

# 正交试验法优选蒙古族药嘎日迪散有效部位提取工艺

裴玲燕, 崔箭, 刘伟志, 秦阿娜, 王汉淙, 王萌萌, 阿里穆斯, 朱丹\*

(中央民族大学 中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室, 北京 100081)

**[摘要]** **目的:** 优选嘎日迪散有效部位的提取工艺, 为后期中试生产提供实验依据。**方法:** 采用非水滴定法测定总生物碱含量; 利用UV测定总黄酮含量, 检测波长500 nm。以嘎日迪散中总生物碱和总黄酮质量分数为指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、溶剂用量、回流时间及提取次数对提取工艺的影响, 利用TLC和LC-MS/MS确定提取物中部分生物碱类成分。**结果:** 影响总黄酮提取率的因素主次顺序为回流时间 > 溶剂用量 > 乙醇体积分数 > 提取次数, 最佳提取条件组合为加22倍量70%乙醇提取5 h; 影响总生物碱提取率的因素主次排序为乙醇体积分数 > 回流时间 > 溶剂用量 > 提取次数, 最佳提取条件组合为加26倍量80%乙醇提取4 h; 总生物碱和总黄酮质量分数分别为0.139%, 0.465%。**结论:** 根据生产实际条件和成本考虑, 确定嘎日迪散最佳提取工艺为加22倍量70%乙醇回流提取5 h。野罂粟中主要生物碱类成分为野罂粟碱、黑龙辛甲醚、瑞芙热米定和黑龙辛。

**[关键词]** 嘎日迪散; 野罂粟; 阿给; 有效部位; 溃疡性结肠炎

**[中图分类号]** R283.6; R284.2; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0031-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014210031

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1116.008.html>

**[网络出版时间]** 2014-09-15 11:16

## Optimization of Extraction Process of Effective Fraction from Garidi Powders by Orthogonal Test

PEI Ling-yan, CUI Jian, LIU Wei-zhi, QIN A-na, WANG Han-cong,  
WANG Meng-meng, Borjigidai Almaz, ZHU Dan\*

(Key Laboratory of Chinese Minority Traditional Medicine, State Nationalities Affairs Commission and Ministry of Education, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of effective fraction in Garidi powders and provide experimental evidence for pilot production at later stage. **Method:** The content of total alkaloids was determined by non-aqueous titration; UV was adopted to determine the content of total flavonoids with detection wavelength at 500 nm. Taking contents of total alkaloids and total flavonoids as indexes, orthogonal test was used to optimize extraction process with ethanol concentration, solid-liquid ratio, extracting time and times as factors, TLC and LC-MS were employed to confirm alkaloids types in extract. **Result:** Influencing factors acting on yield of total flavonoids was in the order of reflux time > solid-liquid ratio > ethanol concentration > extraction times, optimum extraction conditions of total flavonoids was: extracted 5 h with 22 times the amount of 70% ethanol. Factors acted yield of total alkaloids by ethanol concentration > reflux time > solid-liquid ratio > extraction times, optimum extraction conditions was as followings: extracted 4 h with 26 times the volume of 80% ethanol; mass fractions of total alkaloids and total flavonoids were 0.139% and 0.465%, respectively. **Conclusion:** According to actual

**[收稿日期]** 20130408(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273872); 中央民族大学自主科研项目(1112KYZD06); 北京市教育委员会科技成果转化与产业化项目(2012); 北京市自然科学基金项目(2013513); 北京市科技新型计划项目(2009A72)

**[第一作者]** 裴玲燕, 在读硕士, 从事蒙医药的研究与开发, Tel: 18811592408, E-mail: peilingyan@126.com

**[通讯作者]** \*朱丹, 研究员, 博士生导师, 从事防治心脑血管病的药物研究, Tel: 010-68933254-839, E-mail: zhudanredzzz@gmail.com

conditions of production and cost, optimum extraction conditions of Garidi powders is as following: reflux extract 5 h with 22 times the volume of 70% ethanol. Main compositions of alkaloids in *Papaver nudicaule* are nudicauline, amurensinine, reframidine and amurensine.

[ **Key words** ] Garidi powders; *Papaver nudicaule*; *Artemisia frigida*; effective parts; ulcerative colitis

蒙古族药嘎日迪散<sup>[1]</sup>是蒙古族医学临床上治疗包如病的经典方剂,源自额尔德尼班智达·松巴堪布所著《甘露依法从新》。该方由蒙古族药阿给和野罂粟组成。阿给,味苦,性燥、淡、糙、钝、凉,具有止血、消肿、消“奇哈”之功效,用于各种出血、关节肿胀、肾热、月经不调、疮痍等,是常用的“人造甘露水”组成之一<sup>[2]</sup>;野罂粟,味酸、涩、微苦,性微寒,归肺、大肠、肾、胃经,功能敛肺涩肠、燥湿解毒,在北方各民族中主要用于止泻。但嘎日迪散临床应用时存在服用量偏大、药物易发霉、不易贮存等问题,拟通过富集药材的有效部位,减少服用量,同时解决药物微生物超标的问题。

前期研究发现野罂粟抗腹泻作用成分主要为生物碱类成分,阿给有效成分主要为黄酮类物质<sup>[3]</sup>。故本实验采用正交试验结合 TLC 和 LC-MS/MS 优选嘎日迪散有效部位的提取工艺,为该制剂的后期中试水平放大生产提供实验依据。

## 1 材料

ZD-2 型电位滴定仪(上海雷磁),UV-4802H 型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司),LCMS-IT-TOF 型液相色谱离子阱飞行时间串联质谱(日本 Shimadzu 公司,配有 LC-20AD 型泵,SPD-M20A 型紫外检测器,CBM-20A 型控制器,SIL-20A 型自动进样器,CTO-10AS vp 型控温箱,LC solution 软件),Alpha1-2 型真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司),5804R 型离心机(德国 Eppendorf 公司),AR1530 型电子天平(美国奥豪斯公司)。

野罂粟 *Papaver nudicaule* L.,阿给 *Artemisia frigida* Willd. 均购自内蒙古药材采购供应公司,经中央民族大学中国少数民族传统医学研究院阿里穆斯副教授鉴定;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 L106-73WP),预制硅胶板(青岛海洋化工厂分厂),水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 总生物碱的含量测定** 量取提取液 10 mL,平行取 2 次,置于蒸发皿中水浴蒸干,干膏用冰乙酸 20 mL 使溶解,于 7 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 次,每次 20 min,取上清液,弃去沉淀。采用 2010 年版《中国药典》二部附录 VII 中非水滴定法测定,以 0.1 mol·L<sup>-1</sup>

高氯酸的冰乙酸标准溶液为滴定液对提取物的冰乙酸溶液进行滴定,采用电位滴定法指示滴定终点并计算生药材中总生物碱的质量分数(W)。

$$W = \frac{c(v - v_0) \times M}{m \times 1\,000} \times 100\%$$

式中  $c$  为高氯酸标准溶液的浓度, $v$  为样品消耗高氯酸溶液的体积, $v_0$  为空白试验消耗高氯酸溶液的体积, $m$  为生药材的质量, $M$  为野罂粟总生物碱中含量较高的 4 种生物碱类成分<sup>[4]</sup>的平均相对分子质量(326.5)。由于生药材中总生物碱含量较低,空白溶剂对试验结果几乎无影响,故将空白试验消耗的滴定剂体积忽略不计。

## 2.2 总黄酮的含量测定

**2.2.1 对照品溶液配制** 精密称取芦丁对照品 5 mg,置 25 mL 量瓶中,加入适量甲醇,置水浴上微热溶解,放冷,加甲醇定容至刻度,摇匀,待用。

**2.2.2 标准曲线的绘制** 精密量取对照品溶液 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 mL, 分别置于 7 个带刻度的试管中,各加水至 1.5 mL,加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.25 mL,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 0.25 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 2.5 mL,放置 15 min,以相应试剂为空白对照,按 2010 年版《中国药典》附录 VA 中 UV 于 500 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程  $A = 5.06C - 0.0327$  ( $r = 0.9998$ ),线性范围 0.033 ~ 0.2 g·L<sup>-1</sup>。

**2.2.3 样品溶液的配制及测定** 将提取液用冷冻干燥机干燥,研磨成固体小颗粒,用石油醚萃取脱脂,加适量甲醇分 3 次超声溶解,过滤,合并滤液,加甲醇定容至 100 mL。精密量取该溶液 50 μL,加水至 1.5 mL,按 2.2.2 项下方法显色,于 500 nm 处测定 A,计算总黄酮质量浓度并折合成所占生药材的质量分数。

**2.3 正交试验优选**<sup>[5-6]</sup> 选择乙醇体积分数、溶剂用量、回流时间及提取次数为考察因素,每个因素设定 3 个水平,以总生物碱和总黄酮质量分数为评价指标,通过 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表优选嘎日迪散有效部位的提取工艺条件。平行称取阿给和野罂粟生药材 9 份,其中阿给 72 g,野罂粟 45 g。将阿给和野罂粟混

合后,按试验设计条件进行提取,提取液减压浓缩,加水定容至 100 mL,备用,试验安排及结果见表 1。

表 1 嘎日迪散提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 乙醇 体积分 数/%	B 溶剂 用量 /倍	C 回流 时间 /h	D 提取 数/次	总黄酮 /%	总生物 碱/%
1	50	26	4	3	0.392	0.024
2	50	22	5	2	0.396	0.008
3	50	18	6	1	0.369	0.035
4	70	22	5	1	0.504	0.086
5	70	18	6	3	0.354	0.079
6	70	26	4	2	0.456	0.111
7	80	26	6	2	0.418	0.103
8	80	22	4	1	0.437	0.104
9	80	18	5	3	0.442	0.096
总黄酮	$K_1$	0.386	0.422	0.428	0.396	
	$K_2$	0.438	0.446	0.447	0.423	
	$K_3$	0.432	0.388	0.380	0.437	
	$R$	0.052	0.058	0.067	0.041	
总生物碱	$K_1$	0.022	0.080	0.080	0.067	
	$K_2$	0.092	0.066	0.063	0.074	
	$K_3$	0.101	0.070	0.072	0.075	
	$R$	0.131	0.014	0.017	0.008	

由直观分析可知,影响嘎日迪散总黄酮部位提取率的因素主次排序为  $C > B > A > D$ ,最佳提取条件组合为  $A_2B_2C_2D_3$ 。影响总生物碱提取率的因素主次排序为  $A > C > B > D$ ,最佳提取条件组合为  $A_3B_1C_1D_3$ 。综合生产成本等考虑,选择  $A_2B_2C_2D_3$  为提取最佳条件,即加 22 倍量 70% 乙醇回流提取 5 h。该提取条件富集得到的总生物碱含量约为 0.139%,总黄酮含量约 0.465%。

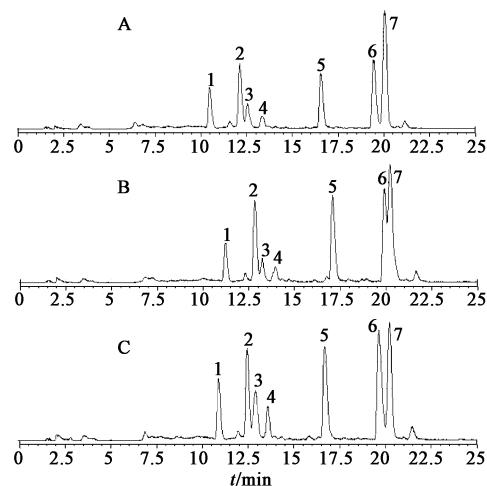
**2.4 LC-MS/MS 分析溶剂对野罂粟总生物碱富集的影响** 称取野罂粟生药材 3 份,每份 0.1 g,分别加入 50%,70%,80% 的甲醇(实验室操作换用甲醇)溶液,超声提取 2 h,经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤上清液约 0.9 mL 至进样瓶中,备用。

**2.4.1 色谱条件** Shimadzu Shim-pack VP-ODS 色谱柱(2.0 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相水(A)-乙腈(B)(0 ~ 25 min, 10% ~ 30% B),流速 0.2 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

**2.4.2 质谱条件** 离子源 ESI,正离子扫描,扫描范围  $m/z$  100 ~ 1 200,加热模块温度 200  $^{\circ}\text{C}$ ,CDL 温度 200  $^{\circ}\text{C}$ ,雾化气流速 1.5 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,干燥气体压力

103.0 kPa,IT 真空度 1.8 e<sup>-002</sup> Pa,TOF 真空度 1.9 e<sup>-004</sup> Pa,正离子模式 4.5 kV,检测器电压 1.57 kV。

根据康少文等<sup>[7-10]</sup>研究野罂粟中生物碱类成分的化学结构,选择的检测离子质荷比分别为  $m/z$  324 ~ 325 ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  326 ~ 327 ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  340 ~ 341 ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  328 ~ 329 ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  348 ~ 349 ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  370 ~ 371 ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  382 ~ 383 ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  398 ~ 399 ( $[M + H]^+$ )。50% 甲醇提取物中 7 个主峰峰面积总和 6.088  $\times 10^8$ ,70% 甲醇提取物中 7 个主峰峰面积总和 6.808  $\times 10^8$ ,80% 甲醇提取物中 7 个主峰峰面积总和 8.414  $\times 10^8$ 。说明 80% 甲醇提取条件下总生物碱含量高于 50% 甲醇和 70% 甲醇,3 个样品图中 7 个主峰  $[M + H]^+$  相对分子质量主要集中在 340.15,328.15,326.13,324.12,340.26。



A. 50% 甲醇; B. 70% 甲醇; C. 80% 甲醇

图 1 野罂粟总生物碱不同提取物 LC-MS/MS 正离子谱

**2.5 TLC 考察溶剂浓度对野罂粟总生物碱富集的影响** 按文献记载<sup>[11]</sup>,展开剂选用甲苯-丙酮-无水乙醇-氨水(4:4:0.6:0.04)。待测液同 2.4 项,选用市售硅胶预制板进行上行展开。硅胶板规格 50 mm  $\times$  100 mm,厚度 0.20 ~ 0.25 mm。采用改良后的碘化铋钾溶液作为显色剂,结果表明 70% 和 80% 甲醇提取物中总生物碱量高于 50% 甲醇。

### 3 讨论

本文采用 LC-MS/MS 测得的 7 个准分子离子峰的总峰面积值,在采用不同浓度溶剂提取条件下的相对大小与非水滴定法测得的总生物碱含量的相对大小一致,结果显示测得的  $[M + H]^+$  的主要相对分子质量为 324,326,328,340,根据文献可知这 4 种生物碱类成分的结构<sup>[4,7-9]</sup>,见图 2。

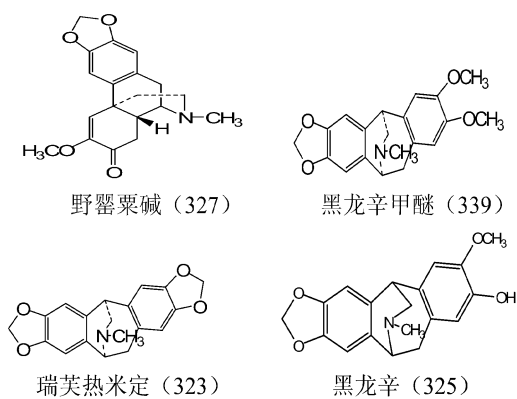


图 2 野罌粟中 4 个生物碱成分结构

LC-MS/MS 初步探究发现,本实验室采用热回流法富集得到的野罌粟生物碱类成分主要为以上 4 种,为深入探究嘎日迪散抗溃疡性结肠炎机制奠定物质基础。经 TLC 显色发现,斑点主要集中在 80% 甲醇提取液的区域,且可观察到 4 个显色相对明显的斑点,说明本文研究的嘎日迪散生物碱主要为 4 种脂溶性生物碱类成分,与文献[3]报道一致,进一步验证了 LC-MS/MS 的试验结果。

[参考文献]

[1] 崔箭,庞宗然,德利格玛,等. 嘎日迪散治疗溃疡性结

肠炎 60 例临床观察[J]. 天津中医药,2012,29(1):17.

[2] 奥·乌力吉,布日额,吴秋实. 蒙药才阿给的民族植物学研究[J]. 中药材,2001,24(6):394.

[3] 刘朝晖,佟继铭,崔箭,等. 野罌粟不同提取物止泻作用的筛选研究[J]. 云南中医中药杂志,2006,27(1):51.

[4] 康少文,于永芳,李翠芹. 野罌粟微量生物碱黑龙辛的研究[J]. 承德医学院学报,1985(2):1.

[5] 汪秋安,范华芳,廖头根. 有机化学实验室技术手册[M]. 北京:化学工业出版社,2012:27.

[6] 赵琳琳,马燕,赵媛,等. 栝楼根丸水提取工艺正交优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):24.

[7] 康少文. 野罌粟有效成分的研究(第一报)[J]. 中草药通讯,1979,10(12):8.

[8] 康少文. 野罌粟有效成分的研究(第二报)[J]. 中草药,1980,11(1):14.

[9] 康少文. 野罌粟有效成分的研究(第三报)[J]. 中草药,1980,11(11):481.

[10] 张沿军,于永芳,康少文. 野罌粟蒴果化学成分研究(I)[J]. 中草药,1997,28(1):7.

[11] 高晓燕,张沿军,康少文. 野罌粟全草总生物碱含量动态分析[J]. 承德医学院学报,1995,12(4):307.

[责任编辑 刘德文]

## 《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline,Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www.cjcmm.com.cn