

Box-Behnken响应面法优化三黄地榆油中 盐酸小檗碱的提取工艺

果秋婷, 赫光中, 李昱, 孙艺方

(咸阳职业技术学院医学院, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 通过Box-Behnken响应面法优化三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺。方法: 以药材粒度、药液比和药材提取时间作为考察因素, 以三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取率作为评价指标, 采用Box-Behnken响应面法考察各个因素及其交互作用对盐酸小檗碱提取率的影响。结果: 确定的最佳提取工艺为: 中药粉末粒度为60目, 液料比为18, 提取时间为1.5 h。采用最佳提取工艺参数提取3批三黄地榆油, 盐酸小檗碱的平均提取量为 (16.6 ± 0.6) mg/g ($n=3$)。结论: 利用Box-Behnken响应面法优化三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺, 方法简便, 预测性良好。

关键词: 三黄地榆油; 盐酸小檗碱; Box-Behnken响应面法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2017)01-043-05

烧(烫)烫伤是由沸水、热油、热蒸汽对皮肤、粘膜等部位的损伤病人在烫伤后经常出现红肿、热痛、水泡、糜烂、破溃等症状, 如果处理及时, 就不会导致不良的后果^[1]。三黄地榆油组方源自《中医皮肤病学简编》, 主要由黄柏、黄芩、大黄等中药组成, 是临床治疗治疗烧(烫)伤、湿疹、溃疡期褥疮等皮肤顽疾的经典验方, 尤其是治疗烫伤效果明显^[2]。方中黄柏、黄芩、大黄、地榆经药理研究表明对各种致病菌均有较强的抑制作用, 可以预防烫伤后的感染; 地榆具有收敛, 收缩毛细血管, 消肿止痛的功效, 同时又可促使上皮生长。冰片防腐防痒, 止痛收敛。因此, 本组方在针对烧烫伤方面具有抑菌、消炎、抗感染等作用, 疗效显著, 具有较好的临床疗效^[3-6]。

三黄地榆油是用香油为油相, 通过加热过程可将中药中的有效成分提取。为提高提取效率, 本研究以中药粉末粒度、香油用量、提取时间作为主要的考察因素, 以三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取率作为评价指标, 采用Box-Behnken响应面法优化三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺^[7-9], 希望为开发该药材资源以及开发新型制剂奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

安捷伦1260高效液相色谱系统(美国安捷伦); ME204E电子天平(梅特勒托利多); DF-101S恒温加热磁力搅拌器(力晨科技)

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(购自中国食品药品检定研究院, 批号110713-201212, 含量: $>99.5\%$)、磷酸二氢铵溶液(色谱纯)。黄柏、黄芩、大黄、地榆、冰片等药材均购于四川新荷花中药饮片有限公司(五味药材均由陕西中医药大学副教授王继涛老师鉴定)。

2 方法

2.1 盐酸小檗碱含量测定

2.1.1 色谱条件^[10]参照照高效液相色谱法(《中国药典》2015年版一部附录VI D)测定, 采用C18硅烷键合硅胶色谱柱(4.6mm×250mm, 5 μ m); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0mL·min⁻¹, 进样量: 20 μ L; 流动相为0.01mol·L⁻¹磷酸二氢铵溶液(pH2.8)-乙腈(75:25, v/v); 检测波长为345 nm。

收稿日期: 2016-12-11

基金项目: 咸阳职业技术学院重点项目(2015KYA03)

作者简介: 果秋婷(1984—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事新剂型与新制剂研究。

2.1.2 对照品溶液的制备 以乙腈为溶剂将盐酸小檗碱对照品配制成 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.3 线性关系 用流动相将小檗碱对照品溶液稀释为一系列标准溶液(2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.1.1”色谱条件进行测定。以得回归方程为: $A=21583C-2861$ ($r=0.9999$) (盐酸小檗碱浓度 C , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 峰面积 A)。其在2.0~50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.2 提取工艺

采用恒温水浴加热提取三黄地榆油中盐酸小檗碱。将黄柏、黄芩、大黄、地榆粉碎筛分, 在各层筛网上精密称取10.0 g中药粉末放入到香油中浸泡一段时间后进行加热提取, 提取物经过抽滤, 即得含盐酸小檗碱的三黄地榆油。具体操作流程如下:

黄柏、黄芩、大黄、地榆干燥根及根茎→洗净→60℃烘干→粉碎机粉碎→香油中浸泡→恒温加热提取→抽滤→含盐酸小檗碱的三黄地榆油。

称取各层筛网上中药粉末10.0g, 分别用不同用量香油、提取时间对药物进行提取。并按照“2.1.1”项下测定, 根据公式计算三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取量。

三黄地榆油中盐酸小檗碱提取量 (mg/g) = 盐酸小檗碱含量 (mg) / 中药粉末重量 (g)

2.3 三黄地榆油中盐酸小檗碱提取的单因素试验

通过前期预实验考察, 发现影响三黄地榆油中盐酸小檗碱提取量的主要因素为: 中药粉末粒度、香油用量、提取时间。分别选取五个粒度水平(20、40、60、80、100目筛); 香油用量为药材重量(液料比)的五个水平(5, 10, 15, 20, 25倍); 分别选取五个时间水平(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 h), 通过单因素考察得到较为适宜的提取工艺参数。

2.3.1 中药粉末粒度筛选 选取五个中药粉末粒度(20、40、60、80、100目筛)各10.0g, 分别加入中药粉末重量15倍香油浸泡0.5h后在80℃恒温条件下提取1.5h, 将其稀释5倍, 照“2.1.1”项下方法测定, 根据公式计算三黄地榆油中盐酸小檗碱提取量。

由实验结果可知, 在其他提取条件相同的情况下, 盐酸小檗碱提取量随着中药粉末粒度的减小而提高。这是由于随着中药粒度的减小, 中药的比表

面积增加, 有利于药材粉末与提取溶剂充分接触[11], 可有效提高盐酸小檗碱的提取量。但粉碎中药材是一个耗能过程, 粒径越小需要粉碎更长的时间, 而且较细的中药粉末容易出现静电, 不利于后续操作, 因此确定中药粉末粒度在40~80目较为适宜。

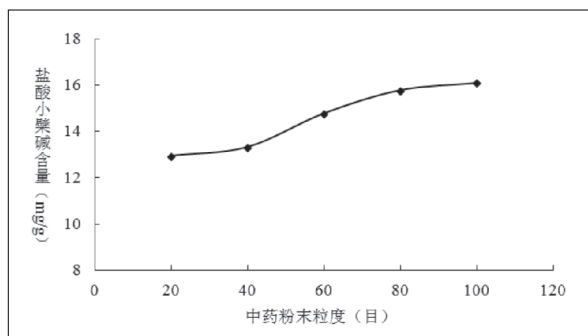


图1 中药粉末粒度对盐酸小檗碱提取量的影响

由实验结果可知, 在其他提取条件相同的情况下, 盐酸小檗碱提取量随着中药粉末粒度的减小而提高。这是由于随着中药粒度的减小, 中药的比表面积增加, 有利于药材粉末与提取溶剂充分接触^[11], 可有效提高盐酸小檗碱的提取量。但粉碎中药材是一个耗能过程, 粒径越小需要粉碎更长的时间, 而且较细的中药粉末容易出现静电, 不利于后续操作, 因此确定中药粉末粒度在40~80目较为适宜。

2.3.2 液料比 选择中药粉末(80目筛)重量的5, 10, 15, 20, 25倍香油作为提取溶剂, 每份中药粉末各10.0g, 将中药粉末在香油中浸泡0.5h后在80℃恒温条件下提取1.5h, 将其稀释5倍, 照“2.1.1”项下方法测定, 根据公式计算三黄地榆油中盐酸小檗碱提取量。

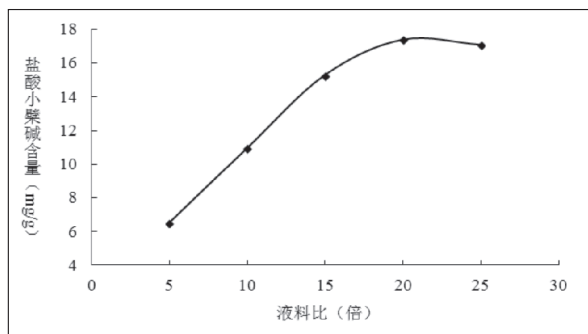


图2 香油用量对盐酸小檗碱提取量的影响

由实验结果可知, 在其他提取条件相同的情况下, 盐酸小檗碱的提取量随着香油用量增加而显著增加, 这可能是由于香油用量的加大, 使中药粉末

中药物浓度与提取溶剂间形成浓度差，有利于盐酸小檗碱的高效提取。本研究表明当香油用量为中药粉末重量的20倍时，盐酸小檗碱提取量达到最高，随后趋于平缓，因此选择香油用量为中药粉末重量（液料比）10~20倍进行优化。

2.3.3 提取时间 分别称取中药粉末（80目筛）10.0 g，用20倍重量的香油作为提取溶剂，将中药粉末在香油中浸泡0.5 h后，分别在80℃恒温条件下提取0.5，1.0，1.5，2.0，3.0 h，将其稀释5倍，照“2.1.1”项下方法测定，根据公式计算三黄地榆油中盐酸小檗碱提取量。

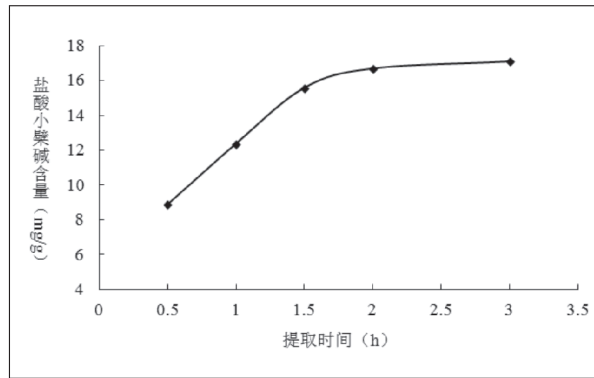


图3 提取时间对盐酸小檗碱提取量的影响

由实验结果可知，盐酸小檗碱的提取率在1.5h后增幅趋缓。故选择1.5 h作为最优提取时间。

2.4 Box-Behnken响应面法优化三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺

在单因素试验的基础上，对三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺影响较显著的3个因素进行优化：中药粉末粒度(X1)、液料比(X2)和提取时间(X3)为考察对象，以盐酸小檗碱提取量(Y, mg/g)为评价指标，利用3因素3水平的Box-Behnken响应面法优化三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺参数，并进行3批验证试验。

表1 响应面法实验设计中的变量水平

| 自变量 | 水平 | | |
|-----------------------------|--------|-------|--------|
| | 低 (-1) | 中 (0) | 高 (+1) |
| X ₁ : 中药粉末粒度 (目) | 80 | 60 | 40 |
| X ₂ : 液料比 (w/v) | 10 | 15 | 20 |
| X ₃ : 提取时间 (h) | 0.5 | 1.0 | 1.5 |
| 因变量 | 目标值 | | |
| Y: 提取量 (mg/g) | 最大 | | |

表2 实验设计表与效应值

| No. | X ₁ /(%) | X ₂ /(w/w) | X ₃ (h) | Y/(mg/g) |
|-----|---------------------|-----------------------|--------------------|----------|
| 1 | 40.0 | 20.0 | 1.0 | 13.7 |
| 2 | 80.0 | 20.0 | 1.0 | 17.2 |
| 3 | 60.0 | 10.0 | 0.5 | 10.7 |
| 4 | 60.0 | 15.0 | 1.0 | 16.3 |
| 5 | 40.0 | 10.0 | 1.0 | 8.4 |
| 6 | 60.0 | 20.0 | 0.5 | 12.7 |
| 7 | 60.0 | 10.0 | 1.5 | 9.4 |
| 8 | 80.0 | 15.0 | 0.5 | 15.2 |
| 9 | 40.0 | 15.0 | 0.5 | 7.8 |
| 10 | 40.0 | 15.0 | 1.5 | 10.4 |
| 11 | 60.0 | 20.0 | 1.5 | 16.8 |
| 12 | 60.0 | 15.0 | 1.0 | 16.5 |
| 13 | 80.0 | 15.0 | 1.5 | 14.6 |
| 14 | 60.0 | 15.0 | 1.0 | 16.1 |
| 15 | 80.0 | 10.0 | 1.0 | 12.9 |

2.4.1 方差分析和显著性检验 选择“Design-Expert 8.0.6”实验设计软件中的“Box-Behnken实验设计”对表2中的实验数据进行处理，进行多元线性回归和二次多元方程拟合。结果见表3，方差分析结果见表4。

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

其中：β_i代表不同的回归系数。

表3 二次多元方程的相关系数

| 因变量 | 相关系数 R ² | 矫正相关系数 R ² | 预测相关系数 R ² | 精密度 |
|---------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
| Y: 提取量 (mg/g) | 0.9878 | 0.9659 | 0.9186 | 19.894 |

拟合方程的相关系数R²为0.9878，表示方程有较好的拟合度，说明设计模型拟合程度良好，能够对做出相对三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺参数准确的预测；拟合方程的矫正相关系数R²为0.9659，表明96.59%实验数据的变异性可用于回归模型来解释；预测相关系数R²和相关系数R²，矫正相关系数R²较为接近，说明模型有足够的预测能力；精密度是有效信号与噪音的比值，从结果可知此模型拟合较好。

表4 回归方程中系数的显著性检验

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均差 | F 值 | P |
|-------------------------------|--------|-----|-------|--------|---------|
| 常数项 | 142.83 | 9 | 15.87 | 45.13 | 0.0003 |
| X ₁ | 47.87 | 1 | 48.87 | 136.13 | <0.0001 |
| X ₂ | 44.94 | 1 | 44.94 | 127.78 | <0.0001 |
| X ₃ | 2.80 | 1 | 2.80 | 7.95 | 0.0371 |
| X ₁ X ₂ | 0.25 | 1 | 0.25 | 0.71 | 0.4376 |
| X ₁ X ₃ | 2.51 | 1 | 2.51 | 7.14 | 0.0442 |
| X ₂ X ₃ | 7.40 | 1 | 7.40 | 21.04 | 0.0059 |
| X ₁ ² | 12.31 | 1 | 12.31 | 35.02 | 0.0020 |
| X ₂ ² | 7.48 | 1 | 7.48 | 21.28 | 0.0058 |
| X ₃ ² | 22.46 | 1 | 22.46 | 63.86 | 0.0005 |
| 残差 | 1.76 | 5 | 0.23 | | |
| 失拟项 | 1.68 | 3 | 0.33 | 13.99 | 0.0675 |
| 纯误差 | 0.080 | 2 | 0.092 | | |
| 总和 | 144.59 | 14 | | | |

从表4结果可知, 中药粉末粒度、液料比、提取时间及其这两个因素之间的交互作用对三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取量影响较为显著。自变量与因变量的等高线及见图4。

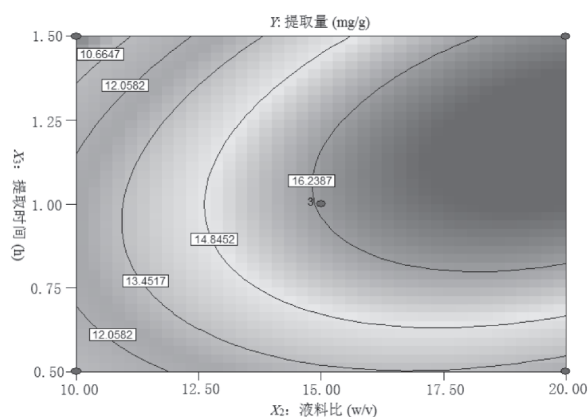
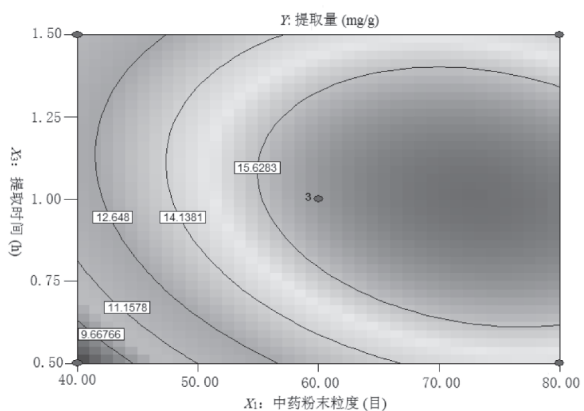
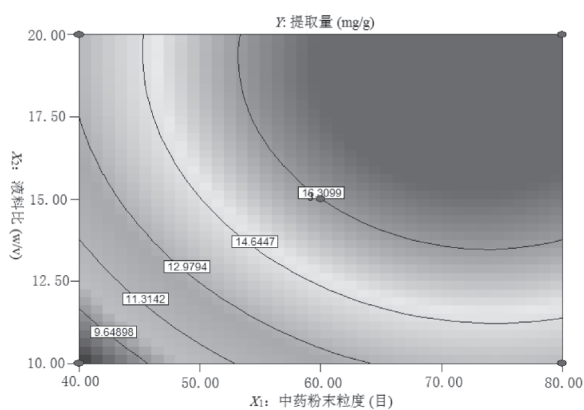


图5 响应面等高线图

2.4.2 提取工艺参数验证 以三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取量最大值为目标, 根据“Design-Expert 8.0.6”实验设计软件得最佳三黄地榆油中盐酸小檗碱提取工艺参数为: 中药粉末粒度为60目、液料比为18、提取时间为1.5h, 模型预测值三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取量为17.2mg/g。按照“2.2”项下以优化后的工艺参数提取3批三黄地榆油, 并按照“2.1.1”项下方法测定三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取量。

表5 验证实验结果

| No. | 中药粉末重量 (g) | 盐酸小檗碱提取量 (mg/g) | 盐酸小檗碱平均提取量 (mg/g, n=3) |
|-----|------------|-----------------|------------------------|
| 1 | 10.2 | 16.8 | |
| 2 | 10.1 | 17.1 | 16.6 |
| 3 | 9.8 | 15.9 | 0.6 |

表6 预测值与实验值比较

| 因变量 | 预测值 (mg/g) | 实验值 (mg/g) | 偏差 (%) |
|---------------------|---------------|---------------|--------|
| 盐酸小檗碱 提取量 (mg/g) | 17.2 | 16.6±0.6 | -3.5% |

由实验结果可知, 3批三黄地榆油中盐酸小檗碱的平均提取量为 (16.6 ± 0.6) mg/g (n=3), 实验观测值与模型预测值偏差为-3.5%, 表明模型预测与实际值较接近, 模型预测良好。

3. 讨论

本研究首先通过单因素实验研究, 考察了中药粉末粒度, 液料比, 提取时间对三黄地榆油中盐酸小檗碱提取量的影响, 初步确定了各提取工艺参数的范围, 接下来采用Box-Behnken响应面法优化三黄地榆油中盐酸小檗碱的提取工艺参数, 并通过实验软件计算得到最佳提取工艺参数: 中药粉末粒度为60目、液料比为18、提取时间为1.5h, 并根据最优工艺参数提取3批三黄地榆油, 用来验证最优工艺参数的可信度。实验结果表明, 3批三黄地榆油中盐酸小檗碱的平均提取量为 (16.6 ± 0.6) mg/g (n=3), 实验观测值与模型预测值偏差为-3.5%, 表明模型预测与实际值较接近, 模型预测良好。

参考文献

- [1] 杨胜群, 熊茜, 邹俊波, 等. 中药在烧烫伤治疗中的应用及作用机制研究进展[J]. 中南药学, 2015(11): 1182-1186.
- [2] 黄锐, 蒲清荣, 陈玉兰, 等. 正交设计法优选三黄油的制备工艺[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2633-2635.
- [3] 李培科. 三黄油治疗烧伤25例[J]. 中国民间疗法, 2001, 9(10): 30.
- [4] 李智荣, 白晓明. 加味三黄油治疗烧伤280例[J]. 河南中医药学刊, 1996(5): 39.
- [5] 吕萍, 常向东. 三黄地榆散在烧烫伤中的应用371例报告[J]. 交通医学, 2001, 15(2): 199-200.
- [6] 郑吉祥. 三黄地榆膏治疗烧伤460例临床总结[J]. 山西医药杂志, 1994, 23(3): 191-192.
- [7] 孙静, 张小飞, 刘洁琼, 等. Box-Behnken效应面法优化银线草中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药师, 2016(3): 440-442, 452.
- [8] 张小飞, 果秋婷. Box-Behnken响应面法优化微波提取刺五加多糖工艺[J]. 中国药师, 2015, 18(9): 1502-1505.
- [9] 张小飞, 万娜, 詹娟娟, 等. Box-Behnken响应面法优化江西产薄荷挥发油提取工艺及其动力学研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(5): 65-69.
- [10] 中国药典2015年版二部[S]. P875.
- [11] 叶惠珍. 超微粉碎对中药方剂药效的影响[J]. 医药导报, 2011, 30(7): 891-895.

[责任编辑、校对: 王军利]

On the Optimization of Extraction Process of Berberine Hydro-chloride from Sanhuang Diyu Oil Based on Box-Behnken Response Surface Methodology

GUO Qiu-ting; HE Guang-zhong; LI Yu; SUN Yi-fang

(Medical School, Xianyang Vocational technical College, Xianyang Shaanxi 712000)

Abstract: Research Objective: To optimize the extraction process of Berberine hydro-chloride from Sanhuang Diyu Oil using Box-Behnken response surface methodology. Methods: The extracting process variables as the size of each medicinal (X1), the liquid-solid ratio (X2) and extraction time (X3) were optimized as independent variables and berberine hydro-chloride extraction amount (Y) as dependent variables. Results: The experiment results indicated that the optimal extraction conditions were the size of each medicinal 60 mesh, the liquid-solid ratio 18, extraction time 1.5 h, respectively. Under these conditions, 3 batches Berberine hydrochloride from Sanhuang Diyu Oil were extracted. The berberine hydrochloride average extraction rate was (16.6 ± 0.6) mg/g (n=3). Conclusions: The extraction process of Sanhuang Diyu Oil using Box-Behnken response surface methodology was simple, stable and predictability.

Key word: Sanhuang Diyu Oil, Berberine hydro-chloride; Box-Behnken response surface methodology