

· 中药工业 ·

星点设计-响应面法优化黄柏提取工艺研究[△]武婧^{1,2,3}, 宋忠兴^{1,4}, 古川^{1,2,3}, 刘红波^{1,2,3}, 翟思程^{1,2,3}, 唐志书^{1,2,3*}

(1. 陕西中医药大学/陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046;

3. 陕西省风湿与肿瘤类中药制剂工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712046;

4. 陕西兴盛德药业有限公司, 陕西 铜川 727031)

[摘要] 目的: 利用星点设计-响应面法优化黄柏的最佳提取工艺。方法: 以盐酸小檗碱含量为评价指标, 选取提取时间、液料比、提取次数 3 个因素进行 Box-Behnken 中心组合设计, 通过星点设计-响应面法确定黄柏最佳提取工艺。结果: 黄柏的最佳提取工艺为水煎煮提取, 液料比 8:1, 提取时间 90 min, 提取 3 次, 盐酸小檗碱得率为 32.15 mg·g⁻¹。结论: 采用星点设计-响应面法优化黄柏提取工艺, 方法简单合理, 且具有良好的预测性。

[关键词] 星点设计-响应面法; 黄柏; 工艺优化

Optimization of Extraction Process of Cortex Phellodendri Chinensis by
Central Composite Design-response Surface Methodology

WU Jing^{1,2,3}, SONG Zhongxing^{1,4}, GU Chuan^{1,2,3}, LIU Hongbo^{1,2,3},ZHAI Sicheng^{1,2,3}, TANG Zhishu^{1,2,3*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal

Resources Industrialization, Shaanxi, Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi province key laboratory of new drugs and Chinese medicine foundation research, Shaanxi, Xianyang 712046, China;

3. Shaanxi rheumatism and tumor center of TCM engineering technology research, Shaanxi, Xianyang 712046, China;

4. Shaanxi Xingshengde Pharmaceutical Co., Ltd., Shaanxi, Tongchuan 727031, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Cortex Phellodendri Chinensis by central composite design-response surface methodology. **Methods:** Water was chose as the extraction solvent and the effect of three factors such as solvent-solid ratio, extraction time and times was designed by Box-Behnken central composite, taking the content of berberine hydrochloride as evaluation indicator. Extraction process was optimized by central composite design-response surface methodology. **Results:** The optimizing extraction process of Cortex Phellodendri Chinensis were as follows: ratio of liquid to solid was 8:1, extraction repeated 3 times, 90 minutes every time. The yield of berberine hydrochloride under this condition was 32.15 mg·g⁻¹. **Conclusion:** Optimizing extraction process of Cortex Phellodendri Chinensis by central composite design-response surface methodology is reasonable, simple, and has good predictability.

[Keywords] Central composite design-response surface methodology; Cortex Phellodendri Chinensis; process optimization

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2015.9.016

黄柏^[1]又名关黄柏、川黄柏, 为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮。现代药理学研究表明, 黄柏具有抗病原微生物、抗溃疡、降压、抗心律失常等作用^[2], 具有清热燥湿,

泻火除蒸, 解毒疗疮等功能。黄柏主要有效部位为生物碱类化合物, 其中盐酸小檗碱为其主要有效成分^[3], 含量高达 3% 以上^[4]。

响应面法(Response Surface Methodology, RSM)

[△][基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81373978); 陕西省重点科技创新团队资助项目(2012KCT-20)

*[通信作者] 唐志书, 教授, 研究方向: 中药高新制备技术应用、中药资源开发与综合利用研究; Tel: (029)38180560, E-mail: tzs6565@163.com

是利用合理的试验设计方法,通过试验得到一定数据,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法。目前中药的提取工艺设计多采用正交设计法,其不能利用较少的试验数据找到因素与响应值间明确的函数关系^[5],以得到最佳的工艺因素组合。响应面优化法所获得的信息量大,直观、预测性好。本研究采用响应面法,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,通过试验数据建立多元回归方程的拟合函数模型,优化黄柏提取工艺,以期为实际的生产提取工艺提供科学参考数据。

1 仪器与材料

日立 LC-7000A 单泵系统液相色谱仪;旋转蒸发器 RE-3000(上海亚荣生化仪器厂);分析天平 AL-2049 [梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];101 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永鑫实验仪器设备厂);KH-400KDE 型高功率数控超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司)。

黄柏药材购于西安盛兴中药饮片厂,经陕西中医药大学大学生药教研室王继涛教授鉴定为黄柏的树皮;盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110713-200107);乙腈、甲醇为色谱纯;水为娃哈哈纯净水;磷酸、十二烷基磺酸钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄柏中盐酸小檗碱分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS C₁₈ (150 mm × 4.0 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (50:50, 每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.1 g)^[6]; 检测波长: 265 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 5.03 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加流动相制成质量浓度为 0.1 mg · mL⁻¹ 的溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取黄柏药材各 50 g, 精密称定, 精密吸取不同方法提取的黄柏提取液 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加流动相定容至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密量取盐酸小檗碱

对照品溶液 4、6、8、10、12、15 μL, 注入高效液相色谱仪中, 按 2.1.1 项下条件测定峰面积。以盐酸小檗碱进样量(X)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程: $Y = 16.964X - 0.47$, $r = 0.9994$, 表明盐酸小檗碱在 0.4 ~ 1.5 μg 与峰面积积分值线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 同一对照品溶液重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 为 0.62%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 同一对照品溶液在放置 0、2、4、8、12、24 h 后, 精密吸取 10 μL 进样分析, 测定其峰面积值, 计算 RSD 为 0.57%。表明供试品溶液 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 在相同条件下制备 6 份供试品溶液, 按照 2.1.3 项下方法制备样品, 测定盐酸小檗碱含量, RSD 为 0.59%, 表明本分析方法重复性良好。

2.1.8 加样回收试验 在相同条件下制备 6 份供试品溶液, 分别加 50 μg 对照品, 按 2.1.3 项下方法制备样品, 测定盐酸小檗碱含量, 平均回收率为 97.5%, RSD 为 0.34%, 表明本方法回收率良好。

2.2 单因素考察

经查阅文献^[7-12]和预试验, 选择对提取工艺影响较大的因素, 分别对提取时间、提取次数和液料比进行单因素考察。

2.2.1 提取时间考察 称取黄柏药材 6 份, 每份 50 g, 液料比为 10:1, 分别在 20、30、45、60、90、120 min 提取 2 次, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 定容至 250 mL。按 2.1.1 项下条件测定黄柏提取液中盐酸小檗碱含量。结果表明, 在 20 ~ 120 min 内, 提取液中盐酸小檗碱含量随提取时间的增加而增加, 但在 90 ~ 120 min 含量增加程度不明显, 故选择 90 min 为最佳提取时间。

2.2.2 料液比考察 称取黄柏药材 6 份, 每份 50 g, 液料比分别为 4:1、6:1、8:1、10:1、12:1、14:1, 提取时间为 90 min, 提取 2 次, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 定容至 250 mL, 按 2.1.1 项下条件测定盐酸小檗碱含量。结果表明, 提取液中盐酸小檗碱的含量随料液比的增大而增大, 但当液料比大于 8:1 时, 提取液中盐酸小檗碱含量的增幅较小, 而且液料比过大, 溶剂用量和浓缩工艺的能耗都会增大, 因此选择 8:1 为最佳液料比。

2.2.3 提取次数考察 取黄柏药材 3 份, 每份 50 g, 液料比为 8:1, 提取时间为 90 min, 提取次数分别为 1、2、3 次, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 定容至 250 mL, 按 2.1.1 项下条件测定盐酸小檗碱含量。结果表明, 提取液中盐酸小檗碱含量随提取次数的增加而增加。经统计学分析, 提取 2 次与 3 次所得的提取液中盐酸小檗碱的含量差异无统计学意义, 故选择提取 2 次为最佳提取次数。

2.3 星点设计-响应面优化与试验结果

在单因素试验结果的基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 以显著影响黄柏提取效果的 3 个因素: 提取时间、液料比、提取次数为自变量(分别以 A、B、C 表示), 作变换如下: $A = (t - 90)/30$, $B = (z - 8)/2$, $C = (T - 2)/1$ (t 、 z 、 T 分别为试验提取时间、液料比及提取次数), 以盐酸小檗碱得率(Y)为响应值, 设计 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验, 试验以随机次序进行。响应面分析因素与水平设计见表 1, 其中编号为 13 ~ 17 的试验为 5 次重复的中心点试验, 用来考察模型的误差。试验设计与结果见表 2。

表 1 星点设计因素水平编码表

水平	A/min	B/mL·g ⁻¹	C/次
-1	60	6:1	1
0	90	8:1	2
1	120	10:1	3

表 2 响应面试验设计与结果

实验编号	A/min	B/mL·g ⁻¹	C/次	Y/mg·g ⁻¹
1	60	6	2	13.79
2	60	10	2	17.54
3	120	6	2	22.32
4	120	10	2	20.16
5	90	6	1	23.83
6	90	6	3	24.32
7	90	10	1	22.65
8	90	10	3	25.86
9	60	8	1	15.74
10	120	8	1	21.89
11	60	8	3	19.78
12	120	8	3	24.35
13	90	8	2	37.24
14	90	8	2	37.91
15	90	8	2	38.13
16	90	8	2	37.52
17	90	8	2	37.94

用 ANOVA 分析响应面的回归参数。由表 3 可知, 一次项 $A < C < B < 0.5$, 各因素与 Y 的线性关系显著; 二次项 A^2 对 Y 的曲面效应显著。利用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 2 数据进行多元回归拟合, 得到 Y 对 A、B、C 的二次多项回归模型: $Y = 37.75 + 2.73 A + 0.24 B + 1.28 C - 1.48 AB - 0.40 AC + 0.68 BC - 11.51 A^2 - 7.79 B^2 - 5.80 C^2$, $r = 0.999 7$ 。

表 3 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P	显著性
模型	1 139.47	9	126.61	517.88	<0.000 1	***
A	59.79	1	59.79	244.56	<0.000 1	***
B	0.48	1	0.48	1.94	0.205 9	-
C	13.00	1	13.00	53.20	0.000 2	**
AB	8.73	1	8.73	35.72	0.000 6	**
AC	0.62	1	0.62	2.55	0.154 1	-
BC	1.85	1	1.85	7.57	0.028 5	**
A ²	557.84	1	557.84	2 281.79	<0.000 1	***
B ²	255.20	1	255.20	1 043.88	<0.000 1	***
C ²	141.53	1	141.53	578.93	<0.000 1	***
残差	1.71	7	0.24			
失拟项	1.19	3	0.40	3.06	0.153 9	-
误差	0.52	4	0.13			
总离差	1 141.18	16				

注: *** 差异极显著 ($P < 0.000 1$); ** 差异高度显著 ($P < 0.001$); * 差异显著 ($P < 0.05$)。

从表 3 的方差分析结果可知, 试验中选用的模型 $P < 0.000 1$, 说明模型达到极显著水平, 失拟项 F 值为 0.153 9, 影响不显著, 说明该回归方程对试验拟合情况很好, 能较好地起到预测作用, 在所选试验条件下, 各因素对盐酸小檗碱得率的影响显著 ($r = 0.999 7$)。此外, 该模型的变异系数 ($CV = 4.78\%$) $< 5\%$, 在可接受范围内。

2.4 提取工艺的响应面分析与优化

采用 Design-Expert 软件^[13], 根据二次回归方程绘制相应的等高线图和自变量对因变量的三维曲面图, 分别将其中一个因素固定在中心值, 以综合评分(Y)对另外两个因素描绘三维图。各因素交互作用的等高线图和响应面图见图 1 ~ 2。对回归方程取一阶偏导数等于零, 整理可得如下公式:

$$2.73 - 1.48B - 0.4C - 23.02A = 0 \quad \text{公式(1)}$$

$$0.24 - 1.48A + 0.68C - 15.58B = 0 \quad \text{公式(2)}$$

$$1.28 - 0.4A + 0.68B - 1.16C = 0 \quad \text{公式(3)}$$

联立方程组, 解得 $A = 0.096\ 088$, $B = 0.052\ 445$, $C = 1.057\ 8$, 代入前述的变换公式得到提取时间 $t = 92.882\ 64$, 液料比 $z = 8.104\ 89$, 提取次数 $T = 3.057\ 8$, 即黄柏的最佳提取工艺条件: 提取时间为 $92.882\ 64\ \text{min}$ 、液料比为 $8.104\ 89:1$ 、提取次数为 $3.057\ 8$ 。但考虑到实际情况最佳提取工艺条件修正如下: 提取时间为 $90\ \text{min}$, 提取次数为 3 次, 液料比为 $8:1$, 在此工艺条件下黄柏提取液中盐酸小檗碱得率为 $31.7\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

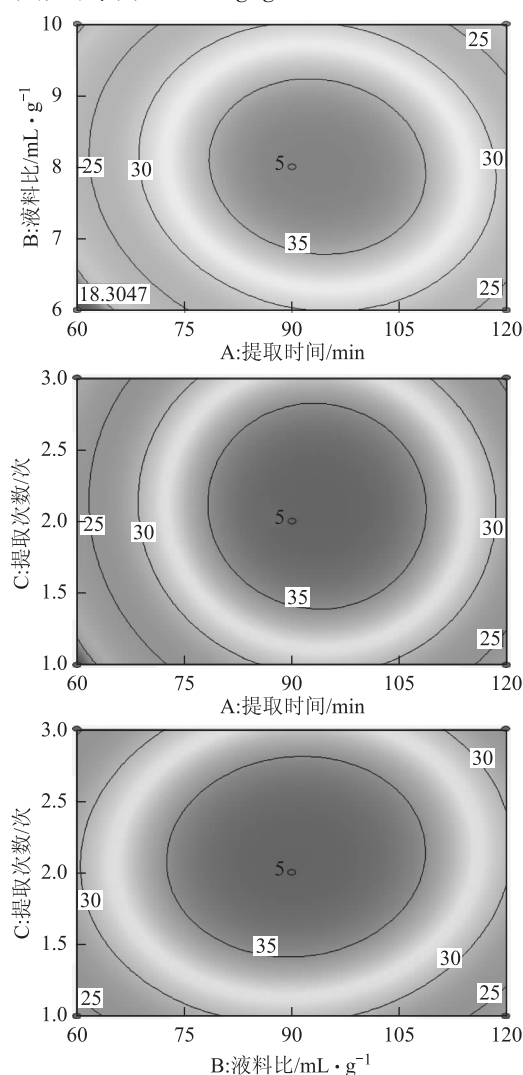


图1 两两交互作用对盐酸小檗碱得率影响的等高线

2.5 工艺验证试验

按照 2.4 项下的最佳工艺进行验证试验 ($n=3$), 黄柏提取液中盐酸小檗碱的实际平均质量分数为 $32.15\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (预测值为 $31.70\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), RSD 为 $\cdot 956 \cdot$

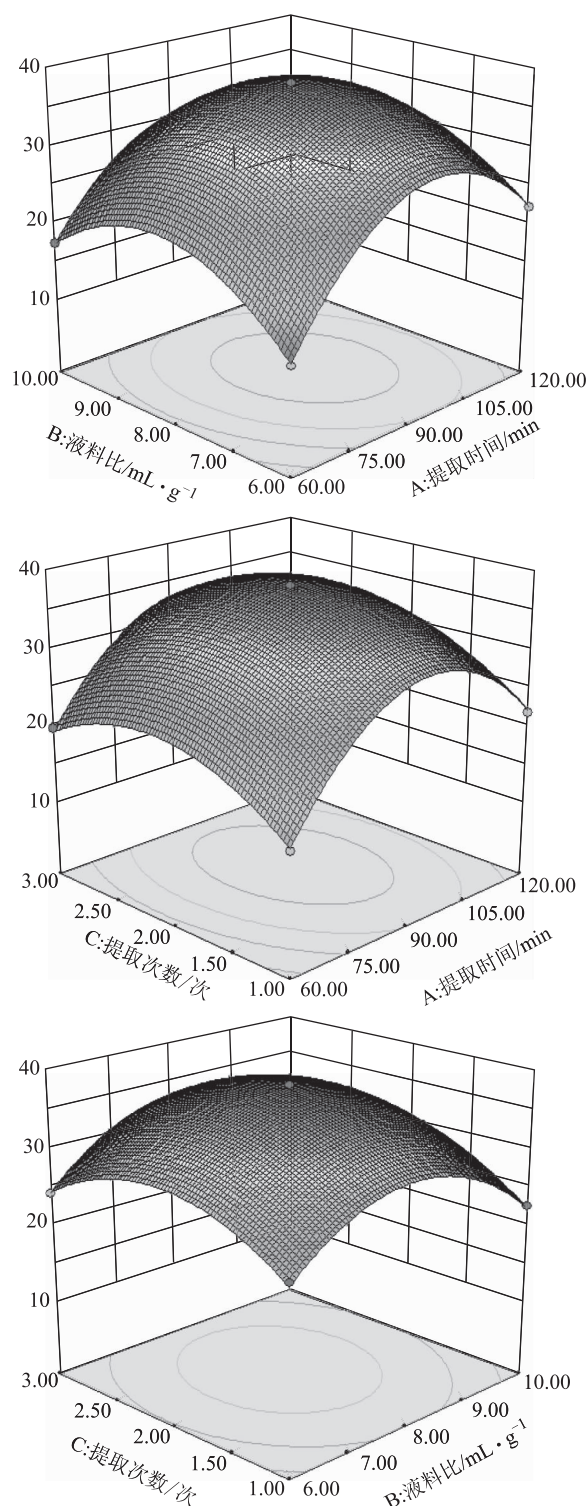


图2 两两交互作用对盐酸小檗碱得率影响的响应面图

0.2%。试验值与理论值偏差较小, 说明本试验中利用星点设计-响应面法优化得到数学模型可靠, 具有良好的预测性, 所得的工艺参数准确可信, 具有较强的应用价值。

(下转第 969 页)

基础上,增加了备案制管理方法。备案制产品将覆盖矿物质、维生素等营养元素以及已纳入保健食品原料目录(总局制定)的保健食品。无疑《食品安全法》将极大的激活现有保健品市场,同时也意味着企业将承担更大的责任,未来同质化竞争将日趋激烈,保健品真正进入品牌竞争时代。

3.2 行业标准助力提取物市场规范

作为中药商品出口大类,植物提取物标准的缺失不仅广受诟病,还严重限制了行业健康蓬勃发展。自2013年医保商会制定发布第一批植物提取物国际商务标准以来,对行业发展起到了很好推动作用。目前很多商检部门都采用此标准作为检测依据,2015年第二批植物提取物国际商务标准已经启动,覆盖的提取物范围扩大至绿茶提取物、柑橘幼果提取物、绿咖啡豆提取物、葡萄籽提取物、淫羊藿提取物、白芍提取物、芦丁、岩藻多糖、灵芝提取物、葛根提取物、当归提取物。同时,2015年医保商会启动与美国药典委员会的全面合作,双

方共同启动标准互认程序,并选择互认标准编辑《植物提取物标准专论》。这一具有里程碑意义的合作必将开启我国植物提取物进军国际市场的新征程。

3.3 行业认证助推行业健康发展

当前,植物提取物行业相对混乱,行业标准不完善,监管缺失等问题的存在,植物提取物产品质量参差不齐,企业各种夸大宣传,掺杂使假情况时有发生,大有“劣币驱逐良币”的行业乱象。为了引领行业健康有序发展,帮助优质企业提升自己企业和品牌价值,中国医药保健品进出口商会(CCCMHPIE)联合美国国家卫生基金会(NSF),共同开展“植物提取物优质供应商”认证(简称GEP认证)工作,打造植物提取物优质供应商。认证工作借鉴NSF认证领域的专业,同时增加行业特色和信用评价认证,综合打造的GEP认证将更适合植物提取物行业,更能有效区分优质植物提取物供应商。

(收稿日期 2015-08-25)

(上接第956页)

3 讨论

本试验通过用星点设计-响应面法优化黄柏的提取工艺,建立了影响因素与有效成分提取率间的数学模型方程,最终确定了黄柏的最佳提取工艺:提取时间为90 min,提取次数为3次,液料比为8:1。最佳工艺下盐酸小檗碱的得率为 $32.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,与预测值($31.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的RSD为0.2%,说明该数学模型方程与实际情况拟合很好,具有良好的预测性。因此用星点设计-响应面法优化黄柏的提取工艺是可靠的,且合理可行。

参考文献

- [1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1997.
- [2] 王浴生,邓文龙,薛春生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:1024-1026.
- [3] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:310-311.
- [4] 蒋国良,吴珂. 黄柏提取工艺的优化[J]. 医药导报,

2007,26(7):792-793.

- [5] 栾军. 现代试验设计优化方法[M]. 上海:上海交通大学出版社,1995:191.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:286.
- [7] 龙凤来,唐柳,余鸽,等. 黄柏提取工艺研究[J]. 杨凌职业技术学院学报,2009,8(2):6-8.
- [8] 王景媛,王昌利,史亚军. 星点设计-效应面法优化复方龙脉宁滴丸提取工艺[J]. 中南药学,2013,11(3):743-747.
- [9] 白曼,马丽娜,张小飞,等. 星点设计-响应面分析法优选穿山龙总皂苷提取工艺[J]. 中南药学,2013,11(1):4-7.
- [10] 陈卫卫,徐冬英,邓超澄,等. 星点设计-效应面法优选胃宁分散片的提取工艺[J]. 中成药,2009,31(1):39-43.
- [11] 王秋红,苏阳,吴伦,等. 星点设计-效应面法优化升麻提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):24-27.
- [12] 毛祖林,李晓波,龚文明,等. 人参皂苷提取工艺优选[J]. 时珍国医国药,2008,19(11):2762-2763.
- [13] 谢蓉,郭东艳,宋忠兴,等. Box-Behnken 效应面法优化淫羊藿配方颗粒提取工艺[J]. 现代中医药,2012,32(5):71-75.

(收稿日期 2015-02-03)