

夏天无提取工艺优化

桂婵¹, 吴安明², 何雁¹, 黄恺³, 傅亮¹, 徐兰¹, 罗晓健^{1,3*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330006; 2. 江西天施康中药股份有限公司, 江西 鹰潭 335000; 3. 中药固体制剂国家工程中心, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 优选夏天无的最佳提取工艺。方法: 以毕枯枯林等 4 个药效指标成分含量和浸膏得率为考察指标, 采用正交设计试验优化提取工艺, 采用相关性检验和综合平衡法优选最佳提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加入 11 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2.5 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 能够较好保留药效成分。

[关键词] 夏天无; 毕枯枯林; 原阿片碱; 延胡索乙素; 巴马汀; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0004-04

Optimization of Extract Technology of *Corydalis decumbens* by Orthogonal Experiment

GUI Chan¹, WU An-ming², HE Yan¹, HUANG Kai³, FU Liang¹, XU Lan¹, LUO Xiao-jian^{1,3*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Herbi-sky Co. Ltd, Yingtan 335000, China; 3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of *Corydalis decumbens*. **Method:** The content of bicuculline, protopine, tetrahydropalmatine, palmatine and yield of extract as indexes, optimization of extract technology by orthogonal experiment and correlation test and comprehensive balance method. **Result:** Optimum extraction condition was as follows: refluxing extracted 3 times with 11 times the amount of 70% ethanol by 2.5 h each time. **Conclusion:** This optimum technology was stable and feasible, it could keep effective components better.

[Key words] *Corydalis decumbens*; bicuculline; protopine; tetrahydropalmatine; palmatine; orthogonal experiment

夏天无为罂粟科植物状生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎, 在清代赵学敏《本草纲目拾遗》中便有本药记载, 是江西省著名的民间草药, 具有活血止痛、舒筋活络、祛风除湿之功效, 用于中药中风偏瘫、头痛、跌扑损伤、风湿痹痛、腰腿疼痛^[1]。其主要有效成分为毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀等生物碱类化合物, 药理研究表明夏天无生物碱具有增加心肌营养性流量、扩张外周血管、脑血管和下肢血管、对抗血小板聚集、松弛平滑肌、抑制实验性血栓形成、镇静、镇痛

等作用, 近来有研究报道夏天无总碱具有抗胆碱酯酶活性^[2]。

为了充分提取夏天无的有效成分, 本试验以毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀 4 种生物碱及浸膏得率为考察指标, 在考察提取方法和溶媒的基础上, 采用重复取样的正交试验优选最佳提取工艺, 为夏天无进一步研究提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦), Milli-Q 型纯水处理系统(美国 MILLIPORE 公司),

[收稿日期] 20110826(012)

[基金项目] 科技人员服务企业行动项目(2009GJC50010)

[第一作者] 桂婵, 硕士研究生, 从事中药新剂型研究, Tel:13767127058, E-mail:guichan198600@163.com

[通讯作者] * 罗晓健, 教授, 博士研究生导师, Tel:0791-87119619, E-mail:luoxj98@126.com

对照品毕枯枯林(批号 1022-101019)、原阿片碱(批号 1369-100918)、延胡索乙素(批号 1361-080213)、盐酸巴马汀(批号 1024-101019)等对照品均购自中药固体制剂技术国家工程研究中心,乙腈为色谱纯,冰醋酸、三乙胺为分析纯,夏天无药材由天施康中药股份有限公司提供。

2 考察指标的测定

2.1 毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀 4 种指标成分含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取对照品毕枯枯林 9.87 mg,原阿片碱 11.08 mg,延胡索乙素 11.09 mg,盐酸巴马汀 9.20 mg(折合成巴马汀 8.31 mg)置 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密吸取试验提取液的续滤液 25 mL,置水浴蒸干,转移至 50 mL 量瓶,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 色谱条件^[3] Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈 A-三乙胺醋酸 B(每 1000 mL 水中加冰醋酸 30 mL、三乙胺 8 mL),线性梯度洗脱 0 ~ 17.5 ~ 62.0 ~ 75.0 min,流动相 A-B 比例 10:90 ~ 24:76 ~ 36:64,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

2.1.4 线性关系考察 按上述色谱条件,各精密吸取 1 mL,混匀,即得母液,并将母液分别稀释 1, 2, 4, 6, 8, 16 倍进样测定。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀的回归方程分别为 $Y = 1.9424X + 10.184$ ($r = 0.9997$), $Y = 9.3463X + 7.2951$ ($r = 0.9997$), $Y = 8.4885X - 3.6468$ ($r = 0.9994$), $Y = 17.265X - 0.7709$ ($r = 0.9998$), 结果表明毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀进样质量浓度分别在 15.4 ~ 246.75, 8.66 ~ 277, 8.66 ~ 277.25, 7.2 ~ 230 mg·L⁻¹有良好的线性关系。

2.1.5 精密性 精密吸取同一对照品按 2.1.3 项下,连续进样 5 次。结果毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀的 RSD 分别为 1.67%, 1.25%, 0.96%, 0.68%, 表明仪器精密性良好。

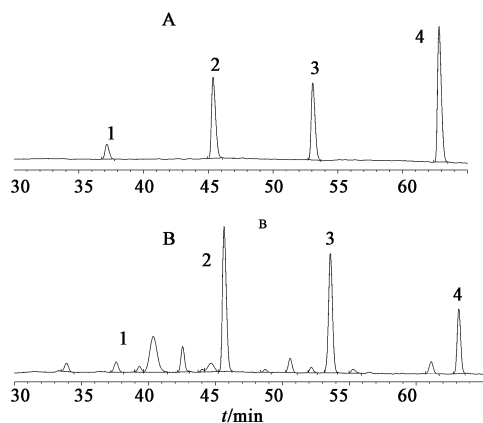
2.1.6 稳定性 取供试品溶液,室温放置,分别于 0, 4, 8, 10, 12 h 按 2.1.3 项下测定。结果毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀的 RSD 分别为 2.71%, 1.25%, 0.59%, 1.41%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性 精密吸取同一质量浓度供试品按 2.1.3 项下,连续进样 5 次。结果毕枯枯林、原阿片

碱、延胡索乙素、巴马汀的 RSD 分别为 2.67%, 2.05%, 1.85%, 1.67%。

2.1.8 加样回收率 取已知含量的供试品 6 份,分别精密加入一定量的毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀对照品,按 2.1.3 项下测定,计算回收率。结果表明毕枯枯林 6 次加样回收率均在 100% ~ 105%,其平均值 102.04%, RSD 1.60%;原阿片碱 6 次加样回收率均在 96% ~ 104%,其平均值 100.77%, RSD 1.82%;延胡索乙素 6 次加样回收率均在 96% ~ 103%,其平均值 101.42%, RSD 2.02%;巴马汀 6 次加样回收率均在 97% ~ 103%,其平均值 100.91%, RSD 2.02%, 表明该方法可靠性良好。

2.1.9 样品测定 精密吸取上述对照品及供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。对照品和供试品的 HPLC 见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 毕枯枯林; 2. 原阿片碱; 3. 延胡索乙素; 4. 巴马汀

图 1 夏天无 HPLC

2.2 浸膏得率测定 参照 2010 年版《中国药典》一部附录 XA 浸出物测定法,精密量取正交试验提取液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 105 °C 干燥 3 h,移置干燥器中,冷却 30 min,迅速精密称定质量,记录数据。按下列公式(浸膏得率/% = 浸膏质量/25 mL 药液相当于药材质量 × 100%)计算浸膏得率。

2.3 提取方法与溶媒考察

2.3.1 回流 取夏天无粗粉 10 g, 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,提取时间每次 1.5 h,收集滤液,回收乙醇,浓缩成稠膏,加适量甲醇溶解,摇匀,备用。

2.3.2 70% 乙醇-渗漉 取夏天无粗粉 10 g, 2 倍量 70% 乙醇装筒浸渍 48 h 后,继续加 6 倍量 70% 乙醇以 2 mL·min⁻¹ 的速度进行渗漉,收集渗漉液,回收乙醇,浓缩成稠膏,加适量甲醇溶解,摇匀,备用。

2.3.3 1% 盐酸-渗漉 取夏天无粗粉 10 g, 2 倍量 1% 盐酸溶液装筒浸渍 48 h 后, 继续加 6 倍量 1% 盐酸溶液以 2 mL·min⁻¹ 的速度进行渗漉, 收集渗漉液, 备用。

2.3.4 浸渍 取夏天无粗粉 10 g, 8 倍量 1% 盐酸

溶液浸渍 48 h 后收集浸渍液, 备用。

将上述 4 个样品采用 HPLC 测定其中毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀的含量, 同时分别测定浸膏得率, 结果见表 1。

表 1 不同提取方法对提取效果的影响

不同提取方法	毕枯枯林	原阿片碱	延胡索乙素	巴马汀	浸膏得率
回流	0.137 9	0.397 4	0.370 3	0.080 5	16.404 4
70% 乙醇渗漉	0.144 6	0.601 7	0.508 9	0.100 8	20.923 3
1% 盐酸渗漉	0.195 4	0.398 0	0.338 1	0.047 5	21.050 3
浸渍	0.060 1	0.140 9	0.134 5	0.022 5	10.897 9

结果表明以 70% 乙醇渗漉提取所得 4 种指标成分含量最高, 其次是 1% 盐酸渗漉、70% 乙醇回流, 最后 1% 盐酸浸渍。考虑今后制剂过程中辅料用量等问题, 浸膏得率相对较低为好, 上述试验浸膏得率由大到小顺序为 70% 乙醇渗漉 > 1% 盐酸渗漉 > 回流法 > 浸渍法, 但实验耗时最长为 70% 乙醇渗漉和 1% 盐酸渗漉, 其次 1% 盐酸浸渍, 最后 70% 乙醇回流。试验选用 1% 盐酸渗漉虽提取含量较高, 但其不利于回收, 且具有腐蚀性, 对环境有危害, 不利于工业生产, 故综合考虑选择提取方法为回流法。

2.4 正交试验设计 根据预实验考察结果, 选择醇

体积分数、溶媒用量、提取时间、提取次数进行 4 因素 3 水平的正交试验, 优化夏天无提取工艺。分别取夏天无粗粉 10 g, 共 27 份。分别测定毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀含量及浸膏得率, 因素水平表和试验结果分别见表 2, 3, 方差分析见表 4。

表 2 夏天无提取工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	醇体积分数/%	溶媒用量/倍	提取时间/h	提取次数/次
1	50	5	1.5	1
2	70	8	2	2
3	95	11	2.5	3

表 3 夏天无提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	毕枯枯林	原阿片碱	延胡索乙素	巴马汀	浸膏得率
1	1	1	1	1	0.048 64	0.160 0	0.162 0	0.036 7	8.678 8
2	1	2	2	2	0.126 2	0.384 6	0.363 3	0.085 56	19.459 0
3	1	3	3	3	0.133 7	0.441 3	0.405 5	0.097 42	22.955 2
4	2	1	2	3	0.110 9	0.429 4	0.400 1	0.101 2	21.753 2
5	2	2	3	1	0.101 9	0.344 7	0.332 4	0.082 09	15.953 2
6	2	3	1	2	0.131 8	0.446 0	0.397 5	0.095 31	23.256 5
7	3	1	3	2	0.115 3	0.393 1	0.395 2	0.098 58	12.530 9
8	3	2	1	3	0.116 5	0.403 6	0.398 5	0.101 3	15.400 8
9	3	3	2	1	0.112 7	0.315 1	0.346 9	0.086 81	11.773 7
毕枯枯林	K ₁	0.103 0	0.092 0	0.099 0	0.088 0				
	K ₂	0.115 0	0.1150	0.117 0	0.124 0				
	K ₃	0.115 0	0.1260	0.117 0	0.120 0				
	R	0.012 0	0.034 0	0.018 0	0.036 0				
原阿片碱	K ₁	0.329 0	0.328 0	0.337 0	0.273 0				
	K ₂	0.407 0	0.3780	0.376 0	0.408 0				
	K ₃	0.371 0	0.4010	0.393 0	0.425 0				
	R	0.078 0	0.0730	0.056 0	0.1520				
延胡索乙素	K ₁	0.3100	0.319 0	0.3190	0.280 0				
	K ₂	0.377 0	0.3650	0.370 0	0.3850				
	K ₃	0.380 0	0.3830	0.378 0	0.4010				
	R	0.070 0	0.0640	0.059 0	0.1210				
巴马汀	K ₁	0.073 0	0.079 0	0.078 0	0.069 0				
	K ₂	0.093 0	0.090 0	0.091 0	0.093 0				
	K ₃	0.096 0	0.093 0	0.09 3	0.100 0				
	R	0.023 0	0.0140 0	0.015 0	0.031 0				
浸膏得率	K ₁	17.031	14.321	15.779	12.135				
	K ₂	20.321	16.938	17.662	18.415				
	K ₃	13.235	19.328	17.146	20.036				
	R	7.086 0	5.007 0	1.883 0	7.901 0				

表4 夏天无提取工艺正交试验方差分析

考察指标	方差来源	SS	<i>f</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
浸膏得率	A	226.324	2	113.162	553.562	<0.01
	B	112.913	2	56.457	276.173	<0.01
	C	17.050	2	8.525	41.701	<0.01
	D	313.492	2	156.746	766.764	<0.01
	误差	3.680	18	0.204		
毕枯枯林	A	0.001	2	0.000	5.740	<0.05
	B	0.006	2	0.003	36.946	<0.01
	C	0.002	2	0.001	12.696	<0.01
	D	0.007	2	0.004	48.267	<0.01
	误差	0.001	18	0.000		
原阿片碱	A	0.027	2	0.014	94.177	<0.01
	B	0.025	2	0.013	86.689	<0.01
	C	0.015	2	0.008	51.942	<0.01
	D	0.124	2	0.062	425.696	<0.01
	误差	0.003	18	0.000		
延胡索乙素	A	0.028	2	0.014	94.196	<0.01
	B	0.020	2	0.010	66.361	<0.01
	C	0.018	2	0.009	61.145	<0.01
	D	0.078	2	0.039	261.942	<0.01
	误差	0.003	18	0.000		
巴马汀	A	0.003	2	0.001	164.858	<0.01
	B	0.001	2	0.001	62.019	<0.01
	C	0.001	2	0.001	74.933	<0.01
	D	0.005	2	0.002	303.150	<0.01
	误差	0.000	18	0.000		

注: $F_{0.05}(2,18) = 3.55, F_{0.05}(2,18) = 6.01$ 。

表5 夏天无最佳提取工艺验证

No.	毕枯枯林	原阿片碱	延胡索乙素	巴马汀	浸膏得率
1	0.126 5	0.475 0	0.431 0	0.107 0	22.732 8
2	0.119 2	0.494 4	0.447 6	0.111 5	23.758 9
3	0.123 0	0.481 9	0.434 1	0.107 9	23.629 1

由表3可知,A,B,C,D影响各个指标的主次关系依次为 $D > A > B > C$,即提取次数对5个指标成分影响最大,其次是醇体积分数。由表4结果可知,溶媒用量、醇体积分数、提取时间、提取次数对考察指标都有显著性影响,并且浸膏得率与4个指标成分含量呈正相关。故选定最佳工艺为 $A_2B_3C_3D_3$,即70%乙醇,11倍溶媒,每次2.5h,提取3次。

3次验证试验,结果见表5,表明正交试验所筛选的工艺稳定可行。

3 讨论

夏天无总生物碱类化合物是其药效成分,主要包括原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀、毕枯枯林等^[4]。选择夏天无总生物碱含量作为优化工艺的考察指标更有代表性。但是,总生物碱含量测定方法一般采用酸性染料比色法^[5],该法测定结果的准确性的影响因素较多,操作复杂,时间长,难以保证实验结果的可靠性。本试验参考夏天无指纹图谱色谱条件^[3],建立了

同时原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀、毕枯枯林含量测定方法,方法准确可靠,操作简单。能够较好反映夏天无中生物碱类成分的提取情况。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:982.
- [2] 盛瑞,顾振纶,蒋航,等.夏天无对小鼠学习记忆及脑内乙酰胆碱酯酶的影响[J].中草药,2003,34(6):543.
- [3] 徐发红,罗跃华,陈伟康,等.HPLC法同时测定夏天无注射液中3个有效成分的含量[J].药物分析杂志,2009,28(9):1494.
- [4] 林海,康建南,李梅连,等.夏天无总生物碱及其制备方法和应用.中国:CN100424085C[P],2008:10.
- [5] 廖静,梁文藻.酸性染料比色法测定不同产地夏天无中总生物碱的含量[J].中草药,1993,24(7):354.

[责任编辑 全燕]