu JF, et al. A preliminary pharmacophylogenetic study of Solanaceae medicinal plants containing tropane alkaloids[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2021,46:4344-4359.
- Chen ZQ, Yang J. Study on light response and CO₂ response in photosynthesis of four species of *Anisodus tanguticus*[J]. J Yunnan Nor Univ; Nat Sci(云南师范大学学报:自科版),2019,39:57-61.
- Jin LX, Gou Y, Jiang GH, et al. Study on isolation, identification and content determination of water-soluble constituents in root of *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher[J]. Pharm Clin Chin Mater Med(中药与临床),2020,11:8-12.
- Zhao WJ, Jia GF, Chen TX, et al. Biomass accumulation and allocation of seedling of Qinghai-Tibet Plateau endemic medicinal plants *Anisodus tanguticus*[J]. Southwest Chin J Agr Sci(西南农业学报),2018,31:2092-2097.
- Han XL, Zhang X, Tan Y, et al. Study on the extraction technology of total alkaloid from the seeds of *Datura*[J]. Heilongjiang Agr Sci(黑龙江农业科学),2016,4:104-107.
- Peng TH, Zhong SS, Zhang SJ, et al. Comparative study on extractions of alkaloids from *Datura* Flos by different methods[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2012,34:832-835.
- Jeong JY, Liu Q, Kim SB, et al. Characterization of melanogenesis inhibitory constituents of *Morus alba* leaves and optimization of extraction conditions using response surface methodology[J]. Molecules,2015,20:8730-8741.
- Qiu ZD, Jin QH, Guo MQ. Optimization of the extraction process of podophyllotoxin from *Diphylleia sinensis* H. L. Li by response surface methodology[J]. Plant Sci J(植物科学学报),2017,35:774-782.