

正交试验法优选三黄丸提取工艺

马燕¹, 喇孝瑾², 白素芬², 吕建东², 张晓鹏², 韩刚², 王虹玉², 喇万英^{2*}

(1. 开滦(集团)有限责任公司医院分院, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 优选三黄丸的提取工艺。方法: 以盐酸小檗碱含量为指标, 高效液相色谱法测定提取液中盐酸小檗碱含量, 采用正交试验设计优选三黄丸的提取工艺。结果: 三黄丸的最佳提取工艺为 6 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h。结论: 该提取工艺稳定, 安全, 简便易行。

[关键词] 三黄丸; 正交试验; 提取工艺; 高效液相色谱法; 盐酸小檗碱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0031-03

Optimization of Extraction Technology for Sanhuang Pill by Orthogonal Test

MA Yan¹, LA Xiao-jin², BAI Su-fen², LV Jian-dong², ZHANG Xiao-peng²,
HAN Gang², WANG Hong-yu², LA Wan-ying^{2*}

(1. Branch of Hospital, Kailuan Group Co. Ltd, Tangshan 063000, China;
2. Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Sanhuang pill. **Method:** Orthogonal experiment was used to optimize extraction technology of Sanhuang pill with the content of berberine hydrochloride as index, the content of berberine hydrochloride was determined by HPLC. **Result:** Optimum extraction process of Sanhuang pill was: extracted 2 times with 6 times the amount of water, 1.5 h each time. **Conclusion:** This optimized technology of Sanhuang pill was simple, stable and effective.

[Key words] Sanhuang pill; orthogonal test; extraction technology; HPLC; berberine hydrochloride

三黄丸出自元朝朱丹溪《丹溪心法》卷三, 由黄连、黄芩、大黄组成, 主治消渴。方中黄连的主要药效成分为小檗碱^[1], 本文采用正交试验法, 以提取液中盐酸小檗碱含量为指标, 对三黄丸的水提工艺进行优选。

1 材料

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110713-201011), 黄连(批号 20101105)、黄芩(批

号 20101205)、大黄(批号 20101203)等药材均购于河北祁新中药颗粒饮片有限公司, 经河北联合大学中医学院喇万英教授鉴定分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根, 蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根茎。乙腈、磷酸二氢钾为色谱纯, 甲醇、乙醇为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 盐酸小檗碱含量测定^[2-3]

2.1.1 对照品、样品及阴性对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品约 3 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液。取各提取液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得样品溶液^[4-5]。除去黄连外, 按本处方工艺制备样品, 照样品制备方法进行处理, 制得阴性对照品溶液。

2.1.2 色谱条件^[6] Zorbox SB C₁₈ 色谱柱

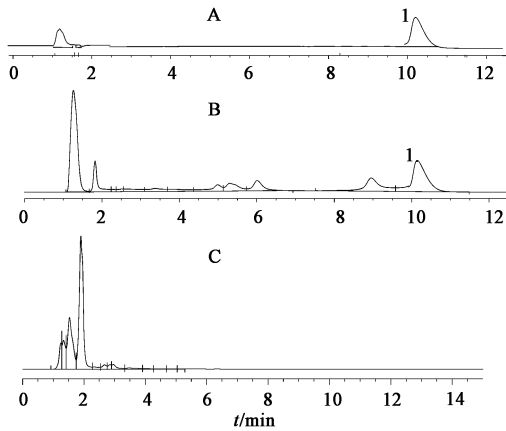
[收稿日期] 20111204(003)

[基金项目] 科技部国际科技合作项目(2008DFA31050)

[第一作者] 马燕, 硕士研究生, 执业医师, 从事医疗工作, Tel: 13582910795, E-mail: mayan212002 @ yahoo.com.cn

[通讯作者] *喇万英, 本科, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 从事科研及教学工作, Tel: 13832873908, E-mail: lwy1948@163.com

(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(25:78), 检测波长 350 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。此条件下盐酸小檗碱与其他组分达到基线分离, 黄连阴性无干扰。色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照; 1. 盐酸小檗碱

图 1 三黄丸水提液 HPLC

2.1.3 线性关系 分别精密吸取对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 加甲醇稀释并定容于 25 mL 量瓶中, 进样 20 μL, 按上述色谱条件进行测定, 以盐酸小檗碱的峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 61.812X + 0.0060$ ($r = 0.9998$)。结果表明盐酸小檗碱在 1.2 ~ 12 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 计算 RSD 0.92%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性考察 分别取放置 1, 2, 4, 6, 8 h 的样品溶液, 测定盐酸小檗碱峰面积, RSD 0.95%, 表明样品溶液至少在 8 h 内稳定。

2.1.6 样品含量测定 按 2.1.2 项下色谱条件, 吸取各样品溶液 10 μL 进样, 测定盐酸小檗碱峰面积, 按标准曲线方程计算其含量。

2.2 正交试验设计 精确称取 9 份药材, 每份药材均含有黄连 100 g、黄芩 100 g、大黄 100 g, 分别于回流装置中回流提取。选择加水量、提取时间、提取次数为考察因素^[7], 每个因素设 3 个水平, 以提取液中盐酸小檗碱含量为指标, 采用 L₉(3⁴) 正交表安排试验见表 1, 正交试验设计及结果见表 2。方差分析见表 3。

由表 2 结果可知, 其最佳提取工艺条件为 A₁B₂C₂D₂, 各因素主次顺序为 C > B > A。方差分析结果表明, 因素 C, B 对盐酸小檗碱含量有显著性影

表 1 三黄丸水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量 / 倍	B 提取时间 / h	C 提取次数 / 次
1	6	1.0	1
2	8	1.5	2
3	10	2.0	3

表 2 三黄丸水提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	盐酸小檗碱 / %
1	1	1	1	1	1.18
2	1	2	2	2	2.12
3	1	3	3	3	2.04
4	2	1	2	3	1.42
5	2	2	3	1	1.81
6	2	3	1	2	1.30
7	3	1	3	2	1.46
8	3	2	1	3	1.21
9	3	3	2	1	1.86
K ₁	5.34	4.06	3.42	4.85	
K ₂	4.53	5.14	5.13	4.88	
K ₃	4.53	5.20	5.04	4.67	
R	0.81	1.14	1.71	0.21	

表 3 盐酸小檗碱含量方差分析

方差来源	SS	MS	f	F	P
A	0.145 8	0.072 9	2	16.95	>0.05
B	0.274 4	0.137 2	2	31.91	<0.05
C	0.617 4	0.308 7	2	71.79	<0.05
D(误差)	0.008 6	0.004 3	2	1.00	

注: F_{0.05}(2, 2) = 19.00。

响。结合实际情况考虑, 最终确定提取工艺条件为 A₁B₂C₂D₂, 即用 6 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h。

2.3 验证试验 精确称取 3 份药材, 每份药材均含有黄连 100 g、黄芩 100 g、大黄 100 g, 粉碎(过 100 目筛), 测得药材粉末中盐酸小檗碱质量浓度分别为 16.34%, 16.66%, 17.62%, 按上述优选工艺分别回流提取, 测得提取液中盐酸小檗碱质量浓度分别为 2.18%, 2.20%, 2.36%, 计算盐酸小檗碱转移率为 13.34%, 13.21%, 13.39%。表明采用优选工艺条件进行提取, 盐酸小檗碱含量较高, 且工艺稳定、合理。

3 讨论

试验进行多次提取时, 由于其他固形物量增多, 导致盐酸小檗碱含量相对降低。本文以盐酸小檗碱

响应面分析法优化湿法超微粉碎地龙蛋白的提取工艺

杨丰云¹, 付廷明¹, 郭立玮^{1*}, 刘峰², 张伟²

(1. 南京中医药大学, 中药复方分离工程重点实验室, 南京 210029;

2. 陕西步长制药有限公司, 西安 710075)

[摘要] 目的: 优选采用湿法超微粉碎法提取地龙蛋白的工艺。方法: 在单因素试验基础上, 以浸泡时间、料液比、提取温度、粉碎时间为影响因素, 蛋白质得率为响应值, 根据中心组合试验设计原理采用四因素三水平的响应面分析法, 对湿法超微粉碎提取地龙蛋白条件进行优化。结果: 湿法超微粉碎提取地龙蛋白的最佳工艺条件为浸泡时间 4.7 h, 料液比 1 : 11, 提取温度 17 ℃, 粉碎时间 10 min。在此条件下蛋白质得率 3.46%。结论: 湿法超微粉碎提取技术适用于地龙蛋白提取。该试验优选提取工艺稳定可行, 适于工业化推广。

[关键词] 湿法超微粉碎; 地龙; 响应面分析法; 蛋白质; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0033-05

Optimization of Extraction Technology for Wet Ultrafine Grinding Technology on Earthworm Protein by Response Surface Methodology

YANG Feng-yun¹, FU Ting-ming¹, GUO Li-wei^{1*}, LIU Feng², ZHANG Wei²

(1. Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Shanxi Buchang Pharmaceutical Co. Ltd, Xi'an 710075, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of earthworm protein by wet ultrafine grinding technology. **Method:** On the basis of single-factor test, extraction technology of wet ultrafine grinding method on earthworm protein was optimized with soaking time, solid-liquid ratio, extraction temperature and grinding time as influencing factors, yield of protein as response value. According to central composite test design principles, 4 factors and 3 levels of response surface analysis method was used. **Result:** Optimum extraction process of

[收稿日期] 20120101(002)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-308-008); 江苏省中医药局科技项目(LZ09007)

[第一作者] 杨丰云, 硕士研究生, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:15250986529, E-mail:yfyfj@sina.com

[通讯作者] * 郭立玮, 博士, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:025-86798188, E-mail:guoliwei815@yahoo.com.cn

作为指标成分进行含量测定, 具有一定的片面性, 不能完全代表该复方的药效, 因此在今后研究中应综合考虑盐酸小檗碱含量及其他有效成分确定工艺。

[参考文献]

- [1] 武佳, 谭桂莲, 杨红. 黄连中盐酸小檗碱提取工艺探究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 437.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 162.
- [3] 吴晋荣, 邢耘. 高效液相色谱法测定一清颗粒盐酸小檗碱含量[J]. 医药导报, 2009, 28(2): 242.

- [4] 刘倩, 刘永刚, 喇孝瑾, 等. 正交试验法优选复方茜草胶囊提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 4.
- [5] 黄家卫, 盛振华. 黄连中盐酸小檗碱的水提工艺研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(3): 528.
- [6] 赵琳琳, 马燕, 赵媛, 等. 栝楼根丸水提取工艺正交优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 24.
- [7] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用[M]. 2版, 北京: 人民卫生出版社, 2000: 138.

[责任编辑 全燕]