

多指标正交试验优选莲松异搏停片中延胡索、苦参醇提工艺

李艳英,王超,郭小玉,张永丽*,黄能听

(北京因科瑞斯医药科技有限公司,北京 100088)

[摘要] **目的:** 优选莲松异搏停片中延胡索、苦参的提取工艺。**方法:** 以延胡索乙素、苦参碱和氧化苦参碱提取量为指标,通过正交试验和单因素试验考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取次数和时间对醇提工艺的影响。采用 HPLC 测定指标成分含量,流动相乙腈(A)-磷酸二氢铵溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,10% A;10~25 min,10%~37% A;25~45 min,37% A),检测波长 220 nm。**结果:** 最佳提取工艺为加 6 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 2 h;延胡索乙素提取量 332.04 mg,苦参碱和氧化苦参碱总量 3 192.08 mg。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行,建立的色谱条件可较好地分离 3 个指标成分。

[关键词] 延胡索;苦参;正交试验;莲松异搏停片;延胡索乙素;苦参碱;氧化苦参碱

[中图分类号] R283.6;R284.2;R944.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0026-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130026

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1459.004.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 14:59

Optimization of Extraction Technology for *Corydalis Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* in Liansong Yiboting Tablets by Orthogonal Design with Multi-indexes

LI Yan-ying, WANG Chao, GUO Xiao-yu, ZHANG Yong-li*, HUANG Neng-ting
(Beijing Increase Pharmaceutical Co. Ltd, Beijing 100088, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of *Corydalis Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* in Liansong Yiboting tablets. **Method:** With extracting amounts of matrine, oxymatrine and tetrahydropalmatine as indexes, orthogonal test and single factor test was adopted to optimize extraction process by taking ethanol concentration, solid-liquid ratio, extracting times and time as factor. HPLC was employed to determine contents of index components with mobile phase of acetonitrile (A) - ammonium dihydrogen phosphate solution (B) for gradient elution (0-10 min, 10% A; 10-25 min, 10%-37% A; 25-45 min, 37% A) and detection wavelength at 220 nm. **Result:** Optimum extraction technology was as following: extracted 3 times with 6 times the amount of 70% ethanol for 2 h each time. Extracting amount of tetrahydropalmatine was 332.04 mg, total extracting amount of matrine and oxymatrine was 3 192.08 mg. **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable and feasible, these established chromatographic conditions had a good separation for three components.

[Key words] *Corydalis Rhizoma*; *Sophorae Flavescentis Radix*; orthogonal test; Liansong Yiboting tablets; tetrahydropalmatine; matrine; oxymatrine

[收稿日期] 20131012(013)

[基金项目] 北京市科委“十病十药”研发项目(Z121102001112009)

[第一作者] 李艳英,硕士,工程师,从事新药研究,Tel:010-81766827,E-mail:yanyingliabc@163.com

[通讯作者] *张永丽,硕士,工程师,从事新药研究,Tel:010-82001093,E-mail:zylkyb@126.com

莲松异搏停片为未在国内上市销售的中药六类复方制剂,由延胡索、苦参、炙甘草、丹参等共8味药组成,具有益气活血、养阴清热、宁心安神的作用,用于治疗冠心病室性早搏气阴不足、瘀热互结证,症见心悸怔忡等症。延胡索中生物碱类成分具有很强的镇痛、镇静、降压和抗心律失常作用^[1-2],延胡索乙素为主要活性成分;苦参中苦参碱和氧化苦参碱对心脏具有负性频率、负性自律性和延长有效不应期作用^[3];研究显示延胡索^[4-6]和苦参^[7-8]中生物碱类成分采用乙醇溶液提取效果较好。故本实验以延胡索乙素、苦参碱和氧化苦参碱提取量为指标,通过正交试验和单因素试验优选莲松异搏停片中延胡索和苦参的提取工艺,为本品临床推广提供参考。

1 材料

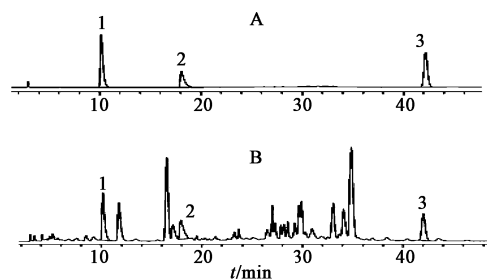
LC-2010AHT型高效液相色谱仪(日本岛津),BT25S型1/10万和BS124S型1/万电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),DZ-2BC型真空干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司)。延胡索和苦参购自安国柏林饮片厂,经中国中医科学院中药研究所张保献教授鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎,豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根,按《中国药典》2010年版一部^[9]检验符合要求;延胡索乙素、苦参碱、氧化苦参碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110726-201112,110805-200507,110780-201007),乙腈、甲醇为色谱级,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 指标成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-磷酸二氢铵溶液(取磷酸二氢铵1.725 g,加水300 mL使溶解,加磷酸调至pH 3.5, B)梯度洗脱(0~10 min, 10% A; 10~25 min, 10%~37% A; 25~45 min, 37% A),检测波长220 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL,见图1。

2.1.2 线性关系考察 精密称取延胡索乙素、苦参碱、氧化苦参碱对照品适量,加甲醇制成质量浓度依次为110, 104, 299 mg·L⁻¹的混合对照品贮备液。精密吸取该贮备液1, 2, 5, 7, 10 mL,分别置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 385\ 360X + 2\ 979.6$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 459\ 525X -$



A. 对照品; B. 供试品; 1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱; 3. 延胡索乙素

图1 莲松异搏停片提取物 HPLC

$12\ 558$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 147\ 259X - 998.87$ ($r = 0.999\ 7$), 线性范围依次为 1.10~11.00, 1.04~10.38, 1.50~14.96 μg。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取本品浸膏粉约1.5 g,置于50 mL量瓶中,加入甲醇35 mL,称定质量,超声处理(250 W, 40 kHz)30 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取上清液25 mL,通过中性氧化铝柱(100~200目,8 g,内径1 cm),加三氯甲烷-甲醇(1:1)混合溶液50 mL洗脱,合并流出液和洗脱液,蒸干,残渣加适量甲醇使溶解,转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2 正交试验 选择乙醇体积分数、溶剂用数、提取次数为考察因素,每个因素设计3个水平,以延胡索乙素、苦参碱和氧化苦参碱的提取量为评价指标,按处方比例称取延胡索139 g、苦参83 g,每个试验平行操作2次,共计18份,混合均匀,按L₉(3⁴)正交表进行试验,暂定每次提取2 h,滤过,合并滤液,浓缩成稠膏,减压干燥,得干浸膏,因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3,4。

表1 莲松异搏停片醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 加醇量/倍	C 提取数/次
1	60	5	2
2	70	6	3
3	80	7	4

由直观分析可知,各因素对延胡索乙素、苦参碱和氧化苦参碱提取量的影响顺序均为A>C>B,初步确定醇提工艺为A₂B₃C₃。方差分析表明A因素对醇提工艺具有显著性影响,因素B、C则无显著性影响,结合生产成本考虑,确定最佳工艺组合A₂B₂C₂,即加6倍量70%乙醇回流提取3次。

2.3 醇提时间考察 按处方比例称取3份药材,每份延胡索555 g、苦参333 g,按优选的工艺条件进行提取,每次提取时间分别为1, 2, 3 h,按2.1项下方法测定指标成分含量,结果延胡索乙素分别为

表 2 莲松异搏停片醇提工艺正交试验安排及直观分析

	No.	A	B	C	D (空白)	延胡索乙素 /mg	苦参碱、氧化 苦参碱总量/mg
	1	1	1	1	1	50.91	526.74
	2	1	2	2	2	62.86	620.64
	3	1	3	3	3	67.39	647.37
	4	2	1	2	3	76.94	739.67
	5	2	2	3	1	84.17	804.93
	6	2	3	1	2	70.83	687.45
	7	3	1	3	2	72.14	682.21
	8	3	2	1	3	65.94	580.97
	9	3	3	2	1	80.83	726.20
延胡索乙素	K_1	181.16	199.99	187.68	215.91		
	K_2	231.94	212.97	220.63	205.83		
	K_3	218.91	219.05	223.70	210.27		
	R	16.93	6.35	12.01	3.36		
苦参碱和氧化 苦参碱总量	K_1	1 794.75	1 948.62	1 795.16	2 057.87		
	K_2	2 232.05	2 006.54	2 086.51	1 990.30		
	K_3	1 989.38	2 061.02	2 134.51	1 968.01		
	R	145.77	37.47	113.12	29.95		

表 3 延胡索乙素质量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	463.72	2	231.86	27.25	<0.05
B	63.19	2	31.60	3.71	>0.05
C	265.84	2	132.92	15.62	>0.05
D(误差)	17.01	2	8.51		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$, 表 4 同。

表 4 苦参碱、氧化苦参碱总量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	32 000.10	2	16 000.05	21.92	<0.05
B	2 106.28	2	1 053.14	1.44	>0.05
C	22 483.03	2	11 241.51	15.4	>0.05
D(误差)	1 459.71	2	729.85		

280.12, 330.25, 334.54 mg, 苦参碱、氧化苦参碱总提取量依次为 2 756.45, 3 194.26, 3 205.17 mg, 故确定提取时间 2 h。

2.4 验证试验 按处方比例称取 3 份药材, 每份含延胡索 555 g、苦参 333 g, 按优选的工艺条件进行 3 次验证试验, 按 2.1 项下色谱条件测得干浸膏粉中延胡索乙素平均质量 332.04 mg, RSD 1.33%, 苦参碱和氧化苦参碱总量均值 3 192.08 mg, RSD 0.50%, 说明该工艺稳定可行。

3 讨论

预试验采用 2010 年版《中国药典》中苦参项下含量测定方法, 结果发现延胡索出峰时间太晚, 且氨基柱重复性差; 改用 C_{18} 色谱柱, 调整不同比例的甲

醇-0.1% 磷酸溶液及乙腈-5 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液均未得到较好的分离, 最终采用 Welch XB-C₁₈ 色谱柱, 乙腈-磷酸二氢按溶液梯度洗脱使 3 个成分得到较好的分离。选择对 2 味药材中 3 个生物碱类有效成分采取定量控制, 符合“多靶点、多方位”的原则, 使优选的提取工艺更加科学合理。

[参考文献]

- [1] 李荣. 延胡索碱及延胡索复方抗冠心病室性心律失常的实验与临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2007.
- [2] 李澎, 任钧国, 段昌令, 等. 4 种延胡索成分对乳鼠心肌细胞缺氧和过氧化损伤的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 84.
- [3] 张宝恒, 王年生, 李学军, 等. 苦参碱的抗心律失常作用[J]. 中国药理学报, 1990, 11(3): 253.
- [4] 商小金, 钱俊青, 郭辉. 响应面法优化延胡索生物碱乙醇提取工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(2): 32.
- [5] 黄康泰. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 874.
- [6] 刘芳, 罗跃娥. 延胡索研究概况[J]. 天津中医学院学报, 2005, 24(4): 240.
- [7] 张奎远, 余世春, 谢冬梅. 苦参提取工艺的优化选择[J]. 基层中药杂志, 2002, 16(1): 13.
- [8] 高拴平, 原春兰, 官晓成, 等. 从苦参中提取苦参碱的研究[J]. 化学工业与工程, 2001, 18(6): 414.
- [9] 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: 附录 VIB, 594.

[责任编辑 刘德文]