

延胡索提取工艺的优化及化学成分与药效指标相关性分析

邹 薇¹, 张 鹤², 包永睿¹, 孟宪生^{1*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 辽阳市食品药品检验所, 辽宁 辽阳 111000

摘要: 目的 针对延胡索抑制肝癌细胞的作用, 结合正交设计法, 优选延胡索中延胡索乙素、原阿片碱的提取工艺条件, 并对 2 种生物碱与药效学指标的相关性进行分析。方法 采用正交设计法, 以延胡索乙素提取率、原阿片碱提取率、SMMC-7721 细胞抑制率和出膏率为评价指标, 对延胡索中 2 种生物碱的提取工艺条件进行优选; 应用 SPSS 13.0 统计软件进行 Pearson 相关系数分析。结果 最佳提取工艺为 6 倍量 70%乙醇回流提取 2 h, 延胡索中 2 种生物碱的提取率最高, 对肝癌细胞的抑制率最高。结论 该方法快速、操作简便, 可以为确定延胡索中 2 种生物碱定量测定方法提供实验依据。

关键词: 延胡索; 延胡索乙素; 原阿片碱; 药效学指标相关性分析; 正交设计

中图分类号: R284.2; R285.51 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0694-05

Optimization of extraction process for *Corydalis Rhizoma* and correlation analysis on its chemical constituents and pharmacodynamic index

ZOU Wei¹, ZHANG He², BAO Yong-rui¹, MENG Xian-sheng¹

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Liaoyang Institute for Food and Drug Control, Liaoyang 111000, China

Abstract: Objective To evaluate the inhibitory effect of *Corydalis Rhizoma* on hepatoma carcinoma cell, the extraction process of two alkaloids in *Corydalis Rhizoma* was optimized with orthogonal design and the coefficient correlation for the two alkaloids and pharmacodynamic index was analyzed. **Methods** The extraction process of the two alkaloids was optimized using orthogonal design with four indexes which included the extraction rates of tetrahydropalmatine and biflorine, MTT inhibitory ratio of SMMC-7721 cell, and the rate of extractum extracted. Pearson correlations were used for analysis on coefficient correlation with SPSS 13.0 software. **Results** The optimal conditions were to reflux extraction with 70% alcohol as much as six times of the medicine amount for once in 2 h. The highest contents for both tetrahydropalmatine and biflorine and the highest inhibitory rate of SMMC-7721 cell were demonstrated. **Conclusion** The rapid and simple method could provide the experimental support for the quantitative determination of two alkaloids in *Corydalis Rhizoma*.

Key words: *Corydalis Rhizoma*; tetrahydropalmatine; biflorine; correlation analysis on pharmacodynamic index; orthogonal design

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。其味辛、苦, 温, 归肝、脾经, 具有活血、利气、止痛之功效, 用于胸胁、脘腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻、跌扑肿痛等^[1]。延胡索生物碱大多具有生理活性, 可扩张冠状动脉, 具有一定的中枢镇静作用, 还有研究表明延胡索中生物碱对肝癌细胞、胃癌细胞、鼻咽癌细胞均具有抑制作用^[2-4]。因此有必要建立一种简单可行、稳定

性高的提取延胡索中生物碱的方法, 为进一步研究其活性成分的构效关系及开发抗癌活性药物提供理论依据。

本实验以乙醇溶液为提取溶剂, 考察乙醇体积分数、回流提取时间、提取次数和乙醇用量 4 个影响因素, 用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 以延胡索乙素提取率、原阿片碱提取率、出膏率及对肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制率为指标, 优选最佳提取工艺。

收稿日期: 2011-09-02

基金项目: “十一五”重大新药创制科技重大专项“组分中药配伍研究技术子平台”(2010ZX09401-304-105C)

作者简介: 邹 薇 (1986—), 女, 辽宁中医药大学硕士, 主要研究方向为药物分析。Tel: (0411)87406496 E-mail: jiayouzouwei@126.com

*通讯作者 孟宪生 Tel: (0411)87406496 E-mail: mxsvvv@126.com

1 仪器与材料

HSS 型电子恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); RE—52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHZ—DIII 型循环水式真空泵: 巩义市予华仪器有限责任公司; Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(配有 DAD、自动进样器)、Chem Station 工作站(Agilent 科技有限公司); CK40 型倒置显微镜(日本 Olympus); HS6150 型超声波清洗器(天津恒奥科技发展有限公司); CP225D 电子分析天平(德国 Sartorius, 十万分之一); NuAire™ US AutoFlow 型 CO₂ 培养箱(德国 NuAire 公司); Sunrise 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

四甲基噻唑蓝(MTT, 美国 Gibco 公司); 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司); RPMI 1640 培养基(批号 1120708)、DMEM 培养基(批号 1181947)均为美国 Gibco 公司产品; 二甲基亚砜(DMSO, 广州科密集团有限公司); 肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中国科学院上海生命科学研究院资源中心。

延胡索药材由辽宁省本溪三药有限公司提供, 经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎; 原阿片碱(批号 110853-200402)、

延胡索乙素(批号 110726-201011)均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇(色谱纯, 购于天津市科密欧化学试剂开发中心); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取延胡索乙素对照品适量, 加甲醇制成 0.104 mg/mL 延胡索乙素对照品储备液。精密称取原阿片碱对照品适量, 加甲醇制成 0.094 mg/mL 原阿片碱对照品储备液。分别将储备液稀释 10 倍作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取延胡索药材粉末(过 3 号筛), 精密称定, 加适量乙醇溶液, 在一定温度下提取若干时间, 滤过, 滤液减压浓缩, 定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。所得样品溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后作为供试品溶液, 备用。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-磷酸盐溶液(64:36; 磷酸盐溶液配比为磷酸二氢钾 0.1 g、磷酸氢二钾 4.8 g, 加水溶解并稀释至 500 mL); 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 283 nm。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 色谱图见图 1。

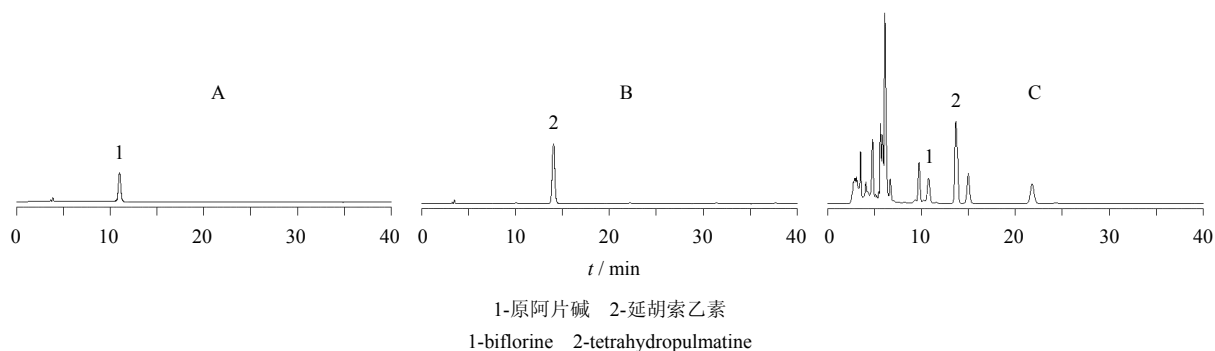


图 1 原阿片碱对照品 (A)、延胡索乙素对照品 (B) 和 延胡索提取物 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of biflorine reference substance (A), tetrahydropulmatine reference substance (B), and *Corydalis Rhizoma* extract (C)

2.3 线性关系考察

分别吸取延胡索乙素和原阿片碱对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀后按上述色谱条件分别进样测定。分别以延胡索乙素、原阿片碱的峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程分别为: 延胡索乙素 $Y=77.079X+83.221$, $r=0.9996$;

原阿片碱 $Y=47.62X-1.74$, $r=0.9998$; 表明延胡索乙素在 0.020 8~0.104 0 mg, 原阿片碱在 0.018 8~0.094 0 mg 呈良好的线性关系。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 分别吸取延胡索乙素、原阿片碱对照品溶液, 按上述色谱条件分别进样测定, 连续进样 6 次, 延胡索乙素和原阿片碱峰面积的 RSD

分别为 2.1%、1.8%。

2.4.2 稳定性试验 取正交 5 号样品制备供试品溶液, 在 0、2、4、8、10、24 h 进样分析, 延胡索乙素和原阿片碱峰面积的 RSD 分别为 0.9%、1.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取正交 5 号样品平行制备供试品溶液 5 份, 进样分析, 延胡索乙素和原阿片碱质量分数的 RSD 分别为 1.3%、1.7%。

2.4.4 加样回收率试验 采用加入回收法, 在已测定的正交 5 号延胡索醇提液中加入一定量的延胡索乙素和原阿片碱对照品, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 计算, 延胡索乙素的平均回收率在 95.5%~104.0% (RSD 为 2.1%), 原阿片碱的平均回收率在 92.1%~103.0% (RSD 为 2.7%)。

2.5 样品测定

取延胡索药材 3 份, 每份 5 g, 精确称定, 按最佳提取工艺制备, 测定, 计算延胡索中延胡索乙素和原阿片碱的量, 结果药材中延胡索乙素和原阿片碱分别为 1.340、0.771 mg/g ($n=3$)。

2.6 MTT 法测定对 SMMC-7721 细胞生长的抑制率

2.6.1 细胞培养 将 SMMC-7721 细胞培养于含 10% FBS、3% 谷氨酰胺、卡那霉素 750 g/mL 的 RPMI 1640 培养液中, 置 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养, 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

2.6.2 抑制率的测定 消化细胞, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 200 μL RPMI 1640 培养液 (细胞密

度 5 000 个/mL), 置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 弃去旧培养液。实验组除加入新的培养液 (200 μL/孔) 外, 还加入除菌后的供试品溶液 (10 μL/孔), 对照孔只加入 200 μL/孔新的培养液。每组 4 个平行孔, 置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 4 d 后, 弃去上清液, 加入 200 μL/孔新鲜配制的含 0.2 mg/mL MTT 的无血清培养液, 37 ℃继续培养 4 h。4 h 后弃上清液, 加入 DMSO 200 μL/孔, 振荡混匀后, 用酶标仪 (波长为 570 nm, 参比波长为 450 nm) 测定吸光度 (A) 值, 按下式计算各提取物对肿瘤细胞 SMMC-7721 生长的抑制率^[9-11]。

肿瘤细胞生长抑制率 = $1 - \text{实验组平均 } A \text{ 值} / \text{对照组平均 } A \text{ 值}$

2.7 正交试验优选延胡索提取工艺

选用 L₉(3⁴) 因素水平表, 结合成分性质及生产实际选择乙醇用量 (A)、乙醇体积分数 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 为考察因素, 以延胡索乙素和原阿片的提取率、SMMC-7721 细胞抑制率、出膏率及其综合评分 [综合评分 = (延胡索乙素提取率/最大延胡索乙素提取率) × 0.3 + (原阿片碱提取率/最大原阿片碱提取率) × 0.3 + (抑制率/最大抑制率) × 0.3 + (出膏率/最大出膏率) × 0.1] 为考察指标, 进行提取工艺优化, 试验设计及结果见表 1^[5-8]。等量称取 9 份延胡索样品各 100 g, 分别按 L₉(3⁴) 正交表中的工艺组合进行回流提取, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩, 定容至 100 mL 量瓶中,

表 1 L₉(3⁴) 正交试验设计及结果

Table 1 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A / 倍	B / %	C / h	D / 次	提取率 / (mg·g ⁻¹)		抑制率 / %	出膏率 / %	综合评分
					延胡索乙素	原阿片碱			
1	6 (1)	60 (1)	1.0 (1)	1 (1)	1.258	0.592	60.17	11.09	0.859 1
2	6 (1)	70 (2)	1.5 (2)	2 (2)	1.330	0.674	77.76	10.41	0.974 8
3	6 (1)	80 (3)	2.0 (3)	3 (3)	1.314	0.615	67.89	9.16	0.897 9
4	8 (2)	60 (1)	1.5 (2)	3 (3)	0.709	0.302	31.88	13.91	0.517 3
5	8 (2)	70 (2)	2.0 (3)	1 (1)	1.226	0.517	59.18	9.73	0.804 9
6	8 (2)	80 (3)	1.0 (1)	2 (2)	0.878	0.348	37.74	8.94	0.562 8
7	10 (3)	60 (1)	2.0 (3)	2 (2)	1.154	0.496	50.16	13.49	0.771 5
8	10 (3)	70 (2)	1.0 (1)	3 (3)	1.261	0.541	67.58	12.28	0.874 2
9	10 (3)	80 (3)	1.5 (2)	1 (1)	1.159	0.509	56.34	7.91	0.762 2
K ₁	2.732	2.148	2.269	2.426					
K ₂	1.885	2.654	2.254	2.309					
K ₃	2.408	2.222	2.474	2.289					
R	0.847	0.506	0.220	0.137					

摇匀, 备用。精密吸取 25 mL, 置恒定质量的玻璃表面皿中, 水浴蒸干, 105 ℃ 烘至恒定质量, 精密称定, 计算出膏率。取备用样品溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后作为供试品溶液, 备用。按前述方法分别测定各考察指标, 并计算综合评分。

提取率 = 提取物中指标成分质量 / 药材质量

出膏率 = 干膏质量 / 样品质量

由直观分析和方差分析 (表 2) 结果可知, 相对于因素 D, 因素 A 对延胡索提取工艺有显著影响 ($P < 0.05$), 因素 B、C 均无显著影响; 各因素作用主次为 $A > B > C > D$ 。综合考虑工艺成本最终确定最佳工艺为 $A_1B_2C_3D_1$, 即最佳提取工艺为 6 倍量 70% 乙醇提取 1 次, 2 h。

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.122 0	2	32.973	$P < 0.05$
B	0.049 8	2	13.459	
C	0.010 1	2	2.730	
D (误差)	0.003 7	2	1.000	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

2.8 相关性分析

通过 SPSS 13.0 软件将 9 组样品的延胡索乙素提取率、原阿片碱提取率、两种生物碱提取率总和及出膏率分别与 SMMC-7721 细胞抑制率做 Pearson 相关系数分析, 结果延胡索乙素提取率与抑制率的 Pearson 相关系数 (r) = 0.932, $P < 0.001$, 可以认为延胡索乙素提取率与抑制率呈正向线性相关; 原阿片碱提取率与抑制率的 Pearson $r = 0.953$, $P < 0.001$, 可以认为原阿片碱提取率与抑制率呈正向线性相关; 两种生物碱提取率总和与抑制率的 Pearson $r = 0.948$, $P < 0.001$, 可以认为两种生物碱提取率总和与抑制率呈正向线性相关; 出膏率与抑制率的 Pearson $r = 0.216$, $P = 0.577 > 0.001$, 可以认为出膏率与抑制率不呈正向线性相关。

2.9 补充和验证试验

由于乙醇用量影响显著, 又以 6 倍量提取最好, 为此又增加了 4 倍和 12 倍量乙醇提取试验, 结果见表 3。为了判定优化工艺是否最佳, 进行验证试验, 结果见表 4。

从表 3、4 可以看出, 验证结果比 9 份样品提取效果都好, 增加乙醇用量可以提高提取效果, 减少

表 3 补充试验

Table 3 Supplementary test

乙醇 用量	提取率 / (mg·g ⁻¹)		抑制率 / %	出膏率 / %	综合 评分
	延胡索乙素	原阿片碱			
4 倍	1.251	0.617	73.21	12.59	0.876
6 倍	1.367	0.765	77.81	13.67	0.982
12 倍	1.376	0.798	77.83	14.16	1.000

表 4 验证试验

Table 4 Verification test

试验号	提取率 / (mg·g ⁻¹)		抑制率 / %	出膏率 / %	综合 评分
	延胡索乙素	原阿片碱			
1	1.343	0.747	77.81	13.57	0.996
2	1.351	0.727	77.21	13.19	0.985
3	1.339	0.748	77.13	13.76	0.995

溶剂用量即降低提取效果, 综合考虑工艺成本最终仍确定最佳提取工艺为 $A_1B_2C_3D_1$, 即最佳提取工艺为 6 倍量 70% 乙醇提取 2 h。

3 讨论

中药有效成分复杂, 在研究提取工艺时, 由于提取延胡索所得的活性部位除生物碱外还含有非生物碱成分, 这些成分对总生物碱药效的影响并不清楚, 所以若单纯以化学指标和生物碱产率的高低来优选最佳提取工艺, 其药效是否最强仍未可知。因此, 本研究在活性导向下以化学和药效双重指标筛选最佳提取工艺, 使优选出的提取工艺依据更充分。还从另一角度阐明了延胡索有效部位中生物碱量的高低与药效强弱是呈正向线性相关, 即生物碱量越高其所对应的药效活性也越强。本实验采用的活性和定量相结合的方法使中药提取产物突出其某方面疗效, 亦为中药提取工艺的优化提供了一种新的思路, 值得尝试。

本实验首次将药效学指标应用于延胡索提取工艺的考察。与传统的单一考察指标相比较, 结合药效学指标可以更好地说明该方法提取有效成分与药效的相关性。

应用多指标正交设计法进行工艺优选时, 首先要解决指标间量纲不一致和指标间的矛盾问题。针对指标间的重要性差异给出各指标权重系数, 然后进行综合评分分析^[12]。本实验通过 SPSS 13.0 软件分析出延胡索乙素提取率、原阿片碱提取率、两种生物碱提取率总和及出膏率分别与抑制率的 Pearson 相关系数。结果表明延胡索乙素提取率、原

阿片碱提取率及两种生物碱提取率总和与抑制率呈正向线性相关,而出膏率与抑制率不呈正向线性相关。故本实验将指标的权重系数设为延胡索乙素提取率为 0.3、原阿片碱提取率为 0.3,抑制率为 0.3,出膏率为 0.1。综合评分后,数据间具有显著性差异,综合考虑工艺成本最终确定最佳工艺为 6 倍量 70% 乙醇提取 2 h。对该提取方法进行方法学分析,结果均表明该方法稳定可行。可为延胡索的进一步开发提供理论依据。

本实验亦考察了《中国药典》2010 年版所用定量测定方法,发现该法易出现拖尾现象。且流动相配制复杂,故选取甲醇-磷酸盐溶液(64:36)为流动相,流动相现配现用,条件稳定、峰形佳、分离度好、理论塔板数达到要求。经过方法学试验表明该工艺稳定可行,并且延胡索中 2 种生物碱得率较高,从而有利于提高对延胡索的综合利用。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 桑晓媛, 张磊, 刘立, 等. 延胡索生物碱的提取及其抗肝肿瘤活性研究 [J]. 浙江理工大学学报, 2009, 26(5): 754-756.
- [3] 李长岭, 吕文军, 李斌. 软肝抗癌止痛颗粒中延胡索乙素含量测定方法研究 [J]. 黑龙江医药, 2010, 23(5): 684-685.
- [4] 林武霖, 王如伟, 孙柳燕. 延胡索质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 409-412.
- [5] 黄春青, 林亚平, 靳风云, 等. 均匀设计法结合药效学指标优选金铁锁提取工艺 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1817-1820.
- [6] 张志国, 欧阳荣, 黄晓霞, 等. 正交设计优选抗瘤升白片的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(2): 1-3.
- [7] 张绍轩, 李勇, 黄青, 等. 用正交试验优选盐酸乙醇回流法提取麻黄的工艺研究 [J]. 中成药, 2008, 30(5): 758-760.
- [8] 孟宪生, 曹爱民, 王海波, 等. 均匀设计优化半仿生提取葛根芩连汤的工艺研究 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 710-711.
- [9] 廖维, 夏新华. 延胡索提取工艺的研究 [J]. 中成药, 2004, 26(10): 94-96.
- [10] 钟振国, 梁红, 钟益宁, 等. 余甘子叶提取成分没食子酸的体外抗肿瘤实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1954-1955.
- [11] 陈君超, 潘友俊, 李兴珊, 等. 药效学相互作用的定量计算方法与模拟研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 2029-2033.
- [12] 李丽, 周军, 张莹, 等. 多指标综合评分法优化痛风宁颗粒提取工艺 [J]. 中成药, 2007, 29(2): 281-285.