

# 复方葶苈泻肺利水合剂中含生物碱类成分药材的提取工艺优选

王丽<sup>1,2</sup>, 黄一平<sup>2\*</sup>, 徐佳<sup>1,2</sup>, 马亚萍<sup>1,2</sup>, 刘小敏<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 南京 210028)

**[摘要]** **目的:**考察不同提取方法中法半夏对黄连中盐酸小檗碱溶出率的影响。**方法:**选择复方葶苈泻肺利水合剂为考察对象,分别以水和乙醇为溶媒,采用方中法半夏、黄连、益母草、半边莲合提取及缺法半夏其余3味药材提取2种方法提取,比较提取液中盐酸小檗碱含量。以盐酸小檗碱提取量为指标,通过正交试验考察乙醇体积分数、提取时间、提取次数及料液比对复方葶苈泻肺利水合剂中4味药材提取工艺的影响。采用HPLC测定盐酸小檗碱含量,流动相乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液(50:50)(每100 mL中加十二烷基硫酸钠0.4 g,以磷酸调节pH 4.0),检测波长345 nm。**结果:**以水为溶媒,2种方式提取的盐酸小檗碱含量差别较大,合提与缺法半夏提取时盐酸小檗碱平均质量分数分别为9.20,13.53 mg·g<sup>-1</sup>;以乙醇为溶媒,2种方式提取的盐酸小檗碱含量差别较小,平均质量分数分别为35.15,36.12 mg·g<sup>-1</sup>。4味药材的最佳提取工艺为加10倍量70%乙醇回流提取2次,每次1.5 h;盐酸小檗碱提取量37.92 mg·g<sup>-1</sup>。**结论:**以水为溶媒,法半夏与黄连合提将导致盐酸小檗碱含量显著降低;以乙醇为溶媒,法半夏与黄连合提对盐酸小檗碱溶出率影响较小,且在乙醇溶液中盐酸小檗碱提取率远高于水提法。优选的提取工艺稳定可行、重复性好,可用于复方葶苈泻肺利水合剂的工业化生产。

**[关键词]** 复方葶苈泻肺利水合剂; 提取方式; 盐酸小檗碱; 法半夏; 黄连

**[中图分类号]** R283.6;R944.1;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0027-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015070027

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150211.1500.003.html>

**[网络出版时间]** 2015-02-11 15:00

**Optimization of Extraction Technology of Herbs Containing Alkaloids from Compound Tingli Xiefei Lishui Mixture** WANG Li<sup>1,2</sup>, HUANG Yi-ping<sup>2\*</sup>, XU Jia<sup>1,2</sup>, MA Ya-ping<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-min<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of Pinelliae Rhizoma Praeparatum on dissolution rate of berberine in Coptidis Rhizoma by different extraction methods. **Method:** Taking compound Tingli Xiefei Lishui mixture for example, water and ethanol were selected as solvent, extraction methods included mixed extraction of four herbs and remaining three herbs without Pinelliae Rhizoma Praeparatum, then the content of berberine in extract were compared. With extracting amount of berberine as index, orthogonal test was used to optimize extraction technology with the concentration and amount of ethanol, extracting times and time as factors. HPLC was employed to determine the content of berberine with mobile phase of acetonitrile-0.05 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate (50:50) and detection wavelength at 345 nm. **Result:** In water extraction process, the content of berberine was significantly differernt, average contents of berberine from mixed extraction of four herbs and remaining three herbs without Pinelliae Rhizoma Praeparatum were 9.20, 13.53 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. In ethanol extraction process, the content of bererine had little difference, which were 35.15, 36.12 mg·g<sup>-1</sup>.

**[收稿日期]** 20140627(010)

**[第一作者]** 王丽,在读硕士,从事中药质量标准与制剂工艺研究,Tel:025-85637809,E-mail:18252066880@163.com

**[通讯作者]** \*黄一平,研究员,硕士生导师,从事中药质量标准与制剂工艺研究,Tel:025-85637809,E-mail:yiping@163.com

Optimum ethanol extraction process was as follows: reflux extracted 2 times with 10 times the amount of 70% ethanol for 1.5 h each time; extracting amount of berberine was  $37.92 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . **Conclusion:** With water as solvent, when four herbs mixed extracting, Pinelliae Rhizoma Praeparatum can reduce the content of berberine significantly. With ethanol as solvent, when four herbs mixed extracting, Pinelliae Rhizoma Praeparatum has little effect on the content of berberine, and ethanol extraction method has higher extracting rate than water extraction method. This optimized technology is stable and feasible with good repeatability, and it can be used in industrial production of compound Tingli Xiefei Lishui mixture.

[**Key words**] compound Tingli Xiefei Lishui mixture; extraction method; berberine; Pinelliae Rhizoma Praeparatum; Coptidis Rhizoma

复方葶苈泻肺利水合剂处方是江苏省中西医结合医院卞美广主任医师的临床经验方,由葶苈子、黄连、法半夏、益母草、半边莲、泽兰、甘草、车前子等 12 味药组成,具有泻肺利水渗湿之功效,用于治疗由晚期肿瘤引起的恶性胸腔积液。方中法半夏、黄连、益母草、半边莲的有效成分为生物碱类,其中法半夏、黄连和半边莲的生物碱类成分均具有显著抗肿瘤<sup>[1-5]</sup>活性,益母草总生物碱具有抗炎镇痛<sup>[6]</sup>、活血利尿<sup>[7-8]</sup>等功效。这 4 味药材所含生物碱类成分可治疗恶性胸水,这可能与具有调节机体水液代谢、直接杀伤癌细胞、调节免疫功能、改善微循环的功能有关<sup>[9-10]</sup>。盐酸小檗碱是黄连中主要生物碱类成分,具有抗炎、抗癌等活性,黄连的抗癌效果可归于该成分的清热解毒功效及其潜在的分子机制<sup>[11]</sup>。

原方采用传统合煎方式,致使盐酸小檗碱提取量较低,仅  $2.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;考虑到方中甘草含有三萜酸类酸性成分,酸性成分与生物碱可能会发生沉淀反应造成损失,且采用一定体积分数乙醇提取能提高半边莲及法半夏中亲脂性生物碱的提取率。为尽可能多提取有效成分,拟将含生物碱的药材与处方中其他不含生物碱的药材分开采用乙醇提取。文献研究发现含盐酸小檗碱的中药与甘草在水煎煮中会出现沉淀反应,进而影响盐酸小檗碱的溶出<sup>[12-13]</sup>。甘草作为法半夏的炮制辅料,和黄连合煎时,可能会有沉淀反应。为考察法半夏对黄连中盐酸小檗碱溶出率的影响,本实验以盐酸小檗碱提取量为指标,采用 4 种提取方法进行比较,为临床中药汤剂的合理提取提供指导;以盐酸小檗碱提取量为评价指标,通过正交试验优选复方葶苈泻肺利水合剂的提取工艺,为该方的新药开发提供参考。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), AT201 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒公司), Millipore-Q 型纯水器(美国密理博公司)。法半夏

(四川新荷花中药饮片股份有限公司)、黄连(南京松龄中药饮片有限公司)、甘草等其余药材均购自江苏省中西医结合医院中药药库,经江苏省中医药研究院黄一平研究员鉴定均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求;盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110713-200208),乙腈为色谱级,水为二次蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

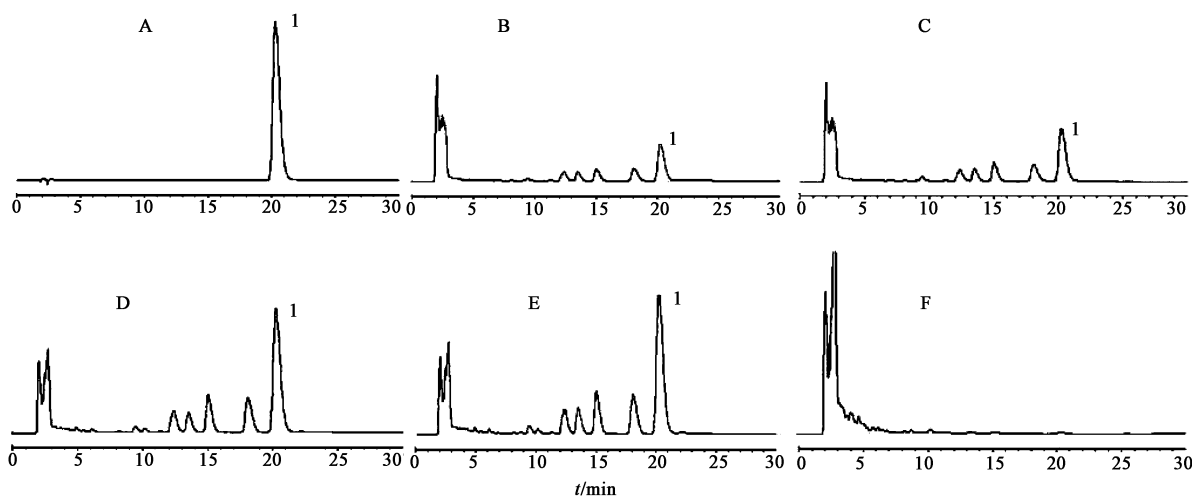
## 2 方法与结果

### 2.1 提取方法对盐酸小檗碱含量的影响

**2.1.1 色谱条件**<sup>[14]</sup> Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g,以磷酸调节 pH 4.0),检测波长 345 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL,柱温 30 °C。理论板数按盐酸小檗碱峰计算不低于 5 000,见图 1。

**2.1.2 溶液的制备** 精密称取适量盐酸小檗碱对照品,加甲醇制成 50.4 mg·L<sup>-1</sup>的对照品溶液。称取处方量法半夏、黄连、益母草、半边莲,共 51 g,加 10 倍量水加热回流提取 2 次,每次 1 h,趁热过滤,合并滤液,得含法半夏水提液;称取处方量黄连、益母草、半边莲,共 45 g,同法制得不含法半夏水提液。称取处方量法半夏、黄连、益母草、半边莲,加 10 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 1 h,趁热过滤,合并滤液,得含法半夏醇提液;称取处方量黄连、益母草、半边莲,同法制得不含法半夏醇提液。称取处方量法半夏、半边莲、益母草,加 10 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 1 h,趁热过滤,合并滤液,得阴性样品溶液。将提取液摇匀,分别精密吸取 2 mL 于 10 mL 量瓶,各加入适量 1% 盐酸甲醇溶液,超声 10 min,放置至室温,用 1% 盐酸甲醇溶液定容至刻度,得供试品溶液。

**2.1.3 标准曲线的建立** 精密吸取对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL 注入液相色谱仪,按 2.1.1 项



A. 对照品; B. 含法半夏水提液; C. 不含法半夏水提液; D. 含法半夏醇提液; E. 不含法半夏醇提液; F. 阴性样品; 1. 盐酸小檗碱

图 1 复方葶苈泻肺利水合剂 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of compound Tingli Xiefei Lishui mixture

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  $Y = 3\ 884.7X - 2.56$  ( $R^2 = 1.000$ ),线性范围  $0.050\ 4 \sim 1.26\ \mu\text{g}$ 。

**2.1.4 精密密度试验** 精密吸取对照品溶液  $10\ \mu\text{L}$ ,按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,计算盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.6%,表明仪器精密密度良好。

**2.1.5 重复性试验** 取同一含法半夏醇提液 6 份,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.5%,说明该方法重复性良好。

**2.1.6 稳定性试验** 取同一含法半夏醇提液样品,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 按 2.1.1 项下色谱条件进样,结果盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.4%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.1.7 加样回收率试验** 精密量取已知含量的含法半夏醇提液样品  $0.5\ \text{mL}$ ,共 6 份,各加入  $0.050\ 4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸小檗碱对照品溶液  $2\ \text{mL}$ ,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算盐酸小檗碱平均加样回收率  $101.83\%$ ,RSD  $2.6\%$ 。

**2.1.8 样品测定** 取 2.1.2 项下的供试品溶液,各平行 3 份,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算含法半夏水提液中盐酸小檗碱分别为  $9.41, 9.06, 9.14\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,不含法半夏水提液为  $13.50, 13.27, 13.81\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,含法半夏醇提液为  $35.23, 35.44, 34.78\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,不含法半夏醇提液依次为  $35.80, 36.10, 36.47\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,故采用醇提法。

**2.2 提取工艺优选** 以盐酸小檗碱提取量为指标,选择乙醇体积分数、提取时间、提取次数及料液比为

考察因素。称取处方量 4 味药材饮片,按正交设计条件进行提取,提取液趁热过滤,按 2.1.1 项下色谱条件测定,正交试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。以盐酸小檗碱提取量为指标,各因素影响提取工艺的顺序为  $D > C > A > B$ 。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A, C, D 均无显著性影响,故选择最佳组合为  $A_2B_3C_3D_2$ ,即加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h。

表 1 复方葶苈泻肺利水合剂醇提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of ethanol extraction process of compound Tingli Xiefei Lishui mixture

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 加醇量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取次数 /次	盐酸小檗碱 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	60	6	0.5	1	13.08
2	60	8	1.0	2	36.90
3	60	10	1.5	3	38.77
4	70	6	1.0	3	38.34
5	70	8	1.5	1	28.81
6	70	10	0.5	2	32.96
7	80	6	1.5	2	35.90
8	80	8	0.5	3	31.01
9	80	10	1.0	1	26.89

**2.3 验证试验** 称取 3 倍处方量法半夏、黄连、益母草、半边莲饮片,共 6 份,按优选的工艺和正交试验 3 各平行 3 份,按 2.1.1 项下色谱条件测得盐酸小檗碱平均质量分数分别为  $37.92, 38.13\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD 均为  $0.2\%$ 。故选择  $A_2B_3C_3D_2$  为最佳提取工

表2 盐酸小檗碱提取量方差分析

Table 2 Variance analysis of extracting amount of berberine

方差来源	SS	MS	F	P
A	21.60	10.80	0.88	>0.05
B(误差)	24.41	12.20		
C	147.71	73.85	6.05	>0.05
D	324.53	162.26	13.30	>0.05

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

艺,说明该工艺稳定可行,重复性好。

### 3 讨论

本文以提取液中盐酸小檗碱含量为指标,分别考察了以水和乙醇为溶媒,采用含法半夏药材合并提取及不含法半夏其余药材提取2种方法进行比较,结果发现醇提法优于水提法,而水提法明显会影响生物碱的提取,并且当法半夏与其他含生物碱的药材合并水提取时,法半夏影响了盐酸小檗碱的溶出。这可能是因为黄连中生物碱类成分在水提过程中因长时间受热会部分分解<sup>[15]</sup>。盐酸小檗碱为季铵生物碱,热稳定性较差,具有水溶性,但其盐类在水中溶解度较小<sup>[16-18]</sup>;且黄连中盐酸小檗碱能与法半夏炮制用的辅料——甘草中甘草酸在水中发生沉淀反应,该反应是通过阴、阳离子的相互作用成盐的反应,以离子键结合,形成一种难溶于水的离子化合物,故影响了盐酸小檗碱的溶出。在含水乙醇中,醇的存在可有效抑制盐酸小檗碱和甘草酸单钾的电离,从而抑制了沉淀反应的发生<sup>[19]</sup>。

在临床使用汤剂和合剂时,处方中含有法半夏、甘草等含酸性成分的药材,同时含有黄连、黄柏、苦参等其他生物碱类成分时,如果将两类药合并水提取是不合理的。为了避免产生化学配伍禁忌,最大限度提取有效成分,提高临床疗效,建议在临床制备汤剂或合剂时,将两类药分开水提取。

#### [参考文献]

[1] 陈雅琳,刘李娜,唐瑛,等. 半夏总生物碱对人肝癌细胞增殖的抑制作用研究[J]. 海军医学杂志,2014,35(1):5-8.

[2] 周茜,唐瑛,孙欢,等. 半夏总生物碱对人肺癌细胞增殖的抑制作用[J]. 药学实践杂志,2013,31(1):38-41.

[3] 张志辉,邓安琚,于金倩,等. 黄连碱药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(17):2750-2754.

[4] Magarinos M P, Sanchez-Margalet V, Kotler M, et al. Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastics cells [J]. Biol Reprod, 2007, 76(2): 203-210.

[5] 粟君,谭兴,李劲涛,等. 半边莲生物碱的提取及其对胃癌细胞的抑制作用[J]. 西华师范大学学报:自然科学版,2007,28(4):311-313.

[6] 李万,蔡亚玲. 益母草总生物碱的药理实验研究[J]. 华中科技大学学报:医学版,2002,31(2):168-171.

[7] 丁伯平,熊莺,徐朝阳,等. 益母草对急性血瘀证大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医药科技,2004,11(1):36-37.

[8] 晁志,马丽玲,周秀佳. 益母草生物碱成分对大鼠的利尿作用研究[J]. 时珍国医国药,2005,16(1):11-12.

[9] 卞美广,邢海燕,陈晓栋,等. 泻肺利水合剂治疗癌性胸水30例疗效观察[J]. 国医论坛,2003,18(3):21-22.

[10] 谢刚,郭志雄. 晚期肺癌胸腔积液的中医药治疗[J]. 中国医学创新,2009,6(7):18-19.

[11] Tang J, Feng Y, Tsao S, et al. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations [J]. J Ethnopharm, 2009, 126(1): 5-17.

[12] 李建荣,刘岱,高晓山. 黄连与黄芩、甘草配伍小檗碱煎出率测定[J]. 中国实验方剂学杂志,1998,4(6):21-22.

[13] 刘耀,张永萍,唐云,等. 不同煎煮方式对柴芍肠宁胶囊中盐酸小檗碱含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):19-21.

[14] 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,2010:285-286.

[15] 钱捷,郝清春,孙琳,等. 加热浓缩时间对黄连中五种生物碱成分的影响[J]. 北京中医学院学报,1993,16(6):20-21.

[16] 陈卫东,穆加兵. 黄连解毒汤有效成分浸出工艺的研究[J]. 南京中医药大学学报,1996,12(4):30-32.

[17] 刘晓华,刘宝林. 三黄胃血平胶囊制备工艺优选[J]. 中成药,2001,23(6):391-394.

[18] 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等. 正交设计法优选双益降糖方中小檗碱的提取工艺[J]. 河北联合大学学报:医学版,2013,15(1):51-52.

[19] 邓江. 含小檗碱的中药与甘草煎煮过程中的化学变化——小檗碱与甘草酸的沉淀反应机理研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2007.

[责任编辑 刘德文]