

正交试验法优选马钱子总生物碱提取工艺*

张文平, 张贵华, 柯 瑾, 马云淑[△]

(云南中医学院, 云南昆明 650500)

摘要: 目的 优选马钱子中土的宁与马钱子碱的提取方法与工艺。方法 在单因素试验的基础上,以高效液相测定的土的宁与马钱子碱总量为指标,以乙醇浓度、乙醇用量及回流时间为影响因素,采用正交试验法优选土的宁与马钱子碱提取工艺。结果 优选的最佳提取工艺为 50%乙醇 10 倍量,回流提取 3 次,每次 2h。结论 验证实验表明该工艺合理、稳定可行。

关键词: 马钱子; 总生物碱; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)02-0014-03

马钱子又名苦实、番木鳖、马钱子等,味苦、性寒,有大毒,为马钱子科马钱子属植物马钱子(*Strychnos nux-vomica*)或云南马钱(*Strychnos pierriana*)的干燥成熟种子,具有改善微循环,增加血流、抑制肿瘤、镇痛、抗炎、抑菌作用^[1]。可用于治疗脑血管病后偏瘫及面瘫、癌症疼痛、坐骨神经痛、颈椎病、风湿性关节炎等^[2]。马钱子的药理和临床应用价值非常突出,马钱子碱和土的宁是主要药效成分,并能相互促进吸收^[3]。为了对马钱子主要有效成分的透皮给药制剂及其他制剂提供马钱子提取物,本实验采用回流提取法,以土的宁与马钱子碱总量为指标,采用正交试验法优选其最佳提取工艺,为以后进一步研究提供科学合理的现代制剂实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1100);TYS-100 型高速多功能粉碎机(浙江省永康市红太阳机电有限公司);T-1000 型电子天平(常熟双杰测试仪器厂);DZF 型真空干燥箱(北京永光明医疗仪器厂)。

1.2 试药

马钱子原药材(购自菊花村中药材市场,经云南中医学院中药鉴定教研室杨树德教授鉴定为马

钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子);土的宁对照品(购自中国生物制品检定所,批号:110705-200306);马钱子碱对照品(购自中国生物制品检定所,批号:110706-200505)。无水乙醇、硫酸、盐酸、磷酸等为分析纯,乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 样品测定方法

2.1.1 色谱条件

采用高效液相色谱法,色谱柱为 LicrospherC18 (4.6mm×250mm,5 μ m);流动相为乙腈-0.01mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液(23:77),10%磷酸调 pH 值为 2.8;流速为 1mL/min;检测波长:260nm,进样量 10 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C。

2.1.2 对照品溶液的制备

分别精密称取土的宁碱对照品 6mg、马钱子碱对照品 5mg,分别置于 10mL 容量瓶中,加三氯甲烷适量使溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密量取 2mL,置同一 10mL 中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(土的宁 0.12mg/mL、马钱子碱 0.10mg/mL)。

2.1.3 供试品溶液的制备

精密称取生马钱子粗粉(过 2 号筛,下同) 10.000g 置于 250mL 圆底烧瓶中,按照正交试验表

* 基金项目: 国家自然科学基金(30960517);云南省教育厅科学研究基金(2012C040,2011Y398)

收稿日期: 2014-01-24

作者简介: 张文平(1981-),女,山东烟台人,讲师,研究方向:中药药剂。

[△]通信作者: 马云淑, E-mail: yunshuma2@126.com

加热回流提取3次,抽滤,合并提取液。分别用各自浓度乙醇定容至250mL容量瓶中摇匀,密取吸取1mL提取液用各自浓度的乙醇定容至10mL容量瓶中,离心10min,频率(5 000r/min),取上清液过0.45 μ m微孔滤膜,即得。

2.1.4 标准曲线的制备

精密吸取对照品溶液1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 μ L注入高效液相色谱仪,以进样量(μ g)为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,并计算回归方程,马钱子碱标准曲线: $y=1491.386x+20.75$, $r=0.9998$;士的宁标准曲线: $y=1873x+8.041$, $r=0.9999$ 。结果表明马钱子碱进样量在0.1~1.0 μ g;士的宁进样量在0.125~1.2 μ g范围内线性关系良好。

2.1.5 含量测定

分别精密吸取对照品与供试品溶液各10 μ L,注入高效液相色谱仪,测定士的宁与马钱子碱峰面积,计算含量。

2.2 提取工艺设计

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 提取溶剂的选择^[4-5]

精密称取马钱子粉8份10g,分别加8倍量下列溶剂(蒸馏水、0.5mol/L硫酸、1mol/L盐酸、1mol/L硝酸、1%硝酸、50%乙醇、碱性氯仿(加氢氧化钠试液混匀)),浸泡30min,第一次回流提取2h,第二次1h,第三次0.5h,每次提取液均要分别收集,最后分别合并并稀释定容到250mL,按2.1.5项下方法测定,实验结果见表1。

表1 不同溶剂马钱子碱和士的宁提取量

溶剂	马钱子碱含量/(mg/g)	士的宁含量/(mg/g)
0.5mol/L 硫酸	0.3507	0.6272
1mol/L 盐酸	0.3805	0.8633
1mol/L 硝酸	0	0.0866
1%硝酸	0	0.4306
碱性氯仿	0.3621	0.7978
50%乙醇①	0.3787	0.8394
50%乙醇②	0.3921	0.8608

氯仿毒性大,而硝酸破坏马钱子生物碱成分,酸水溶出杂质多,通过比较马钱子碱和士的宁的提取率大小,综合各种因素,最终选择50%乙醇最为最佳溶剂。

2.2.1.2 溶剂pH的考察

取马钱子粉12份,每份10g,分别加盐酸和氢氧化钠调pH=3,5,7,9的50%乙醇80mL,浸泡30min,回流提取3次,每次1h,将提取液抽滤并收集滤液,合并每次滤液定容到250mL,精密取1mL至10mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度线,3000r/min离心10min,取上清液用0.45 μ m的微孔滤膜过滤并装入进样瓶中,参照2.1.5项下含量测定方法,精密吸取10 μ L,HPLC测定士的宁与马钱子碱总量。结果表明,pH在5~7之间为宜。实验结果见表2。

表2 不同PH马钱子碱和士的宁提取量

PH	马钱子碱含量/(mg/g)	士的宁含量/(mg/g)
3	0.2825	0.7429
5	0.2844	0.7478
7	0.3021	0.7171
9	0.2827	0.7145

2.2.2 正交试验设计

2.2.2.1 因素水平的确定与考察指标^[6]

以50%乙醇为溶剂,选取乙醇浓度A、乙醇用量B、回流时间C为考察因素,以士的宁与马钱子碱总含量为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。提取工艺优选因素水平表见表3。

表3 提取工艺因素水平表

水平	乙醇浓度 A/%	乙醇用量 B/倍	回流时间 C/h
1	50	6	0.5
2	70	8	1.0
3	90	10	2.0

2.2.2.2 正交试验结果及方差分析

精密称取生马钱子粗粉(过2号筛,混匀)27份(每号实验平行3次),每份约10g,置于250mL圆底烧瓶中,加热回流提取3次,抽滤,合并提取液。分别用不同浓度乙醇定容至250mL容量瓶中摇匀,密取吸取1mL提取液用相应浓度的乙醇定容至10mL容量瓶中,摇匀,3 000r/min离心10min,取上清液,按2.1.5项下含量测定方法测定含量,结果见表4,方差分析见表5。

通过正交试验直观分析,方差分析表可知,各因素影响顺序为A>C>B,其中乙醇浓度对士的宁与马钱子碱的提取结果影响最大,理论最佳提取工艺条件为A₁B₃C₃,即加50%乙醇提取3次,加醇量为10倍量,每次2h。

表 4 $L_9(3^4)$ 正交实验设计及结果

试验号	因素				马钱子碱与土的宁含量之和 /(mg/g)
	乙醇浓度 /%	乙醇用量 /倍	提取时间 /h	空白	
1	1	1	1	1	27.2190
2	1	2	2	2	27.8280
3	1	3	3	3	30.6313
4	2	1	2	3	27.9287
5	2	2	3	1	29.0214
6	2	3	1	2	28.3739
7	3	1	3	2	22.9244
8	3	2	1	3	18.9090
9	3	3	2	1	21.6783
k_1	28.559	26.024	24.834	25.973	
k_2	28.441	25.253	25.812	26.375	
k_3	21.171	26.895	27.526	25.823	
极差 R	7.388	1.642	2.692	0.552	

表 5 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	$F_{0.05(2,2)}$	P	显著性
乙醇浓度	107.473	2	219.474	19	0.005	*
乙醇用量	4.048	2	8.266	19	0.108	
提取时间	11.139	2	22.748	19	0.042	*
误差	0.490	2				

注: * $P < 0.05$

2.2.3 提取工艺验证性试验

平行称取药材粗粉 3 份, 每份 10g, 精密称定, 按优选出的工艺进行重复性验证试验, 结果见表 6。结果表明正交试验优选的工艺条件较好, 说明此工艺合理可行。

3 讨论

生马钱子为苦寒大毒之品, 临床医生多畏之, 即使用者也以外用居多。而鉴于其外用的疗效确切, 剂量小, 治疗药效强, 工业化生产更显得重要, 本实验为工业化大生产提供了科学合理可行的实验依据。

马钱子粉用 50% 乙醇浸泡 30min 后按筛选出

表 6 验证试验结果

编号	马钱子碱含量 /(mg/g)	土的宁含量 /(mg/g)	二者之和 /(mg/g)
1	9.66	21.25	30.91
2	10.06	21.38	31.44
3	10.15	21.41	31.56
平均含量(mg/g)	9.96	21.34	31.30
RSD%	2.59	0.38	1.10

的工艺提取, 马钱子总碱提取率比不浸泡高。

目前对马钱子中土的宁与马钱子碱总量的提取方法的报道较少, 以回流提取法提取率较高, 而报道有用 65% 乙醇 10 倍量、回流 3 次, 每次 1h 的提取方法, 但其也仅仅以土的宁提取率为指标, 考察不够全面, 且优选对象为制马钱子, 综上考虑, 本实验用 50% 乙醇为溶媒, 以马钱子碱和土的宁 2 种主要成分的转移率为指标对生品马钱子的醇提工艺进行全面正交优选, 最佳工艺结果表明两生物碱的提取率较高, 证明该工艺合理。

本实验参照 2010 版药典(一部)方法直接测定提取液中马钱子碱和土的宁的含量, 简单可行, 省去了后续萃取纯化过程, 减少生物碱成分损失。

参考文献:

- [1] 旭坤, 蔡宝昌. Brucine 对 Heps 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用和毒性的研究[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 35-39.
- [2] 焦杨. 马钱子的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2009, 22(8): 918-919.
- [3] 朱建伟, 武继彪, 李成韶, 等. 马钱子碱镇痛作用及其药效动力学研究[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(3): 166.
- [4] 汤淮波, 张令君, 李湘玲, 等. 不同溶剂提取马钱子中土的宁与马钱子碱的实验研究[J]. 中医药导报, 2009, 15(11): 52-53.
- [5] 祁艳, 陈军. 马钱子总生物碱提取纯化工艺及抗肿瘤研究 [J]. 中成药, 2010, 32(3): 405-408.
- [6] 王利杰, 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): 629-631.

(编辑: 岳胜难)

Optimization of Extraction Technology of Total Alkaloids of Semen Strychni by Orthogonal Test

ZHANG Wen-ping, ZHANG Gui-hua, KE Jin, MA Yun-shu
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To optimize extraction process conditions of Semen Strychni. **Methods** With the content of Strychnine and brucine as the target, based on the single factor experiment, extraction technology of Semen Strychni was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test, taking the concentration of ethanol, ethanol dosage and extraction time as investigated factors. **Results** Optimum extraction technology was: extracted 3 times with 10 times the amount of 50% ethanol, 2 hours each time. **Conclusion** This optimized extraction technology was simple and reasonable and it was stable.

KEY WORDS: Semen Strychni; total alkaloids of Semen Strychni; orthogonal test; extraction technology