

# 响应面法优化暗紫贝母流浸膏提取工艺及其质量评价

张亚梅<sup>1</sup>, 韩鸿萍<sup>1,2\*</sup>, 宋道光<sup>2</sup>

<sup>1</sup>青海师范大学化学化工学院, 西宁 810008;

<sup>2</sup>青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室, 西宁 810016

**摘要:** 优化暗紫贝母流浸膏提取工艺, 评价暗紫贝母流浸膏质量。以总生物碱含量、贝母辛含量、贝母素甲、贝母素乙和西贝母碱三碱含量之和、浸膏得率的综合评分作为评价指标, 采用单因素实验确定乙醇体积分数、乙醇用量、浸润时间、渗漉速度 4 个因素对暗紫贝母流浸膏提取的影响; 利用 Box-Behnken 响应面法确定并验证暗紫贝母流浸膏的最优渗漉提取工艺条件; 采用薄层色谱法对暗紫贝母药材进行定性鉴别, 并对其水分、灰分及浸出物进行检查; 采用薄层色谱建立暗紫贝母流浸膏中贝母辛、贝母素乙的定性鉴别方法, 并对其乙醇量和重金属进行检查。结果表明暗紫贝母流浸膏的最佳提取工艺为: 乙醇体积分数为 70%, 乙醇用量为 18 倍, 浸润时间为 39 h, 渗漉速度为 3 mL/(kg·min), 在此条件下暗紫贝母流浸膏综合评分为 (89.97 ± 1.90)%。药材和流浸膏 TLC 结果斑点清晰, 分离度好, 药材水分不超过 15%、灰分不超过 5.0% 及浸出物大于 9.0%, 暗紫贝母流浸膏的乙醇量和重金属检查均符合《中华人民共和国药典》流浸膏制剂规定。本研究优化的暗紫贝母流浸膏提取工艺稳定可行, 为暗紫贝母开发利用提供参考。

**关键词:** 暗紫贝母流浸膏; 响应面; 提取工艺; 质量评价

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)9-1554-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.9.011

## Optimization of the extraction process of *Fritillaria unibracteata* fluid extract by response surface methodology and its quality evaluation

ZHANG Ya-mei<sup>1</sup>, HAN Hong-ping<sup>1,2\*</sup>, SONG Dao-guang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai Normal University, Xining 810008, China;

<sup>2</sup>The Key Laboratory of Medicinal Plant and Animal Resources of Qinghai-Tibetan Plateau in Qinghai Province, Xining 810016, China

**Abstract:** This study aims to optimise the extraction process and evaluate the quality of *Fritillaria unibracteata* fluid extract (FUFEE). The comprehensive score of total alkaloid content, the content of peimisine, the sum of the three alkaloid contents of peimine, peiminine and sipeimine, and the extraction rate were used as the evaluation indexes, and the single factor experiment were used to determine the effects of the volume fraction of ethanol, the amount of ethanol, the infiltration time, and the percolation speed on the extraction of FUFEE; The Box-Behnken response surface method was used to determine and verify the optimal percolation extraction process conditions of FUFEE; the qualitative identification of *F. unibracteata* by thin-layer chromatography (TLC), and the examination of its moisture, ash and leachate; the establishment of a TLC method for the qualitative identification of peimisine and peiminine in the FUFEE, and the examination of its ethanol amount and heavy metals. The results showed that the optimal extraction process for FUFEE were as follows: ethanol volume fraction 70%, ethanol dosage 18 times, infiltration time 39 h, and percolation rate 3 mL/(kg·min), and the comprehensive score of FUFEE under these conditions was (89.97 ± 1.90)%. The TLC results of the herbs and the fluid extract were clear spots with good separation, the moisture of the herbs was not more than 15%, the ash was not more than 5.0% and the leachate was more than 9.0%, and the amount of ethanol and the examination of heavy metals of FUFEE complied with the provisions of the *Chinese Pharmacopoeia* for fluid extract preparation. The optimised extraction process of FUFEE is stable and feasible, and provides a reference for the development and utilization of *F. unibracteata*.

**Key words:** *Fritillaria unibracteata* fluid extract; response surface; extraction process; quality evaluation

收稿日期: 2024-04-15

接受日期: 2024-07-31

基金项目: 青海省重点研发与转化项目 (2022-SF-142)

\* 通信作者 Tel: 86-971-6307635; E-mail: sunnyhph@163.com

暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia)属于百合科贝母属植物,以其干燥鳞茎入药,是中国青藏高原特色的生物资源。主要分布于四川若尔盖高原和川西高山峡谷东段,包括四川阿坝州各县以及青海果洛、班玛等地,道地明确,居青海省政府认定道地中藏药材“十八青药”第四<sup>[1-3]</sup>。在形貌上暗紫贝母与其他种类的贝母最显著的区别是其花为深紫色,花被片上有黄褐色小方格<sup>[4]</sup>。暗紫贝母含有多种化学成分,包括生物碱<sup>[5]</sup>、甾醇<sup>[6]</sup>、有机酸及其酯<sup>[7]</sup>、核苷<sup>[8]</sup>和挥发油<sup>[9]</sup>等。生物碱是其活性成分,也是研究最多的成分,其中贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和西贝母碱是其指标性成分<sup>[10]</sup>。作为川贝母主要基源植物之一,暗紫贝母素有川贝珍品“止咳圣药”之称,在中医中广泛用于治疗呼吸系统疾病,具有良好的清热润肺、止咳化痰、平喘和抗炎功效<sup>[11,12]</sup>,现代药理学研究还表明暗紫贝母的鳞茎具有多种其他药用特性,比如有研究表明贝母素甲能显著降低 MKN-45 胃癌细胞活性,抑制迁移<sup>[13]</sup>;贝母素乙可通过降低循环 IFN- $\gamma$  水平,抑制 TGF- $\beta$ 、CTGF、ERK1/2、NF- $\kappa$ B 和 FasL 等信号转导通路,改善博来霉素致肺损伤大鼠模型的肺部炎症,减轻肺纤维化<sup>[14]</sup>。暗紫贝母具有极高的市场需求和价值,在中国、日本、加拿大、韩国及马来西亚等地均有交易,驰名中外,供不应求<sup>[15]</sup>,价格也由 2 000 年的 100 元/kg 上涨至现在的 5 000 元/kg。其鳞茎生长速度极为缓慢,通常需要四年的时间,才能从种子生长成为可用药材<sup>[16]</sup>。由于其良好的药效、苛刻的生长环境及市场需求量大等多因素导致暗紫贝母人工过度挖掘,野生数量急剧减少,2021 年我国将其列为二级国家重点保护野生植物<sup>[17]</sup>。

目前市场上多种贝母中成药以流浸膏为原料药,但有关暗紫贝母流浸膏提取工艺还未见报道,因此本研究采用单因素和响应面法优化暗紫贝母流浸膏提取工艺,并对其质量进行评价,旨在为暗紫贝母资源的开发利用、质量评价及其在医药领域的应用提供相关依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试药

暗紫贝母购自青海省果洛州班玛县经韩鸿萍教授鉴定为暗紫贝母。

西贝母碱(批号: DSTDX000102)、贝母辛(批号: DSTDB001301)、贝母素甲(批号: DST210517-011)、贝母素乙(批号: DST191011-012)(纯度 98

$\geq$ %,中国成都德斯特生物技术有限公司);溴甲酚绿(分析纯,批号:20230216,天津欧博凯化工有限公司);无水乙醇(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);乙酸乙酯(分析纯,天津市百世化工有限公司);甲醇(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂);硅胶 GF 板(50 mm  $\times$  100 mm,青岛海洋化工厂分厂)。

### 1.2 仪器

ME-204E 梅特勒电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);IKA RV3 旋转蒸发仪(德国(广州)仪器设备有限公司);TU1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Agilent 6546 超高效液相色谱串联四级杆-飞行时间质谱(美国安捷伦公司);Milli-Q 超纯水制备系统(美国 Millipore 公司);DS-L22 型超声波清洗机(德国大陆汽车电子长春有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 暗紫贝母流浸膏的制备

取暗紫贝母粗粉 20 g,加入玻璃渗漉筒中,按照单因素和响应面实验设计条件,以一定浓度乙醇浸润一定时间后开始渗漉,收集初漉液 17 mL,放置待用;继续收集续漉液,待渗漉完成后,续漉液在 60  $^{\circ}$ C 以下减压浓缩,与初漉液合并,混匀,用上述浓度乙醇稀释至 20 mL,滤过,即得暗紫贝母流浸膏。

#### 1.3.2 暗紫贝母流浸膏中总生物碱含量测定

##### 1.3.2.1 对照品溶液的制备

精密称取西贝母碱对照品 10 mg,加三氯甲烷配制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的溶液。

##### 1.3.2.2 线性关系考察

参考 2020 年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)一部川贝母含量测定项下标准曲线测定方法,精准移取对照品溶液 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL,加三氯甲烷至 10.0 mL,加水 5 mL、再精密加 0.05% 溴甲酚绿缓冲液 2 mL,密塞振摇 90 s,移入分液漏斗中,放置 20 min。取三氯甲烷层,用脱脂棉过滤,收集续滤液,以相应的试剂为空白,在 414 nm 的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线<sup>[11]</sup>。

##### 1.3.2.3 供试品溶液的制备及总生物碱的含量计算

精准量取本品 0.5 mL 于具塞锥形瓶中,加浓氨试液 2 mL,密塞浸润 30 min。加三氯甲烷-甲醇(4:1)混合溶液 20 mL,加热回流 1 h,放冷后过滤,用三氯甲烷-甲醇(4:1)混合溶液洗涤药渣,加入同一量

瓶中,定容至 25 mL 刻度,摇匀,水浴蒸干<sup>[18]</sup>,自“1.3.2.2”项下“补加三氯甲烷至 10 mL”起,在 414 nm 波长处测定各供试液吸光度,将吸光度带入标准曲线回归方程,根据公式(1)计算总生物碱含量( $T$ )。

$$T = C \times V \times N / m \quad (1)$$

式中: $C$  为生物碱的质量浓度, g/mL;  $V$  为样品体积, mL;  $N$  为稀释倍数;  $m$  为贝母粉末质量, g。

1.3.3 暗紫贝母流浸膏中贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙含量测定

1.3.3.1 色谱条件

采用 Acquity UPLC CSH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相为流动相 A 为 0.1% 乙酸水(含 0.01 mol/L 乙酸铵), B 为乙腈, 流速为 0.4 mL/min。梯度洗脱: 0 ~ 10 min, 10% B; 10 ~ 20 min, 10% → 20% B; 20 ~ 25 min, 20% B; 25 ~ 26 min, 20% B → 10% B; 26 ~ 30 min, 10% B, 柱温 30 °C, 进样量 2 μL。

1.3.3.2 质谱条件

质谱仪为四级杆-飞行时间质谱仪, 电喷雾离子源, 正离子检测模式, 采集分子量设置范围  $m/z$  100 ~ 1 000 Da。雾化气温度 325 °C, 干燥气流量 10 L/min, 雾化器流量 35 psi, 鞘气温度 350 °C, 鞘气流量 10 L/min, 毛细管电压 4 kV, 碰撞能量 40 V。

1.3.3.3 对照品溶液的制备

分别准确称取 0.005 g 贝母素甲、贝母素乙、西贝母碱、贝母辛标准品溶于 5 mL 容量瓶, 用甲醇定容, 配制成浓度为 1 000.00 μg/mL 的混合储备液。

1.3.3.4 供试品溶液的制备

精密吸取本品 2 mL, 加浓氨试液 4 mL, 混匀, 密塞浸润 1 h, 加入三氯甲烷-甲醇(4:1)的混合溶液 40 mL, 称定重量, 混匀, 80 °C 水浴回流 2 h, 放冷, 用上述混合溶液补足减失的重量, 混匀, 蒸干, 残渣加甲醇溶解后转移至 2 mL 的量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得<sup>[11]</sup>。

1.3.3.5 线性关系考察

根据实验需求, 将混合储备液用甲醇逐级稀释得到不同浓度标准溶液, 以标准溶液浓度为横坐标, 响应值峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.3.3.6 精密度

精密吸取同一对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录

6 份样品峰面积, 根据目标成分峰面积计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值。

1.3.3.7 重复性

平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 记录 6 份样品的峰面积, 根据目标成分峰面积计算其 RSD 值。

1.3.3.8 稳定性

取同一供试品溶液, 分别在 0、4、6、8、10、12 h 时进样, 记录色谱图, 计算目标成分峰面积的 RSD。

1.3.3.9 加样回收率

向 3 个供试品溶液中加入一定量的标准溶液, 记录各成分的峰面积, 根据下式计算平均回收率和 RSD 值。

1.3.4 浸膏得率测定

取本品适量, 于已干燥并恒重的蒸发皿中, 水浴蒸发溶剂, 在 110 °C 烘箱中干燥 3 h 后, 取出置干燥器中冷却 30 min, 称重, 按公式(2)计算得膏率( $R$ )。

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $m_1$  为干浸膏质量, g;  $m_2$  为药材质量, g。

1.3.5 单因素试验

准确称取暗紫贝母 20 g, 采取控制单一变量法, 依次考察乙醇体积分数: 50%、55%、60%、65%、70%; 乙醇用量 12、14、16、18、20 倍; 浸润时间: 16、24、32、40、48 h; 渗漉流速: 1、2、3、4、5 mL/(kg · min), 研究单因素条件对暗紫贝母流浸膏制备的影响。

1.3.6 综合评分

参考文献方法及各指标重要程度, 将总生物碱含量、贝母辛含量、贝母素甲、贝母素乙和西贝母碱三碱含量之和、浸膏得率作为权重指标, 通过综合加权评分来确定最佳提取工艺条件, 计算方法如下: 综合评分 =  $Y_{ij}$ 总生物碱含量 \* 35% +  $Y_{ij}$ 贝母辛含量 \* 30% +  $Y_{ij}$ 三碱含量之和 \* 15% +  $Y_{ij}$ 浸膏得率 \* 20%,  $Y_{ij}$  = 某指标值/某指标值中的最大值。

1.3.7 响应面优化试验

基于单因素试验结果, 设置乙醇体积分数( $A$ )、乙醇用量( $B$ )、浸润时间( $C$ )、渗漉速度( $D$ )为考察因素, 综合评分( $E$ )为响应值, 实验因素水平见表 1, 运用 Design-Expert-13 软件得出不同实验组合条件, 根据综合评分筛选出最优提取工艺。

表1 实验因素和水平

Table 1 Experimental factors and levels

水平 Level	因素 Factor			
	A 乙醇体积分数 Ethanol volume fraction (%)	B 乙醇用量 Ethanol dosage (times)	C 浸润时间 Infiltration time (h)	D 渗漉速度 Percolation speed (mL/(kg·min))
-1	60	16	24	3
0	65	18	32	4
1	70	20	40	5

### 1.3.8 药材鉴别及质量评价

#### 1.3.8.1 薄层鉴定

按照2020年版《中国药典》一部川贝母鉴别方法鉴定。

#### 1.3.8.2 水分测定

按照2020年版《中国药典》通则“0832 水分测定法”项下第二法(烘干法),测定暗紫贝母药材水分,不得超过15%。

#### 1.3.8.3 灰分测定

按照2020年版《中国药典》通则“2302 灰分测定法”,测定暗紫贝母药材总灰分,不得超过5.0%。

#### 1.3.8.4 浸出物测定

按照《中国药典》通则“2201 浸出物测定法”项下热浸法测定,用稀乙醇作溶剂,以干燥品计算供试品中水溶性浸出物的含量,不得少于9.0%。

### 1.3.9 暗紫贝母流浸膏质量评价

#### 1.3.9.1 性状

根据各批流浸膏剂成品实际性状:本品为棕黄色液体,味微苦。

#### 1.3.9.2 薄层鉴定

取贝母辛和贝母素乙对照品适量,加甲醇制成1 mg/mL的对照品溶液。吸取本品10 mL,加浓氨试液5 mL,密塞放置1 h,加二氯甲烷40 mL,超声1 h后过滤,蒸干,残渣用甲醇0.5 mL溶解,即得供试品溶液。点样量、展开剂、显色方法参照2020年版《中国药典》一部川贝母鉴别法。

#### 1.3.9.3 乙醇量测定

按2020年版《中国药典》四部“0189 流浸膏剂与浸膏剂”项下乙醇量的规定,对本品三批流浸膏样品的乙醇含量进行检查。

#### 1.3.9.4 重金属检查

按2020年版《中国药典》四部“0821 重金属检查法”项下第二法对三批流浸膏样品进行检查,供试品溶液管中颜色不得比标准铅溶液颜色深。

## 2 实验结果

### 2.1 暗紫贝母流浸膏中总生物碱含量测定

按“1.3.2.2”项制作标准曲线,得到回归方程 $Y = 0.029 6X - 0.084 3$  ( $R^2 = 0.999 5$ ),线性关系良好,范围为12~28 mg/L。

### 2.2 暗紫贝母流浸膏中贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙含量测定

#### 2.2.1 贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙色谱图

按照“1.3.3”项下色谱条件和质谱条件进行测定,得到混合对照品总离子流色谱图(total ion chromatogram, TIC)如图1所示,4种生物碱在18~23 min全部出峰,分离效果良好,峰型较好。

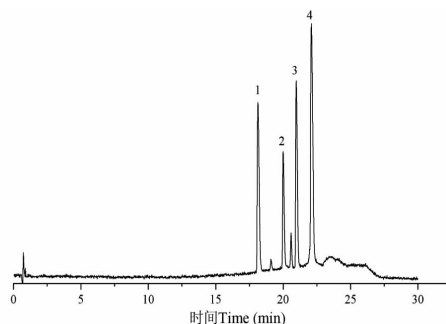


图1 混合对照品 TIC

Fig. 1 TIC of mixed control

注:1. 西贝母碱;2. 贝母辛;3. 贝母素甲;4. 贝母素乙。Note: 1. Sipeimine; 2. Peimisine; 3. Peimine; 4. Peiminine.

#### 2.2.2 线性关系考察结果

按“1.3.3.5”项制作标准曲线,得到贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙标准曲线方程分别为 $Y_1 = 6 190 720X_1 + 3 053 410$  ( $R^2 = 0.998 0$ );  $Y_2 = 11 541 800X_2 + 15 302 500$  ( $R^2 = 0.998 1$ );  $Y_3 = 11 985 700X_3 - 9 691 380$  ( $R^2 = 0.987 1$ );  $Y_4 = 15 105 800X_4 + 98 914 200$  ( $R^2 = 0.993 9$ ),线性关系良好,范围为1.25~100  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.2.3 精密度考察

计算得到对照品溶液 6 次进样贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙峰面积的 RSD 值分别为 1.3%、1.2%、2.2%、1.0%，表明仪器精密度良好。

### 2.2.4 重复性考察

计算得到 6 份供试品溶液中贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙峰面积的 RSD 值分别为 1.7%、1.8%、1.0%、1.6%，结果表明该方法重复性良好。

### 2.2.5 稳定性考察

计算得到供试品溶液在 0、2、4、6、8、12、24 h 时贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙峰面积的 RSD 值分别为 1.9%、2.8%、2.3%、1.8%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.2.6 加样回收率试验

贝母辛、西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙平均回收率为 92.04%、91.06%、81.71%、115.0%，RSD 分别为 1.2%、1.5%、1.1%、2.3%，表明回收率良好。

## 2.3 单因素结果与分析

### 2.3.1 乙醇体积分数对暗紫贝母流浸膏提取影响

在其他提取工艺条件不变的前提下，通过综合评分考察乙醇体积分数对暗紫贝母流浸膏提取的影响，结果如图 2 所示，乙醇体积分数对综合评分结果影响很大，随着乙醇体积分数的增加，综合评分逐渐增大，乙醇体积分数为 65% 时综合评分最高，之后趋于平缓。原因可能是乙醇体积分数过大会使其他成分提取出来，不利于生物碱成分提取，故选择 60%、65%、70% 进行后续实验。

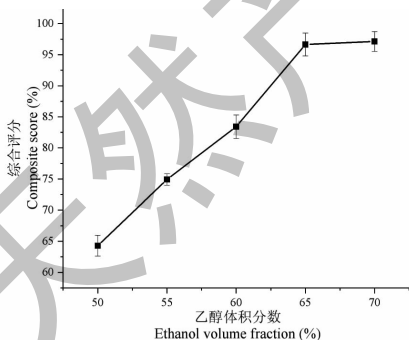


图 2 不同乙醇体积分数下综合评分结果

Fig. 2 Composite score results at different ethanol volume fractions

### 2.3.2 乙醇用量对暗紫贝母流浸膏提取影响

在其他提取工艺条件不变的前提下，通过综合评分考察乙醇用量对暗紫贝母流浸膏提取的影响，结果如图 3 所示，随着乙醇用量的增加，综合评分逐

渐增大，乙醇用量 18 倍后综合评分呈现平缓趋势，继续增加料液比后影响不大。从提取效果和成本用量两方面考虑，选择 16、18、20 倍进行后续实验。

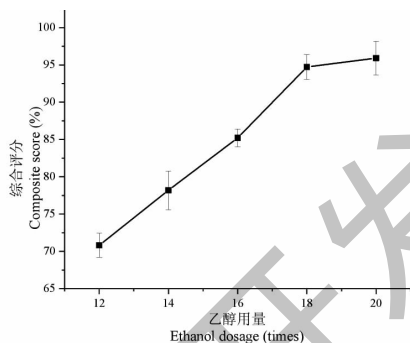


图 3 不同乙醇用量下综合评分结果

Fig. 3 Composite score results at different ethanol dosages

### 2.3.3 浸润时间对暗紫贝母流浸膏提取影响

在其他提取工艺条件不变的前提下，通过综合评分考察浸润时间对暗紫贝母流浸膏提取的影响，结果如图 4 所示，浸润时间对综合评分结果影响很大，随着浸润时间的增加，综合评分逐渐增大，浸润时间 40 h 时综合评分达到峰值，浸润时间越长，成分溶出量也越高，但当成分全部溶出后，再延长提取时间只会降低提取效率，故选择 24、32、40 h 进行后续实验。

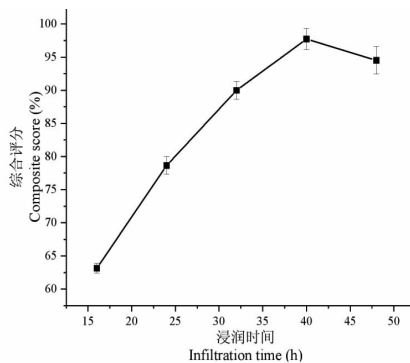


图 4 不同浸润时间下综合评分结果

Fig. 4 Composite score results at different infiltration times

### 2.3.4 渗漉速度对暗紫贝母流浸膏提取影响

在其他提取工艺条件不变的前提下，通过综合评分考察渗漉速度对暗紫贝母流浸膏提取的影响，结果如图 5 所示，随着渗漉速度的增快，综合评分逐渐减小，渗漉速度为 2 mL/(kg·min) 时综合评分最高，渗漉速度 5 mL/(kg·min) 后综合评分急剧下降，表明渗漉速度的快慢对综合评分影响较大，在渗漉速度为 2 mL/(kg·min) 时，实验实际情况表明速

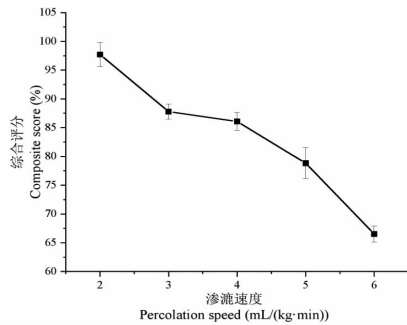


图5 不同渗漉速度下综合评分结果

Fig. 5 Composite score results under different percolation rates

度过慢,提取时间过长,因此从节约成本和提高提取效率的角度出发,选择3、4、5 mL/(kg·min)进行后续实验。

## 2.4 响应面优化结果分析

### 2.4.1 响应面模型分析

总生物碱含量按“1.3.2.3”项下方法测定,贝母辛及三碱含量之和按“1.3.3”项下方法测定,得膏率按“1.3.4”项下方法测定,综合评分根据“1.3.6”项下综合评分公式计算,得到响应面试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface test design and results

编号 No.	A (%)	B (times)	C (h)	D (mL/(kg·min))	总生物碱含量 Total alkaloid content ( $\mu\text{g/g}$ )	贝母辛含量 Peimisine content ( $\mu\text{g/g}$ )	三碱含量之和 Sum of three alkaloid content ( $\mu\text{g/g}$ )	得膏率 Extraction rate (%)	综合评分 Composite score (%)
1	60	16	32	4	1 000.110	30.051	45.623	5.213	66.628
2	70	16	32	4	1 034.291	33.279	64.407	5.168	73.161
3	60	20	32	4	1 079.899	26.512	36.937	7.123	70.797
4	70	20	32	4	990.372	49.444	45.738	6.627	77.543
5	65	18	24	3	1 056.250	27.686	41.124	6.532	69.918
6	65	18	40	3	1 005.574	64.738	46.961	6.724	84.395
7	65	18	24	5	985.304	50.317	47.283	5.027	73.806
8	65	18	40	5	1 003.885	36.074	64.033	6.766	77.481
9	60	18	32	3	1 078.209	29.596	48.191	7.268	74.932
10	70	18	32	3	1 093.412	38.694	46.977	7.475	79.143
11	60	18	32	5	986.993	36.305	39.808	5.523	68.089
12	70	18	32	5	1 015.709	46.207	44.925	6.928	77.696
13	65	16	24	4	1 035.980	28.237	41.631	5.030	65.614
14	65	20	24	4	929.561	30.662	62.248	5.923	70.472
15	65	16	40	4	1 056.250	49.613	44.442	5.639	76.682
16	65	20	40	4	1 051.182	47.248	36.314	7.404	78.445
17	60	18	24	4	1 042.736	29.251	46.194	5.979	69.806
18	70	18	24	4	1 005.574	48.129	39.996	5.362	72.789
19	60	18	40	4	1 059.628	35.630	47.036	6.953	75.558
20	70	18	40	4	988.682	78.531	53.699	5.603	87.721
21	65	16	32	3	1 000.507	31.916	45.051	6.332	70.209
22	65	20	32	3	1 144.088	28.520	42.238	6.978	74.375
23	65	16	32	5	1 090.034	31.613	48.396	5.152	70.458
24	65	20	32	5	1 034.291	28.666	36.909	7.486	71.188
25	65	18	32	4	1 056.250	26.128	30.042	7.436	69.157
26	65	18	32	4	1 027.534	28.825	45.211	6.838	71.244

续表 2(Continued Tab. 2)

编号 No.	A(%)	B(times)	C(h)	D(mL/(kg·min))	总生物碱含量 Total alkaloid content (μg/g)	贝母辛含量 Peimisine content (μg/g)	三碱含量之和 Sum of three alkaloid content (μg/g)	得膏率 Extraction rate (%)	综合评分 Composite score (%)
27	65	18	32	4	1 106.926	28.476	33.791	7.336	72.210
28	65	18	32	4	1 064.696	35.762	42.183	6.764	74.128
29	65	18	32	4	1 037.669	24.556	40.052	7.144	69.539

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型	668.97	14	47.78	27.17	< 0.000 1	**
A	148.71	1	148.71	84.57	< 0.000 1	**
B	33.56	1	33.56	19.09	0.000 6	*
C	279.14	1	279.14	158.75	< 0.000 1	**
D	16.93	1	16.93	9.63	0.007 8	*
AB	0.011 3	1	0.011 3	0.006 4	0.937 2	-
AC	21.07	1	21.07	11.98	0.003 8	*
AD	7.28	1	7.28	4.14	0.061 3	-
BC	2.39	1	2.39	1.36	0.262 8	-
BD	2.95	1	2.95	1.68	0.216 0	-
CD	29.17	1	29.17	16.59	0.001 1	*
A <sup>2</sup>	27.72	1	27.72	15.76	0.001 4	*
B <sup>2</sup>	14.00	1	14.00	7.96	0.013 6	*
C <sup>2</sup>	65.19	1	65.19	37.07	< 0.000 1	**
D <sup>2</sup>	20.92	1	20.92	11.90	0.003 9	*
残差 Residual	24.62	14	1.76	-	-	-
失拟项 Lack of fit	8.10	10	0.810 3	0.196 3	0.983 2	不显著
纯误差 Pure error	16.51	4	4.13	-	-	-
总误差 Cor total	693.59	28	-	-	-	-

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

利用 Design-Expert 13 软件处理实验数据,对各因素分别进行多元线性回归和二项拟合,得到回归方程如下:  $Y = 71.26 + 3.52A + 1.67B + 4.82C - 1.19D + 0.05AB + 2.30AC + 1.35AD - 0.77BC - 0.86BD - 2.70CD + 2.07A^2 - 1.47B^2 + 3.17C^2 + 1.80D^2$ 。

由表 3 所示,模型  $P < 0.000 1$ ,  $F = 27.17$ ,且失拟项  $P = 0.983 2 > 0.05$  为不显著,说明回归模型极显著,具有统计学意义,且无失拟因素存在。该模型判定系数  $R^2 = 0.964 5 > 0.9$ ,调整判定系数  $AdjR^2 = 0.929 0$ ,变异系数为 1.80%,模型变异的可能性

较小,进一步说明该模型拟合程度较高,该模型可用于优化暗紫贝母流浸膏提取工艺。由  $F$  值可知,各因素对暗紫贝母流浸膏提取工艺的影响大小为  $C > A > B > D$ ,浸润时间 > 乙醇体积分数 > 乙醇用量 > 渗漉速度,因素乙醇体积分数和浸润时间表现为极显著因素,乙醇用量和渗漉速度为显著因素。

#### 2.4.2 响应面各因素交互作用分析

响应面 3D 图走势越陡峭,等高线形状越接近椭圆,则两因素交互作用影响越显著<sup>[19]</sup>。由图 6b 和图 6f 可知,浸润时间与渗漉速度、乙醇体积分数

交互作用对暗紫贝母流浸膏的提取具有显著影响,图 6a、6c、6d 和 6e 曲面平缓,说明两因素对暗紫贝

母流浸膏的提取影响较小,这也与表 3 方差分析所得到的结果是一致的。

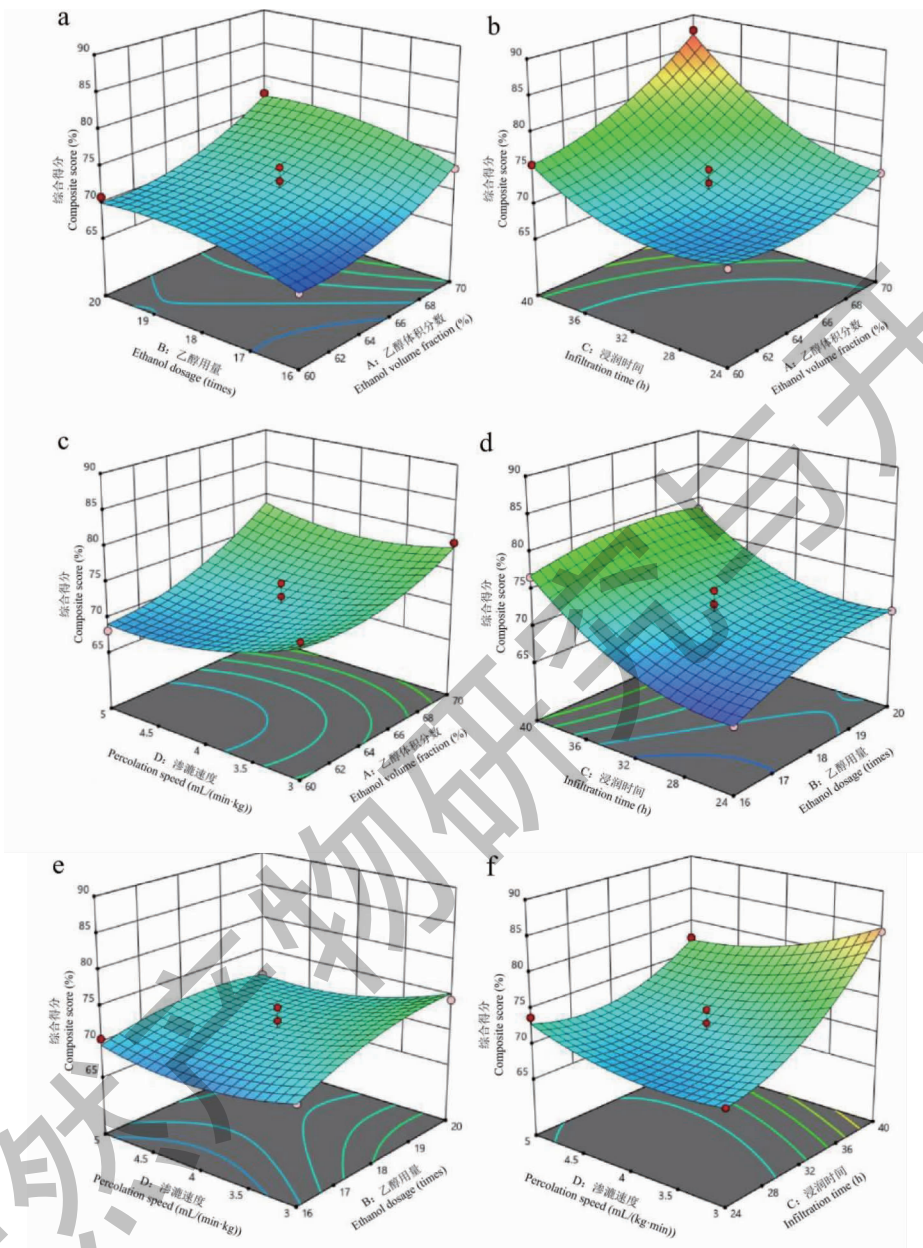


图 6 各因素交互作用的响应面图

Fig. 6 Response surface diagram of interaction of each factor

### 2.4.3 验证工艺

预测暗紫贝母流浸膏最优提取工艺为乙醇浓度 69.80%,乙醇用量 17.67 倍,浸润时间 39.30 h,渗漉速度 3.10 mL/(kg·min),综合评分 88.84%。结合实际操作,修正为乙醇浓度 70%,乙醇用量 18 倍,浸润时间 39 h,渗漉速度 3 mL/(kg·min)。按响应面优化的提取工艺重复 3 次实验,综合评分为

(89.97 ± 1.90)%, RSD 为 2.1%,表明提取工艺稳定可行。

## 2.5 药材鉴别及质量评价结果与分析

### 2.5.1 薄层鉴定

薄层色谱鉴定结果如图 7 所示,暗紫贝母药材供试品与对照品色谱的相应位置上,显相同颜色的斑点,且斑点清晰,分离度好。



### 2.5.2 水分测定、总灰分测定、浸出物测定结果

暗紫贝母药材的水分为 9.6% (<15.0%), 总灰分为 3.4% (<5.0%), 浸出物为 33.0% (>9.0%), 结果均合格。



图 7 暗紫贝母药材 TLC

Fig. 7 TLC of *F. unibracteata*

注:1. 暗紫贝母药材;2. 贝母辛;3. 贝母素乙。Note:1. *F. unibracteata*;2. Peimisine;3. Peiminine

## 2.6 暗紫贝母流浸膏质量评价

### 2.6.1 性状

各批流浸膏剂成品实际性状:本品为棕黄色液体,味微苦。

### 2.6.2 薄层鉴定

薄层色谱鉴定结果如图 8 所示,暗紫贝母流浸膏供试品与对照品色谱的相应位置上,显相同颜色的斑点,且斑点清晰,分离度好。



图 8 暗紫贝母流浸膏 TLC 图

Fig. 8 TLC chromatograms of *F. unibracteata* fluid extract

注:1. 暗紫贝母流浸膏;2. 贝母辛;3. 贝母素乙。Note:1. *F. unibracteata* fluid extract;2. Peimisine;3. Peiminine.

### 2.6.3 乙醇量

三批暗紫贝母流浸膏样品乙醇量分别为 46.0%、46.0% 和 45.5%。

### 2.6.4 重金属检查

B 管为标准铅溶液颜色,A、C、D 管为供试品溶

液管。结果如图 9 所示,A、C、D 管颜色均浅于 B 管,重金属含量未超标。

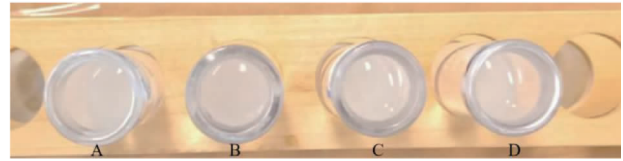


图 9 重金属检查结果图

Fig. 9 Heavy metal test results

## 3 讨论与结论

本实验以暗紫贝母为实验材料,选择总生物碱含量、贝母辛含量、西贝母碱、贝母素甲和贝母素乙三碱含量之和及浸膏得率作为提取工艺优化的考察指标,并利用综合评分作为工艺的评价指标,以期为暗紫贝母流浸膏的开发提供理论依据。采用酸性染料比色法测定总生物碱含量;采用 UPLC-QTOF-MS 法测定四种生物碱单体含量,该方法稳定性好、精密度高、重复性好,适用于暗紫贝母的定量分析,同时也为评价暗紫贝母的质量提供了可靠依据。通过单因素和响应面试验得到暗紫贝母流浸膏最佳渗漉提取工艺为:乙醇体积分数为 70%,乙醇用量为 18 倍,浸润时间为 39 h,渗漉速度为 3 mL/(kg·min),优化了暗紫贝母流浸膏渗漉提取工艺条件。

本研究中暗紫贝母药材薄层色谱鉴定结果斑点清晰、分离度好;药材质量检查中水分测定、总灰分测定、浸出物测定结果均符合标准。并建立了暗紫贝母流浸膏薄层色谱鉴定方法,同时对其乙醇量、重金属含量进行检查,以保证制剂质量,结果均符合中国药典流浸膏制剂规定。研究结果可为今后有效控制暗紫贝母流浸膏的质量提供理论依据。

### 参考文献

- Xu B, Shi FS, Wang LH, et al. Effects of altitude on phenology and morphological characteristics of *Fritillaria unibracteata* [J]. Bull Bot Res (植物研究), 2021, 41:666-674.
- The People's Government of Qinghai Province. Our province identified 'Eighteen Qingyao' as the main genuine Tibetan medicinal materials (我省认定“十八青药”为主要道地中藏药材) [EB/OL]. (2021-12-23) [2024-4-13]. <http://www.qinghai.gov.cn/zwgk/system/2021/12/23/010399716.shtml>.
- Pan F, Chen AM, Zhu XQ, et al. Antioxidant activity of secondary metabolites derived from the fungal *Endophytic fusarium* sp. A14 isolated from *Fritillaria unibracteata* Hsiao et KC

- Hsia[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2017, 29:376-381.
- 4 Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press,2004:109-111.
- 5 Zhang ZY, Chen Y, Jiang XB, et al. Cloning and expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase gene in *Fritillaria unibracteata*[J]. Seed(种子),2019,38:39-45.
- 6 Yu SC, Xiao PG. Studies on the chemical constituents of the plant *Fritillaria unibracteata*[J]. J Integr Plant Biol(植物学报),1990,32:929-935.
- 7 Zhou QM, Peng C, Lu TY, et al. Chemical constituents from *Fritillaria unibracteata*[J]. J Chin Med Mater(中药材),2016,39:2237-2239.
- 8 Zhang HJ, Ma SZ, Xiao YC, et al. RP-HPLC Simultaneous determination of ten nucleosides and nucleobases in *Fritillaria unibracteata*[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2012,32:986-989.
- 9 Guo JX, Lei YT, Han HP, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Volatile Oil from *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia and analysis of its chemical components[J]. J Qinghai Norm Uni:Nat Sci(青海师范大学学报:自科版),2022,38:68-76.
- 10 Wang SH, Liang H, Wang YQ, et al. Steroidal alkaloids and their glycosides from the bulbs of *Fritillaria unibracteata* Chinese[J]. Steroids,2022,181:108977.
- 11 Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press,2020:38-39.
- 12 Huang DY, Zou M, Huang BH, et al. Study on recombinant expression and site-specific mutation of mevalerate kinase gene in *Fritillaria unibracteata*[J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志),2024,39:48-52.
- 13 Zhang T, Liu GY, Cao JL, et al. Peimine-induced apoptosis and inhibition of migration by regulating reactive oxygen species-mediated MAPK/STAT3/NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in gastric cancer MKN-45 cells[J]. Drug Dev Res,2022,83:1683-1696.
- 14 Guo H, Ji F, Liu B, et al. Peiminine ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in rats[J]. Mol Med Rep,2013,7:1103-1110.
- 15 Cunningham AB, Brinckmann JA, Pei SJ, et al. High altitude species, high profits: can the trade in wild harvested *Fritillaria cirrhosa* (Liliaceae) be sustained[J]. J Ethnopharmacol,2018,223:142-151.
- 16 Deng QL, Yang ZM, Chen Y, et al. Study on the high-quality and high-yield fertilization of *Fritillaria unibracteata* based on quadratic general rotary unitized design[J]. Soil Fertil Sci China(中国土壤与肥料),2022,6:96-103.
- 17 Duan GP, Hai P, Zhang MJ, et al. Diagnosis and comprehensive evaluation of soil fertility of *Fritillaria cirrhosa* D. Don GAP site[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报),2023,40:721-726.
- 18 Wu YL. Researches on quality standards of the extract of Szechuan-fritillary[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine(成都中医药大学),2012.
- 19 Ding YF, Liu YY, Li F, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of velvet antler polypeptide by response surface methodology[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2021,39:123-125.