

正交设计优选黄连中盐酸小檗碱的提取工艺^{*}

★ 齐宁利 朱卫丰 廖正根 颜冬梅 (江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

摘要:目的:观察正交设计对黄连中盐酸小檗碱提取工艺的优化作用。方法:采用正交设计安排试验,以总生物碱量、小檗碱量、干浸膏得率为指标,考察醇浓度、醇用量、回流时间、提取次数对其影响。结果:最佳工艺条件为药材加 6 倍量 70% 乙醇,提取 3 次,每次回流 1 小时,该结果在验证试验中得到验证。结论:正交设计优化的提取工艺可充分提取黄连中盐酸小檗碱及生物碱类化合物。

关键词:盐酸小檗碱;正交设计;提取工艺

中图分类号:TQ 460.6 **文献标识码:**A

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的根茎,具清热燥湿,泻火解毒等功效,其主要有效成分是以盐酸小檗碱为代表的生物碱类化合物。为充分提取黄连中生物碱,选择适宜的提取工艺,本文通过 $L_9(3^4)$ 正交设计实验,采用综合评分法,以总生物碱、小檗碱和总干浸膏为指标,确定黄连生物碱的最佳提取参数。

1 材料与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪;紫外分光光度计 UV3000 (Hitachi 公司);色谱条件(Hypersil ODS2 5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm);盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200208,购于中国药品生物制品检定所);黄连(购自江西黄庆仁栈华氏饮片厂,批号:20051108,产地:河北)。

2 色谱条件

色谱柱:ODS 柱;流动相:乙腈-0.033 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(33:67);检测波长:265 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:1 mL/min。

3 方法与结果

3.1 黄连总生物碱的含量测定

3.1.1 对照液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 26 μg 的溶液,即得。

3.1.2 标准曲线的制备 取 3.1.1 项下盐酸小檗碱对照液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,分别置于 5 mL 容量瓶中,甲醇定容至 5 mL,在紫外分光光度计下 349.5 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,计算回归方程。回归方程为 $Y = 57.613X + 0.0011$, $R = 0.9995$ 。结果表明:盐酸小檗碱在 1.04~6.24 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

3.2 盐酸小檗碱的含量测定

3.2.1 标准曲线的制备 将 3.1.1 项下盐酸小檗碱对照液精密吸取 2.4、5.6、7.8 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度。分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪,测定,记录峰面积。以盐酸小檗碱浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,计算回归方程。回归方程为 $Y = 68.38X + 67.063$, $R = 0.9991$ 。结果表明:盐酸小檗碱在

5.2~6 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性。

3.3 干浸膏得率的测定 精密吸取滤液 10 mL,水浴蒸干,105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重,精密称定,计算浸膏得率。

3.4 正交实验筛选黄连中小檗碱的提取工艺

3.4.1 正交实验设计 选用 $L_9(3^4)$ 正交实验表,取黄连 30g 进行实验,以总生物碱量、小檗碱量、干浸膏得率为指标,考察醇浓度、醇用量、回流时间、提取次数对其影响。因素水平见表 1,实验安排见表 2。

表 1 因素水平

因素水平	A 乙醇浓度(%)	B 乙醇用量(倍)	C 提取时间(h)	D 提取次数
1	50	4	1	1
2	60	6	1.5	2
3	70	8	2	3

3.4.2 实验结果 通过正交实验,结果与方差分析见表 2~5。

3.5 实验结果分析 按照 $L_9(3^4)$ 正交设计表的条件进行实验,分别测得干膏得率、总生物碱量、小檗碱量,进行多指标综合评分,评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化,再给出不同的权重,总生物碱量和小檗碱量系数分别设为 0.4 和 0.6。在有效成分明确的前提下,干浸膏量减少有利于制剂的成型工艺,因此设浸膏得率的权重系数为 -0.2,以综合值进行统计分析。综合评分 = $0.4X \times 100 / 0.09897 + 0.6Y \times 100 / 0.22335 - 0.2Z \times 100 / 0.2086$ (X:总生物碱量;Y:小檗碱含量;Z:浸膏得率)。

对表 6 中的数据进行方差分析,以综合评分为判断标准。方差分析表明各因素对综合评分的影响都无显著性意义。极差分析表明:因素 B(乙醇用量)为主要影响因素,各因素作用主次顺序为 $B > A > D > C$,确定最佳工艺为 $A_3B_2C_1D_3$,即药材加 6 倍量 70% 乙醇,提取 3 次,每次回流 1 小时。

3.6 正交实验结果验证试验 工艺验证实验为考察上述优选提取工艺的稳定性,取黄连、黄柏饮片各 30 g,取 3 份,按该最佳工艺条件即药材加 6 倍量 70% 乙醇,提取 3 次,每次回流 1 h 进行提取,分别测定浸膏得率、总生物碱量、小檗碱

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(No.2006CB504702)

含量。结果见表 8。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

列号	因素水平				膏得率	总生物碱量	小檗碱量
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	0.1 107	0.077 48	0.017 17
2	1	2	2	2	0.191 0	0.083 37	0.011 49
3	1	3	3	3	0.208 6	0.082 98	0.010 85
4	2	1	2	3	0.172 5	0.098 97	0.011 81
5	2	2	3	1	0.13 13	0.073 22	0.010 03
6	2	3	1	2	0.182 6	0.063 60	0.001 325
7	3	1	3	2	0.093 65	0.072 85	0.006 395
8	3	2	1	3	0.171 9	0.090 55	0.022 33
9	3	3	2	1	0.069 75	0.064 32	0.008 150
浸膏得率 K1	0.510 3	0.376 8	0.465 2	0.311 7			
浸膏得率 K2	0.486 4	0.494 2	0.433 2	0.467 2			
浸膏得率 K3	0.335 3	0.460 9	0.433 5	0.553 0			
R	0.175 0	0.117 3	0.031 95	0.241 2			
总生物碱量 K1	0.243 8	0.249 3	0.231 7	0.2150			
总生物碱量 K2	0.235 8	0.247 1	0.246 7	0.219 8			
总生物碱量 K3	0.227 7	0.210 9	0.229 1	0.272 5			
R	0.016 1	0.038 4	0.017 6	0.057 5			
小檗碱量 K1	0.039 51	0.035 38	0.040 83	0.035 35			
小檗碱量 K2	0.023 17	0.043 85	0.031 45	0.019 21			
小檗碱量 K3	0.036 88	0.020 33	0.027 28	0.044 99			
R	0.016 35	0.023 53	0.013 55	0.025 78			

表 3 干浸膏得率方差分析

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值
A	2	0.006 003	0.003 002	26.803 6	>0.05
B	2	0.002 439	0.001 219	10.883 9	<0.05
D	2	0.009 971	0.004 985	44.508 9	>0.05
C	2	0.000 225	0.000 112		

表 4 总生物碱浸出量方差分析

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值
C	2	0.000 091 6	0.000 045 80	2.120 4	>0.05
D	2	0.000 678 5	0.000 339 3	15.708 3	>0.05
B	2	0.000 310 0	0.000 155 0	7.175 9	>0.05
A	2	0.000 043 2	0.000 021 60		

表 5 小檗碱浸出量方差分析

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值
B	2	0.000 051 34	0.000 025 67	1.599 4	>0.05
C	2	0.000 094 63	0.000 047 32	2.947 9	>0.05
D	2	0.000 113 1	0.000 056 55	3.523 4	>0.05
A	2	0.000 032 10	0.000 016 05		

表 6 综合评分结果

实验号	因素水平				综合评分
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	25.313 4
2	1	2	2	2	18.469 1
3	1	3	3	3	16.452 1
4	2	1	2	3	26.633 8
5	2	2	3	1	19.698 5
6	2	3	1	2	8.553 1
7	3	1	3	2	22.182 3
8	3	2	1	3	26.114 3
9	3	3	2	1	21.497 7
K1	60.234 7	74.129 5	59.981 2	66.509 7	
K2	54.885 8	64.281 9	66.600 6	49.204 9	
K3	69.794 3	46.503 4	58.332 9	69.200 2	
R	14.908 5	27.626 1	8.267 6	19.995 3	

表 7 综合评分结果方差分析

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值
A	2	38.028 8	19.014 4	3.169 1	>0.05
B	2	130.694 9	65.347 5	10.238 4	>0.05
D	2	78.500 4	39.250 2	6.149 6	>0.05
C	2	12.765 2	6.382 6		

表 8 正交实验最佳提取工艺的验证结果

实验号	浸膏得率	总生物碱量	小檗碱量	综合评分
1	0.172 1	0.0852 3	0.0235 2	24.264 7
2	0.172 2	0.0885 8	0.0229 0	25.442 5
3	0.180 1	0.091 50	0.022 69	25.808 8

由上表可知,按正交实验优选的最佳工艺进行验证实验,3 次结果的综合评分均处于最高水平,说明该提取工艺是可靠的。

4 讨论与结论

本实验通过正交设计优选了黄连的提取工艺,以浸膏得率、总生物碱量、小檗碱量为考察指标,采用综合评分的方法确定最佳提取工艺为:药材加 6 倍量 70% 乙醇,提取 3 次,每次回流 1 小时。按最佳工艺进行重复性实验,稳定性较理想,适合于工业生产,故此方案合理可行。

已完成的初步临床验证实验结果表明:本实验所采用的提取方法制得的软膏与传统的黄连、黄柏水提法制得的软膏相比效果更好。传统的水提法的科学、合理性有待于进一步考察。

(收稿日期:2007-01-25)