

Box-Behnken 设计-效应面法优选酒黄连炮制工艺

万 丹^{1,2}, 张水寒^{1,2*}, 肖 娟^{1,2}, 蔡 萍^{1,2}, 刘 婵¹, 秦裕辉¹, 黄惠勇^{1*}

1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013

2. 杨永华全国名老中医药专家传承工作室, 湖南 长沙 410013

摘 要: 目的 优选酒黄连的最佳炮制工艺。方法 以小檗碱等 4 种生物碱含量之和、醇浸膏得率、外观性状为评价指标, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法考察黄酒用量、闷润时间、炒制温度、炒制时间对其质量的影响, 优选酒黄连的炮制工艺参数。结果 黄连最佳酒炙工艺为黄酒用量 12 g (药材与黄酒用量比为 1:12), 闷润时间 75 min, 炒制温度 100 °C, 炒制时间为 7 min。结论 优选的酒黄连炮制工艺合理可行, 可制备出质量可控的酒黄连饮片。

关键词: 黄连; 酒炙工艺; Box-Behnken 设计; 响应曲面法

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)04-0341-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.04.011

Optimization of processing technology for prepared *Coptidis Rhizoma* with vino by Box-Behnken design-response surface method

WAN Dan^{1,2}, ZHANG Shui-han^{1,2}, XIAO Juan^{1,2}, CAI Ping^{1,2}, LIU Chan¹, QIN Yu-hui¹, HUANG Hui-yong¹

1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410013, China

2. The Inheritance Studio of Yang Yonghua of the Famous Old TCM Experts, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To optimize the processing technology for prepared *Coptidis Rhizoma* with vino. **Methods** The contents of berberine, epiberberine, coptisine, palmatine, extraction rate, and appearance in the rhizomes of *Coptis chinensis* were determined and were used as the investigative indexes to optimize the processing technology for prepared *Coptidis Rhizoma* with vino by Box-Behnken design-response surface method. The effect of wine amount, stuffy embellish time, stir-frying temperature, and stir-frying time on the quality of prepared *Coptidis Rhizoma* with vino was investigated to optimize the processing technology parameters of prepared *Coptidis Rhizoma* with vino. **Results** The optimal parameters were as follows: using 120% wine (g/g), moistening for 75 min, and stir-baked 12 min at 100 °C. **Conclusion** The processing technology for prepared *Coptidis Rhizoma* with vino is feasible, it could provide the experimental basis for the standardization for processing technology of prepared *Coptidis Rhizoma* with vino.

Key words: *Coptidis Rhizoma*; processing technology; Box-Behnken design; response surface method

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* wall. 的干燥根茎。具有清热燥湿, 泻火解毒的功效。黄连生用苦寒性较强, 经酒炙后能引药上行, 缓其寒性, 善清头目之火, 用于目赤、口疮。但黄连在炮制过程中不规范的操作易使药材发霉变质, 不仅不能达到“减毒增效”的作用, 反而会适得其反^[1]。《中国药典》和各省炮制规范中均未规定具体的酒炙工艺参数, 且炮制工

艺规范主要依靠人的主观感觉控制^[2], 故酒黄连饮片炮制工艺缺乏规范, 随意性大, 使得酒黄连饮片质量参差不齐, 稳定性差, 对临床疗效影响较大。因此, 本研究采用 Box-Behnken 设计-效应面法优选酒黄连炮制工艺, 制定工艺参数, 用于指导生产。

1 仪器与材料

LC—20A 高效液相色谱仪(日本岛津)、AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ3200 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有

收稿日期: 2014-02-20

基金项目: 湖南省科技厅重点项目(2012TF1005)

作者简介: 万 丹, 女, 硕士, 实习研究员, 研究方向为中药新制剂与新技术。E-mail: chenjiwandan@163.com

*通信作者 张水寒, 研究员, 博导。

黄惠勇, 二级教授, 博导。

限公司)。DHG—9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司);美的 SK2103 电磁炉。

对照品盐酸小檗碱(批号 110713-201212, 质量分数 99.4%)购自中国食品药品检定研究院。乙腈, 色谱纯, 美国 Tedia 公司; 水系娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯。

黄连于 2013 年 5 月采自四川省武隆县, 经湖南省中医药研究院中药研究所谢昭明研究员鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎。

2 方法

2.1 醇溶性浸出物的测定^[3]

取炮制酒黄连样品适量, 按《中国药典》2010 年版一部附录 X A 醇溶性浸出物测定法(热浸法)测定, 用 75%乙醇作溶剂, 以干燥品计算样品中醇溶性浸出物量。

2.2 黄连中小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的测定^[3-4]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g, 再以磷酸调节 pH 值为 4.0)为流动相; 检测波长为 345 nm。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于 5 000。

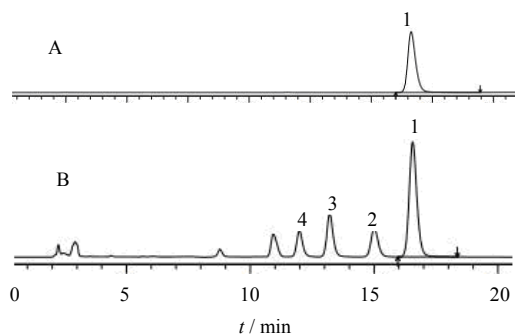
2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成 90 μg/mL 的溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-盐酸(100:1)的混合溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 分钟, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定(图 1)。以盐酸小檗碱对照品的峰面积为对照, 分别计算小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀的量。

2.3 酒炒黄连炮制工艺的设计^[5]

采用 Box-Behnken 实验设计原理, 选择黄酒用量(A)、闷润时间(B)、炒炙温度(C)、炒炙时间(D) 4 因素为自变量, 以小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量之和, 外观性状, 醇溶性浸出物量指标为效应值。以综合评分的方法, 采用 4 因素 3 水平的效应面分析方法进行分析, 设计因素及水平见表 1。具体炮制方法: 取黄连药材适量, 洗净,



1-盐酸小檗碱; 2-盐酸巴马汀; 3-盐酸黄连碱; 4-盐酸表小檗碱
1-berberine hydrochloride; 2-palmatine hydrochloride; 3-coptisine hydrochloride; 4-epiberberine hydrochloride

图 1 盐酸小檗碱(A)、黄连样品(B) HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC of berberine hydrochloride (A) *Coptidis Rhizoma* sample (B)

以闷润法软化, 切至 1~2 mm 薄片, 分成 27 份, 每份 100 g。按表 1 设计方案。

2.4 综合评分方法

用多指标试验的综合评分公式, 对效应面试验结果进行分析。根据所测成分在黄连中的重要性, 考虑小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量之和占 50%, 外观性状占 25%, 醇浸膏得率 25%。各样品分别计算综合评分^[2]值, 总分计为 1.0, 分析结果见表 1。

外观性状以酒黄连饮片片型整齐, 闷润透, 饮片颜色均匀, 周边呈灰黄色或黄褐色, 切面或碎断面暗黄色或暗红黄色, 饮片成品干燥, 略有酒香气者为佳, 总分记为 10 分, 根据炮制的酒黄连饮片分别赋分。

$$\text{综合评分} = (M_1/M_{1\max}) \times 0.5 + (M_2/M_{2\max}) \times 0.25 + (M_3/M_{3\max}) \times 0.25$$

式中 M_1 为小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量之和, M_2 为外观性状分, M_3 为浸膏得率。

3 结果

3.1 多元二次效应面回归模型的建立与分析

采用 Minitab16.0 软件对表 1 结果进行二次回归效应面回归分析, 得拟合方程 $Y = 0.902 - 0.020A + 0.030B - 0.025C + 0.006D - 0.009AB + 0.025AC + 0.028AD - 0.001BC - 0.029BD + 0.035CD - 0.054A^2 - 0.038B^2 - 0.016C^2 - 0.038D^2$ 。

由方差分析(表 2)可知, 模型的 F 值为 2.96, P 值为 0.033, 说明实验所采用的二次模型在统计学上是有意义的。失拟项 P 值为 0.857, 无明显失拟因素存在, 拟合优度良好, 因此可用该回归方程代

表1 Box-Behnken 设计及结果
Table 1 Box-Behnken design and results

试验号	A/g	B/min	C/°C	D/min	M_1	M_2	M_3	综合评分
1	15 (0)	80 (1)	130 (0)	11 (1)	11.15	8.5	25.85	0.83
2	15 (0)	60 (0)	100 (-1)	7 (-1)	13.44	9.0	25.32	0.92
3	10 (-1)	80 (1)	130 (0)	9 (0)	12.48	7.0	27.15	0.85
4	10 (-1)	40 (-1)	130 (0)	9 (0)	11.88	6.5	24.71	0.79
5	15 (0)	60 (0)	130 (0)	9 (0)	12.48	9.5	20.46	0.86
6	20 (1)	60 (0)	160 (1)	9 (0)	11.51	8.5	25.81	0.84
7	10 (-1)	60 (0)	130 (0)	11 (1)	12.26	7.5	20.12	0.79
8	10 (-1)	60 (0)	130 (0)	7 (-1)	12.86	7.0	26.51	0.86
9	20 (1)	60 (0)	130 (0)	11 (1)	11.18	8.0	24.35	0.81
10	15 (0)	60 (0)	100 (-1)	11 (1)	12.35	9.5	24.32	0.89
11	10 (-1)	60 (0)	100 (-1)	9 (0)	13.24	8.0	24.88	0.88
12	15 (0)	40 (-1)	130 (0)	7 (-1)	11.21	7.0	23.51	0.77
13	10 (-1)	60 (0)	160 (1)	9 (0)	13.31	7.5	21.64	0.84
14	15 (0)	60 (0)	130 (0)	9 (0)	12.54	9.0	25.58	0.89
15	15 (0)	80 (1)	130 (0)	7 (-1)	13.38	8.0	24.91	0.89
16	15 (0)	60 (0)	160 (1)	7 (-1)	10.94	6.0	22.83	0.73
17	15 (0)	80 (1)	100 (-1)	9 (0)	13.67	8.5	25.16	0.91
18	20 (1)	60 (0)	130 (0)	7 (-1)	11.28	6.0	24.72	0.76
19	15 (0)	40 (-1)	130 (0)	11 (1)	12.86	7.0	24.46	0.84
20	15 (0)	60 (0)	130 (0)	9 (0)	14.78	9.0	24.68	0.96
21	15 (0)	40 (-1)	160 (1)	9 (0)	10.24	7.5	25.82	0.78
22	15 (0)	80 (1)	160 (1)	9 (0)	13.51	7.0	24.73	0.86
23	20 (1)	40 (-1)	130 (0)	9 (0)	11.64	7.5	21.11	0.78
24	15 (0)	40 (-1)	100 (-1)	9 (0)	12.88	7.0	22.15	0.82
25	20 (1)	60 (0)	100 (-1)	9 (0)	10.86	7.0	25.91	0.78
26	15 (0)	60 (0)	160 (1)	11 (1)	12.56	8.5	21.38	0.84
27	20 (1)	80 (1)	130 (0)	9 (0)	11.81	6.5	25.53	0.80

表2 方差分析
Table 2 Analysis of variance

来源	自由度	Seq	F	P	来源	自由度	Seq	F	P
模型	14	0.058 247	2.96	0.033	交互作用	6	0.014 318	1.70	0.204
线性	4	0.023 734	4.23	0.023	A*B	1	0.000 328	0.23	0.637
A	1	0.004 818	3.43	0.089	A*C	1	0.002 522	1.80	0.205
B	1	0.010 906	7.77	0.016	A*D	1	0.003 049	2.17	0.166
C	1	0.007 638	5.44	0.038	B*C	1	0.000 008	0.01	0.942
D	1	0.000 372	0.26	0.616	B*D	1	0.003 492	2.49	0.141
平方	4	0.020 195	3.60	0.038	C*D	1	0.004 919	3.50	0.086
A*A	1	0.008 645	11.27	0.006	失拟	10	0.011 414	0.42	0.857
B*B	1	0.003 841	5.50	0.037	纯误差	2	0.005 436		
C*C	1	0.000 091	1.03	0.330	合计	26	0.075 097		
D*D	1	0.007 619	5.43	0.038					

替实验真实点对实验结果进行分析。因素 B、C、 A^2 、 B^2 、 D^2 项的 P 值均 <0.05 , 说明这几项对综合评分均有显著影响, 剩余项均 $P>0.05$, 说明无显著性影响, 由此可知, 单因素对 Y 值的影响明显大于交互项。

3.2 效面评估及优化

应用 Minitab16 实验设计软件绘制各因变量对

响应值的三维曲面图(图2)。按照上述条件结合模拟方程进行优化, 得到优化后的炮制工艺为黄酒用量 11.31 g, 闷润时间 77.97 min, 炒炙温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 炒炙时间为 7 min, 考虑到实际操作方便, 将黄连炮制工艺定为黄酒用量 12 g (药材与黄酒用量比为 1:12), 闷润时间 75 min, 炒炙温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 炒炙时间为 7 min。

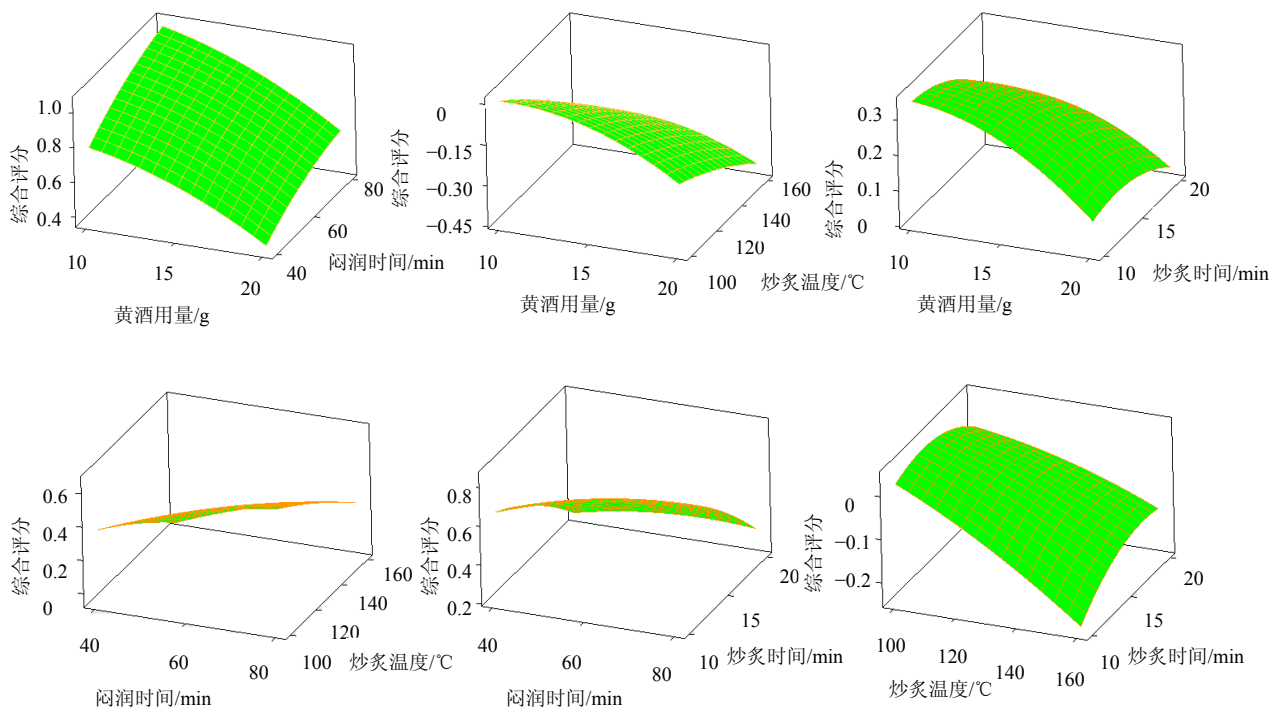


图2 Y 的三维响应面图

Fig. 2 Three-dimensional response surface of Y

3.3 工艺验证

取3份黄连药材, 每份 500 g, 照上述已确定的最佳炮制工艺条件制成酒黄连饮片, 分别测定每份酒黄连饮片中总碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量之和、浸膏得率、观察外观性状(表3), 测得综合评分值为 0.92, RSD 为 1.26%, 接近预测值, 说明确定的酒黄连炮制工艺稳定可行, 能制备出质量可控的酒黄连精制饮片。

表3 验证试验

Table 3 Verification test

样品	小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量之和/mg	外观性状	浸膏得率/%	综合评分
1	13.11	9.0	26.03	0.91
2	13.05	9.5	26.45	0.93
3	12.95	9.0	26.29	0.91

4 讨论

Box-Behnken 中心组合设计可以评价因素与响应值的非线性关系, 其与中心复合设计相比, 优点是不需要连续进行多次试验, 且在影响因素数相同的情况下, Box-Behnken 试验的试验组合数更少, 因而更经济; 与正交设计相比, 能同时进行线性、两因素相互作用、二次多项式或更高次项的模型拟合, 通过模型优选出最佳工艺条件, 且测得的结果更加直观、准确^[6]。

前期预试验对酒炙黄连进行了单因素考察, 以外观性状和醇溶性浸出物量为评价指标, 分别考察了不同黄酒用量、闷润时间、炒炙温度及炒炙时间对酒黄连饮片质量的影响。实验结果表明, 黄酒用量为 10%~20%、闷润时间为 40~80 min、炒炙温度为 100~160 $^{\circ}\text{C}$ 、炒炙时间为 7~11 min 时, 酒

黄连饮片外观性状较佳且醇溶性浸出物含量较高。

黄连的主要活性成分为小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀等结构类似的异喹啉类生物碱，其药理作用多样性，具有抑制A型单胺氧化酶、选择性抑制血管平滑肌细胞增殖、抑制破骨细胞分化、双重抑制血管平滑肌细胞增殖、抗真菌活性及心肌保护作用等。且其小檗碱等生物碱易溶于水，在热水中溶解度更高。所以在黄连切制时，用较低温水喷淋2~3次，并不断予以翻动，以减少成分的流失。有国外研究认为，当黄连在加热到130℃、1h时，可生成小檗红碱，且其含量随加热温度的升高和时间的延长而增加，同时小檗碱的含量相应减少^[7]，所以本实验选取小檗碱等含量作为主要指标，考察酒黄连的炮制工艺。本研究优选的酒黄连炮制工艺，酒黄连饮片中小檗碱等的含量高，外观良好，符合药典中酒黄连炮制要求。

参考文献

- [1] 钟振华. 炮制技术传承及规范推广刻不容缓——访中国科学院中药研究所炮制研究员毛淑杰 [J]. 中国处方药, 2008, 1(5): 32.
- [2] 傅华荣, 杨金梅, 龚千锋, 等. 正交试验优选酒黄连最佳炮制工艺 [J]. 中成药, 2009, 31(12): 1887-1890.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 汪 坤, 张振凌, 贾秀梅. 一测多评法优选黄连最佳提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 24: 9-11.
- [5] 康大力, 朱翠霞, 张洪利, 等. 多指标正交试验优化酒黄连炮制工艺 [J]. 中药材, 2009, 32(5): 685-687.
- [6] 陈 洁, 戴衍朋, 孙立立, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优选甘草切制工艺 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1579-1583.
- [7] 王延年, 刘晓秋. 现代中药炮制 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2008.