

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006 - 4931(2025)24 - 0079 - 05
doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2025.24.016



Box - Behnken 响应面法优选岩黄连中盐酸小檗碱提取工艺*

符海郦¹, 揭 晶², 杨梦玲², 肖梦杰^{3△}

(1. 长江航运总医院·武汉脑科医院, 湖北 武汉 430019; 2. 武汉生物工程学院医药学院, 湖北 武汉 430415; 3. 湖北省宜昌市妇幼保健院, 湖北 宜昌 443000)

摘要:目的 优化岩黄连中盐酸小檗碱的提取工艺。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定药材样品中盐酸小檗碱的含量, 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.1% 甲酸溶液(20:80, V/V), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 349 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL; 以盐酸小檗碱提取率为评价指标, 在单因素试验基础上以甲醇体积分数、提取时间、提取温度为考察因素, 采用 Box - Behnken 响应面法优化盐酸小檗碱的提取工艺, 并验证。结果 盐酸小檗碱进样量在 0.102 ~ 3.264 μg ($r = 0.9996$) 范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 95.36%, RSD 为 1.70% ($n = 6$)。盐酸小檗碱的最佳提取工艺为 50 °C 条件下, 以 55% 甲醇提取 27 min, 验证试验结果表明, 此条件下盐酸小檗碱的提取率为 5.91%, 与理论值 5.95% 相对误差为 0.68%。结论 优选工艺操作简便, 结果稳定可靠, 精密度、稳定性、重复性好, 可用于优化岩黄连中盐酸小檗碱的提取工艺。

关键词: 岩黄连; 盐酸小檗碱; 响应面法; 提取工艺; 高效液相色谱法

Optimization of Extraction Process of Berberine Hydrochloride from Herba Corydalis Saxicola by Box - Behnken Response Surface Methodology

FU Haitan¹, JIE Jing², YANG Mengling², XIAO Mengjie³

(1. General Hospital of the Yangtze River Shipping·Wuhan Brain Hospital, Wuhan, Hubei, China 430019; 2. College of Medicine and pharmacy, Wuhan University of Bioengineering, Wuhan, Hubei, China 430415; 3. Yichang Maternity & Child Healthcare Hospital, Yichang, Hubei, China 443000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of berberine hydrochloride from Herba Corydalis Saxicola. **Methods** The high - performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of berberine hydrochloride in medicinal materials. The chromatographic column was Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% formic acid solution (20:80, V/V), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 349 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL; The extraction rate of berberine hydrochloride was as the evaluation index and methanol volume fraction, extraction time and extraction temperature were selected as the investigation factors selected based on single factor test. The Box - Behnken response surface methodology was used to optimize the extraction process of berberine hydrochloride and verified. **Results** The linear range of berberine hydrochloride was 0.102 - 3.264 μg ($r = 0.9996$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recovery rate was 95.36%, with an RSD of 1.70% ($n = 6$). The optimum extraction process of berberine hydrochloride as follows: extraction with 55% methanol at 50 °C for 27 min. The results of validation test showed that the extraction rate of berberine hydrochloride under this condition was 5.91%, with the relative error of 0.68% compared with the theoretical value of 5.95%. **Conclusion** The optimized process is simple to operate, the results are stable and reliable, with good precision, stability and repeatability, which can be used to optimize the extraction process of berberine hydrochloride from Herba Corydalis Saxicola.

Key words: Herba Corydalis Saxicola; berberine hydrochloride; response surface methodology; extraction process; HPLC

岩黄连为罂粟科紫堇属多年生草本植物岩黄连的全草, 别名岩胡、土黄连、石生黄堇、菊花黄连^[1], 主要分布于我国广西、贵州、云南等西南部地区。岩黄连为国家二级重点保护野生植物, 是壮族特色护肝药物, 其质量标准记载在《广西中药材标准(1990年版)》和《广西

壮族自治区壮药质量标准》中。其具有护肝、抗菌、消炎、抗肿瘤、抗氧化、镇静止痛、免疫调节^[2-6]等作用, 常用于口舌糜烂、目翳火眼、急性腹痛、腹泻、肝硬化、急性黄疸型肝炎等的治疗^[7-8]。岩黄连主要有效成分为生物碱类, 目前已分离出 77 个, 包括小檗碱、卡维丁、白蓬

* 基金项目: 湖北省武汉市医学科研项目[WZ19Q13]。

第一作者: 符海郦, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药材及其制剂质量标准, (电子信箱)316751441@qq.com。

△通信作者: 肖梦杰, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为临床药学与中药药物制剂, (电子信箱)421153940@qq.com。

叶碱及脱氢卡维丁等^[9-11]。小檗碱是其主要活性成分,具有抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、抗炎、抗癌、治疗类风湿性关节炎、预防骨质疏松等作用^[12]。本研究中采用甲醇-超声法提取岩黄连中小檗碱后,以高效液相色谱(HPLC)法测定含量,通过Box-Behnken响应面法优选提取工艺,为岩黄连相关制剂的研发和应用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);KQ-600VDV 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);101-2AB 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);NBL-214i 型电子天平(艾德姆衡器<武汉>有限公司,精度为 0.1 mg);UV-1800 型紫外分光光度计(岛津企业管理<中国>有限公司);FW100 型粉碎机(郑州科丰仪器设备有限公司)。

1.2 试药

盐酸小檗碱对照品(南京源植生物科技有限公司,批号为 Yx1024211,含量 99.5%);乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。岩黄连药材由武汉生物工程学院医药学院提供(采自贵州省黔南布依族苗族自治州平塘县),由该院揭晶教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 甲酸溶液(20:80, V/V);流速:0.8 mL/min;检测波长:349 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL。

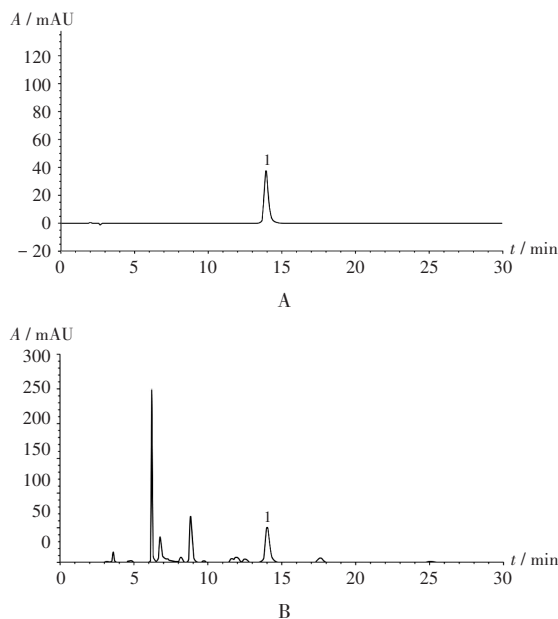
2.1.2 溶液制备

取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成质量浓度为 0.204 mg/mL 的对照品溶液。取样品粉末(过 5 号筛,下同)0.2 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加 55% 甲醇适量,50 °C 条件下超声处理(功率 200 W、频率 50 kHz,下同)27 min,放冷,加甲醇定容,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:取 2.1.2 项下对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按盐酸小檗碱峰计为 12 196,分离度为 2.0,基线分离良好。详见图 1。

线性关系考察:分别取 2.1.2 项下对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以盐酸小檗碱进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰



1. 小檗碱

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Berberine

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 11.936X - 0.1714$ ($r = 0.9996, n = 7$)。结果表明,盐酸小檗碱进样量在 0.102 ~ 3.264 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取 2.1.2 项下供试品溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积,并计算药材样品含量。结果盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 1.16% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:精密吸取 2.1.2 项下供试品溶液适量,室温放置 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算药材样品含量。结果盐酸小檗碱含量的 RSD 为 0.91% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置 36 h 内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品 6 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算药材样品含量。结果盐酸小檗碱含量的 RSD 为 0.96% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品粉末适量,6 份,每份 0.02 g,精密称定,加入 4 mL 对照品溶液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表 1。

2.2 单因素试验

提取温度:取药材样品粉末适量,共 5 份,精密称定,置锥形瓶中,加入 70% 甲醇 20 mL,分别于 40, 45, 50, 55, 60 °C 条件下超声 20 min,过滤,取续滤液,按

表 1 加样回收试验结果 (n = 6)

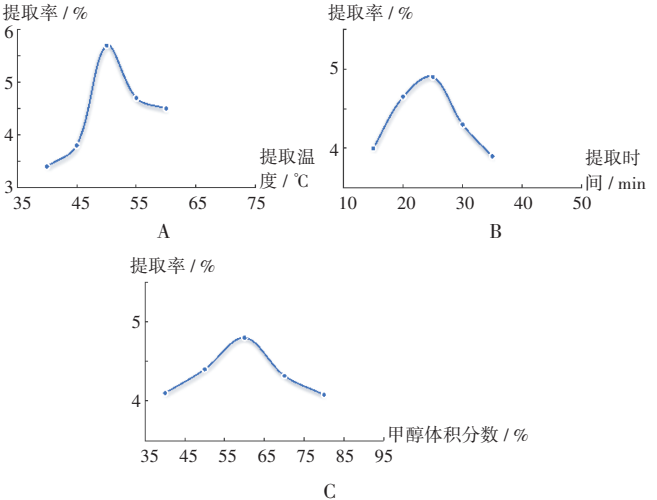
Tab. 1 Results of the recovery test (n = 6)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.020 1	0.864 3	0.816 0	1.625 5	93.28	95.36	1.70
0.020 0	0.864 0	0.816 0	1.660 1	97.56		
0.019 8	0.851 4	0.816 0	1.616 2	93.73		
0.020 1	0.864 3	0.816 0	1.643 9	95.54		
0.020 0	0.860 0	0.816 0	1.647 1	96.46		
0.019 9	0.864 3	0.816 0	1.644 2	95.58		

2. 1. 1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品提取率。结果 40~50℃条件下范围内,随温度的升高盐酸小檗碱提取率逐渐升高,50℃到达峰值,故提取温度选择 50℃。见图 2 A。

提取时间:取药材样品粉末适量,共 5 份,精密称定,置锥形瓶中,加入 70% 的甲醇 20 mL,于 50℃条件下,分别超声提取 15,20,25,30,35 min,过滤,取续滤液,按 2. 1. 1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品提取率。结果 15~25 min 范围内,随时间延长,盐酸小檗碱提取率逐渐升高,25 min 到达峰值,故选择 25 min 为提取时间。见图 2 B。

甲醇体积分数:取药材样品粉末适量,共 5 份,精密称定,置锥形瓶中,加入 20 mL 体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80% 的甲醇溶液,固定提取温度为 50℃,提取时间为 20 min,超声提取,过滤,取续滤液,按 2. 1. 1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品提取率。结果甲醇体积分数在 40%~60% 范围内随积分分数增加时,盐酸小檗碱提取率逐渐升高,甲醇体积分数为 60% 时到达峰值,故选择 60% 甲醇提取。见图 2 C。



A. 提取温度 B. 提取时间 C. 甲醇体积分数

图 2 单因素试验

A. Extraction time B. Extraction temperature C. Methanol volume fraction

Fig. 2 Single factor test

表 2 因素与水平

Tab. 2 Factors and levels

水平	因素 A(%)	因素 B(°C)	因素 C(min)
- 1	40	40	15
0	60	50	25
1	80	60	35

表 3 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of test

序号	因素 A	因素 B	因素 C	提取率(%)	序号	因素 A	因素 B	因素 C	提取率(%)
1	- 1	- 1	0	5.12	10	0	0	0	5.68
2	- 1	1	0	5.55	11	0	1	- 1	5.27
3	1	0	1	5.31	12	1	0	- 1	4.96
4	0	0	0	5.84	13	0	0	0	5.65
5	0	1	1	5.40	14	- 1	0	1	5.46
6	0	0	0	5.82	15	1	- 1	0	5.30
7	0	0	0	5.74	16	- 1	0	- 1	5.08
8	0	- 1	1	5.32	17	1	1	0	5.13
9	0	- 1	- 1	4.92					

2. 3 响应面优化工艺

试验设计与结果:以甲醇体积分数(因素 A)、提取温度(因素 B)、提取时间(因素 C)为考察因素,盐酸小檗碱含量为评价指标,采用 Design - Expert 10. 0. 7 软件设计三因素三水平试验。因素与水平见表 2,试验设计与结果见表 3,方差分析结果见表 4。

模型拟合及显著性分析:使用 Design - Expert 10. 0. 7 软件,对数据进行二次多项式回归及拟合,得回归方程 $Y=5.75+0.064A+0.086B-0.16C+0.0045AB+0.00053AC-0.0044BC-0.0025A^2-0.0022B^2-0.0063C^2$ ($R^2=0.8735$),表明该模型拟合良好。可见该

表 4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
模型	1.32	9	0.15	28.69	0.000 1
A	0.033	1	0.033	6.21	0.041 5
B	0.060	1	0.060	11.37	0.011 9
C	0.2	1	0.20	37.91	0.000 5
AB	0.90	1	0.090	17.19	0.004 3
AC	2.250×10^{-4}	1	2.250×10^{-4}	0.043	0.841 7
BC	0.018	1	0.018	3.48	0.104 3
A ²	0.26	1	0.26	49.47	0.000 2
B ²	0.21	1	0.21	40.00	0.000 4
C ²	0.37	1	0.37	70.23	<0.000 1
残差	0.037	7	5.236×10^{-3}		
失拟项	8.725×10^{-3}	3	2.908×10^{-3}	0.42	0.751 0
纯误差	0.028	4	6.980×10^{-3}		
总误差	1.37	16			

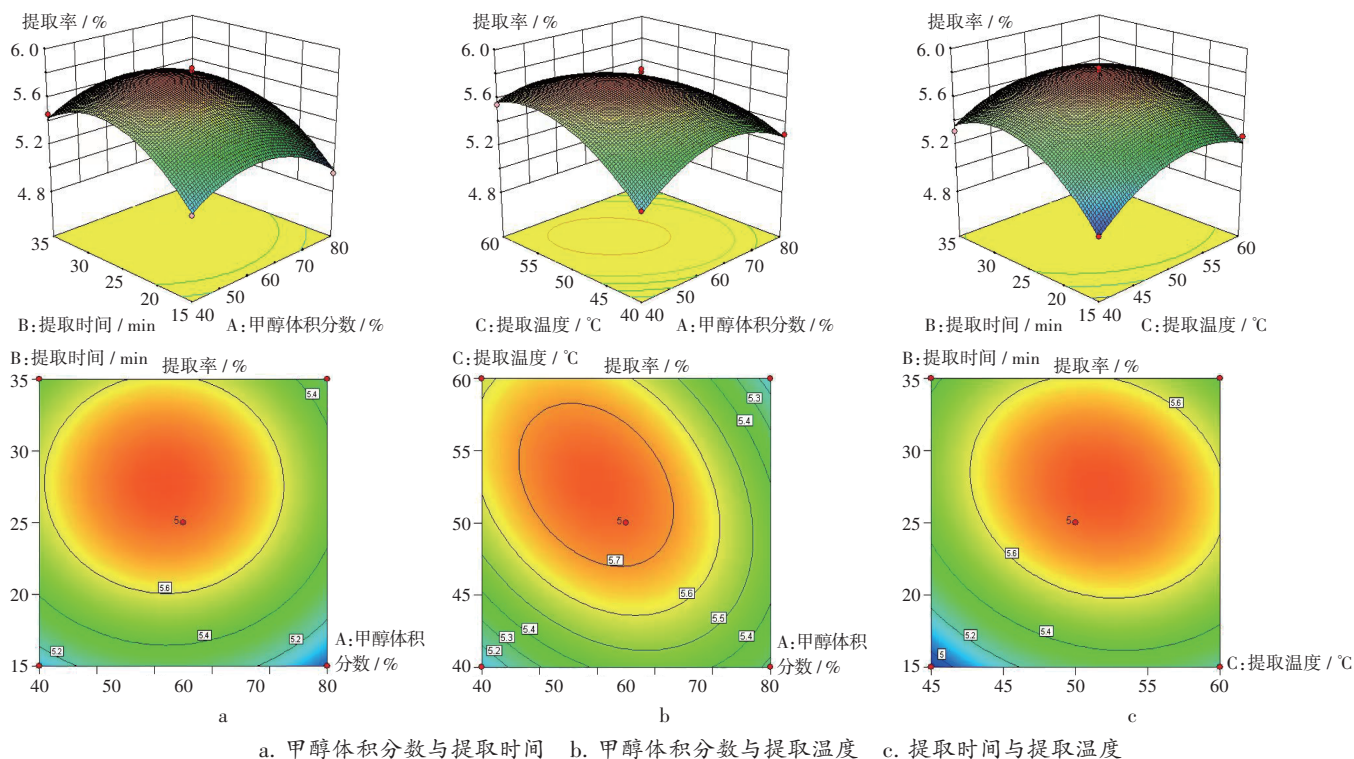


图3 各因素之间的交互作用

A. Methanol volume fraction and extraction time B. Methanol volume fraction and extraction temperature C. Extraction time and extraction temperature

Fig. 3 Interactions among various factors

模型的稳定性相对理想,可用作分析判断盐酸小檗碱的提取效果。

响应面图交互作用:甲醇体积分数与提取时间的交互作用显著;甲醇体积分数与提取温度的交互作用均不显著;提取时间与提取温度的交互作用较显著。详见图3。

验证试验:使用 Design - Expert 10. 0. 7 软件数据分析,得到提取率最高理论值为 5. 95%,对应的提取工艺为甲醇体积分数 56. 15%,提取温度 52. 17 °C,提取时间 27. 26 min。根据实际试验情况进行调整后最终条件为,甲醇体积分数 55%,提取温度 50 °C,提取时间 27 min。按此条件平行提取 3 次,结果盐酸小檗碱的提取率为 5. 91%,RSD 为 0. 43%,与理论值的相对误差为 0. 68%,表明该工艺条件准确可行。

3 讨论

3.1 提取方法选择

目前岩黄连有效成分提取研究集中在总生物碱类的提取,主要有加热回流法、超声法、索氏提取法、浸渍法、渗漉法和煎煮法,超声法具有简单快捷、提取率高、经济实惠等优势,由于总生物碱类易溶于水和醇类,甲醇可显著降低脂溶性杂质含量,因此甲醇提取法在岩黄连有效成分提取中应用较广^[13-18]。在预试验中得到的供试品溶液色谱图基线平整,因此本研究采取甲醇结合超声法作为提取方式。

3.2 检测波长选择

通过预试验采用二极管阵列检测器对盐酸小檗碱进行 190 ~ 800 nm 全波长扫描,发现盐酸小檗碱在 349 nm 波长处有最大吸收,故选择 349 nm 作为检测波长。

3.3 流动相选择

预试验中比较了甲醇 - 0. 1% 磷酸溶液(20:80, V/V)与乙腈 - 0. 1% 磷酸溶液两种流动相(20:80, V/V)。结果采用乙腈 - 0. 1% 磷酸溶液作为流动相时,盐酸小檗碱在 14 min 分离度较好。此外,为了减少峰的拖尾,比较了乙腈 - 0. 1% 磷酸溶液(20:80, V/V)与乙腈 - 0. 1% 甲酸溶液(20:80, V/V)两种流动相,结果采用后一流动相时,对称因子较好,最终确定流动相为乙腈 - 0. 1% 甲酸溶液(20:80, V/V)。

3.4 方法学评价

岩黄连活性有效成分提取研究主要集中在脱氢甲卡维丁、巴马汀等成分,有关盐酸小檗碱的提取研究甚少。Box - Behnken 响应面法采用多元线性和二次项模型拟合,能提高试验精确度并预测最佳点^[19],多应用于优化工艺设计、提取条件等方面^[20]。本研究中采用 Box - Behnken 响应面法,最终确定了岩黄连中盐酸小檗碱的最佳提取工艺。结果表明,该方法操作简便、适用性高,结果准确,精密度、稳定性、重复性好,可用于岩黄连药材中盐酸小檗碱的检测,为岩黄连制剂产品的合理开发、深度加工和工业化生产提供参考。后续将在岩