

藏药小檗皮的醇提工艺优化研究^Δ

郝露*,周珍,冯慧,赵娅,周邦华,范刚,赖先荣*(成都中医药大学民族医药学院,成都 611137)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0958-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.23

摘要 目的:优化小檗皮的醇提工艺。方法:以小檗皮中木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量和浸膏量为评价指标,采用均匀设计-综合评分法考察乙醇用量、乙醇体积分数、提取时间对提取工艺的影响;采用3次均匀设计试验分别对第1次、第2次、第3次的提取工艺进行考察,分别确定3次提取试验各自的优化工艺并进行验证试验,计算转移率。结果:最优工艺为取小檗皮粗粉加入15倍量75%乙醇,回流提取2次,每次提取120 min。验证试验中,小檗皮按优化工艺提取2次后木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量分别为58.96、4.82、3.07、23.29 mg/g,转移率分别为93.85%、95.02%、96.28%、94.88%(RSD分别为3.87%、2.64%、4.00%、3.91%, $n=3$)。结论:优化的小檗皮乙醇回流提取工艺合理、可行,稳定性好。

关键词 藏药;小檗皮;乙醇提取物;均匀设计法;提取工艺

Study on Extraction Technology Optimization of Tibetan Medicine Cortex of *Berberis dictyophylla* by Ethanol

HAO Lu, ZHOU Zhen, FENG Hui, ZHAO Ya, ZHOU Banghua, FAN Gang, LAI Xianrong (College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize extraction technology of cortex of *Berberis dictyophylla* by ethanol. METHODS: Using the contents of magnoflorine, jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride, the amount of extract as evaluation indexes, the effects of ethanol amount, volume fraction of ethanol and extraction time on extraction technology were investigated by uniform design method-comprehensive scoring method. The extraction methods of first time, second time and third time were investigated by 3 times of uniform design test. The optimal schemes of 3 times of extraction test were determined and validation test was conducted, and the transfer rates were calculated. RESULTS: The optimal technology was as follows as coarse powder of cortex of *B. dictyophylla*, 15-fold 75% ethanol, extracting for 2 times, 120 min each time. In validation test, the contents of magnoflorine, jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride were 58.96, 4.82, 3.07, 23.29 mg/g after *B. dictyophylla* was extracted by optimization technology for 2 times. The transfer rates were 93.85%, 95.02%, 96.28%, 94.88%, respectively (RSD=3.87%, 2.64%, 4.00%, 3.91%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimal ethanol reflux extraction technology of cortex of *B. dictyophylla* is reasonable and feasible with good stability.

KEYWORDS Tibetan medicine; Cortex of *Berberis dictyophylla*; Ethanol extract; Uniform design method; Extraction technology

- Pharmacol Sci, 2013, 34(6):340-346.
- [7] 邱红梅,赖舒,尚京川,等.石榴皮鞣质对大鼠乙醇性胃黏膜损伤的保护作用研究[J].中国药房,2012,23(27):2509-2512.
- [8] 赵洁,童笑梅.丹参对幼鼠应激性溃疡预防作用的实验研究[J].中国当代儿科杂志,2005,7(6):523-525.
- [9] 古学文,廖永州.疏肝健脾活血法对胃溃疡患者胃黏膜表皮生长因子及受体表达的影响[J].广州中医药大学学报,2010,27(2):113-115.
- [10] 张双霞,李光迪,于晓辉,等.根除幽门螺杆菌对慢性胃炎和胃溃疡组织中MIF蛋白表达的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2009,30(6):724-728.
- [11] KIM JJ, KIM N, LEE BH, et al. Risk factors for development and recurrence of peptic ulcer disease[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2010, 56(4):220-226.
- [12] 何绍珍,任建林.乙醇对胃黏膜作用机制的研究进展[J].世界华人消化杂志,2005,13(21):259-261.
- [13] 苏静怡.病理生理学[M].北京:北京医科大学中国协和医学院联合出版社,1997:135-139.
- [14] SATOH T, MCKERCHER SR, LIPTON SA. Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of proelectrophilic drugs[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66(8):45-51.
- [15] MERCADO N, KIZAWA Y, UEDA K, et al. Activation of transcription factor Nrf2 signaling by the shingosine kinase inhibitor SKI- II is mediated by the formation of Keap1 dimers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88168-e88175.
- (收稿日期:2017-10-09 修回日期:2017-11-17)
(编辑:林静)

小檗皮为小檗科植物刺红珠(*Berberis dictyophylla* Franch.)及同属多种植物茎或根的干燥内皮,为常用藏药材(藏药名:吉尔巴^[1-2])。《晶珠本草》记载:“小檗皮,功效解毒,治瘟疫,眼病”,即可用于治疗黄水病、眼病、肾炎等疾病^[3]。小檗皮主要化学成分有小檗碱、药根碱、巴马汀、木兰花碱等生物碱类成分。药理研究表明,生物碱类成分具有明显的降血糖作用,对糖尿病及其并发症(如糖尿病视网膜病变)等有良好的防治效果^[4-5]。

针对小檗皮提取工艺,吴秦西等^[6]前期开展了基于藏医传统用药方法(小檗膏)的提取工艺(水煎煮法)研究,但其以柱色谱-紫外分光光度法测定盐酸小檗碱含量并将其代表总生物碱的含量,难以反映各主要生物碱成分的提取率;另有研究^[7]发现,水煎煮法制备的小檗膏中盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的提取率均低于40%,且未测定其中含量最高且具有活性作用的木兰花碱的含量。笔者前期研究的结果表明,不同体积分数的乙醇可以明显提高小檗碱等生物碱的提取率。为全面提取出小檗皮中的活性成分,笔者参考北美黄连提取物标准及制法(70%乙醇提取物)^[8]及小檗皮质量标准中的含量测定方法^[9],以小檗皮中4个主要生物碱类有效成分含量和浸膏量为指标,采用均匀设计-综合评价法优化小檗皮的醇提工艺参数,为小檗皮现代制剂的研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司,包括在线脱气机、G1322A型四元泵、G1329A型自动进样器、HT-340K型柱温箱、G1315D型二级管阵列检测器);KQ-50B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D型电子天平(德国赛多利斯公司);ULUP-I-10T型超纯水机(成都超纯科技有限公司);W201型恒温水浴锅(上海申顺生物科技有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

小檗皮药材,产地西藏(批号:20141201),由西藏甘露藏药厂提供,为藏医临床使用的“白小檗”,经成都中医药大学民族医药学院赖先荣副研究员、范刚副研究员鉴定为小檗科植物刺红珠的干燥茎内皮,符合六省区藏药标准小檗皮药材项下的有关规定^[2],薄层色谱检出与盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、木兰花碱对照品对应的色谱斑点。

木兰花碱对照品(四川赛因斯特生物科技有限公司,批号: MUST-14122416,纯度:99.77%);盐酸药根碱对照品(批号:110733-201108,供含量测定用)、盐酸巴马汀对照品(批号:110732-201309,供含量测定用)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,供含量测定用)均来源于中国食品药品检定研究院;磷酸、乙腈为色谱

纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 生物碱的含量测定

参考文献方法^[9]进行测定。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Capcell Pak C₁₈-MG II S5(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 14%~18% A; 10~15 min, 18%~23% A; 15~20 min, 23%~26% A; 20~35 min, 26%~26% A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:270 nm;进样量:10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品13.42、10.20、11.06、10.00 mg,分别置于25、50、100、25 mL量瓶中,加入甲醇使其溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为0.537、0.204、0.110 6、0.400 mg/mL的4种对照品贮备液。分别精密量取上述各贮备液2、0.5、0.5、1 mL,置于同一10 mL量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,制成木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱质量浓度分别为107.40、10.20、5.53、40.00 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取“2.3”项下小檗皮提取液适量(分别取第1次、第2次和第3次提取液1、4、10 mL),置于50 mL量瓶中,加入溶剂[盐酸-70%甲醇溶液(3:100, V/V)]稀释并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.4 系统适用性和专属性试验 分别吸取供试品溶液、混合对照品溶液和溶剂各10 μL,进样,记录色谱图。结果表明,供试品溶液中4种成分的色谱峰与相邻成分的色谱峰均可实现基线分离,其他成分对测定无干扰。理论板数以盐酸小檗碱峰计不少于5 000,目标成分与相邻峰间的分离度均大于1.5。色谱图见图1。

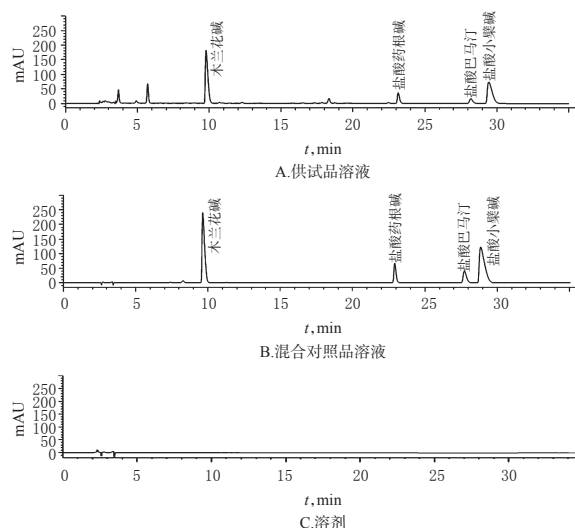


图1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.5 标准曲线的绘制 分别吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液2、4、6、8、10、12 μL,进样,记录色谱图,分别以4种成分的进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得4种成分木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的线性方程分别为 $y=2\ 016.9x+14.357(r=0.999\ 6)$ 、 $y=4\ 207.6x-0.386\ 7(r=0.999\ 3)$ 、 $y=4\ 448.9x-1.971\ 4(r=0.999\ 9)$ 、 $y=3\ 909.9x-7.071\ 4(r=0.999\ 5)$ 。结果表明,4种成分进样量线性范围分别为0.214 8~1.288 8、0.020 4~0.122 4、0.011 1~0.066 3、0.080 0~0.480 0 μg。

2.1.6 定量限考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,连续进样测定6次,记录色谱图。当信噪比为10:1时计算得定量限。结果,木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的定量限分别为2.685、2.040、2.760、4.000 ng。

2.1.7 精密度考察 分别吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液,于同日内分别连续进样6次,记录色谱图。结果,木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为0.20%、0.68%、0.34%、0.33% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性考察 精密吸取同一提取液(第1次提取的5号提取液),制备成供试品溶液后分别于室温下放置0、5、10、15、20、24 h进样,记录色谱图。结果,木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的RSD分别为0.37%、1.97%、1.86%、0.33% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.9 重复性考察 取同一小檗皮提取液(第1次提取的5号提取液)6份,平行制备成供试品溶液,进样测定,记录色谱图及峰面积,计算含量。结果,木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的RSD分别为0.27%、1.37%、1.88%、0.45% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.10 准确度考察 精密量取同一份已知含量的小檗皮浓缩液(3次提取合并后木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱质量浓度分别为7.184 0、0.599 4、0.380 9、2.884 5 mg/mL)9份,每份1 mL,分别按已知含量的50%、100%、150% 3个水平加入木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品,制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果,木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的平均回收率分别为97.07%、97.37%、100.7%、98.51%,RSD分别为1.00%、0.97%、1.42%、0.86% ($n=9$),表明方法准确度较好。

2.1.11 含量测定 取小檗皮粉末3份,每份约0.5 g,精密称定,制备成供试品溶液,测定并计算含量。结果,小檗皮药材中木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的平均含量分别为62.818 6、5.071 6、3.190 4、

24.544 2 mg/g($n=3$)。

2.2 浸膏得率测定

照醇溶性浸出物测定法^[10]。精密量取小檗皮提取液25 mL,置于已干燥至恒质量的扁平称量瓶中,水浴蒸干,于105 ℃干燥3 h,置于干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量,计算浸膏得率(浸膏质量/药材质量×100%)。

2.3 均匀设计试验

因提取次数对乙醇用量、提取时间产生交互影响,在预试验基础上,将提取次数作为独立因素进行单因素考察,按经验设定提取次数为3次,每次提取均选择乙醇用量(X_1)、乙醇体积分数(X_2)和提取时间(X_3)为考察因素,以4种成分含量和浸膏得率为评价指标。本试验根据各因素对提取工艺影响的贡献大小分配权重系数,即木兰花碱含量(Y_1)、盐酸药根碱含量(Y_2)、盐酸巴马汀含量(Y_3)、盐酸小檗碱含量(Y_4)与浸膏得率(Y_5)权重系数均为0.2,采用综合评分法^[11]评分。综合评分(Y)= $Y_1/Y_{1max} \times 0.2 + Y_2/Y_{2max} \times 0.2 + Y_3/Y_{3max} \times 0.2 + Y_4/Y_{4max} \times 0.2 + Y_5/Y_{5max} \times 0.2$ 。因素与水平见表1,按 $U_6(6^4)$ 均匀设计表安排设计进行回流提取试验^[12]。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

编码水平	因素		
	乙醇用量(X_1),倍	乙醇体积分数(X_2),%	提取时间(X_3),min
1	8	15	30
2	10	30	60
3	12	45	90
4	14	60	120
5	16	75	150
6	18	90	180

2.3.1 第1次提取均匀设计试验安排与结果 称取小檗皮药材粉末30 g,置于1 000 mL圆底烧瓶中,回流提取1次。提取液趁热滤过(100目滤布),制成250 mL的小檗皮提取液,每组试验重复3次。试验安排与结果见表2。

表2 第一次提取均匀设计试验安排与结果

Tab 2 Uniform design test design and results of first time extraction

序号	因素			指标					
	X_1 ,倍	X_2 ,%	X_3 ,min	Y_1 ,mg/g	Y_2 ,mg/g	Y_3 ,mg/g	Y_4 ,mg/g	Y_5 ,%	Y
1	8	30	90	21.34	1.69	1.08	7.55	12.01	0.440 5
2	10	60	180	32.50	2.72	1.73	12.61	21.32	0.721 1
3	12	90	60	33.54	3.25	2.15	15.13	19.07	0.794 9
4	14	15	150	23.95	1.74	1.12	7.91	12.96	0.468 7
5	16	45	30	38.73	3.19	2.00	14.45	21.49	0.814 1
6	18	75	120	46.45	3.96	2.51	18.48	25.13	1.000 0

应用DPS 7.05软件对试验数据进行多元二次逐步回归分析,结果见表3。

以 Y 的回归方程为主要方程, X_1X_2 的回归方程系数为正值且有极显著性影响,其取值应为极大值(即乙醇用量为18倍量,乙醇体积分数为90%)。考虑提取效果、

表3 第1次提取均匀设计试验的回归分析结果

Tab 3 Regression analysis results of uniform design test for first time extraction

回归方程	相关系数(R)	标准差(S)	显著水平(P)
$Y_1=18.5606-0.002233X_1X_2+0.03116X_1X_3$	0.9688	2.9737	0.0125
$Y_2=1.4196+0.001914X_1X_2$	0.9654	0.2622	0.0018
$Y_3=0.8976+0.001236X_1X_2$	0.9765	0.1382	0.0008
$Y_4=6.2668+0.009174X_1X_2$	0.9710	1.1452	0.0012
$Y_5=11.8580+0.009722X_1X_2$	0.8525	3.0236	0.0310
$Y_6=0.3909+0.0004509X_1X_2$	0.9474	0.0773	0.0041

成本及 X_1X_2 的交互作用,按15倍乙醇用量、75%乙醇进行验证试验); X_3 未纳入回归方程,其取值可以为极小值至极大值之间的任意值(参考提取时均匀设计试验安排表及提取效果,按提取时间为120 min进行验证试验)。综合考虑试验时间、成本及提取效果,本研究按15倍乙醇用量、75%乙醇、120 min提取时间进行第一次提取试验的验证试验。

该工艺条件下, Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 的预测值分别为41.05、3.57、2.29、16.59 mg/g,转移率(提取液中各成分的量/药材中各成分的量 $\times 100\%$)为65.35%、70.39%、71.78%、67.59%, Y_5 预测值为22.79%,假设随机误差满足正态分布,按照医学统计学对医学参考值的计算^[13]及均匀设计法对预测值可信区间的估计^[11],则实测值的数据落在预测值的99%的可信区间为[预测值 $\pm 2.58\times S$],可得预测值的99%可信区间估计范围为33.38~48.72、2.90~4.24、1.93~2.64、13.64~19.54 mg/g(以下试验的分析过程相同)。

3批样品第1次提取的验证试验结果见表4。

表4 第1次提取工艺验证试验结果

Tab 4 Results of validation tests of first time extraction technology

指标	样品1,mg/g	样品2,mg/g	样品3,mg/g	均值,mg/g	转移率,%
Y_1	46.00	47.45	46.12	46.52	72.96(RSD=1.70%)
Y_2	3.71	4.03	3.92	3.89	76.66(RSD=4.20%)
Y_3	2.41	2.58	2.53	2.51	78.56(RSD=3.50%)
Y_4	17.72	19.20	18.71	18.54	75.39(RSD=4.10%)
Y_5	24.00	24.00	24.20	24.07	(RSD=0.48%)

验证试验结果表明,各指标的含量高于均匀设计试验中各试验号的结果。第1次提取时,4种成分含量均值分别为46.52、3.89、2.51、18.54 mg/g,转移率为72.96%、76.66%、78.56%、75.39%,4种成分实测值处于含量预测范围间,提示小檞皮回流提取优化工艺稳定、可行。故确定小檞皮第1次提取的优化工艺为取小檞皮粉末适量,加15倍量75%乙醇,回流提取120 min。

2.3.2 第2次提取均匀设计试验安排与结果 称取小檞皮药材粗粉30 g,照上述已优化提取工艺进行第1次回流提取,除去滤液,取药渣按均匀设计试验安排进行试验,提取及综合评分方式同第1次提取,每组试验重复3次,结果见表5。

表5 第2次提取均匀设计试验安排与结果

Tab 5 Uniform design test design and results of second time extraction

序号	因素			指标					
	X_1 ,倍	X_2 ,%	X_3 ,min	Y_1 ,mg/g	Y_2 ,mg/g	Y_3 ,mg/g	Y_4 ,mg/g	Y_5 ,%	Y
1	8	30	90	8.44	0.61	0.38	2.90	6.85	0.5809
2	10	60	180	13.04	1.02	0.63	4.99	7.51	0.8588
3	12	90	60	11.78	1.00	0.63	4.95	6.14	0.8036
4	14	15	150	10.89	0.71	0.44	3.34	7.42	0.6739
5	16	45	30	13.98	1.04	0.64	5.04	7.91	0.8779
6	18	75	120	15.28	1.22	0.75	6.11	7.48	0.9891

采用DPS 7.05软件对试验数据进行多元二次逐步回归分析,结果见表6。

表6 第2次提取均匀设计试验的回归分析结果

Tab 6 Regression analysis results of uniform design test for second time extraction

回归方程	相关系数(R)	标准差(S)	显著水平(P)
$Y_1=5.5301+0.5158X_1$	0.7960	1.6405	0.0582
$Y_2=0.6185+0.0004470X_1X_2$	0.8956	0.1126	0.0158
$Y_3=0.3856+0.0002765X_1X_2$	0.9085	0.0645	0.0122
$Y_4=2.8607+0.002419X_1X_2$	0.9120	0.5517	0.0113
$Y_5=7.1362-0.0003491X_2X_3+0.001819X_1X_2$	0.8560	0.4191	0.1382
$Y_6=0.6052+0.0002746X_1X_2$	0.9320	0.0889	0.0350

分析结果同“2.3.1”项下。综合考虑试验时间、成本及提取效率,本研究按15倍乙醇用量、75%乙醇、120 min提取时间进行第2次提取试验的验证试验。

该工艺条件下第2次提取时 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 的预测值分别为13.07、1.12、0.69、5.58 mg/g,转移率为20.18%、22.08%、21.63%、22.73%, Y_5 预测值为7.22%,预测值的99%可信区间估计范围为8.87~17.27、0.83~1.41、0.52~0.86、4.17~6.99 mg/g。

3批样品第2次提取的验证试验结果见表7。

表7 第2次提取工艺验证试验结果

Tab 7 Results of validation tests of second time extraction technology

指标	样品1,mg/g	样品2,mg/g	样品3,mg/g	均值,mg/g	转移率,%	累计转移量,mg/g	累计转移率,%
Y_1	12.34	11.88	11.42	11.88	18.91(RSD=3.90%)	58.40	92.97
Y_2	0.97	0.93	0.90	0.93	18.39(RSD=3.80%)	4.82	95.04
Y_3	0.59	0.57	0.54	0.57	17.75(RSD=4.40%)	3.08	96.54
Y_4	4.83	4.63	4.45	4.64	18.89(RSD=4.10%)	23.18	94.44
Y_5	6.48	6.30	6.05	6.28	(RSD=3.44%)	30.35	

验证试验结果表明,各指标的含量与均匀设计试验各试验号中最大结果相差不大。第2次提取时,4种成分的含量均值分别为11.88、0.93、0.57、4.64 mg/g,转移率分别为18.91%、18.39%、17.75%、18.89%,4种成分实测值处于含量预测范围区间内,提示小檞皮回流提取优化工艺稳定、可行。故小檞皮第2次提取优化工艺为取小檞皮药渣适量,加15倍量75%乙醇,回流提取120 min。

2.3.3 第3次提取均匀设计试验安排与结果 称取小檞

皮药材粉末 30 g, 照已优化提取工艺进行第 1、2 次回流提取, 除去滤液, 取药渣按第 3 次提取均匀设计试验安排进行试验, 提取及综合评分方式同第 1 次试验, 每组试验重复 3 次, 结果见表 8。

表 8 第 3 次提取均匀设计试验安排与结果

Tab 8 Uniform design test design and results of third time extraction

序号	因素			指标					
	X_1 , 倍	X_2 , %	X_3 , min	Y_1 , mg/g	Y_2 , mg/g	Y_3 , mg/g	Y_4 , mg/g	Y_5 , %	Y
1	8	30	90	4.70	0.30	0.17	1.50	3.64	0.761 1
2	10	60	180	5.44	0.39	0.22	2.03	3.18	0.907 3
3	12	90	60	3.94	0.29	0.17	1.47	1.89	0.652 8
4	14	15	150	5.14	0.29	0.16	1.40	4.37	0.787 3
5	16	45	30	5.85	0.38	0.22	1.96	3.78	0.930 4
6	18	75	120	5.62	0.41	0.23	2.15	3.07	0.932 5

应用 DPS 7.05 软件对试验数据进行多元二次逐步回归分析, 结果见表 9。

表 9 第 3 次提取均匀设计试验的回归分析结果

Tab 9 Regression analysis results of uniform design test for third time extraction

回归方程	相关系数(R)	标准差(S)	显著水平(P)
$Y_1=2.998 2+0.067 23X_1+0.004 682X_2X_3-0.000 725 0X_1X_2+0.000 015 83X_2X_3$	0.994 4	0.164 7	0.157 3
$Y_2=0.244 2+0.000 306 4X_1X_2+0.000 008 463X_2X_3$	0.787 2	0.045 5	0.236 4
$Y_3=0.171 3+0.000 004 805X_2X_3$	0.617 3	0.026 6	0.191 6
$Y_4=1.482 0+0.000 051 34X_2X_3$	0.607 2	0.292 1	0.201 2
$Y_5=3.164 6+0.069 29X_1+0.002 085X_2-0.000 270 5X_2X_3-0.000 007 514X_2X_3$	1.000 0	0.005 0	0.004 0
$Y=0.715 8+0.000 624 0X_1X_2$	0.537 8	0.107 1	0.258 1

以 Y 的回归方程为主要方程, 其相关系数 $R=0.537 8$, 影响因素显著水平 $P_{(X_1, X_2)}=0.258 1 > 0.05$, 提示回归方程无统计学意义, 其各因素取值可以是均匀设计水平范围内的任意值。考虑试验时间、成本及提取效果, 可以选择 8 倍量溶剂提取 30 min, 提取溶剂与前两次提取一致, 本研究按 8 倍量 75% 乙醇提取 30 min 进行第 3 次提取试验的验证试验。该工艺条件下第 3 次提取时 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 预测值分别为 4.27、0.28、0.18、1.59 mg/g, 转移率为 6.79%、5.52%、5.64%、6.48%, Y_5 预测值为 2.18%, 预测值的 99% 可信区间估计范围为 3.84~4.69、0.16~0.39、0.11~0.25、0.84~2.34 mg/g。

3 批样品第 3 次提取的验证试验结果见表 10。

表 10 第 3 次提取工艺验证试验结果

Tab 10 Results of validation tests of third time extraction technology

指标	样品 1, mg/g	样品 2, mg/g	样品 3, mg/g	均值, mg/g	转移率, %	累计转移量, mg/g	累计转移率, %
Y_1	2.09	2.14	2.23	2.16	3.42(RSD=3.30%)	60.56	95.29
Y_2	0.17	0.17	0.18	0.17	3.44(RSD=3.30%)	4.99	98.49
Y_3	0.10	0.10	0.10	0.10	3.17(RSD=5.60%)	3.18	99.75
Y_4	0.87	0.90	0.92	0.90	3.65(RSD=2.80%)	24.08	97.93
Y_5	1.14	1.14	1.26	1.18	(RSD=5.87%)	31.53	

验证试验结果表明, 按优化工艺进行第 3 次提取时, 4 种成分含量均值分别为 2.16、0.17、0.10、0.90 mg/g, 转移率为 3.42%、3.44%、3.17%、3.65%, 4 种成分实测值多数与含量预测值相近(实测值与预测值之间差异的原因, 可能来源于系统误差与增大的偶然误差), 故小檗皮第 3 次乙醇回流提取优化工艺为取小檗皮药渣适量, 加 8 倍量 75% 乙醇, 回流提取 30 min。

第 3 次转移率仅为 3.5% 左右, 前两次提取 4 种成分木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的总转移率分别为 92.97%、95.04%、96.54%、94.44%, 均达 90% 以上, 从节约成本的角度考虑, 故小檗皮乙醇回流提取工艺的优化工艺为取小檗皮粗粉适量, 加入 15 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次, 每次 120 min。

2.4 验证试验

为了考察均匀设计试验的结果是否具有重现性, 称取小檗皮药材粉末 100 g, 共 3 份, 每份按已优化工艺提取 2 次进行验证试验, 结果见表 11。

表 11 提取工艺验证试验结果

Tab 11 Results of validation test of extraction technology

指标	样品 1, mg/g	样品 2, mg/g	样品 3, mg/g	均值, mg/g	转移率, %
Y_1	58.38	57.02	61.48	58.96	93.85(RSD=3.87%)
Y_2	4.79	4.71	4.96	4.82	95.02(RSD=2.64%)
Y_3	3.02	2.98	3.21	3.07	96.28(RSD=4.00%)
Y_4	23.18	22.44	24.25	23.29	94.88(RSD=3.91%)
Y_5	29.88	29.02	32.30	30.18(RSD=5.59%)	

结果表明, 小檗皮按优化工艺提取 2 次后 4 种成分木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量均值分别为 58.96、4.82、3.07、23.29 mg/g, 转移率分别为 93.85%、95.02%、96.28%、94.88%, RSD 分别为 3.87%、2.64%、4.00%、3.91% ($n=3$), 提示优化的小檗皮乙醇提取工艺稳定、可行。

3 讨论

3.1 色谱条件确定

本文在文献[9]的基础上, 对小檗皮醇提物中 4 种成分测定方法进行了改进, 并进行了方法学考察。在对测定波长的考察中, 以文献报道^[7, 14]的 270、345 nm 分别作为检测波长, 发现在 345 nm 波长处盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱检测灵敏度高, 但木兰花碱的吸收很弱; 而在 270 nm 波长处杂质对测定成分的干扰较小, 4 种成分的检测灵敏度及线性关系均良好, 故选用 270 nm 为检测波长。在流动相的选择中, 笔者分别尝试了甲醇-水溶液、甲醇-磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.02 mol/mL 碳酸氢钾溶液和乙腈-三乙胺溶液等 5 种不同的流动相体系, 最终确定采用乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 此流动相体系可使 4 种成分得到有效分离, 并且峰形对称。在供试品溶剂考察中, 分别考察

了甲醇溶液与不同比例的盐酸-甲醇溶液,发现溶剂为盐酸-70%甲醇(3:100)溶液时,供试品各色谱峰均分离良好,且峰形对称。

3.2 含量测定方法改进

目前针对小檗皮的提取工艺,仅本课题组前期做了基于藏医传统用药方法(小檗膏)的提取工艺(水煎煮法)研究^[6],但采用紫外分光光度法测定总生物碱含量,在一定程度上很难阐释提取工艺对某个活性成分提取率的影响,且该工艺提取率较低。此次研究采用HPLC法,测得小檗皮药材中木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的平均含量分别为6.28%、0.51%、0.32%、2.45%,其中以木兰花碱的含量最高,盐酸小檗碱含量次之,且以小檗皮中此4种主要活性成分含量和浸膏得率为指标,优化了小檗皮乙醇回流法的提取工艺参数。含量测定结果表明,与传统工艺相比,乙醇回流提取法提高了小檗碱等有效成分的含量(见表11),验证试验结果也表明了本文建立的藏药小檗皮回流提取工艺合理稳定、可行,各成分的转移率明显提高(从文献的低于40%^[7]提高到90%以上),可以有效地提高药材的利用率,为藏医对小檗皮的现代制剂研发提供了参考。

3.3 提取工艺参数确定

本文结合生产实际,对试验中的因素-水平选择及其取值范围进行了合理预测。研究结果表明,乙醇用量、乙醇体积分数是主要影响因素,而提取时间影响不大。为了减少提取多次引起的交互影响,考察提取次数因素时,将每次提取时对4种成分提取率的影响因素分别进行考察,因此分步进行了3次提取试验,并对每次提取试验结果进行单独的分析验证,确定每次提取的最优提取工艺参数,最终得出最优工艺条件。从优化工艺的验证试验可以看出,4种成分的总转移率均在90%以上。故结果表明,在此工艺条件下,仅需提取2次,各成分就能较好地提取完全。本文选取的4种成分在提取物中所占的比例为29.64%(4种成分总含量×投药量30g)/(浸膏量×投药量30g),与同属植物来源的三颗针药材的化学成分比较^[15],提示小檗皮提取物中可能还含有除这4种生物碱成分外的其他成分,这些成分是否与小檗皮的临床疗效有关,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国药品标准:藏药:第一册[S].北京:人民卫生出版社,1995:340.
- [2] 六省区卫生局.藏药标准:第一、二分册合编本[S].西宁:青海人民出版社,1979:11.
- [3] 帝玛尔·丹增彭措.晶珠本草[M].上海:上海科学技术出版社,1986:175.
- [4] 张燕,孟宪丽,岳丽珺,等.藏药小檗皮对糖尿病模型小鼠血糖水平影响的初步研究[J].现代生物医学进展,2013,13(19):3619-3622.
- [5] 岳丽珺,孟宪丽,张燕,等.藏药小檗皮对糖尿病大鼠视网膜PKC-β、VEGF、HIF-1α表达的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(1):181-186.
- [6] 吴秦西,王友利,张燕,等.均匀设计法优化藏药小檗皮的煎煮法提取工艺[J].时珍国医国药,2013,24(7):1637-1639.
- [7] 叶凡,周邦华,王胜,等.HPLC法测定藏药小檗膏提取物中3种生物碱的含量[J].时珍国医国药,2016,27(2):286-289.
- [8] 侯团章.中草药提取物:第1卷[M].北京:中国医药科技出版社,2004:297-300.
- [9] 李艳,吕秀梅,林亚丽,等.藏药小檗皮的质量标准研究[J].中国中药杂志,2016,41(4):592-596.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:202.
- [11] 牟婵,周若鹏,赖滢滢.正交试验法优选复方淫羊藿咀嚼片的提取工艺[J].中国药房,2015,26(28):3986-3988.
- [12] 方开泰.均匀设计与均匀设计表[M].北京:科学出版社,1994:25,149.
- [13] 李康,贺佳.医学统计学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2013:24.
- [14] 陈芳,邓雁如,许妍妍,等.双波长HPLC同时测定黄连及金芪降糖片中6种生物碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):60-65.
- [15] 王志东,宋宝安,杨松,等.贵州中草药三颗针化学成分研究[J].贵州大学学报(自然科学版),2009,26(3):11-13,17.

(收稿日期:2017-06-20 修回日期:2017-09-10)

(编辑:刘萍)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅