

粉防己中汉防己甲素和乙素提取条件的优化

张家口医学院基础部 (075000) 甄攀*

清华大学分析中心

陈培榕 王鹤泉

摘要 利用正交试验方法,研究了影响粉防己中汉防己甲、乙素的提取效率的各种因素,得到的最佳提取条件为:用含33.3%氨水的无水乙醇溶液浸泡8h,超声震荡提取4h。在此条件下测得的汉防己甲素的含量为0.678%,乙素的含量为0.616%。汉防己甲、乙素的含量用高效液相色谱(HPLC)检测,最低检出限分别为 3.87×10^{-8} 和 2.48×10^{-8} mmol/L。

关键词 粉防己 汉防己甲素 汉防己乙素 正交试验 高效液相色谱

汉防己是防己科千金藤属植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥块根,有效成分为汉防己碱,其中主要为汉防己甲素(tetrandrine)和汉防己乙素(demethyltetrandrine)^[1]。汉防己碱具有镇痛、消炎、降压、抗菌、抗肿瘤、松弛横纹肌等作用^[2],近来研究发现汉防己碱具有抗心率失常作用^[3]。汉防己碱的含量是粉防己药材质量的重要指标之一,有关研究汉防己碱的测试工作曾有报道^[4~6],但没有看到有关研究汉防己碱提取条件的报道。我们在已建立的色谱分析方法的基础上,利用正交试验,以汉防己甲、乙素的百分含量为指标,进行了提取条件的优化,为提取汉防己甲、乙素提供了科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂: 高效液相色谱仪:岛津LC-10A,SPD-10VA紫外检测器;超声震荡器;1BRANSON B-52。

汉防己甲素:由中国药品生物制品检定所提供;汉防己乙素:由北京医科大学植物化学教研室提供;粉防己:由北京市海淀药店提供。

所用试剂均为分析纯,水为重蒸去离子水。

1.2 色谱分析

分离条件:采用正相色谱体系对汉防己甲、乙素进行分离与检测,色谱柱为 $\phi 4.6$ mm \times 15cm Micropark si-5硅胶柱,流动相为:三氯甲烷-无水甲醇-氨水(30:68.9:

1.1),检测波长为228nm,柱温30 $^{\circ}$ C,流速0.3ml/min,六通阀进样,进样量6 μ l。分离谱图见图1。图2为汉防己甲、乙素标准对照品的色谱图。用保留时间定性, $t_R = 6.118$ min的峰为汉防己甲素峰, $t_R = 7.122$ min的峰为汉防己乙素峰。

1.3 工作曲线方程: 准确称取一定量的汉防己甲、乙素标准对照品,分别用无水乙醇溶解,配成一系列不同浓度的标准溶液,进样分析,用峰面积对浓度作图,得到汉防己甲、乙

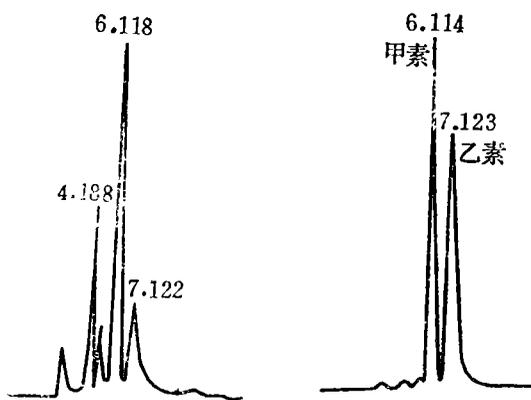


图1 粉防己色谱图 图2 汉防己甲、乙素色谱图

*Address: Zhen Pan, Zhangjiakou Medical College, Zhangjiakou

素的工作曲线。见表1。

市售粉防己干燥后粉碎,称取3.00g粉末,按以下各种方法处理,进样分析,利用上述汉防己甲、乙素工作曲线即可求出它们的百分含量。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的比较:根据汉防己甲、乙素的化学性质以及有关文献的报道,研究了儿种常见易得的溶剂如水、三氯甲烷、无水乙醇以及含有氨水的无水乙醇对汉防己甲、乙素提取效率的影响。结果见表2。

表1 汉防己甲、乙素的工作曲线

汉防己	进样次数	线性范围 (mmol/L)	工作曲线	相关系数
甲素	5	0.01~0.1	$y = 8.961x + 0.4565$	0.9988
乙素	5	0.01~0.1	$y = 8.406x + 0.5928$	0.9986

注: y 为峰面积 ($\times 10^5 \mu\text{V}\cdot\text{s}$), x 为浓度 (mmol/L)。

2.2 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交设计选择提取条件:在上述研究的基础上,我们认为提取溶剂中氨水浓度是主要影响因素,其次还有浸泡时间以及超声振荡提取时间。采用 $L_8(4 \times 2^4)$ [7] 正交设计安排试验,提取溶剂中氨水浓度安排 4 个水平,浸泡时间和超声振荡提取时间均安排 2 个水平,以汉防己甲、乙素的百分含量为指标。考查因素水平列于表 3,正交试验结果见表 4。

表3 考查因素水平

考查因素	A	B	C
	提取溶剂中氨水浓度(%)	浸泡时间(h)	超声振荡提取时间(h)
考查水平	1 7.7	5.0	2.5
	2 14.3	8.0	4.0
	3 25.0		
	4 33.3		

表2 提取溶剂的比较

序号	提取溶剂	提取时间(h)	汉防己甲素 (%)	汉防己乙素 (%)
1	水	4	0.076	0.032
2	三氯甲烷	4	0.210	0.135
3	无水乙醇	4	0.240	0.136
4	14.3%氨水的无水乙醇	4	0.675	0.510

从表2中看出,14.3%氨水的无水乙醇溶液的提取效率明显优于其他3种,因此选择含有氨水的无水乙醇溶液作为提取溶剂,作进一步的研究。

表4 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交试验

序号	A	B	C	汉防己甲素 (%)	汉防己乙素 (%)	
1	1	1	1	0.240	0.136	
2	1	2	2	0.437	0.365	
3	2	1	1	0.570	0.225	
4	2	2	2	0.675	0.510	
5	3	1	2	0.678	0.525	
6	3	2	1	0.602	0.369	
7	4	1	2	0.677	0.616	
8	4	2	1	0.607	0.485	
	T_1	0.677	2.165	2.019	Σ	Σ
甲	T_2	1.245	2.321	2.467	4.486	3.231
	T_3	1.280				
素	T_4	1.284				
	Q	0.132	0.004	0.026	$Q_T = 0.163$	$Q_E = 0.001$
	T_1	0.501	1.502	1.215		
乙	T_2	0.735	1.729	2.016		
	T_3	0.894				
素	T_4	1.101				
	Q ₁	0.096	0.006	0.080	$Q_T = 0.184$	$Q_E = 0.0019$

从正交试验表上T值看出:对于甲素,最优条件为 $A_4B_2C_2$ 或 $A_3B_2C_2$,对于乙素,最优条件为 $A_4B_2C_2$,因此我们选择提取汉防己甲、乙素的最佳条件为 $A_4B_2C_2$,即提取溶剂中氨水浓度为33.3%,无水乙醇为67.7%,浸泡时间为8h,超声振荡提取时间为4h。

2.3 方差分析:对以上正交试验结果进行方差分析,分析结果见表5。

方差分析结果:对于汉防己甲素和乙素提取溶剂中氨水浓度、超声振荡提取时间的影响

均高度显著, 浸泡时间在本文所取的范围内对两者的影响均不显著。

2.4 结论: 通过正交试验, 找到了提取汉防己甲、乙素的最佳条件。在此条件下测得汉防己甲素的百分含量达到最大值为0.678%, 汉防己乙素的百分含量达到最大值为0.61%, 提高了汉防己碱的提取效率, 提取液组份简单、稳定, 提取条件和色谱条件有良好的兼容关系。

表5 方差分析

汉防己	方差来源	变差平方和	自由度	方差估计值	F值	F _{0.05} (f ₁ , f ₂)	显著性
甲	氨水浓度	0.132	3	0.044	88	19.16	显著
	浸泡时间	0.004	1	0.004	8	18.51	不显著
	提取时间	0.026	1	0.026	52	18.51	显著
	试验误差	0.001	2	0.0005			
	总和	0.163	7				
乙	氨水浓度	0.096	3	0.032	40.14	19.16	显著
	浸泡时间	0.006	1	0.006	7.5	18.51	不显著
	提取时间	0.080	1	0.080	100	18.51	显著
	试验误差	0.0019	2	0.0008			
	总和	0.184	7				

参 考 文 献

- 1 北京中医学院主编. 中药化学. 上海: 上海人民出版社, 1976. 83
- 2 江苏新医学院主编. 中药大辞典. 上海: 上海人民出版社, 1977. 981
- 3 姜建石, 等. 中国药理学报, 1988, 9(5): 412
- 4 杨义方. 中草药, 1985, 16(6): 41
- 5 陈浩松, 等. 中国中药杂志, 1993, 18(4): 412
- 6 Zhang T Y, et al. J Liq Chromatogra, 1988, 11(8): 1661.
- 7 邓勃编著. 数理统计在分析化学中的应用. 北京: 化学工业出版社, 1984. 306

(1993-12-25收稿)

(上接第572页)

表1 麻黄碱、士的宁含量测定结果 (n=4)

提取方法	样品	测定成分	含量(%)	RSD(%)
回流	麻黄	麻黄碱	0.64	2.4
	马钱子	士的宁	0.97	3.6
	九分散	麻黄碱	0.10	2.1
		士的宁	0.02	0.4
振荡	麻黄	麻黄碱	0.67	0.3
	马钱子	士的宁	0.99	0.8
	九分散	麻黄碱	0.09	2.3
		士的宁	0.02	3.0

表2 回收率测定结果 (n=4)

提取方法	样品	测定成分	标准品添加量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
回流	麻黄	麻黄碱	2.00	1.77	88.50	3.1
	马钱子	士的宁	2.00	1.89	94.50	2.1
	九分散	麻黄碱	2.10	1.88	89.52	0.4
		士的宁	1.95	1.91	97.95	1.7
振荡	麻黄	麻黄碱	2.00	1.81	90.50	3.3
	马钱子	士的宁	2.00	1.91	95.50	1.4
	九分散	麻黄碱	2.00	1.82	91.00	0.9
		士的宁	1.95	1.82	93.33	2.5

3 小结与讨论

实验结果表明, 用HPLC法经1次测定即可对九分散中的麻黄碱和士的宁进行满意的定量, 从而为九分散的质量控制及检测提供了更为简便可靠的方法。

样品测定及回收率测定结果表明用两种方法提取所测含量相近, 但振荡法操作简便, 被认为是一个更加实用的方法。

(1993-12-30收稿)

On the Optimization of Extraction Conditions of Tetrandrine and Demethyltetrandrine from Fourstamen *Stephania* (*Stephania tetrandra*)

Zhen Pan, Chen Peirong, et al

Several factors influencing the extraction of tetrandrine and demethyltetrandrine from Chinese medicinal herbs, *Stephania tetrandra* S. Moore were studied by means of Orthogonal method. The optimum Condition was eight hours steeping, in 33.3% ammonia in absolute alcohol for four hours under ultrasonic agitation. Tetrandrine and demethyltetrandrine were detected by HPLC. The contents were 0.678% and 0.616%, the detection limits were 3.87×10^{-3} and 0.48×10^{-3} mmol/L respectively.

(Original article on page 575)

The Hormone Ingredient in the Egg-Oil of Chinese Woodfrog (*Rana temporaria chensinensis*) and the effect of Egg-Oil

on Platelet Aggregation and blood Lipid

Li Chengyi, Chen Guangrong, Sun Wenwei

Hormone ingredient in the egg-oil, egg and Oviductus Ranae of *Rana temporaria chensinensis* is David were studied as well as the effect of egg-oil on platelet aggregation and blood lipid. Results proved that the estradiol content in the egg-oil is very high. The egg-oil can obviously inhibit blood platelet aggregation and showed an hypolipemia activity. It is expected that the egg-oil of *R. temporaria chensinensis* can be developed as an efficient medicine for the prevention and cure of atherosclerosis and hyperlipemia in elderly.

(Original article on page 584)

Protective Effects of Polysaccharide of Membranous Milkvetch (*Astragalus membranaceus*) on Acute Myocardially Infarcted Heart in Dog and Its Mechanism of Action

Lu Wenwei, Lei Chunli, Chen Yu, et al

Seventeen physiological, biochemical and morphological indexes consistently showed that *Astragalus* polysaccharide was able to enhance the myocardia contractility, attenuate the area of myocardial infarction, and reduce the degree of myocardial damage of myocardially infarcted dog heart in vivo. The mechanism might be related to the inhibition of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ activity & the anti-free-radical-damage action.

(Original article on page 586)