

正交试验法优选马钱子渗漉提取工艺

秦婷¹, 李平², 郭金甲², 杨冬丽², 王志文^{1*}, 王春民^{2*}

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000;

2. 颈复康药业集团有限公司, 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 优选腰痛宁贴膏中马钱子的渗漉提取工艺。方法: 以土的宁转移率为指标, 采用正交试验法考察乙醇体积分数、溶媒用量和渗漉速度对马钱子渗漉提取工艺的影响。采用 HPLC 测得土的宁含量, 色谱条件为流动相甲醇-水-冰醋酸(20:96:7, 三乙胺调节 pH 3.10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果: 最佳提取工艺为加 15 倍量 70% 乙醇以 2 mL·kg⁻¹·min⁻¹ 的速度渗漉提取, 土的宁转移率 >90%。结论: 优选的提取工艺合理、重复性好, 对腰痛宁贴膏的工业化生产具有指导意义。

[关键词] 马钱子; 渗漉法; 正交试验; 提取工艺; 土的宁; 含量测定; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0044-03

[doi] 10.11653/syjf2013220044

Optimization of Percolation Process of Strychni Semen from Yaotongning Plasters by Orthogonal Test

QIN Ting¹, LI Ping², GUO Jin-jia², YANG Dong-li², WANG Zhi-wen^{1*}, WANG Chun-min^{2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. Jingfukang Pharmaceutical Group Co. Ltd, Hebei Engineering Technology Research Center of New Excipients for Traditional Chinese Medicine, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize percolation process of Strychni Semen from Yaotongning plasters. **Method:** With transferring rate of strychnine as index, orthogonal test was adopted to optimize percolation extraction technology with the concentration and amount of ethanol, percolation rate as factors. The content of strychnine was determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: mobile phase of methanol-water-acetic acid (20:96:7, pH was adjusted to 3.10 with triethylamine), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength 254 nm. **Result:** Optimum percolation process was added 15 times the amount of 70% ethanol with percolation speed of 2 mL·kg⁻¹·min⁻¹. Under these conditions, transferring rate of strychnine was more than 90%. **Conclusion:** Optimized extraction technology was reasonable, convenient and feasible, this study had guiding significance for industrial production of Yaotongning plasters.

[Key words] Strychni Semen; percolation; orthogonal test; extraction technology; strychnine; content determination; HPLC

马钱子性苦、温, 具有通络止痛、散结消肿的功效^[1], 常用于治疗跌打损伤、骨折肿痛、风湿顽痹、

麻木瘫痪等骨伤科类疾病^[2], 亦具有抗肿瘤作用^[3]。腰痛宁贴膏由马钱子、苍术、川牛膝、乳香等

[收稿日期] 20130421(001)

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目(09276414D)

[第一作者] 秦婷, 在读硕士, 高级工程师, 从事新药研制开发及专利管理研究, Tel:0314-2292079, E-mail:dwtuvyps@sohu.com

[通讯作者] * 王志文, 硕士生导师, 教授, 从事中医学教学与研究, Tel:0315-3726325, E-mail:wangzhiwen_1955@163.com;

* 王春民, 硕士, 主任药师, 从事新药开发研究, Tel:0314-2292103, E-mail:13603140779@139.com

10味中药组成,具有消肿止痛、疏散寒邪、温经通络的之功效,用于治疗腰椎间盘突出,坐骨神经痛、慢性风湿性关节炎等症。方中马钱子为君药,其主要药效成分马钱子总生物碱(1.8%~5.3%),有大毒,故采用渗漉法单独提取。总生物碱中以土的宁为主要成分,药理作用与马钱子碱相似,但疗效为后者的40倍^[4]。故本实验以土的宁转移率为考察指标,通过正交试验优选马钱子的渗漉提取工艺,为腰痛宁贴膏的临床应用及推广提供参考。

1 材料

SPD-10AVP型高效液相色谱仪(日本岛津),AL104型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。马钱子(由颈复康药业集团有限公司提供,经颈复康药业集团有限公司王春民主任中药师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(批号110705-200306,中国食品药品检定研究院),三乙胺、甲醇、冰乙酸为色谱纯,乙醇为食品级,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计^[5] 在预试验基础上,选取乙醇体积分数、溶剂用量和渗漉速度为考察因素,每个因素设定3个水平,以土的宁转移率为评价指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,筛选马钱子的最佳提取工艺条件,因素水平见表1。

表1 腰痛宁贴膏中马钱子提取工艺正交试验因素水平

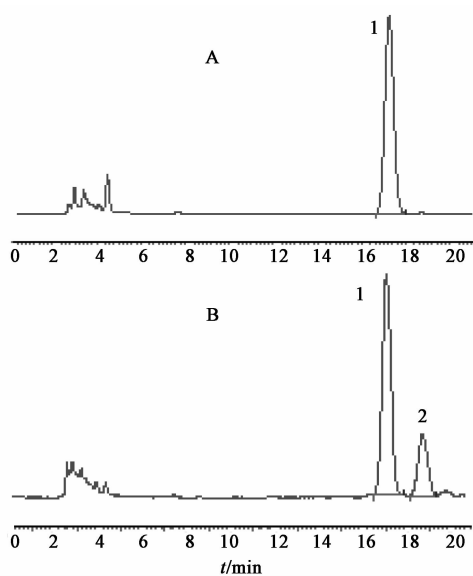
水平	A 乙醇体积 分数/%	B 溶剂用量 /倍	C 渗漉速度 /mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
1	70	9	1
2	60	12	2
3	50	15	3

2.2 土的宁的含量测定

2.2.1 色谱条件^[6] 用八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相甲醇-水-冰醋酸(20:96:7,三乙胺调节pH 3.10),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长254 nm,进样量10 μL。见图1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取土的宁对照品,加甲醇制成6 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取马钱子浸膏约0.2 g,置磨口锥形瓶中,加入三氯甲烷25 mL和浓氨水1.0 mL,密塞,超声处理10 min。提取液移入分液漏斗中,用三氯甲烷30 mL分次洗涤锥形瓶,洗涤液并入分液漏斗中,用0.5 mol·L⁻¹硫酸溶液提取3次,每次20 mL,合并硫酸液,加浓氨试液调节



A. 对照品; B. 供试品 1. 土的宁; 2. 马钱子碱

图1 马钱子 HPLC

pH 9~10,用三氯甲烷提取3次,每次20 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加适量甲醇溶解,并定容至50 mL滤过,精密量取续滤液1 mL置50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密量取土的宁对照品贮备液(115 mg·L⁻¹)0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL,分别置于25 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,按2.2.1项下条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 24\ 705X - 990.13$ ($r = 0.999\ 9$),表明土的宁在2.30~13.80 mg·L⁻¹与峰面积呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取土的宁对照品溶液10 μL,重复进样6次,按2.2.1项下条件测定,记录土的宁峰面积的RSD 0.90%。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液适量,分别于制备后0,2,4,8,12,24 h进样,按2.2.1项下条件测定,结果土的宁峰面积的RSD 0.75%,表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取同一批已知含量的浸膏样品约0.1 g,共称取9份,等分为3组,每组分别精密加入土的宁对照品溶液2,4,6 mL,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表2。

2.2.8 重复性试验 取同一批马钱子浸膏样品6份,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,结果土的宁含量的RSD 2.02%,表明该方法重复性良好。

表 2 士的宁含量测定的加样回收率试验

No.	样品中质量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.777 2	0.431 8	1.192 3	101.4	100.3	1.60
2	0.830 6	0.431 8	1.236 4	102.1		
3	0.861 1	0.431 8	1.287 7	100.4		
4	0.792 5	0.863 6	1.696 1	97.64		
5	0.815 3	0.863 6	1.685 3	99.62		
6	0.853 4	0.863 6	1.703 4	100.8		
7	0.883 9	1.295 4	2.126 1	102.5		
8	0.929 6	1.295 4	2.253 2	98.75		
9	0.876 3	1.295 4	2.187 2	99.29		

2.3 提取工艺优选 将制马钱子粉碎成粗粉,过 14 目筛备用。取制马钱子粗粉 9 份,每份 240 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计加入不同体积分数乙醇浸渍 24 h,渗漉提取,收集渗漉液,减压浓缩成相对密度约 1.30(25 ~ 30 ℃)的浸膏,测定浸膏中士的宁含量,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 3 腰痛宁贴膏中马钱子提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	士的宁转移率/%
1	1	1	1	1	85.65
2	1	2	2	2	86.53
3	1	3	3	3	96.97
4	2	1	2	3	81.86
5	2	2	3	1	82.19
6	2	3	1	2	95.37
7	3	1	3	2	73.70
8	3	2	1	3	80.27
9	3	3	2	1	94.36
K_1	269.2	241.2	261.3	262.2	
K_2	259.4	249.0	262.8	255.6	
K_3	248.3	286.7	252.9	259.1	
R	6.94	15.16	3.30	2.20	

表 4 马钱子提取工艺正交试验方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	72.9	2	36.45	10.04	>0.05
B	394.7	2	197.35	54.36	<0.05
C	36.25	2	18.12	4.99	>0.05
D(误差)	7.27	2	3.63	1.00	

注: $F_{0.1}(2,2) = 9.0, F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

由直观分析可知,各因素对马钱子提取工艺的影响顺序为 $B > A > C$ 。方差分析表明因素 B 对士的宁转移率影响显著,其他因素则无显著影响,最佳提取工艺为 $A_1B_3C_2$,即加 15 倍量 70% 乙醇以 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度渗漉。

2.4 验证试验 取同批制马钱子粗粉 3 份,每份 240 g,按最佳提取工艺条件进行渗漉,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果士的宁转移率分别为 93.20%, 92.98%, 93.36%, 浸膏提取率分别为 22.45%, 22.71%, 23.01%, 表明该提取工艺稳定可行、重复性较好。

3 讨论

渗漉提取属于动态浸出方法,溶剂利用率高,有效成分浸出完全,适用于贵重药材、毒性药材的提取,其中冷渗法还可保护有效成分。马钱子为毒性药材,预试验曾采用渗漉法与回流提取方法进行比较,结果发现渗漉法提取的生产成本较低,士的宁转移率(93%)高于回流提取法(89%),故选择渗漉法。马钱子主要有效成分为士的宁及马钱子碱等生物碱,为醇溶性成分,一般多采用酸性乙醇或含水乙醇提取^[7],酸性乙醇不利于乙醇的回收利用及后续制备工艺生产,故采用含水乙醇作为提取溶媒。

士的宁是马钱子中主要成份和药理活性成份,约占总生物碱的 45%,正交试验设计的关键在于提高士的宁转移率,马钱子碱毒性较大,药理活性弱,选取士的宁转移率作为考察指标适合工艺参数的优选。采用腰痛宁贴膏成品的含量测定方法对马钱子浸膏半成品进行检测,样品成份分离较好,且方法简便可行,利于半成品的质量控制。

[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: 47.

[2] 金翔, 周信, 马勇. 马钱子在骨伤科的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 198.

[3] 瞿叶清, 陈军, 林爱华, 等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 143.

[4] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用. 第 1~6 卷[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 777.

[5] 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.

[6] 秦婷, 李平, 郑艳春, 等. 反相高效液相色谱测定腰痛宁贴膏中士的宁及马钱子碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 78.

[7] 徐小龙. 马钱子总生物碱的提取工艺研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2010.

[责任编辑 仝燕]