

· 中药工业 ·

正交试验设计筛选黄连总生物碱的提取纯化工艺研究

熊玲¹, 覃瑶², 罗维早^{2,3}, 肖坤全², 王欣^{3*}

(1. 成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610045; 2. 太极集团有限公司, 重庆 401147;
3. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

[摘要] 目的: 筛选黄连总生物碱最佳提取工艺。方法: 采用正交试验设计, 以小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱的转移率为指标, 筛选最佳的提取参数。在此基础上综合提取转移率、能耗及成本因素对提取工艺进行优化。结果: 以70%乙醇作为提取溶剂, 提取3次, 每次1 h, 溶剂用量分别为8、6、6倍为最佳提取工艺。结论: 所筛选的提取工艺能够有效提取出黄连中的主要活性成分。

[关键词] 黄连; 正交设计; 生物碱; 提取工艺

Study on Extraction and Purification Technology of Total Alkaloids from Rhizoma Coptidis by Orthogonal Design

XIONG Ling¹, QIN Yao², LUO Weizao^{2,3}, XIAO Kunquan², WANG Xin^{3*}

(1. Chengdu Center for Food & Drug Control, Sichuan, 610045, P. R. China;

2. Taiji Group, Chongqing, 401147, P. R. China;

3. Chongqing Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing, 400065, P. R. China)

[Abstract] **Objective:** To screen the optimal extraction technology of total alkaloids from Rhizome Coptidis. **Methods:** The extraction parameters were optimized by using orthogonal experiment design with the transfer rate of berberine, palmartin, coptisine, epiberberine as the index. Combining the comprehensive extraction rate, power consumption and cost factors, the extraction process was further optimized. **Results:** The optimal process was as follows: 70% ethanol as solvent, extracting 3 times, each time 1 h, amount of solvent 8, 6, 6 times, respectively. **Conclusion:** The selected extraction technology can effectively extract the major active constituent of Rhizoma Coptidis.

[Keywords] Rhizoma Coptidis; orthogonal design; alkaloid; extraction process

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.5.023

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

盐酸巴马汀对照品(批号: 110732-200506)、盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-200208)、盐酸药根碱对照品(批号: 0733-200005)(中国食品药品检定研究院); HPLC 试剂为色谱纯; 其余各试剂均使用分析纯。

黄连药材于2012年3月采集于重庆石柱当地, 经瞿显友研究员、舒抒副研究员鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎。

1.2 仪器

LC-2010 型液相色谱仪(岛津); AUW220D 型电子天平(十万分之一, 日本岛津公司); BS224S 型电子天平(万分之一, 德国赛多利斯公司); KQ250DB 型数控超声波清洗器(巩义市予华仪器有限责任公司); KQ5200 型水浴锅(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司); Delta 320 pH 计(Mettler-Toledo Group); 三用紫外线分析仪(上海顾村电光仪器厂); 大孔树脂 D101(蚌埠市辽源新材料有限公司); DAISO 反相 C₁₈ 硅胶填料(60 μm, 北京颇赛科技发展有限公司); 预制硅胶板(青岛谱科分离材料有限

* [通信作者] 王欣, 副研究员, 研究方向: 中药化学成分与药效物质基础研究; E-mail: wangxin-cq386@sina.com

公司)。

2 实验方法及结果

2.1 样品的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱6种对照品适量,置于50 mL容量瓶中,甲醇定容至刻度,得到各对照品质量浓度分别为22.2、19.0、65.8、93.4、58.2、281.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取提取液1 mL,加甲醇:浓盐酸(100:1)稀释至25 mL,摇匀,离心($10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),即得HPLC样品。

2.1.3 药材样品溶液的制备 取药材粉末(过四号筛)约0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-浓盐酸(100:1)的混合液50 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,离心($10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),即得。

2.2 色谱条件

Welch Materials XtimateTM C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相A为乙腈, B为30 mmol·L⁻¹碳酸氢铵溶液(每1000 mL碳酸氢铵溶液含7 mL氨水及1 mL三乙胺), 梯度洗脱条件: 0~15 min A:B为(10~25):(90~75), 15~25 min A:B为(25~30):(75~70), 25~40 min A:B为(30~45):(70~55)。流速为1 mL·min⁻¹; 检测波长为270 nm; 柱温为30 °C; 进样量10 μL 。理论塔板数按盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰计算均不低于5000。

2.3 回流提取正交试验

以黄连中6个生物碱(小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱、药根碱)的转移率为考察指标,取黄连药材粗粉进行正交试验。主要因素为溶媒用量(A)、提取时间(B)、乙醇浓度(C)、提取次数(D),根据黄连中生物碱类成分的提取有关文献^[14],选择L₉(3⁴)正交表进行试验。

取黄连药材粗粉9份,每份150 g,分别进行回流提取,收集提取液,按2.1样品的制备配制HPLC样品,按2.2色谱条件测定样品,计算转移率。

表1 因素水平表

	A/倍数	B/h	C(%)	D/次数
1	4	0.5	25	1
2	6	1	50	2
3	8	1.5	75	3

表2 小檗碱提取转移率正交试验结果

NO.	溶媒用量 A	提取时间 B	乙醇浓度 C	提取次数 D	小檗碱转移率(%)
1	1	1	1	1	31.96
2	1	2	2	2	72.30
3	1	3	3	3	87.67
4	2	1	2	3	77.41
5	2	2	3	1	59.55
6	2	3	1	2	67.48
7	3	1	3	2	85.36
8	3	2	1	3	91.61
9	3	3	2	1	62.25
均值1	63.980	64.912	63.688	51.253	
均值2	68.149	74.488	70.653	75.047	
均值3	79.739	72.468	77.527	85.567	
极差 R	15.760	9.577	13.840	34.314	

由表3可知, D因素的F比>F_{0.05}, D因素对该指标的影响有显著性意义,且非常重要;由小檗碱转移率正交试验结果表直观分析R可知,其影响因素大小依次为D>A>C>B。由直观分析可以看出,最佳提取工艺为A₃B₂C₃D₃,即用8倍量75%的乙醇提取3次,每次1 h。

表3 方差分析表(小檗碱)

方差来源	偏差平方和(S)	自由度	F比	F临界值	显著性
A	400.277	2	2.618	4.460	
B	152.896	2	1.000	4.460	
C	287.461	2	1.880	4.460	
D	1853.899	2	12.125	4.460	*
误差(B)	152.896	2			

注:以B因素的偏差平方和为误差。

由表5可知, D因素的F比>F_{0.05}, D因素对该指标的影响有显著性意义,且非常重要;由巴马汀转移率正交试验结果表直观分析R可知,其影响因素大小依次为D>A>C>B。由直观分析可以看出,最佳提取工艺为A₃B₂C₃D₃,即用8倍量75%的

乙醇提取3次, 每次1 h。

表4 巴马汀提取转移率正交试验结果

NO.	溶媒用量 A	提取时间 B	乙醇浓度 C	提取次数 D	巴马汀转移率(%)
1	1	1	1	1	33.76
2	1	2	2	2	72.53
3	1	3	3	3	86.23
4	2	1	2	3	78.13
5	2	2	3	1	60.22
6	2	3	1	2	71.05
7	3	1	3	2	87.01
8	3	2	1	3	95.66
9	3	3	2	1	62.35
均值1	64.176	66.301	66.824	52.110	
均值2	69.795	76.137	71.004	76.864	
均值3	81.676	73.209	77.820	86.673	
极差 R	17.500	9.836	10.996	34.562	

表5 方差分析表(巴马汀)

方差来源	偏差平方和(S)	自由度	F比	F临界值	显著性
A	478.885	2	3.128	4.460	
B	153.073	2	1.000	4.460	
C	184.866	2	1.208	4.460	
D	1903.588	2	12.436	4.460	*
误差(B)	153.073	2			

注: 以 B 因素的偏差平方和为误差。

由表7可知, D因素的F比 > $F_{0.05}$, D因素对该指标的影响有显著性意义, 且非常重要; 由黄连碱转移率正交试验结果表直观分析R可知, 其影响

表6 黄连碱提取转移率正交试验结果

NO.	溶媒用量 A	提取时间 B	乙醇浓度 C	提取次数 D	黄连碱转移率(%)
1	1	1	1	1	29.11
2	1	2	2	2	65.84
3	1	3	3	3	76.02
4	2	1	2	3	71.63
5	2	2	3	1	49.38
6	2	3	1	2	60.26
7	3	1	3	2	74.66
8	3	2	1	3	83.59
9	3	3	2	1	54.16
均值1	56.993	58.469	57.653	44.215	
均值2	60.425	66.272	63.878	66.923	
均值3	70.803	63.480	66.690	77.083	
极差 R	13.810	7.803	9.037	32.867	

因素大小依次为 $D > A > C > B$ 。由直观分析可以看出, 最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_3$, 即用8倍量75%的乙醇提取3次, 每次1 h。

表7 方差分析表(黄连碱)

方差来源	偏差平方和(S)	自由度	F比	F临界值	显著性
A	310.340	2	3.308	4.460	
B	93.810	2	1.000	4.460	
C	128.227	2	1.367	4.460	
D	1698.666	2	18.108	4.460	*
误差(B)	93.810	2			

注: 以 B 因素的偏差平方和为误差。

由表9可知, D因素的F比 > $F_{0.05}$, D因素对该指标的影响有显著性意义, 且非常重要; 由小檗碱转移率正交试验结果表直观分析R可知, 其影响因素大小依次为 $D > A > C > B$ 。由直观分析可以看出, 最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_3$, 即用8倍量75%的乙醇提取3次, 每次1 h。

表8 表小檗碱提取转移率正交试验结果

NO.	溶媒用量 A	提取时间 B	乙醇浓度 C	提取次数 D	表小檗碱转移率(%)
1	1	1	1	1	30.54
2	1	2	2	2	66.05
3	1	3	3	3	77.08
4	2	1	2	3	71.55
5	2	2	3	1	53.21
6	2	3	1	2	63.64
7	3	1	3	2	77.06
8	3	2	1	3	87.43
9	3	3	2	1	56.28
均值1	57.888	59.715	60.536	46.677	
均值2	62.799	68.895	64.626	68.918	
均值3	73.592	65.669	69.116	78.684	
极差 R	15.704	9.179	8.580	32.007	

表9 方差分析表(小檗碱)

方差来源	偏差平方和(S)	自由度	F比	F临界值	显著性
A	387.022	2	3.502	4.460	
B	130.108	2	1.177	4.460	
C	110.505	2	1.000	4.460	
D	1614.711	2	14.612	4.460	*
误差(C)	110.505	2			

注: 以 C 因素的偏差平方和为误差。

由表 11 可知, D 因素的 F 比 $> F_{0.05}$, D 因素对该指标的影响有显著性意义, 且非常重要; 由非洲防己碱转移率正交试验结果表直观分析 R 可知, 其影响因素大小依次为 $D > A > C > B$ 。由直观分析可以看出, 最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_3$, 即用 8 倍量 75% 的乙醇提取 3 次, 每次 1 h。

表 10 非洲防己碱提取转移率正交试验结果

NO.	溶媒用量 A	提取时间 B	乙醇浓度 C	提取次数 D	非洲防己碱转移率(%)
1	1	1	1	1	32.48
2	1	2	2	2	70.15
3	1	3	3	3	83.86
4	2	1	2	3	76.00
5	2	2	3	1	56.55
6	2	3	1	2	67.99
7	3	1	3	2	83.18
8	3	2	1	3	92.09
9	3	3	2	1	60.22
均值 1	62.164	63.887	64.189	49.752	
均值 2	66.848	72.929	68.789	73.772	
均值 3	78.496	70.692	74.529	83.984	
极差 R	16.332	9.043	10.340	34.232	

表 11 方差分析表(非洲防己碱)

方差来源	偏差平方和(S)	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	424.434	2	3.189	4.460	
B	133.085	2	1.000	4.460	
C	161.123	2	1.211	4.460	
D	1853.286	2	13.926	4.460	*
误差(B)	133.085	2			

注: 以 B 因素的偏差平方和为误差。

由表 13 可知, D 因素的 $F > F_{0.05}$, D 因素对该指标的影响有显著性意义, 且非常重要; 由药根碱转移率正交试验结果表直观分析 R 可知, 其影响因素大小依次为 $D > A > C > B$ 。由直观分析可以看出, 最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_3$, 即用 8 倍量 75% 的乙醇提取 3 次, 每次 1 h。

回流提取正交试验结果可知, 回流提取黄连中 6 个生物碱(小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱、药根碱)最佳提取工艺都为 $A_3B_2C_3D_3$, 即用 8 倍量 75% 的乙醇提取 3 次, 每次 1 h。

表 12 药根碱提取转移率正交试验结果

NO.	溶媒用量 A	提取时间 B	乙醇浓度 C	提取次数 D	药根碱转移率(%)
1	1	1	1	1	33.37
2	1	2	2	2	73.22
3	1	3	3	3	87.82
4	2	1	2	3	79.34
5	2	2	3	1	60.08
6	2	3	1	2	71.70
7	3	1	3	2	86.84
8	3	2	1	3	94.19
9	3	3	2	1	63.14
均值 1	64.804	66.515	66.418	52.195	
均值 2	70.375	75.832	71.900	77.252	
均值 3	81.387	74.219	78.248	87.119	
极差 R	16.583	9.316	11.830	34.924	

表 13 方差分析表(药根碱)

方差来源	偏差平方和(S)	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	427.509	2	2.876	4.460	
B	148.672	2	1.000	4.460	
C	210.181	2	1.414	4.460	
D	1944.528	2	13.079	4.460	*
误差(B)	148.672	2			

注: 以 B 因素的偏差平方和为误差。

2.4 优化实验

根据上述实验结果, 从大生产时节约能耗, 减少成本的角度出发, 以黄连中 6 个生物碱(小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱、药根碱)的转移率为考察指标, 分别称取黄连药材粗粉 150 g, 共 9 份, 分成 3 组; 每组分别用 70%、75%、80% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次溶剂用量为 8、6、6 倍, 即 1200、900、900 mL, 每次回流 1 h, 合并 3 次的提取液, 按 2.1 样品的制备配制 HPLC 样品, 按 2.2 色谱条件测定样品, 计算转移率。

从表 14 可知, 70% 乙醇为提取溶剂, 各生物碱转移率最高。

2.5 验证实验

根据上述实验结果, 分别称取黄连药材粗粉 500 g, 共 3 份, 加入 70% 乙醇, 各提取 3 次, 每次 1 h, 溶剂用量分别为 8、6、6 倍, 即 4000、3000、3000 mL, 合并 3 次的提取液, 按 2.1 方法配制 HPLC 样品, 按 2.2 色谱条件测定样品, 计算转移率, 结果见表 15。

表 14 回流提取转移率一览表

序号	溶剂	各生物碱转移率(%)						各生物碱平均转移率(%)					
		药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	70%乙醇	95.80	103.73	92.35	95.45	95.54	99.80	96.00	101.61	91.93	94.82	94.31	98.37
2	70%乙醇	94.73	101.98	92.66	96.32	94.94	99.01						
3	70%乙醇	97.46	99.11	90.78	92.68	92.45	96.29						
4	75%乙醇	92.47	94.11	86.27	87.73	88.56	91.96	94.62	94.60	87.37	89.51	90.04	92.99
5	75%乙醇	94.53	94.11	86.81	88.93	89.18	91.99						
6	75%乙醇	96.86	95.57	89.02	91.87	92.37	95.02						
7	80%乙醇	94.84	93.83	87.50	88.65	90.37	93.09	94.75	93.84	88.29	89.60	91.38	94.66
8	80%乙醇	94.45	94.46	88.37	90.58	92.08	95.74						
9	80%乙醇	94.95	93.23	89.01	89.56	91.69	95.16						

表 15 回流提取转移率一览表

序号	溶剂	各生物碱转移率(%)						各生物碱平均转移率(%)					
		药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	70%乙醇	219.47	337.21	94.03	93.43	88.30	60.30	220.16	335.63	91.24	91.07	86.27	59.17
2	70%乙醇	221.64	336.20	91.64	88.35	86.30	59.01						
3	70%乙醇	219.39	333.47	88.06	91.43	84.20	58.19						

3 讨论

黄连始载于《神农本草经》，列为上品。《本草纲目》中记载：“其根连珠而色黄，故名。”自古以来认为四川为主产地。有泻火、燥湿、解毒、杀虫的功能。现代医学研究成果表明，黄连抗菌、抗炎、镇痛、降糖等活性均与黄连中多种生物碱密切相关，黄连药材的主要活性成分为其中的生物碱，包括小檗碱、黄连碱、巴马汀、表小檗碱等。2010版《中华人民共和国药典》一部对黄连制定了4种生物碱的含量限度；依据多成分含量测定符合中药多成分的特点，更有利于中药材质量控制的整体性和客观性。但仅对药材进行质量控制，并不能保证成药的质量。成药安全有效需依赖于合理的制备工艺及完善的质量控制^[6]。现有的黄连提取工艺多采用小檗碱作为单一指标成分进行黄连提取工艺的筛选和研究^[7-9]，而黄连另含有其他多种生物碱，其含量同样影响黄连及其提取物的质量，单一选择一种生物碱作为指标成分进行黄连提取工艺的筛选不能体现中药多成分多指标的特色，更不能保证成品有效性和可控性，故本研究采用多成分作为指标对黄连的提取工艺进行筛选，为后续黄连成药的制备提供依据。

正交试验设计中，以多成分为指标筛选出的最佳提取工艺为8倍量75%的乙醇提取3次，每次1h。结合能耗及实际生产成本的考虑，在此参数上

进行了微调验证，确定最终的最佳提取工艺为以70%乙醇作为提取溶剂，提取3次，每次1h，溶剂用量分别为8、6、6倍。

参考文献

- [1] 张红梅,程雪梅,王长虹,等. 黄连中生物碱提取工艺的正交试验研究[J]. 中国医药工业杂志,2008,39(8):588-590.
- [2] 刘圣,唐丽琴,陈礼明,等. 正交试验优选黄连中小檗碱提取工艺的研究[J]. 中国药房,2004,15(1):18-20.
- [3] 张乐佳,夏新华. 黄连提取工艺的研究[J]. 中成药,2001,23(6):398-400.
- [4] 张福维,关崇新,高坤. 盐酸小檗碱提取实验的改进[J]. 大学化学,2003,18(4):47.
- [5] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师,2006,9(5):469-470.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科学出版社,2005.
- [7] 彭福,瞿显友,钟国跃,等. HPLC法测定黄连不同部位中6个生物碱[J]. 中草药,2014,43(3):509-512.
- [8] 阳勇,李铁刚,朱晶晶,等. HPLC法测定黄连药材及其炮制品中主要生物碱的含量[J]. 中成药,2010,32(9):1540-1544.
- [9] 耿志鹏,郑海杰,张艺,等. RP-HPLC测定不同产地黄连中6种生物碱的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(19):2576-2580.

(2016-09-20)