

星点设计-效应面法优化黄连提取工艺

李航,李小芳*,李娜,易鹏,苏娟,张玉莉

(1. 成都中医药大学,成都 611137; 2. 中药材标准化教育部重点实验室,成都 611137;
3. 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地,成都 611137)

[摘要] 目的:优选黄连提取工艺。方法:以乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间为自变量,以总评“归一值”(包括浸膏得率,小檗碱、黄连碱、黄连总碱的质量分数)为因变量,对自变量各水平进行多元线性回归及二项式拟合;采用效应面法优选提取工艺,并对结果进行预测分析。结果:优选的提取工艺为 10 倍量 50% 乙醇提取 3 次,每次 50 min。提取率实测值与预测值偏差为 -2.27%,二项式拟合 $r=0.936\ 2$ 。结论:优选的黄连提取工艺简便,预测性良好。

[关键词] 黄连;星点设计;效应面优化法;总评“归一值”;小檗碱;黄连碱;黄连总碱;一测多评
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)14-0052-04

Optimization of Extraction Technology for Effective Constituents from *Coptis chinensis* by Central Composite Design/Response Surface Methodology

LI Hang, LI Xiao-fang*, LI Na, YI Peng, SU Juan, ZHANG Yu-li

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Chengdu 611137, China; 3. System of Traditional Chinese Medicine resources and Development Utilization of Ministry of State Key Laboratory Breeding Base, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of *Coptis chinensis*. **Method:** With the concentration of ethanol, the amount of solvent and extraction time as independent variables, overall desirability as dependent variable (including yield of extract, the content of berberine, coptisine and total alkaloids), each level of independent variables were fitted by multiple linear regression and binomial formula, response surface method was used to optimize extraction process, and prediction was carried out through comparing observed and predicted value. **Result:** Optimal extraction process was: extracted 3 times with 10 times the amount of 50% ethanol, 50 min each time. the regression coefficients of binomial fitting complex model was 0.936 2, deviation between observed and predicted value was -2.27%. **Conclusion:** Optimized extraction technology of *C. chinensis* was convenient with high predictive.

[Key words] *Coptis chinensis*; central composite design; response surface methodology; overall desirability; berberine; coptisine; total alkaloids from *C. chinensis*; quantitative analysis of multi-components by single marker

毛茛科植物黄连为本课题自组处方——肠康宁 中的一味中药,具有清热燥湿、泻火解毒等功效。现

[收稿日期] 20120227(015)
[基金项目] 四川省教育厅科研项目(102B076);成都中医药大学实验技术项目(024043-20)
[第一作者] 李航,在读硕士,从事中药新剂型及中药新技术研究, Tel:13980555289, E-mail:sdlxsas@126.com
[通讯作者] * 李小芳,博士,教授,从事中药新剂型及中药新技术研究, Tel:13808195110, E-mail:lixiaofang918@163.com

代研究表明黄连总生物碱、小檗碱、黄连碱均具有防治应激性胃溃疡作用,其中黄连碱作用强度要明显强于黄连总生物碱和小檗碱,且用量较少^[1]。结合中药复方的用药特点,本试验确定以小檗碱、黄连碱、黄连总碱的含量及浸膏得率为指标,运用星点设计-效应面法结合总评归一值法进行黄连提取工艺优化。

1 材料

Agilent1200 型高效液相色谱仪(四元泵,美国安捷伦公司),BP211D AG 型电子天平(德国 Sartorius),UPT 型实验室超纯水器(济南启科设备有限公司),YF-111 型高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司)。

盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110713-200609),黄连饮片(四川新荷花股份有限公司,产地四川,批号 1106067),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相^[2] 乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g,以磷酸调 pH 4.0),柱温 25 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 345 nm,理论塔板数以盐酸小檗碱峰计算应不低于 5 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 4.525 mg 至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 90.5 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备^[2] 取黄连提取液 2 mL,精密称定,加甲醇-盐酸(100:1)混合液 50 mL,转移至密塞的锥形瓶中,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,混匀,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液 0.5,1,2,4,6,8,10 mL 至 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,取 10 μL 进样测定,每个样品进样 3 次。以盐酸小檗碱含量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y = 2\,210.7X + 13.3$ ($R^2 = 0.999\,9$),在 4.525 ~ 90.5 mg·L⁻¹ 呈良好线性关系。

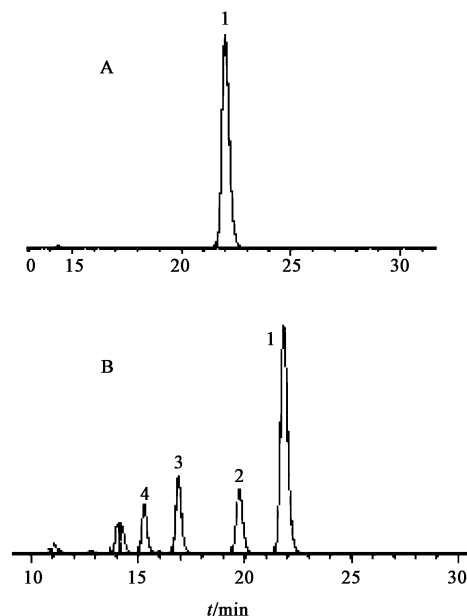
2.1.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,按上述色谱条件测定,结果小檗碱峰面积 RSD 0.5%。说明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称取同一对照品溶液,分别于 0,2,4,6,8,12 h 测定,按上述色谱条件测定,结果 RSD 0.3%,表明被测物在 12 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一样品溶液 5 份,按 2.1.3 项下方法制备供试品,测定其小檗碱含量,结果 RSD 0.2%,表明该方法的重复性良好。

2.1.8 加样回收试验 分别精密称取 6 份同一黄连药材粉末各 0.1 g。分别准确加入小檗碱对照品溶液,摇匀,按 2.1.3 项下制备供试品;按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算得平均回收率为 100.35%,RSD 2.3%。说明该方法回收率良好。

2.1.9 药材测定 取星点设计试验的 1~20 号样品制备供试品溶液,测定黄连药材中小檗碱、黄连碱、黄连总碱的含量。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 小檗碱; 2. 巴马汀;

3. 黄连碱; 4. 表小檗碱

图 1 黄连 HPLC

以总评“归一值”为指标,即浸膏得率,小檗碱、黄连碱和黄连总碱的 OD 值之和。每个指标均标准化为 0~1 的“归一值”,各指标“归一值”求算几何平均数,得总评“归一值”。公式如下^[3]:

$$OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k} (K \text{ 为指标数})。$$

对取值越小越好的因素和取值越大越好的指标,分别采用 Hassan 法进行数学转换求“归一值” d_{min} 和 d_{max} ,公式如下:

$$d_{min} = (Y_{max} - Y_i) / (Y_{max} - Y_{min});$$

$$d_{max} = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})。$$

各指标“归一值”求算几何平均数,得总评“归一值”。本研究所用指标均取最大值。

2.2 醇提工艺优选 选取乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间和提取次数为考察因素,其中提取次数为非连续变量,回归处理较困难,结合预试验结果、工业生产实际及相关文献,暂定为 3 次。每因素设 5 水平,用代码值 $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ 表示(3 因素星点设计的 $\alpha = 1.732$)。因素水平见表 1,试验安排和结果见表 2。

表 1 黄连生物碱提取工艺优选星点设计试验因素水平			
水平	X_1 乙醇体积分数/%	X_2 溶剂用量/倍	X_3 提取时间/min
- 1. 732	40	4	30
- 1	50. 566 2	5. 690 6	49. 019 2
0	0	0	0
1	79. 433 8	10. 309 4	100. 98 1
1. 732	90	12	120

表 2 黄连生物碱提取工艺优选星点设计试验安排								
No.	X_1	X_2	X_3	浸膏得率 /%	小檗碱 /%	黄连碱 /%	黄连总碱 /%	OD 值
1	- 1	- 1	- 1	24. 03	6. 193	1. 605	10. 362	0. 651
2	1	- 1	- 1	22. 10	6. 182	1. 516	10. 243	0. 508
3	- 1	1	- 1	24. 89	6. 694	1. 809	11. 271	0. 968
4	1	1	- 1	22. 77	6. 307	1. 599	10. 513	0. 626
5	- 1	- 1	1	24. 52	6. 187	1. 633	10. 395	0. 683
6	1	- 1	1	22. 84	5. 936	1. 463	9. 863	0. 439
7	- 1	1	1	25. 56	6. 555	1. 744	11. 005	0. 915
8	1	1	1	21. 41	6. 258	1. 583	10. 428	0. 504
9	- 1. 732	0	0	25. 53	6. 524	1. 733	10. 954	0. 898
10	1. 732	0	0	20. 11	5. 444	1. 143	8. 934	0. 000
11	0	- 1. 732	0	22. 84	5. 740	1. 474	9. 618	0. 361
12	0	1. 732	0	25. 14	6. 609	1. 748	11. 090	0. 918
13	0	0	- 1. 732	24. 40	6. 465	1. 700	10. 849	0. 812
14	0	0	1. 732	24. 14	6. 463	1. 705	10. 845	0. 800
15 ~ 20	0	0	0	24. 44	6. 473	1. 710	10. 859	0. 820

注:试验步骤 15 ~ 20 为重复试验,其值为平均值;黄连总碱主要包括小檗碱、黄连碱、巴马汀、表小檗碱。

2.2.1 模型拟合及显著性检验 以总评 OD 值为因变量,使用 Design-Expert 7 对各因素进行多元线性回归和二项式拟合。多元线性回归 $P < 0.000\ 3$, $R^2 = 0.677\ 0$,虽然模型通过检验,但拟合度不佳,预测性较差。

多元线性方程 Y (总 OD 值) = $1.195 - 0.013 \times X_1 + 0.052 \times X_2 - 6.386 \times 10^{-4} \times X_3$;

二项式拟合方程 Y (总 OD 值) = $-2.878 + 0.075X_1 + 0.326X_2 + 5.081 \times 10^{-3} X_3 - 1.367 \times 10^{-3} X_1X_2 - 5.660 \times 10^{-5} X_1 X_3 - 2.863 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 5.660 \times 10^{-4} X_1^2 - 0.0102X_2^2 + 1.660 \times 10^{-6} X_3^2$ 。

对该模型进行方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知,模型组具有高度的显著性, $R^2 = 0.936\ 2$,说明方程拟合度和可信度均良好,试验误差小,故可用此模型对黄连各生物碱的提取工艺进行分析和预测。 X_1, X_2 因素中一次项和二次项均具有显著性影响,说明各具体试验因子对响应值的影响不是简单线性关系。故选择二项式拟合模型为成功模型,实测值和预测值基本吻合,有较好的预测作用。

表 3 黄连生物碱醇提工艺拟合回归方程方差分析					
方差来源	<i>SS</i>	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	1.00	9	0.11	16.31	<0.000 1
X_1	0.52	1	0.52	76.03	<0.000 1
X_2	0.21	1	0.21	30.10	0.000 3
X_3	3.85×10^{-3}	1	3.85×10^{-3}	0.57	
X_1X_2	0.017	1	0.017	2.43	
X_1X_3	3.60×10^{-3}	1	3.60×10^{-3}	0.53	
X_2X_3	2.36×10^{-3}	1	2.36×10^{-3}	0.35	
X_1^2	0.22	1	0.22	32.11	0.000 2
X_2^2	0.047	1	0.047	6.82	<0.05
X_3^2	1.98×10^{-5}	1	1.98×10^{-5}	2.90×10^{-3}	
残差	0.068	10	6.82×10^{-3}		
总差	1.07	19			

2.2.2 工艺条件优化与预测 根据回归方程,作响应曲面图,考察所拟合的响应曲面形状,分析乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间对黄连中小檗碱、黄连碱、黄连总碱含量的影响。其响应面图见图 2 ~ 4。

比较 3 组图并结合表 3 中 P 值可知, X_1, X_2 ,

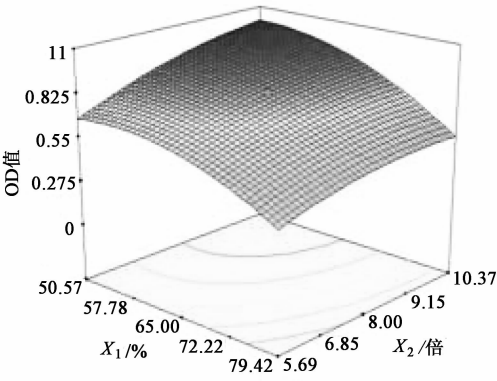


图2 乙醇体积分数、溶剂用量及其相互作用对生物碱影响的响应面

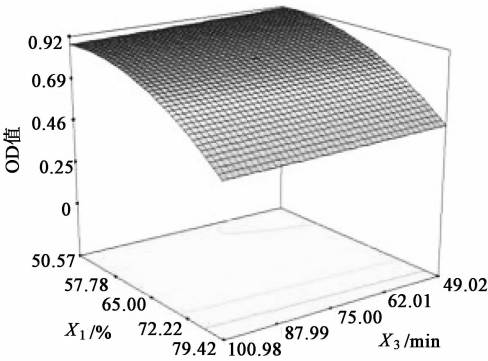


图3 乙醇体积分数、提取时间及其相互作用对生物碱影响的响应面

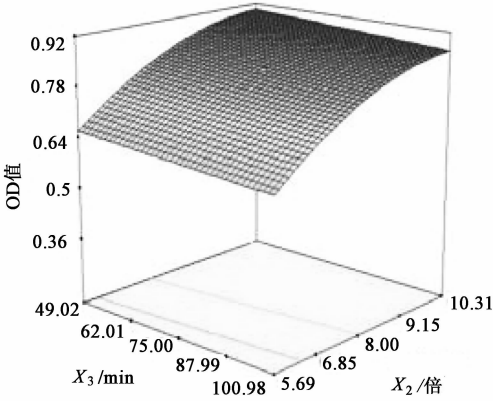


图4 溶剂用量、提取时间及其相互作用对生物碱影响的响应面

X_1^2, X_2^2 对总评 OD 值的影响显著,各因素间的交互作用影响不明显;表明各影响因素对小檗碱、黄连碱、黄连总碱得率的影响不是简单的线性关系。为进一步确定最佳提取工艺参数,基于已建立的数学模型,对总评 OD 值进行最优化设计,得到最佳 OD 值的提取条件为乙醇体积分数为 50%,溶剂用量 10 倍量,提取时间 50 min。总评归一值的预测值为

0.823 7。
2.2.3 验证试验 为检验试验方法的可靠性,按优选工艺条件进行 3 次验证试验,得到总评归一值的实际值为 0.805 4,黄连中小檗碱、黄连碱、黄连总碱及浸膏得率的质量分数分别为 24.96%,6.93%,1.87%,12.01%,与预测值偏差为 -2.27%,说明本试验建立的数学模型可用于预测黄连其醇沉工艺的总评指标。

3 讨论

国内学者对星点设计-效应面法优化药材提取工艺的应用越来越多^[4-5],但目前对于黄连提取工艺的优选大多采取正交设计或均匀设计法^[6-7],主要以小檗碱、浸膏得率作为因变量,普遍存在精确度不高、预测性不好、考查指标成分不全面等问题。本试验结合中医药的用药特点及肠康宁方的疗效作用,将星点设计-效应面法和总评归一法引入到黄连的提取工艺研究中来,较好的解决了上述问题,可在一定程度上对医药研究工作者提供借鉴和参考。

本试验对于 3 次验证试验的结果做了提取率考察,来佐证本试验建立的数学模型的可信性。提取率 = 提取物中小檗碱的质量分数/药材中小檗碱的质量分数 × 100%。通过公式计算得出,用此数学模型提取小檗碱的提取率为 92.15%,进一步证明了此数学模型的可信性。

[参考文献]

[1] 李峰. 黄连的化学成分及质量标准的研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.
[2] 中国药典. 一部[S]. 2010;285.
[3] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8):532.
[4] 陈健, 廖国平, 张忠义. 星点设计-效应面法优化超高压提取红景天中红景天苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 19.
[5] 田振坤, 马英丽, 吴伦, 等. 星点设计-效应面法优化北五味子果实提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):28.
[6] 徐媛, 张琰, 刘新友, 等. 正交试验法优选黄连中小檗碱提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(5):60.
[7] 汪兰芳, 方优妮, 王平, 等. 正交试验优选失眠贴中黄连乙醇回流提取工艺[J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(5):31.

[责任编辑 仝燕]