

氧化槐定碱含量测定方法的建立及提取工艺的优化

郭留城 (漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462000)

摘要: 目的: 优化氧化槐定碱的提取工艺, 建立氧化槐定碱的含量测定的方法。方法: 采用 Box-Bohnken 响应面法, 设计三因素三水平响应面实验优化提取工艺; 采用紫外可见分光光度法建立氧化槐定碱的含量测定方法。结果: 苦豆子药材中氧化槐定碱的最佳超声提取工艺为溶剂用量 10 倍, 超声时间为 20min, 超声功率为 80kW, 应用优化后的提取工艺氧化槐定碱的平均含量为 0.197% (RSD 为 1.83%), 与预测值为 0.20632% 非常接近。结论: Box-Behnken 响应面优化苦豆子中氧化槐定碱的超声提取工艺稳定、准确可靠, 建立的氧化槐定碱的含量测定方法操作简便、重复性好、结果准确, 可为苦豆子药材的质量评价及氧化槐定碱的相关制剂研究提供参考。

关键词: 响应面法; 氧化槐定碱; 含量测定; 提取方法

氧化槐定碱 (Oxysophoridine, OSR), 是从豆科槐属植物苦豆子 (*Sophora alopecuroides* L.) 中提取得到的一种重要的生物碱。近几年, 关于这种生物碱的研究又有了很大的进展, 研究发现 OSR 具有镇痛、抗炎、抗肿瘤、镇静、抗心律失常、抗菌、抗病毒、免疫调节、保护脑缺血、抗氧化等多方面的药理活性^[1-6]。然而国内外对 OSR 含量的测定方法的研究比较少, 主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[3] 和电分析法^[4] 等。但电分析法重现性、精密度差; 而 HPLC 法较为费时费力, 且仪器设备价格昂贵, 操作复杂, 给 OSR 制剂工艺研究和质量控制等带来诸多不便, 因此迫切需要建立一种专属性高、快速、准确的含量测定方法。

紫外分光光度法是一种操作简便、准确迅速的分析方法, 并且不需要复杂和昂贵的设备, 样品消耗少, 而且测定后仍能回收利用, 低浓度的盐和大多数缓冲溶液不干扰测定, 成为一种广泛使用的含量测定方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

苦豆子购于安徽省亳州市东祥药业销售有限公司, 经漯河医学高等专科学校天然药物化学教研室鉴定为豆科植物苦豆子 (*Sophora alopecuroides* L.) 的干燥种子, 粉碎成粗粉, 备用。

1.2 仪器与试剂

KQ500DE 型医用超声波 (昆山市超声仪器有限公司); Carry100 型紫外可见分光光度计 (美国瓦里安); RE3000 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); TGL-16G 离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

氧化槐定碱对照品 (190322, 纯度 98.7%, 南京道斯夫生物科技有限公司), 其他所用试剂和溶剂均为分析纯。

2 氧化槐定碱提取方法的优选

OSR 是苦豆子的主要有效成分之一, 易溶于水, 拟采用水提醇沉法进行提取分离和纯化^[5]。根据实验室现有条件, 结合文献报道^[6] 采用煎煮法、浸渍法、渗漉法、超声辅助提取法、微波辅助提取法进行优化提方法。取苦豆子粗粉适量, 适量蒸馏水浸泡过夜, 按上述方法进

行实验, 合并提取液, 多次采用水提醇沉法纯化, 减压旋蒸除溶剂。每种提取方法平行做三次, OSR 平均含量依次为: 0.10% (RSD 为 1.69%)、0.15% (RSD 为 1.51%)、0.22% (RSD 为 1.12%)、0.21% (RSD 为 1.27%)、0.19% (RSD 为 1.83%)。由实验结果可知, 渗漉法、超声辅助提取法、微波辅助提取法三种提取方法的提取效果较好, 但是对比这三种实验方法发现: 渗漉法操作复杂, 使用溶剂较多, 分离纯化困难; 微波辅助提取法对药材的加热效果明显, 可能影响到有效成分的稳定性; 本试验采用超声辅助提取法, 操作简单, 使用溶剂较少, 加热效果不明显, 提取效果好的超声辅助提取法, 并采取 Box-Behnken 响应面法进行提取方法的优化。

2.1 Box-Behnken 响应面优化设计

为了得到 OSR 提取的最佳优化工艺, 在参考文献和单因素预试验的基础上^[7-8], 采用 Box-Behnken 响应面设计方法, 设计 3 因素 3 水平响应面试验, 以 OSR 含量为响应值 (Y) 进行优化, 溶剂用量、提取时间和超声功率的设计水平如表 1 所示, 实验结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平设计

水平	溶剂用量 / 倍 (A)	提取时间 / min (B)	超声功率 / kW (C)
-1	6	10	40
0	8	20	60
+1	10	30	80

表 2 Box-Behnken 实验设计与结果

Run	A: 溶剂用量 / 倍	B: 提取时间 / min	C: 超声功率 / kW	OSR 含量 / %
1	10	20	40	0.1955
2	6	20	40	0.0986
3	8	20	60	0.1977
4	8	10	80	0.1081
5	8	30	80	0.1846
6	8	30	40	0.2097
7	10	10	60	0.1528
8	6	30	60	0.1221
9	6	10	60	0.0495
10	8	20	60	0.1969
11	8	20	60	0.2174
12	10	30	60	0.2191

13	8	20	60	0.2069
14	10	20	80	0.2067
15	8	20	60	0.2127
16	8	10	40	0.1039
17	6	20	80	0.1756

应用 Design-Expert V8.0.6.1 对表 2 进行分析, 结果见表 3, 以含量对各因素自变量进行模型拟合, 通过拟合得到的二次回归方程为 $OSR \text{ 含量} = 0.2063 + 0.0410 \times A + 0.0402 \times B + 0.0084 \times C - 0.0016 \times A \times B - 0.0165 \times A \times C - 0.0073 \times B \times C - 0.0265 \times A^2 - 0.0440 \times B^2 - 0.0108 \times C^2$ ($R^2 = 0.9378$), 由拟合方程结果可知拟合模型 F 值为 11.7364 ($P < 0.05$), 说明拟合模型拟合度高, 表明该拟合模型拟合结果良好, 可用于实验结果分析, 信噪比值为 10.951, 相对较高, 证明该模型可用于实验结果分析, 证明实测值与预测值之间的相关性较高, 能够高度准确的预测实际情况。

表 3 Box-Behnken 设计方差分析结果

来源	平方和 ($\times 10^{-4}$)	自由度	均方 ($\times 10^{-4}$)	F	P
Model	407.9585	9	45.3287	11.7364	0.0019
A	134.7261	1	134.7261	34.8831	0.0006
B	128.9618	1	128.9618	33.3906	0.0007
C	5.6616	1	5.6616	1.4659	0.2653
AB	0.0992	1	0.0992	0.0257	0.8772
AC	10.8241	1	10.8241	2.8026	0.1380
BC	2.1462	1	2.1462	0.5557	0.4803
A ²	29.4792	1	29.4792	7.6327	0.0280
B ²	81.4602	1	81.4602	21.0915	0.0025
C ²	4.8748	1	4.8748	1.2622	0.2983
残差	27.0356	7	3.8622		
失拟项	23.7671	3	7.9224	9.6955	0.0263
纯误差	3.2685	4	0.8171		
总离差	434.9941	16			

根据二次回归方程拟合结果, 将其中一个因素水平固定, 进行 OSR 含量对其他两个因素的拟合, 并得到实验结果的三维效应曲面图对 OSR 的提取工艺参数进行优选, 图 1 中 OSR 的含量随着各变量的增加而增加, 到达最大值后逐渐下降。软件的处方优化的结果为: 溶剂用量为 10 倍、超声时间为 20min, 超声功率为 80kW。

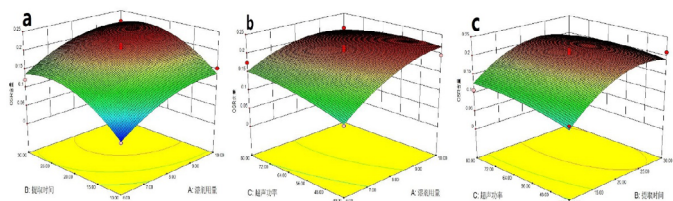


图 1 因素对 OSR 含量的三维响应面图

2.2 验证实验

根据响应面实验结果的最优工艺, 即溶剂用量为 10 倍、超声时间为 20min, 超声功率为 80kW, 3 批 OSR 的含量结果分别为 0.200‰、0.194‰、0.197‰, 平均含量为 0.197‰, RSD 值为 1.83%。OSR 的含量的实测平

均值为 0.197‰与预测值为 0.20632‰非常接近, 偏差较小, 预测性良好, 证明 OSR 的最佳提取工艺的稳定性。

3 氧化槐定碱含量测定方法建立与方法学验证

3.1 最佳吸收波长选择

精密称取 OSR 对照品适量置于容量瓶中, 加蒸馏水定容, 配制成适宜浓度的 OSR 溶液。以蒸馏水为空白, 于 200~800nm 范围内扫描, OSR 对照品溶液在 200~250nm 范围内随着波长减小, 吸光度逐渐增大, 综合考虑吸收强度、试验干扰和信噪比等因素, 最后确定以 210nm 为测定波长。

3.2 线性与回归方程

精密称取 OSR 26.4mg 置于 100mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容, 配制成 1mmol/L 的 OSR 储备液。分别精密量取 OSR 储备液适量, 分别配制成 50、60、70、80、90、100 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 在 210nm 处测定吸光度。进行线性回归, 得回归方程为 $y = 2.92 \times 10^{-3}x + 0.12906$, $R^2 = 0.99476$, 线性范围为: 50~100 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.3 精密度的试验

精密量取 OSR 对照品溶液适量, 配制成 75 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 平行 6 份, 定容, 并以蒸馏水为参比, 于 210nm 处测定吸光度, 结果为: 0.3472、0.3510、0.3483、0.3467、0.3478、0.3495, 平均值为: 0.3482, RSD 为 0.46% ($n=6$), 表明精密度良好。

3.4 重复性试验

取同一批 OSR 提取液, 制备供试品溶液 6 份, 分别测定吸光度, 结果为: 0.4123、0.4024、0.4098、0.4157、0.4208、0.4189, 平均值为: 0.4122, RSD 为 1.63% ($n=6$), 表明供试品重复性良好。

3.5 稳定性试验

精密量取 OSR 对照品溶液适量, 配制成适宜的溶液, 每隔 30min 测定 1 次吸光度, 结果为: 0.4367、0.4411、0.4327、0.4471、0.4392、0.4439, 平均值为 0.4394, RSD 为 1.17% ($n=6$), OSR 溶液在 3h 内稳定。

3.6 加样回收率试验

取同一批 OSR 提取液制成适宜浓度后, 分成三组, 分别加入高中低三种浓度 OSR 对照品, 分别测定吸光度, 平行测定 3 次, 高中低三种浓度 OSR 的回收率分别为: 95.34% (RSD 为 1.17%)、96.25% (RSD 为 0.82%)、98.24% (RSD 为 0.53%)。

3.7 氧化槐定碱的含量测定

取纯化好的 OSR 样品适量, 制备供试品溶液 3 批测定的结果分别为 0.194‰ (RSD 为 1.07%)、0.199‰ (RSD 为 1.01%) 和 0.193‰ (RSD 为 1.30%)。

4 结论

本研究通过应用 Box-Behnken 法对苦豆子中 OSR 超声提取进行优化, 选用溶剂的用量、超声时间和超声功率 3 个因素建立了二次回归方程, 以 OSR 的提取率为考察指标。经过验证实验表明, 优选出的 (下转第 130 页)

论考试和技能考试合格后才能上岗,提高综合安全控制能力;②定期进行有毒有害场所进行风险评估和相关岗位人员的应急演练;③对现场作业人员应配备防静电工作服、防静电工作鞋、防毒面具及防酸、防碱用品等必要的个体劳保用品,并实行色彩管理。

2.5 管理组织因素控制

①油品码头必须按比例配置专职安全人员,设置专门的安全管理机构;②建立安全保证体系和信息反馈体系,设立安全生产委员会,以便处理重大安全事项;③制定特殊危险事件及突发事件的应急预案,该预案应与整个港口的应急预案衔接,制定训练演习计划,并定期进行演习;④建立严格的门卫安全管理制度,所有进出油库、码头机动车辆均应配戴阻火器,并加强安全管理;⑤采用现代化安全管理方法,推行安全科学管理,防止各种事故发生。

2.6 设计因素控制

①积极加强与设计方之间的沟通,向其提供尽可能完善的资料,使设计方考虑施工的实际情况,加强对实地的考察工作,根据施工情况不断改进设计;②尽量选用经验丰富的人员,加强人员培训,还可采用以老带新的方法,加强人员间的交流;③加强对审定工作的管理,建立严格的奖惩制度。加强监督,提高人员的责任感;④工程建设期间,召开风险讨论会,排查阻碍工程风险点。

2.7 建造因素控制

①加强安装、建造公司与上级之间的沟通,及时得到有关变更或修改的通知,并向上级部门反映不能解决的问题,使工作上不会出现脱节现象,保证工期顺利进行;②提高施工人员素质、经验。加强对施工人员的培训,对施工人员进行正确的引导,强调保证施工进度

重要性,培养进度意识。每一项工作尽量做到有经验、资历高的员工帮、带经验不足的员工;③明确责任,定期召开生产进度会议。

3 结论

采用事故树法理论对码头的油库区开展全面的风险辨识和风险评价,在此基础上针对主要风险源提出风险控制措施,得到以下结论:①着火源是码头油库区中必须考虑的风险因素,其风险后果极为严重。而且由于码头在生产过程中不可避免会产生火源因素,所以必须加强对火源因素的防范、隔离等管理措施;②在整个油库、码头生产过程的各个环节中,均存在操作人员(或管理人员)失误所造成的风险。并且,它不但是生产过程中最重要的风险源,在设计因素和建造因素中人员的失误也占有相当大的比重。因此可认为,在码头生产过程中人员操作失误和管理失误是最主要的薄弱环节;③虽然在工程施工中偶发事件发生的可能性很小,但是一旦发生,后果极其严重。因此,针对某一具体的施工工程,加大对偶发事件的预测、预报,完善应急措施是十分必要的,特别是要考虑对恶劣海况如台风的预测和防护。

参考文献:

- [1] 胡建华. 油品储运技术 [M]. 北京: 中国石化出版社, 2000.
- [2] JTJ237-99. 装卸油品码头防火设计规范 [S]. 北京: 交通部, 1999.

作者简介:

李树朋(1983-)男,汉族,籍贯:山东龙口,大学本科,研究方向:油库管理。

刘绍雄(1984-)男,汉族,籍贯:黑龙江哈尔滨,大学专科,目前职称:技术员,研究方向:油库管理。

(上接第127页)最佳超声提取工艺稳定可行、预测性较好。本实验建立了一种简便快速的含量测定方法,对实验方法进行了方法学考察,并用该方法对3个平行批次样品中该指标性成分的含量进行了测定,结果表明,本实验方法比较成熟,科学合理,稳定可靠,重复性好,在线性范围内具有良好的灵敏度和加样回收率,为苦豆子等中药中OSR的含量测定,以及OSR制剂的开发和质量控制的进一步研究提供了一种简便快速的含量测定方法。

参考文献:

- [1] Zhang Ya-Nan, Zhang Qiu-Yan, Li Xiao-Dan, et al. Gemcitabine, lycorine and oxysophoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture. [J]. Emerging microbes & infections, 2020, 9(1): 1170-1173.
- [2] 张明发, 沈雅琴. 槐定碱和氧化槐定碱及13 α -羟基苦参碱抗炎和免疫抑制作用的研究进展 [J]. 抗感染药, 2018, 15(06): 921-925.
- [3] 文友民, 纪红燕, 邓宁, 等. HPLC-UV测定大鼠血浆

中氧化槐定碱含量及其药代动力学研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(9): 1449-1453.

- [4] 姚慧琴, 高作宁, 韩晓霞, 等. 苦参碱类生物碱在玻碳电极上的直接电化学行为及电分析方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 30(10): 765-768.
- [5] 张玉玲, 岳晓琪, 张艳丽. 苦豆子生物碱体外抑菌活性的检测 [J]. 轻工科技, 2019, 35(7): 33-34.
- [6] 张明发, 沈雅琴. 槐定碱和氧化槐定碱及拉马宁碱的药动力学研究进展 [J]. 抗感染药, 2020, 17(6): 777-781.
- [7] David J. Edwards, Robert W. Mee. Fractional Box-Behnken Designs for One-Step Response Surface Methodology [J]. Journal of Quality Technology, 2019, 43(4): 288-306.
- [8] 张小雯, 孙敬蒙, 汪卓明, 等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 响应面法优化马来酸桂哌齐脂质体的制备及表征 [J]. 医药导报, 2021, 40(2): 240-247.

基金资助: 2017年度河南省高等学校青年骨干教师培养计划(编号: 2017GGJS286)。