

正交试验优选降糖胶囊中黄连提取方法

韩立炜, 任天池(北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

摘要: 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 以小檗碱的含量为指标, 优选降糖胶囊中黄连的提取方法。用 HPLC 法测定小檗碱的含量, 流动相为磷酸二氢钾-硫代硫酸钠-水-乙腈 (3.4g: 1.7g: 140ml: 60ml)。结果表明: 最佳提取条件为 80% 乙醇回流 3 次, 第 1 次 6 倍量回流 2h, 第 2 次 5 倍量回流 1.5h, 第 3 次 4 倍量回流 1.5h。

关键词: 降糖胶囊; 黄连; 小檗碱; 正交设计

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2000)01-0012-03

Studies on the Extraction Process of Rhizoma Coptidis in Jiangtang Capsule by Orthogonal Design Method

HAN Li-wei, REN Tian-chi

(Faculty of Chinese Pharmacy, Beijing University of TCM, Beijing 100029)

Abstract: By determining berberine with HPLC method, the optimum extraction conditions of rhizoma coptidis in Jiangtang capsule were established. The mobile phase of HPLC was $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-H}_2\text{O-CH}_3\text{CN}$ (3.4g: 1.7g: 140ml: 60ml). The best extraction process was as follows: reflux with 80% alcohol for three times, for the first time: 6 times alcohol of crude drug for 2hr; the second: 5times for 1.5hr and the last: 4 times for 1.5hr.

Key words: Jiangtang capsule; rhizoma coptidis; Berberine; orthogonal design method

降糖胶囊是由黄连、大黄等药味组成的复方制剂, 临床应用具有较好的降糖功效。因方中黄连与大黄并用, 故对黄连采用单独提取的方法, 曾有研究表明, 不同方法提取小檗碱, 按其得率多少, 评价其优劣为: 乙醇提取优于酸水或碱水提取法^[1]。我们即采用乙醇回流提取的方法, 用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 并用 HPLC 法测定黄连中小檗碱的含量, 确定黄连的最佳提取工艺。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪系列(日本); 真空干燥箱(浙江黄岩医疗设备厂); CX-100-A 超声清洗器(北京医疗设备二厂); 黄连为毛茛科植物黄连(*Coptis Chinensis* Franch.) 的干燥根茎(购自北京市药材公司); 盐酸小檗碱(批号为 0713-9605, 购自中国药品生物制品检定所); 乙腈为色谱纯; 注射用水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 黄连提取工艺的优选

2.1.1 因素及其水平 根据小檗碱的化学性质, 采用乙醇回流的提取方法。考虑到提取过程中可能的影响因素, 选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表, 以小檗碱含量为指标, 考察醇浓度、醇用量及回流提取时间对其影响。因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

因素	A	B	C
水平	乙醇浓度(%)	乙醇用量(倍)	提取时间(h)
1	60	9(4, 3, 2)	3(1, 1, 1)
2	80	15(6, 5, 4)	5(2, 1.5, 1.5)
3	90	18(7, 6, 5)	6(2, 2, 2)

2.1.2 小檗碱的含量测定 高效液相色谱条件: 固定相为 YWG-C₁₈ 柱 (3.9mm × 150mm, 粒径 10 μ m), 流动相为磷酸二氢钾-硫代硫酸钠-水-乙腈 (3.4g: 1.7g: 140ml:

60ml), 检测波长为 345nm, 纸速为 0.25cm/min, 流速为 1.0ml/min, 灵敏度为 0.05AUFS。

线性关系考察: 精密称取盐酸小檗碱对照品 2.04mg, 用甲醇定容于 10ml 容量瓶中, 精密吸取 1ml, 用甲醇定容于 10ml 容量瓶中, 即得对照品溶液, 精密吸取此对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 μ l 进样, 记录峰面积, 得回归方程为 $Y = -1317 + 1609510x$ (Y 为峰面积, x 为盐酸小檗碱的量), 线性相关系数 $r = 0.9999$ 。说明盐酸小檗碱含量在 0.0408~0.2856 μ g 范围内与峰面积积分值呈线性关系, 且可以用外标一点法计算含量。

供试品溶液的制备: 合并由正交试验提取所得的 3 次提取液, 回收乙醇, 真空干燥, 得干浸膏。精密称取

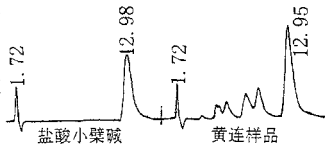


图 1 HPLC 色谱图

干浸膏 0.2g, 用甲醇加 30ml 超声提取 30min, 过滤, 滤液用甲醇定容至 50ml, 精密吸取 5ml, 过 Al_2O_3 柱(5g 中性 Al_2O_3 湿法装柱, 乙醇预洗 30ml), 甲醇洗至无黄色, 甲醇液收集在 50ml 容量瓶中, 并用甲醇定容至刻度, 精密吸取 1ml, 用甲醇定容至 2ml 容量瓶中, 即得供试品溶液。

样品含量测定: 精密吸取 5 μ l 供试品溶液, 进样, 记录峰面积, 代入线性方程, 求出小檗碱的含量, 计算每份样品中小檗碱的百分含量, 作为考察指标。结果见表 2。HPLC 图见图 1。

2.1.3 提取条件的优选 优选方法^[21]与结果见表 2。方差分析结果见表 3。可以看出, 各因素对小檗碱的提取量均有极显著影响。影响因素 $A > C > B$, 且以 $A_2C_2B_2$ 为佳。即乙醇回流提取黄连中小檗碱的最佳条件为 80% 乙醇回流提取 3 次, 第 1 次加乙醇 6 倍提取 2h, 第 2 次加 5 倍提取 1.5h, 第 3 次加 4 倍提取 1.5h。

验证试验: 按已确定的最佳工艺提取, 测定小檗碱的含量为 5.30%, 高于正交试验表

中各号试验的含量, 故此条件为最佳提取条件。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

试验号	A	B	C	D	试验结果 小檗碱含量(%)
1	1	1	1	1	4.06
2	1	2	2	2	4.97
3	1	3	3	3	4.38
4	2	1	2	3	5.04
5	2	2	3	1	5.03
6	2	3	1	2	4.82
7	3	1	3	2	3.93
8	3	2	1	3	4.51
9	3	3	2	1	4.78
I	13.41	13.03	13.39	13.87	
II	14.89	14.51	14.79	13.72	
III	13.22	13.98	13.34	13.93	
R	0.56	0.49	0.48	0.07	

表 3 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F
A	0.5529	2	0.2764	162.61
B	0.3705	2	0.1853	108.97
C	0.4473	2	0.2237	131.56
D(误差)	0.0034	2	0.0017	

注: $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

2.2 黄连中小檗碱提净率考察

2.2.1 提净试验 按常规方法, 先用 0.5% 硫酸水溶液浸泡黄连 24h, 共用 20 倍 0.5% 硫酸水溶液提取 3 次共 5h, 合并 3 次水煎液, 加氯化钠至饱和, 用盐酸调 pH 至 2, 药液放置 12h 后, 离心, 沉淀在 60 $^{\circ}$ C 温度下烘干。精密称取 0.2g, 用“供试品溶液制备方法”处理, 定容于 50ml 容量瓶中, 精密吸取 2ml, 用甲醇定容于 10ml 容量瓶中。精密吸取 5 μ l 进样, 测定峰面积, 用重新制备的标准曲线方程 $Y = -1302.250 + 1130263.021x$ ($r = 0.9999$) 计算含量为 5.98%。

2.2.2 最佳提取工艺的小檗碱提净率

小檗碱提净率 = $5.30 / 5.98 \times 100\% = 87\%$ 。

3 讨论

3.1 本试验中 HPLC 法的流动相采用了日本药典^[3]中的组成, 配比则是由实验中摸索而得。采用本文中的流动相, 可以使小檗碱与其它成分达到基线分离, 峰形及保留时间均较合适, 可供小檗属植物中小檗碱含量的测定者参考。

3.2 提净试验中采用的方法是分离净化小檗碱的常规方法。虽然小檗碱的提得率较高, 但一则费时费工, 步骤繁琐; 二则该方法只用于小檗碱的提净, 而忽略了其他生物碱的提取, 这在中药研究中, 不利于含小檗碱成分中药药效的整体发挥。

3.3 本文由正交试验确定的最佳提取工艺所得小檗碱的提净率较高, 可以用于实际生产。

参考文献:

- [1] 武可泗, 王宏涛, 王立伦. 黄柏提制盐酸小檗碱的工艺研究[J]. 陕西中医学院学报, 1994, 17(3): 41
- [2] 金丕焕. 医学统计方法[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993. 91
- [3] 吴树春. 日本药典(第12版)中收载天然药物的高效液相色谱法分析[J]. 西北药学杂志, 1992, 7(3): 27

(收稿日期: 1999-08-02)