

护肝拔毒浸膏提取工艺优选

谢辉*, 毛春芹, 狄留庆, 卞正
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的: 优选护肝拔毒浸膏乙醇提取工艺条件。方法: 采用正交试验设计, 以苦参碱和氧化苦参碱的含量以及浸出物得率为考察指标, 优选护肝拔毒浸膏醇提工艺条件。结果: 护肝拔毒浸膏的最佳醇提工艺条件为用饮片总量 15 倍量 60% 乙醇分 3 次回流提取, 每次 2 h。结论: 此工艺稳定可行。

[关键词] 护肝拔毒浸膏; 苦参碱; 氧化苦参碱; 正交设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0038-03

Study on Extraction Process of Haganbadu Extractum

XIE Hui*, MAO Chun-qin, DI Liu-qing, BAI Zheng

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To find out the optimal ethanol extraction process for Haganbadu extractum. **Method:** The extraction process was studied by orthogonal design with yield of the extracted content of matrine and oxymatrine and the productivity of the ethanol extraction. **Result:** The optimal extraction process was as follows: 60% alcohol, 15 times the amount of herbs, refluxing for 3 times, each time 2 hours. **Conclusion:** The extraction process is stable and convenient for applying to production.

[Key words] Haganbadu extractum; matrine; oxymatrine; orthogonal design

护肝拔毒浸膏的处方来源于江苏省名中医邹逸天长期临床实践的有效经验方, 以苦参为君药, 配伍青蒿、黄芪、土鳖虫等药味组成, 具有清热利湿、疏肝活血、益气健脾功效。多年医疗实践表明, 在肝胆经穴上敷贴护肝拔毒浸膏可较快地缓解慢性乙型肝炎患者的胁痛、乏力、食欲不振、腹胀等临床症状, 配合基础治疗可显著提高肝功能的复常率, 降低复发率。本研究采用正交试验对护肝拔毒浸膏的提取工艺条件进行优化研究。根据处方药味活性成分的性质, 结合长期临床使用情况, 采用乙醇回流提取工艺, 以乙醇体积分数与用量、提取时间、提取次数等工艺条件为考察因素, 以苦参总碱的含量以及浸出物得率为考察指标, 优选最佳提取工艺条件。

1 仪器与试药

Waters 515 型高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器; Hypersil ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(大连依利特科技有限公司), 电子天平(Mettler Toledo AG285)。

苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号 110805-200508), 氧化苦参碱对照品对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 1100780-200505), 甲醇为色谱纯, 购自山东禹王实业有限公司化学分公司, 其余所用试剂均为分析纯, 均购自上海化学试剂有限公司, 水为重蒸水(自制)。处方饮片均购自江苏省医药公司, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定符合相关要求。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表进行试验设计, 对乙醇体积分数及用量、回流次数、回流时间进行考察, 以苦参总碱(苦参碱与氧化苦参碱)含量和浸出物得率为考察指标, 优选提取工艺最佳

[收稿日期] 20101217(003)

[基金项目] 江苏省中医药局科研项目(HZ07093)

[通讯作者] * 谢辉, 副教授, 研究方向: 中药制剂研究与开发, Tel: 025-85811517, E-mail: njxh6@yahoo.com.cn

参数。因素水平设计见表1。按处方配比称取处方药材9份,每份按照 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排,加入乙醇,加热回流后将所得的滤液减压浓缩成稠膏,备用。回流2次时,每次乙醇加入量分别是总用量的60%,40%;回流3次时,每次乙醇加入量分别是总用量的40%,30%,30%。

表1 乙醇回流提取工艺因素水平

水平	A 乙醇总用量 /倍	B 乙醇体积 分数/%	C 回流次数 /次	D 回流时间 /h
1	18	70	3	2.0
2	15	60	2	1.5
3	12	50	1	1.0

2.2 考察指标的测定

2.2.1 HPLC 测定苦参碱与氧化苦参碱的含量 色谱条件:Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.02% 三乙胺(43:57),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 220 nm,柱温 40 ℃。

对照品溶液制备:精密称取苦参碱、氧化苦参碱对照品适量,分别用甲醇溶解并稀释、定容,制成每 1 mL 含苦参碱 0.200 8 mg 和氧化苦参碱 1.047 mg 的对照品储备液。将对照品储备液用适量甲醇稀释,分别制成不同浓度的苦参碱对照品溶液(每 1 mL 含苦参碱 140.56, 20.08 μg)和氧化苦参碱对照品溶液(每 1 mL 含氧化苦参碱 104.7 μg 和 26.175 μg)

供试品溶液的制备:取约相当于 0.5 g 苦参饮片的醇提浸膏,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 0.2% 盐酸溶液 40 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 0.2% 盐酸溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 10 mL,用浓氨水调 pH 9~10,再用三氯甲烷提取 4 次,每次 10 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇溶解,定容至 10 mL,即得。

正交样品中苦参总碱的含量测定:分别精密吸取各浓度的苦参碱及氧化苦参碱对照品溶液和各供试品溶液各 15 μL,注入液相色谱仪,测定,每个样品平行进样 2 次,以外标两点法计算各样品中的苦参碱和氧化苦参碱的含量,加合为苦参总碱含量。结果见表 2。

2.2.2 浸出物得率测定 精密称取各实验号样品稠膏 1 g,置于已干燥恒重的蒸发皿中,于 105 ℃烘

箱中干燥 3 h,取出置干燥器内冷却 30 min,迅速精密称重,计算浸出物得率。结果见表 2。

表2 乙醇提取工艺正交试验

No.	A	B	C	D	苦参总碱 含量/mg	浸出物得 率/%
1	1	1	1	1	112.55	11.27
2	1	2	2	2	78.92	16.20
3	1	3	3	3	42.80	12.52
4	2	1	2	3	60.56	10.57
5	2	2	3	1	91.72	15.35
6	2	3	1	2	89.67	16.22
7	3	1	3	2	46.59	15.30
8	3	2	1	3	62.37	17.24
9	3	3	2	1	111.77	14.72
苦参总碱						
I_j	234.26	219.70	264.59	316.05	CT=53 969.85	
II_j	241.96	233.00	251.25	215.18		
III_j	220.72	244.24	181.11	165.72		
SS_j	77.03	100.64	1 340.80	3 913.16		
浸出物						
I_j	39.99	37.14	44.73	41.34	CT=1 860.13	
II_j	42.15	48.79	41.49	47.72		
III_j	47.25	43.45	43.17	40.33		
SS_j	9.28	22.66	1.75	10.69		

2.3 正交试验结果的方差分析 方差分析结果见表 3,4。结果表明,回流时间对苦参总碱的含量有显著影响($P < 0.05$)。综合苦参总碱含量、浸出物得率的方差分析结果,经直观比较分析,最终确定最优工艺条件为 $A_2B_2C_1D_1$ 。即用饮片总量 15 倍量 60% 乙醇分 3 次回流提取,每次 2 h。

表3 苦参总碱含量方差分析($\bar{x} \pm s, n=12$)

误差来源	SS	f	MS	F	P
D	3 913.16	2	1 956.58	50.80	<0.05
C	1 340.80	2	670.40	17.41	
B	100.64	2	50.32	1.31	
A(误差)	77.03	2	38.51		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$ (表4同)。

2.4 最佳醇提工艺验证 按处方配比称取药材 3 份,以上述最佳醇提工艺条件回流提取,合并 3 次提取液,过滤,减压回收乙醇,取样测定浸膏中苦参总碱的含量及浸出物得率。色谱条件和供试品溶液的

表 4 浸出物得率方差分析

误差来源	SS	f	MS	F	P
B	22.66	2	11.33	12.96	
D	10.69	2	5.35	6.11	
A	9.28	2	4.64	5.31	
C(误差)	1.75	2	0.87		

制备方法与醇提正交样品相同。结果见表 5。结果表明该工艺稳定、可行。

表 5 最佳醇提工艺验证

No.	苦参总碱/mg	浸出物/%
1	112.65	17.09
2	112.46	17.58
3	111.02	17.60

3 讨论

处方中苦参为君药,其活性成分为生物碱类,其中所含苦参碱、氧化苦参碱具有抗肝纤维化、保肝、抗菌、抗肿瘤、促进肝功能恢复和抑制乙型肝炎病毒复制等多种药理作用。在研究过程中发现苦参碱与氧化苦参碱之间存在相互转化的现象,文献也有相关报道^[1-3],因此本文以两者的总含量为考察指标优化醇提工艺条件。

目前苦参碱类生物碱的含量测定方法有薄层扫描法、高效液相色谱法、气相色谱质谱联用法等,本文采用 HPLC 测定具有准确、简便、快速等优势。选择流动相时,参考文献[4-6]的条件进行预试,结合本复方制剂的分离效果,以甲醇-水为基础,加入一

定比例的硅醇基抑制剂三乙胺来改善峰形,结果以甲醇-0.02%三乙胺(43:57)为流动相分离效果较好,既简化了流动相,同时又避免了使用无机酸盐对泵和色谱柱的伤害。

测定正交样品中苦参碱与氧化苦参碱的含量,结果表明随着乙醇体积分数的降低,浸膏中氧化苦参碱的含量增加,而苦参碱的含量则减少,这一现象与苦参碱、氧化苦参碱的极性差异相吻合。综合苦参总碱含量、浸出物得率的方差分析结果,最终确定了最优提取工艺条件。

[参考文献]

- [1] 陆蕴如,杨钟柯,董育妹.苦参在复方中化学成分变化的研究[J].中国中药杂志,1996,21(7):412.
- [2] 江海燕,陈勇,张辉.苦参不同炮制品中苦参碱和氧化苦参碱含量测定[J].中成药,2001,23(3):185.
- [3] 潘广洲,李峰,李键.苦参碱和氧化苦参碱的转化对苦参提取工艺的影响[J].现代中药研究与实践,2008,22(2):52.
- [4] 田娟,王智民,王维皓.HPLC测定苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(2):23.
- [5] 袁祥慧,李绪伦.高效液相色谱法同时测定山豆根中苦参碱和氧化苦参碱含量[J].中国药业,2008,17(14):31.
- [6] 许乾丽,茅向军,鲍家科.HPLC法测定复方栀子喷雾剂中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J].中国药事,2009,23(3):281.

[责任编辑 全燕]