

正交试验法优选醋泡马钱子的炮制工艺

王晓崑, 易炳学, 龚千锋*, 钟凌云, 余宏, 陈泣
(江西中医学院药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 优选醋泡马钱子的炮制工艺。方法: 采用单因素试验和正交试验优选醋泡马钱子的炮制工艺, 考察醋种类、药液比、醋浸时间、水漂时间对马钱子中毒性成分马钱子碱和土的宁含量的影响。采用 HPLC 测定马钱子碱和土的宁含量, 色谱条件为依利特 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水-二乙胺 (34: 100: 1), 检测波长 258 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果: 醋泡马钱子的最佳炮制工艺为选用香醋, 药液比 (3: 14), 醋浸时间 1 d, 水漂时间是 1 d, 马钱子碱和土的宁平均质量分数分别为 0.131 5%, 0.177 3%。结论: 优选的炮制工艺稳定可行、重复性好, 可用于降低马钱子毒性。

[关键词] 醋; 马钱子; 马钱子碱; 土的宁; 正交试验

[中图分类号] R283.3; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0013-03

[doi] 10.11653/syjf2013210013

Optimization of Processing Technology for Strychni Semen with Vinegar by Orthogonal Test

WANG Xiao-wei, YI Bing-xue, GONG Qian-feng*, ZHONG Ling-yun, YU Hong, CHEN Qi
(College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of Strychni Semen with vinegar. **Method:** Single factor tests and orthogonal test were optimized processing technology of Strychni Semen with vinegar, effects of kinds of vinegar, ratio of drug and liquid, vinegar soaking time and blanching time on the contents of brucine and strychnine were investigated. The contents of brucine and strychnine were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Elite Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-water-diethylamine (34: 100: 1), detection wavelength 258 nm, flow rate 1 mL·min⁻¹, column temperature 30 ℃. **Result:** The best processing technology of Strychni Semen with vinegar was: balsamic vinegar, proportion of drug and liquid (3: 14), vinegar soaking time 1 d and blanching time 1 d. The contents of brucine and strychnine were 0.131 5%, 0.177 3%, respectively. **Conclusion:** Optimized processing technology was stable, feasible and reproducible, it could be used to reduce toxicity of Strychni Semen.

[Key words] vinegar; Strychni Semen; brucine; strychnine; orthogonal test

马钱子性温, 味苦, 有大毒, 归肝、脾经, 具有散

结消肿、通络止痛之功效, 临床用于治疗跌打损伤、骨折肿痛、痈疽疮毒、咽喉肿痛、风湿顽痹、麻木瘫痪等症^[1]。马钱子的炮制方法包括麻黄炙、煮制、砂烫、绿豆制、烘烤法、尿泡马钱子等^[2], 其中江西樟帮特色的尿泡马钱子沿用至今, 应用较为普遍, 记载于《江西省中药饮片炮制规范》^[3], 但尿泡马钱子的辅料尿液不卫生, 气味难以下咽。龚腊根等^[4]研究表明醋泡马钱子可代替尿泡马钱子, 因为马钱子经醋制后可中和马钱子生物碱以达到降低药物毒性的

[收稿日期] 20130427(019)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项 (201007011)

[第一作者] 王晓崑, 在读硕士, 从事中药炮制学研究, Tel: 18070406940, E-mail: enchjake@163.com

[通讯作者] * 龚千锋, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制学研究, Tel: 0791-87118852, E-mail: gongqf2002@163.com

作用,且酸入肝,可增强药物疏肝解郁、止痛的功效。本实验以马钱子碱和土的宁含量为检测指标,采用正交试验优选醋泡马钱子的炮制工艺,为醋泡马钱子的临床应用提供实验依据。

1 材料

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(上海仪先仪器有限公司),HH-2 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),FA-1004N 型 1/10 万电子分析天平(上海精科有限公司),GZX-9146MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司),SZ-93A 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器有限公司)。

马钱子(购自江西樟树天齐堂饮片有限公司,经江西中医学院范崔生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、马钱子碱对照品(均购于成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为 S-035-120526, M-053-120606,纯度均 >98.5%),白醋、陈醋、香醋(湖南省长康实业有限责任公司,总酸度均 $\geq 0.04 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

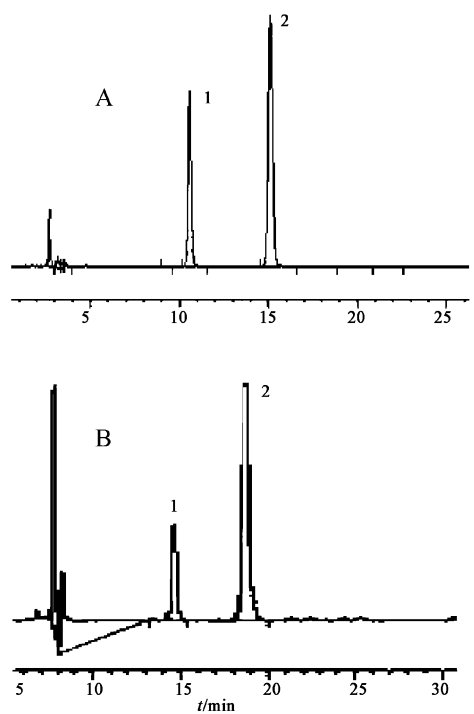
2.1 马钱子碱和土的宁的含量测定

2.1.1 色谱条件 依利特 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水-二乙胺(34:100:1),检测波长 258 nm,流速 1 mL \cdot min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品土的宁、马钱子碱 6, 5 mg,精密称定,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,分别精密量取 2 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 0.12, 0.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 将生马钱子粉碎成粗颗粒,称取 10 g 置于圆底烧瓶中,加 10 倍量水浸泡 30 min,回流煎煮 2 h,趁热过滤,用适量水洗涤残渣 3 次,合并洗涤液和滤液,置于旋转蒸发器中减压浓缩至 50 mL,备用。精密量取制马钱子单煎液 10 mL,用氨水调 pH 9,用三氯甲烷萃取 4 次,每次 25 mL,合并萃取液,用三氯甲烷定容至 100 mL,精密移取 10 mL 至表面皿中,挥干三氯甲烷,加适量甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,用甲醇定容,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20 μL ,按 2.1.1 项下色谱条件进样分析,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归



A. 对照品; B. 供试品; 1. 马钱子碱; 2. 土的宁

图 1 醋泡马钱子 HPLC

方程 $Y_{\text{马钱子碱}} = 37168X - 0.0016 (R^2 = 1)$, $Y_{\text{土的宁}} = 37784X - 0.062 (R^2 = 1)$,表明马钱子碱、土的宁分别在 0.61 ~ 30.94, 0.98 ~ 49.30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 取同一供试品溶液,重复进样 6 次,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算土的宁、马钱子峰面积的 RSD 分别为 2.04%, 0.54%,说明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批醋泡马钱子适量,共 6 份,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算土的宁、马钱子峰面积的 RSD 分别为 0.89%, 1.09%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品试液,每隔 6 h 测定 1 次,连续考察 24 h,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算土的宁、马钱子峰面积的 RSD 分别为 0.90%, 0.53%,说明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.8 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的醋泡品 6 份,每份 0.1 g,精密称定,精密加入对照品适量,按 2.1.3 项下方法制备样品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算土的宁、马钱子碱的平均回收率分别为 97.2% (RSD 0.85%), 98.3% (RSD 1.89%),该方法稳定可靠。

2.2 炮制工艺优选 将马钱子药材进行大小分档,取净马钱子水浸 2 d,润 0.5 d,做切片前软化处理,切成 1.5 mm 厚的薄片^[4]。称取马钱子饮片 15 mg,共 9 份,以马钱子碱、土的宁含量的综合评分为指标,权重系数分别为 0.4、0.6,选取醋种类、醋用量、醋浸时间、水漂时间为考察因素,各因素选取 3 个水平进行试验设计,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 醋制马钱子炮制工艺正交试验因素水平

水平	A 醋种类	B 醋用量 /mL	C 醋浸时间 /d	D 水漂时间 /d
1	香醋	70	2	1
2	陈醋	110	5	3
3	白醋	150	8	5

表 2 醋制马钱子炮制工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	马钱子碱 /%	土的宁 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	0.060	0.174	100
2	1	2	2	2	0.033	0.122	64
3	1	3	3	3	0.032	0.102	56
4	2	1	2	3	0.037	0.127	69
5	2	2	3	1	0.026	0.082	45
6	2	3	1	2	0.028	0.083	48
7	3	1	3	2	0.039	0.121	68
8	3	2	1	3	0.029	0.074	45
9	3	3	2	1	0.032	0.093	53
K_1	220.0	236.6	193.0	198.0			
K_2	162.0	154.4	185.6	180.0			
K_3	166.0	157.0	169.4	169.6			
R	19.3	27.4	7.8	34.0			

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	232.72	2	116.36	7.29	>0.05
B	486.32	2	243.16	15.24	>0.05
D	699.5	2	349.75	21.91	<0.05
C(误差)	31.92	2	15.96	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

由直观分析可知,各因素对炮制工艺的影响顺序为水漂时间 > 醋用量 > 醋种类 > 醋浸时间。以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析,因素 D 对炮制工艺的影响具有显著性差异,因素 A、B 则无显著性影响,确定最佳炮制工艺为选用香醋,醋用量 70 mL(3:14),醋浸时间 1 d,水漂时间 1 d。

2.3 验证试验 分别称取马钱子生品 30,45,60,75,90,105 g,分别加 14 倍量 pH 5 的香醋按优选的炮制工艺进行醋炙,制备供试品溶液,进行 HPLC 测定,结果马钱子碱质量分数分别为 0.129%,0.132%,0.130%,0.134%,0.131%,0.133%,土的宁质量分数分别为 0.178%,0.176%,0.179%,0.178%,0.176%,0.177%。

3 讨论

尿泡马钱子的辅料童子尿^[5]含有尿酸和尿激酶等刺激成分,且炮制周期长^[6]。辅料醋对中药的药性及解毒、增效均具有特殊意义,研究成果较多^[7]。2010 年版《中国药典》记载马钱子的炮制品种仅为砂烫品,提示在醋制马钱子的炮制工艺还有待于完善。目前,马钱子的成分分析、药理方面研究较多,如总生物碱的定量分析及指纹图谱^[8]、总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用^[9]等,利用现代科学方法,对传统以经验为主的炮制方法进行规范化研究,有利于投入大生产,更好为临床服务。

[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] 叶定江. 马钱子炮制历史沿革的研究[J]. 中国中药杂志,1993,18(5):259.

[3] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[S]. 上海:上海科学技术出版社,2008:264.

[4] 龚腊根,余选民,闵贵春. 马钱子炮制工艺研究[J]. 中药通报,1984,9(2):19.

[5] 邓富明,余寿祥,张海云. 樟树中药传统炮制法[M]. 南昌:江西人民出版社,1983:113.

[6] 龚千锋,袁小平,钟凌云,等. 中药材炮制加工方法图解[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:83.

[7] 毛淑杰,李先端,马志静,等. 中药炮制辅料的规范化示范研究 II——醋的现代研究概况[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(8):48.

[8] 屈艳格,陈军,蔡宝昌. 马钱子总生物碱的定量分析及其 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):76.

[9] 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.

[责任编辑 仝燕]