

正交试验法优选红曲中洛伐他汀的提取工艺

胡正芳,李除夕,贾树田,李琴*

(南京海陵中药制药工艺技术研究有限公司,南京 210049)

[摘要] 目的: 优选红曲中洛伐他汀的提取工艺。方法: 以干膏得率和洛伐他汀转移率的综合评分为指标, 选取提取次数、提取时间、乙醇体积分数和乙醇用量为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选提取工艺条件。结果: 最佳提取工艺为 6 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 0.5 h。结论: 该优选工艺合理、稳定可行, 有效成分洛伐他汀提取率高。

[关键词] 红曲; 洛伐他汀; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0053-03

Optimization of Extraction Technology for Lovastatin from *Monascus purpureus* by Orthogonal Test

HU Zheng-fang, LI Chu-xi, JIA Shu-tian, LI Qin*

(Nanjing Hailing R&D for Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology Co. Ltd, Nanjing 210049, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of lovastatin from *Monascus purpureus*. **Method:** With composite score of yield of dry extract and transfer rate of lovastatin as index, taking extraction times, extraction time, the concentration and amount of ethanol as factors, extraction technology of lovastatin from *M. purpureus* was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Result:** Optimum extraction technology was as follows: reflux extracted 2 times with 6 times the amount of 95% ethanol, 0.5 h per time. **Conclusion:** This optimized extraction technology was feasible, stable and reasonable with high yield of lovastatin.

[Key words] *Monascus purpureus*; lovastatin; orthogonal test; extraction technology

红曲具有健脾消食、活血化瘀之功效。现代研究表明,红曲中含有红曲色素、他汀同系物、麦角甾醇等多种有效成分,具有降血脂、降血压、降血糖、抑菌、增强免疫、抗肿瘤等药理作用^[1-6]。其中含有的 13 种他汀同系物,能够特异性地抑制还原酶-HMG-CoA 的活性,降低体内胆固醇的水平,其中以洛伐他汀含量最高。本研究以干膏得率和洛伐他汀转移率的综合评分为考察指标,采用正交试验对影响红曲中洛伐他汀提取工艺的主要因素进行优选,以确定其最佳提取工艺。

1 材料

LC-2010A 型高效液相色谱仪(Shimadzu 公司),洛伐他汀对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100600-200301),红曲药材购于上海红太阳生物制品有限公司(批号分别为 031011, 031024, 031101),经南京海陵中药制药工艺技术研究有限公司李琴工程师鉴定为曲霉科真菌紫色红曲霉 *Monascus purpureus* Went. 的菌丝体及孢子,经人工培养使菌丝在粳米内部生长,最终整个米粒变为红色所得的制品。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计^[7-10] 红曲中的主要有效成分他汀类易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,本试验采用乙醇回流提取法,选择提取次数、提取时间、乙醇体积分数、乙醇用量为考察因素,每个因素考察 3 个水

[收稿日期] 20120817(015)
[第一作者] 胡正芳,博士,中级工程师,从事中药新药研发, Tel:025-83505999, E-mail: njhlyy@163.com
[通讯作者] *李琴,硕士,中级工程师,从事新药研发, Tel: 025-83505999, E-mail: yzjlq@yahoo.com.cn

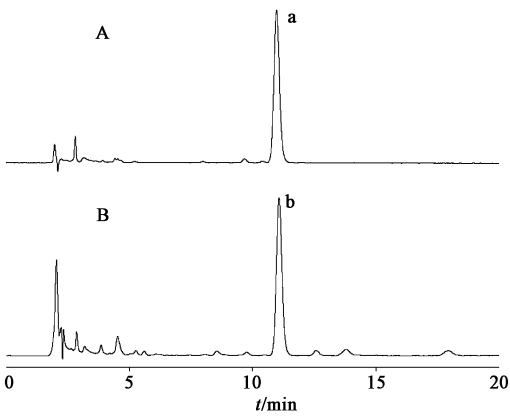
平,以干浸膏得率和洛伐他汀转移率的综合评分为评价指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平见表 1。

表 1 红曲中洛伐他汀提取工艺正交试验因素水平

	A	B	C	D
水平	提取数 /次	提取时间 /h	乙醇体积 分数/%	乙醇用量 /倍
1	2	1.5	85	6
2	3	1.0	90	7
3	4	0.5	95	8

2.2 洛伐他汀含量测定

2.2.1 色谱条件 岛津 VP-ODS 型色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.05% 磷酸溶液(78:22),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 238 nm,柱温 30 ℃。在此条件下,主要成分洛伐他汀与其他成分有较好的分离效果,理论塔板数>3 000。见图 1。



A. 对照品;B. 样品;a. 洛伐他汀

图 1 红曲 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 称取洛伐他汀对照品约 10 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 75% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 5 mL 至 50 mL 量瓶中,精密加入 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL,摇匀,静置 10 min,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

2.2.3.1 红曲药材供试品溶液的制备 称取本品约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 乙醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 20 min,放冷,称定质量,用 75% 乙醇补足减失的质量,摇匀,离心 10 min(3 000 r·min⁻¹),精密量取上清液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,精密加入 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL,摇匀,静置 10 min,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3.2 提取液供试品溶液的制备 量取提取液适量,蒸干,置具塞锥形瓶中,按 2.2.3.1 项下方法制备,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系 精密称取洛伐他汀对照品 20.63 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,作为贮备液;分别精密量取贮备液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 mL 于 20 mL 量瓶中,精密加入 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL,摇匀,静置 10 min,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列稀释液。分别精密量取各稀释液 20 μL 按上述色谱条件进样检测,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 67\,807X - 30\,423$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.10 ~ 0.82 μg。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL,重复进样 6 次,测定峰面积,结果洛伐他汀 RSD 0.05%,表示仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品提取液各 20 μL,分别于 0,2,4,6,8,12,24 h 进样,按上述色谱条件测定峰面积,结果洛伐他汀 RSD 1.67%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批号供试品 6 份,按 2.2.3.1 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定峰面积并计算含量,结果洛伐他汀平均含量 1.25%,RSD 0.5%,表明本法具有良好的重复性。

2.2.8 药材加样回收率试验 称取已知含量药材供试品约 0.25 g,共 9 份,精密称定,分别精密加入对照品溶液适量,按 2.2.3.1 项下方法制备成 75%,100%,125% 质量浓度水平的供试品溶液,按上述色谱条件测定峰面积并计算含量,结果洛伐他汀平均加样回收率 101.52%,RSD 0.52%。

2.2.9 提取液加样回收率试验 量取适量已知含量提取液供试品共 9 份,蒸干,分别精密加入对照品溶液适量,按 2.2.3.2 项下的方法制备成 75%,100%,125% 3 个质量浓度水平的供试品溶液,按上述色谱条件测定峰面积并计算含量,结果洛伐他汀平均回收率为 97.53%,RSD 1.00%。

2.2.10 样品的测定 分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,按外标法计算含量。

2.3 干膏得率的测定 精密吸取提取液 50 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 ℃ 干燥 6 h,置干燥器中冷却至室温,称定质量,计算干膏得率。

2.4 正交试验数据分析 正交试验以干浸膏得率和洛伐他汀转移率的综合评分为考察指标,具体评价方法为干浸膏得率记 x ,最大干浸膏得率定为 $x_0 = 100$,则 $X = 100x/x_0$;洛伐他汀转移率记 y ,最大转移率定为 $y_0 = 100$,则 $Y = 100y/y_0$;根据干浸膏得率和洛伐他汀的转移率的对制剂疗效和成型的影响,确定干浸膏得率权重系数为 $1/5$,洛伐他汀转移率权重系数为 $4/5$,综合评分为 $X/5 + 4Y/5$ 。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 红曲中洛伐他汀提取工艺正交试验安排							
No.	A	B	C	D	干浸膏 得率 /%	洛伐他汀 转移率 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	11.00	77.3	81.9
2	1	2	2	2	14.84	89.2	97.2
3	1	3	3	3	16.20	89.5	99.1
4	2	1	2	3	12.00	85.9	90.7
5	2	2	3	1	13.44	88.0	94.4
6	2	3	1	2	9.60	70.2	73.9
7	3	1	3	2	13.36	90.5	96.5
8	3	2	1	3	8.32	73.5	75.2
9	3	3	2	1	10.70	84.3	87.7
K_1	92.73	89.70	77.00	88.00			
K_2	86.33	88.93	91.87	89.20			
K_3	86.47	86.90	96.67	88.33			
R	6.40	2.80	19.67	1.20			

表 3 综合评分方差分析				
方差来源	SS	f	F	P
A	80.25	2	34.86	<0.05
B	12.56	2	5.46	
C	630.84	2	274.04	<0.05
D(误差)	2.30	2	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > A > B > D$,以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果表明 A, C 因素有显著性差异, B 因素无显著性影响。综合分析,确定最佳提取工艺 $A_1B_1C_3D_2$,即加 6 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 0.5 h。

2.5 验证试验 称取红曲药材共 3 份,每份 100 g,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,结果干浸膏得率分别为 12.32%,12.54%,12.11%;洛伐他汀转移率分别为 92.90%,93.00%,92.48%。表明该

优选工艺稳定可行。

3 讨论

红曲中的主要有效成分他汀类,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂和碱水,传统工艺常用碱水和乙醇提取。通过预试验发现碱水提取有效成分转移率 94%,与乙醇提取相近,但干浸膏得率高达 33.0%,远远高于乙醇提取的干浸膏得率 12%,可能是热碱水溶解了大米中淀粉等物质所致。因而用碱水提取红曲得到的干浸膏量大,有效成分洛伐他汀含量相对较低,不利于制剂。因此本试验采用传统的乙醇回流提取工艺。

红曲中洛伐他汀是 HMG-CoA 还原酶抑制剂,有开环和闭环 2 种结构,且 2 种形态同时存在。为了更准确地控制红曲的质量,本试验建立 HPLC 测定红曲中洛伐他汀的总量,即在前处理步骤中用氢氧化钠让闭环的洛伐他汀完全转化为开环结构,测定开环结构的含量,即为洛伐他汀的总量^[11]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 23.

[2] 朱效刚,陶冠军,陈蕴,等. 高效液相色谱法测定功能性红曲中的麦角甾醇[J]. 食品与发酵工业,2004,30(9):104.

[3] 谢林明,励建荣. 红曲色素的提取及其稳定性研究[J]. 食品工业科技,2004,25(3):118.

[4] 戴伟,李立,刘海波,等. 红曲调节血脂作用的研究[J]. 上海预防医学杂志,2003,15(8):374.

[5] 傅剑云,夏勇,孟佳. 红曲对实验性高血脂症大鼠体重及血脂水平的影响[J]. 中国临床康复,2002,6(1):57.

[6] 美珍,田林华,迟家敏. 血脂康对Ⅱ型糖尿病糖、脂代谢的影响[J]. 中华内科杂志,1998,37(6):374.

[7] 施钧瀚,牛晓静,赵新红. 安渴胶囊提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):37.

[8] 季巧遇,李谔光,刘旭海,等. 正交试验优选健胃消食口崩片提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):14.

[9] 杨金额,陈虎虎,龚苏晓,等. 正交试验法优选头痛滴丸的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):59.

[10] 叶伟兵,赵琦,张翌春,等. 正交试验法优选板桥解毒颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):47.

[11] 罗仁才,孙开奇,谢申猛,等. 红曲中洛伐他汀总量的测定方法[J]. 卫生研究,2003,32(2):157.

[责任编辑 全燕]