益髓通经方中总生物碱的提取工艺研究

张杰，王化宇，任钰，张炜煜
（长春中医药大学，吉林长春 130117）

摘要：试验优选了益髓通经方中总生物碱的提取方法和最佳提取工艺。以总生物碱的提取率为考核指标，采用单因素试验法确定其提取方法，采用正交试验法优化其最佳提取工艺。结果表明，方中总生物碱的最佳提取工艺为：采用乙醇回流提取法，药材加12倍量50%的乙醇提取三次，每次2 h。该提取工艺操作简单，稳定性好，适合于工业化生产。

关键词：益髓通经方；总生物碱；提取工艺；正交试验
文章篇号：1673-9078(2013)5-1061-1064

Extraction of Total Alkaloids from Mixed Herbs Yisuitongjing

ZHANG Jie, WANG Hua-yu, REN Yu, ZHANG Wei-yu
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: The extraction method and process for total alkaloids in a herb mixture named Yisuitongjing were optimized in this paper. With the content of total alkaloids as indexes, the extraction method was optimized by single factor experiment and the extraction process was optimized by orthogonal experiment. The highest extraction yield of total alkaloids were reached when using ethanol as reflux extraction regent and adding 50% ethanol solution for twelve times with extracting time 2.0 h. The extraction process was simple and reasonable, suitable for industrial production.

Key words: yisuitongjing; total alkaloids ; extraction technology ; orthogonal test

益髓通经方为长春中医药大学赵建军教授的经验方，由马钱子、鹿茸等药材组成，临床可用于格林-巴利综合征（Guillain-Barre syndrom，GBS）的治疗。方中药材马钱子为君药，具有散结消肿、通络止痛之功效[1]，经前期药理学试验研究表明，其所含有的生物碱类成分马钱子碱和士的宁对GBS等神经系统疾病有很好的治疗作用[2~3]，为益髓通经方治疗GBS的有效成分。由于马钱子碱和士的宁均有较强毒性[4~5]，为满足制剂需求，我们将对益髓通经方中的总生物碱类成分的提取方法进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

士的宁对照品（批号：110705-200306），马钱子碱对照品（批号：110706-200505）均购于中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈（色谱纯）均购于Sigma公司，其余试剂均为分析纯。

收稿日期：2013-01-13
基金项目：吉林省自然科学基金项目（201015111）
作者简介：张杰（1960-），女，副研究员，研究方向：主要从事中药学研究与开发
通讯作者：张炜煜（1963-），女，教授，博士生导师，研究方向：主要从事新剂型新技术研究与开发

药材马钱子等（批号：20100827）购于吉林省北药药材加工有限公司，经长春中医药大学鉴定教研室姜大成教授鉴定均为真品。

1.2 仪器

AR2140型电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；RE-52AA型旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；Agilent1200高效液相色谱仪，安捷伦公司；Agilent VWD型检测器，安捷伦公司；DZF-6050型真空干燥箱，上海一恒科技有限公司；MA-10000型可调式电热套，北京科伟永兴仪器有限公司；DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱，上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 含量测定方法的建立

1.3.1.1 对照品溶液的制备

精密称取士的宁和马钱子碱对照品适量，分别置5 mL量瓶中，加氯仿溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取上述对照品溶液各1 mL，置同一5 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得每1 mL中含士的宁0.250 mg/mL、马钱子碱0.253 mg/mL的混合对照品溶液。

1.3.1.2 供试品溶液的制备

取提取物约0.1 g，精密称定，加10 mL硫酸（3→100）溶解，加氨水调pH值至9~10，以氯仿萃取

四次，每次 10 mL，合并氯仿层，挥干，残渣加氯仿适量使溶解，置 100 mL 量瓶中，加三氯甲烷稀释至刻度，摇匀，即得。

1.3.1.3 测定波长的确定

分别取马钱子碱对照品溶液和士的宁对照品溶液适量，配置成适宜浓度，在 200~400 nm 波长范围内进行紫外扫描。

1.3.1.4 色谱条件

色谱柱：Agilent C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：A（水-磷酸二氢钾-庚烷磺酸钠等量混合）-B（乙腈），体积比为 81:19；检测波长：260 nm；柱温：25 ℃；流速：1 mL/min；进样量：10 μL。

1.3.1.5 系统适用性实验

取混合对照品溶液和供试品溶液，在本色谱条件下进样，测定色谱峰。

1.3.1.6 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.5、3.0 mL，分别置 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成不同浓度对照品溶液；分别进样，记录峰面积。

1.3.2 提取方法对总生物碱含量的影响

1.3.2.1 酸性乙醇提取法

按处方称取药材，加 10 倍量 pH=5、浓度为 50%的乙醇加热回流提取二次，每次 1 h，滤过，滤液合并，回收乙醇至无醇味，用盐酸调 pH 值至 2~3，滤过，滤液用氨水调 pH 值至 9~10，挥干，干燥至恒重，即得。

1.3.2.2 乙醇回流提取法

按处方称取药材，加 10 倍量 50%的乙醇加热回流提取二次，每次 1 h，滤过，滤液合并，回收乙醇至无醇味，干燥至恒重，即得。

1.3.2.3 酸水提取法[6]

按处方称取药材，加 10 倍量 pH=5 的水溶液加热提取二次，每次 1 h，滤过，滤液合并，用盐酸调 pH 值至 2~3，滤过，滤液用氨水调 pH 值至 9~10，浓缩，干燥至恒重，即得。

1.3.2.4 水煎煮法

按处方称取药材，加 10 倍量的水溶液煎煮二次，每次 1 h，滤过，滤液合并，浓缩，干燥至恒重，即得。

1.3.2.5 氨性氯仿提取法[7]

按处方称取药材，加适量 10%的氨水浸润，用 5 倍量氯仿加热回流 5 h，冷却，滤过，残渣加 3 倍量的氯仿，加热回流 5 h，滤过，合并滤液，回收氯仿，干燥至恒重，即得。

1.3.2.6 含量测定

将各组提取物按“1.3.1.2”中方法制备成供试品溶液，依法测定其中总生物碱的含量。

1.3.3 正交实验

采用 $L_9(3^4)$正交试验法，以总生物碱的含量为考核指标，取处方量药材，按因素水平表（表 1）和正交试验表（表 3）设计的试验进行回流提取，滤过，滤液合并，浓缩，干燥至恒重。

表 1 因素水平表

Table 1 Levels of the factors

水平	因素			
	A (乙醇浓度/%)	B (加醇量/倍)	C (提取时间/h)	D (提取次数/次)
1	40	8	1.0	1
2	50	10	2.0	2
3	60	12	3.0	3

2 结果与讨论

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 检测波长的测定结果

马钱子碱和士的宁的紫外扫描图谱见图 1、2。

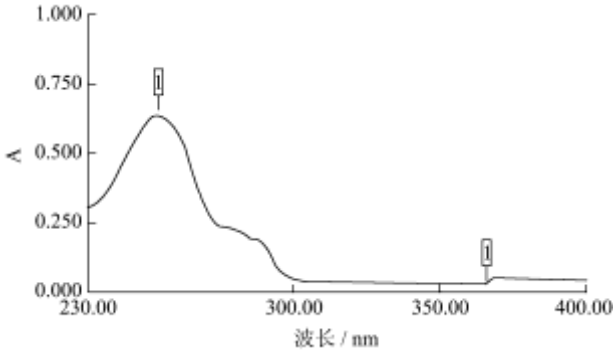


图 1 士的宁光谱扫描曲线

Fig.1 Scanning spectral curve of strychnine

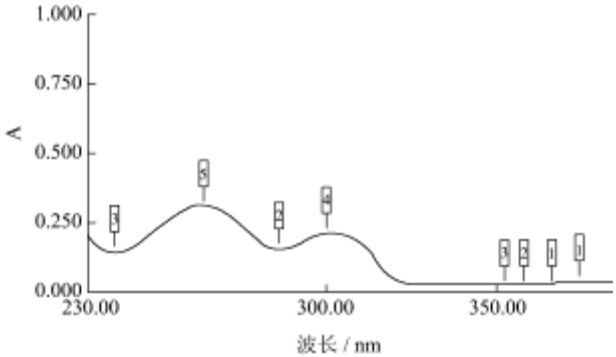


图 2 马钱子碱的光谱扫描曲线

Fig.2 Scanning spectral curve of brucine

结果显示，马钱子碱在 264 nm 有最大吸收，士的宁在 254 nm 处有最大吸收，根据文献[8~9]及《中华人民共和国药典》2010 年版一部“马钱子”项下相关规定[10]，综合实验结果，确定测定波长为 260 nm。

2.1.2 系统适应性试验结果

马钱子碱和士的宁的 HPLC 图谱见图3、4。

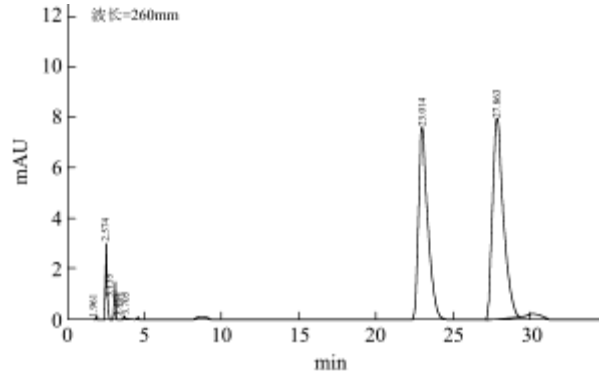


图 3 标准品 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of standard sample

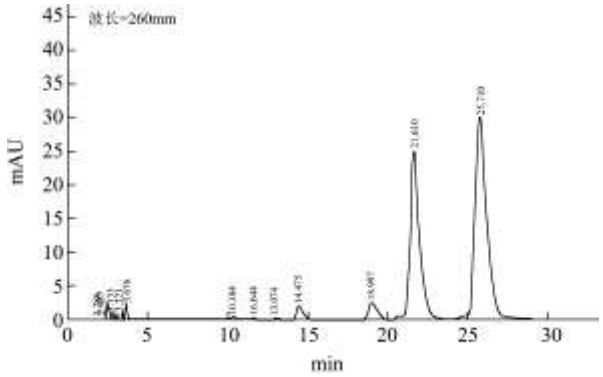


图 4 供试品 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC chromatogram of test sample

结果表明，供试品中马钱子碱、士的宁得到较好的分离，其色谱峰的保留时间与对照品基本一致。

2.1.3 线性关系考察结果

表 2 各提取物含量测定结果（mg/g 提取物）

Table 2 The assay results of extractions

提取方法	干膏重/g	马钱子碱含量/(mg/g)	士的宁含量/(mg/g)	总生物碱含量/(mg/g)
酸性乙醇提取法	4.513	3.997	9.753	13.750
乙醇回来提取法	5.785	4.173	11.634	15.807
酸水提取法	9.167	2.042	5.917	7.959
水煎煮法	10.645	0.751	2.173	2.924
氨性氯仿提取法	2.379	2.935	6.030	8.965

以对照品峰面积（Y）为纵坐标，对照品浓度（X）为横坐标，进行线性回归，得到马钱子碱的回归方程为 Y=20492X-46.23（r=0.9999），士的宁的回归方程为 Y=24538X-58.833（r=0.9996），表明马钱子碱和士的宁分别在 0.007284 mg/mL~0.182100 mg/mL 与 0.00744 mg/mL~0.18600 mg/mL 浓度范围内，与峰面积具有良好线性关系。

2.2 提取方法对总生物碱含量的影响

表 2 表明，五种提取方法提取物中总生物碱含量的顺序比较：乙醇回流提取法>酸性乙醇提取法>氨性氯仿提取法>酸水提取法>水煎煮法。考虑到干膏总量，结合生产实际，故选用乙醇回流提取法提取益髓通经方中的总生物碱成分。

2.3 正交试验结果

分别取正交试验干燥至恒重的浸膏，依法测定其中总生物碱含量。结果见表3、表 4。

表 3 正交试验表及试验结果

Table 3 Orthogonal test design and results

实验号	因素 A	B	C	D	马钱子碱含量/(mg/g)	士的宁含量/(mg/g)	两种生物碱总含量/(mg/g)
1	1	1	1	1	3.1418	5.9878	9.13
2	1	2	2	2	5.3569	11.3220	16.68
3	1	3	3	3	5.4616	12.2773	17.74
4	2	1	2	3	5.4783	11.6495	17.13
5	2	2	3	1	3.6978	7.9196	11.62
6	2	3	1	2	5.6379	11.8566	17.50
7	3	1	3	2	5.0508	10.6338	15.68
8	3	2	1	3	6.1827	12.6477	18.83
9	3	3	2	1	4.2745	8.2684	12.54
k_1	14.517	13.980	15.150	11.097			
k_2	15.413	15.710	15.450	16.617			
k_3	15.683	15.923	15.013	17.900			
R	1.166	1.943	0.437	6.803			

表 4 方差分析表

Table 4 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	2.238	2	7.485	19.000	
B	6.815	2	22.793	19.000	*
C	0.299	2	1.000	19.000	
D	78.403	2	262.217	19.000	***
误差	0.30	2			

注：$F_{0.05}(2,2)=19.00$，$F_{0.01}(2,2)=99.00$，$F_{0.01}(2,2)=199.00$。

方差分析结果表明，以两种生物碱总含量为考察指标，影响马钱子提取工艺的因素作用顺序为：提取次数>加醇量>乙醇浓度>提取时间，提取次数的影响有极显著性差异（$p<0.001$），加醇量的影响有极显著性差异（$p<0.05$）。考虑到最经济和最常规的方案，确定最佳工艺为 $A_2B_3C_2D_3$，即加 12 倍于药材量的 50%乙醇，提取三次，每次 2.0 h。

为进一步验证优选方法的可靠性，取 10 倍于处方量的药材，共三份，按所选的最佳工艺进行提取，依法测定提取物中马钱子碱和士的宁的含量。结果提取物中两种生物碱的总量分别为 17.90%、17.75%、17.82%，说明优选的工艺条件简单、稳定、可行。

3 结论

3.1 据报道，生物碱类成分的提取方法有浸渍法、煎煮法、渗漉法等[11]，这些方法一般不适合于工业化生产，例如浸渍法和渗漉法操作周期较长，溶剂消耗量较大[12]，而应用煎煮法和酸水提取法虽然提取物中生物碱的总量较高，但是因为杂质较多造成其单位含量偏低，需要进一步纯化，以上原因均会造成生产成本的提高。本研究根据试验结果和生产实际，选用更适合工业生产的乙醇回流提取法进行试验。

3.2 文献中曾有使用回流提取法提取马钱子的报道，但其选用的乙醇浓度较高，在大工业生产过程中会存在一定安全隐患；也有人选用酸性乙醇提取马钱子生物碱，但其操作过程相对复杂。本研究选用低浓度乙醇提取马钱子中的马钱子碱和士的宁，结果表明其提取率较高，符合生产实际。

3.3 在建立了马钱子碱和士的宁的含量测定方法过程中我们尝试了多种流动相[13~15]，最终确定以水-磷酸二氢钾-庚烷磺酸钠等量混合作为 A 相（81%），乙腈作为 B 相（19%），可以使马钱子碱和士的宁得到很好的分离，所建立的分析方法专属性强，准确度高。

3.4 本实验以总生物碱的含量为考核指标优选益髓通经方中总生物碱的提取方法和提取工艺，所确定的最佳提取工艺为：药材加 12 倍量 50%的乙醇提取三次，每次 2 h。优选的最佳提取方法操作简单，提取物中有效成分含量稳定，适合于大工业生产。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2010:47

[2] 郭常申.中药马钱子的药理作用及应用[J].科技创新导报,2012,5:230-231

[3] 李明华,张艳,刘巨源.马钱子碱对大鼠海马神经元钠通道的影响[J].新乡医学院学报,2003,6(20):389-393

[4] 马维波.马钱子的炮制、毒理及合理应用浅述[J].中国中医药现代远程教育,2011,12(9):57-58

[5] 屈艳格.士的宁的研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2011, 24(17):247-251

[6] 魏海柳,李琳,马明松,等.响应面法优化水提白附片中的总生物碱[J].现代食品科技,2012,3:309-312

[7] 汤淮波,张令君,李湘玲,等.不同溶剂提取马钱子中士的宁与马钱子碱的实验研究[J].中医药导报,2009,15(11):52-53

[8] 李嫚,徐自升,陈志鹏,等.正交实验优化马钱子碱提取工艺[J].南京中医药大学学报 2009,25(6):446

[9] 管庆霞,王录娜,李永吉,等.马钱子不同提取方法的比较研究[J].中华中医药学刊,2009,27(4):815-816

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

[11] 徐金华,陈军,蔡宝昌.马钱子碱的研究进展[J].中国新药杂志,2009,18(3):213

[12] 陶永霞,刘洪海,王忠民,等.番茄碱的研究现状及应用前景[J].现代食品科技,2006,2:253-256

[13] 陈军.马钱子总生物碱的含量测定[J].中药新药与临床药理,2007,6(18):468-471

[14] 王立杰,蔡宝昌,陈军,等.生马钱子醇提工艺正交设计优选[J].中成药,2009,31(4):629

[15] 沈炜.正交试验优选马钱子的提取工艺研究[J].浙江中西医结合杂志,2010,20(9):581-583

欢迎订阅 EI 收录期刊 · 中文核心期刊
《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620

地址：广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508，邮编：510640
电话：020-87112373，87114555，87113352，87112532
E-mail：xdspkj9@qq.com