

中药血散薯中总生物碱提取工艺优选

薛佳津¹,杨瑞云^{1*},韦波¹,刘静¹,梁敏¹,罗艳²

(1. 广西师范大学化学化工学院,药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室,广西 桂林 541004;
2. 广西医科大学药学院,南宁 530021)

[摘要] 目的:优选血散薯总生物碱的提取工艺。方法:以总生物碱得率为指标,采用单因素和正交试验法考察乙醇体积分数、料液比、提取时间、pH 对血散薯总生物碱得率的影响。结果:血散薯中总生物碱的最佳提取工艺为 16 倍量 70% 乙醇提取 2.0 h,pH 2.0。结论:该优选工艺能较好的提取血散薯中的生物碱。
[关键词] 血散薯;生物碱;提取;离子交换树脂
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)14-0036-03

Optimization of Extraction Technology of Total Alkaloids
from *Stephania dielsiana*

XUE Jia-jin¹, YANG Rui-yun^{1*}, WEI Bo¹, LIU Jing¹, LIANG Min¹, LUO Yan²

(1. Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Ministry of Education of China; College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective: To optimize extraction technology of total alkaloids in *Stephania dielsiana*. Method: With yield of total alkaloids as index, effect of the concentration of ethanol, solid-liquid ratio, extraction time and pH on yield of total alkaloids was investigated by orthogonal test and single factor test. Result: The best extraction conditions were as follows: extracted 2 h with 16 times the amount of 70% ethanol, pH 2.0. Conclusion: This optimized technology was suitable for extraction of total alkaloids in *S. dielsiana*.
[Key words] *Stephania dielsiana*; alkaloids; extraction; ion exchange resin

血散薯为防己科千金藤属植物,主要分布于我国西南部和南部各省区,以块茎和根部入药^[1],具有清热凉血、散瘀消肿、止咳化痰的功效,可治中暑发烧、血瘀腹痛、咳嗽咯血、淋巴结核等症^[2-3]。目前,对血散薯中生物碱的提取纯化工艺研究较少。

本课题组在前期对血散薯化学成分的研究中发现大量生物碱成分,其中含量最大的是千金藤碱。千金藤碱为阿朴菲类生物碱,具有抗癌、抗肿瘤、抑制中枢神经系统及解痉的作用^[4]。本文利用紫外-可见分光光度法^[5-6],以千金藤碱为对照品,以溴甲酚绿缓冲液为显色剂,通过正交试验法对血散薯中总生物碱的提取工艺进行优选,旨在为血散薯中生物碱的开发利用提供依据。

1 材料

TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通仪器有限公司),BS124S 型电子天平[赛多利斯(北京)科学有限公司],DZF-1B 型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

血散薯(购自桂林市药材市场,由广西师范大学生命科学院谢强副教授鉴定为 *Stephania dielsiana*

[收稿日期] 20120224(013)
[基金项目] 973 计划前期研究专项(2007CB516805);广西科技厅应用基础研究(桂科基 0731050);药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室主任基金(CMEMR2011-19);广西自然科学基金创新团队项目(2010GXNSFF013001)
[第一作者] 薛佳津,在读硕士,从事天然有机化学研究,Tel: 15296803325,E-mail: xue_jia_jin@163.com
[通讯作者] * 杨瑞云,博士,副教授,从事天然有机化学研究,Tel:18978339921,E-mail: yang_rui_yun@163.com

Y. C. Wu), 千金藤碱对照品(纯度 98%, 实验室自制), 732 强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂(成都市科龙化工试剂厂), 所用试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 总生物碱含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取千金藤碱对照品 4.0 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加三氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取血散薯粗粉 4.0 g, 用 80 mL 三氯甲烷加热回流提取 4.0 h, 冷却后将提取液转移到 100 mL 量瓶中, 加三氯甲烷至刻度, 摇匀, 精密吸取 1.0 mL 溶液移入 25 mL 量瓶中, 加三氯甲烷至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 溴甲酚绿缓冲液的制备 精密称取溴甲酚绿 0.125 g, 用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 12.5 mL 溶解, 移入 250 mL 量瓶中, 加少量水溶解的邻苯二甲酸氢钾 0.002 5 g, 加水至刻度, 摇匀, 备用。

2.1.4 最大吸收波长确定 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 1.0 mL, 分别移入装有 5.0 mL 三氯甲烷的 2 个分液漏斗中, 各加入溴甲酚绿缓冲液 3.0 mL 和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 1.0 mL, 振摇 1.0 min, 静置 30 min, 以三氯甲烷加溴甲酚绿缓冲液和 $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 萃取液为空白, 于 190 ~ 600 nm 进行扫描^[7-8], 结果在 412 nm 处有最大吸收, 故选定 412 nm 为检测波长。

2.1.5 标准曲线的绘制 精密吸取 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 对照品溶液分别移入 5.0 mL 量瓶中, 加三氯甲烷定容至刻度, 振摇, 移至分液漏斗中, 精密加入溴甲酚绿缓冲液和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 各 1.0 mL, 摇匀, 静置, 取澄清的三氯甲烷溶液于 412 nm 波长处测定吸光度(A), 以质量浓度为纵坐标, A 为横坐标, 进行线性考察, 得回归方程 $A = 0.0428C - 0.0015$ ($R^2 = 0.9991$)。千金藤碱在 4 ~ 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.1.6 精密度试验^[9] 取供试品溶液, 于 412 nm 波长处重复测定 5 次, RSD 0.39%, 表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在室温下每隔 1 h 进行测定, 结果 RSD 1.08%, 表明样品在 5.0 h 内稳定。

2.1.8 加样回收试验 索氏提取器中加入精密称取已测定含量的样品粉末 2.0 g, 精密称取千金藤碱对照品 1.0 mg, 以三氯甲烷 80 mL 提取 4.0 h, 冷却后转移至 100 mL 量瓶中, 加三氯甲烷稀释至刻度,

摇匀, 依法测定, 结果平均回收率为 98.72% ($n = 5$), RSD 1.10%。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 乙醇体积分数的考察 精密称取的血散薯样品 7 份, 每份 4.0 g, 分别以 10 倍量体积分数为 10%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95% 的乙醇回流提取 2.0 h, 过滤, 浓缩得血散薯提取物浸膏, 测定 A, 计算总生物碱得率分别为 2.50%, 3.08%, 3.26%, 3.47%, 3.68%, 2.99%, 2.64%。由结果可知, 总生物碱得率随着乙醇体积分数的增加逐渐增加, 但乙醇体积分数 > 70% 后总生物碱得率随乙醇体积分数的增加陡然减少。故选择 70% 乙醇提取效果最佳。

2.2.2 料液比的考察 精密称取的血散薯样品 5 份, 每份 4.0 g, 分别用 80% 乙醇以料液比 8:1, 12:1, 16:1, 20:1, 25:1 回流提取 2.0 h, 过滤, 浓缩得浸膏, 测定 A, 计算总生物碱得率分别为 2.62%, 2.88%, 3.12%, 3.13%, 3.14%。由结果可知, 总生物碱得率随着料液比增加不断增大。但当料液比 > 16:1 时, 总生物碱得率增加缓慢, 说明血散薯中生物碱类化合物溶出量已趋向最大值。故选择液料比 16:1 进行考察。

2.2.3 提取时间的考察 精密称取的血散薯样品 5 份, 每份 4.0 g, 用 64 mL 80% 乙醇分别提取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h, 过滤, 浓缩得浸膏, 测定 A, 计算总生物碱得率分别为 2.61%, 2.63%, 3.48%, 3.52%, 3.54%。由结果可知, 总生物碱得率随提取时间增长而增大, 但 2.0 h 后总生物碱得率增长速度减缓。故选择 2.0 h 为最佳提取时间。

2.2.4 pH 考察^[10] 精密称取血散薯样品, 每份 4.0 g, 分别加入 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 的 80% 乙醇 50 mL 回流提取 2.0 h, 过滤, 浓缩得浸膏, 测定吸光度, 计算总生物碱得率分别为 3.28%, 2.92%, 2.07%, 1.18%, 0.75%。由结果可知, 总生物碱得率随 pH 上升而下降, 强酸环境中提取率高。故选择 pH 2.0 为最佳。

2.3 正交试验设计 根据单因素试验结果, 选取乙醇体积分数、液料比、提取时间、pH 为考察因素, 以总生物碱含量为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素水平安排见表 1, 正交试验结果见表 2, 方差分析见表 3。每份称取 4.0 血散薯样品。

从单因素试验可知, D 为影响生物碱提取的最主要因素。由表 2 结果可知, 影响血散薯总生物碱提取的主次因素为 $D > A > B > C$, 即 pH > 乙醇体

表 1 血散薯总生物碱的提取工艺正交试验因素水平				
水平	A 乙醇体积 分数/%	B 料液比 /mL·g ⁻¹	C 提取时间 /h	D pH
1	60	12∶1	1.0	2
2	70	16∶1	1.5	3
3	80	20∶1	2.0	4

表 2 血散薯总生物碱的提取工艺正交试验安排					
No.	A	B	C	D	总生物碱 提取率/%
1	1	1	1	1	3.8
2	1	2	2	2	3.6
3	1	3	3	3	3.5
4	2	1	2	3	3.4
5	2	2	3	1	3.9
6	2	3	1	2	3.7
7	3	1	3	2	3.2
8	3	2	1	3	3.3
9	3	3	2	1	3.6
K ₁	10.90	10.40	10.80	11.30	
K ₂	11.00	10.80	10.60	10.50	
K ₃	10.10	10.80	10.60	10.20	
R	0.03	0.013	0.007	0.037	

表 3 总生物碱提取率方差分析					
方差来源	SS	MS	f	F	P
A	0.162	0.081	2	18.0	
B	0.036	0.018	2	4.0	
C(误差)	0.009	0.004	2	1.0	
D	0.216	0.108	24.0		

注： $F_{(2,2)}0.05=19.00$ 。

积分数>液料比>提取时间。以极差最小的C因素为误差项进行方差估算,D因素有显著性影响,应选pH 2;A,B因素均无显著影响。优选的提取工艺组合为A₂B₂C₃D₁,即16倍量70%乙醇提取2 h,pH 2。

2.4 验证试验 精密称取的血散薯样品3份,每份4.0 g,按优选提取工艺条件进行3次验证试验,结果总生物碱平均得率为3.98%,RSD 1.10%。说明此工艺条件稳定、可行。

3 讨论

经正交试验优化工艺条件提取的血散薯总生物碱含量为3.98%,其中含较多水溶性多糖、果胶、黏液质及醇溶性油脂等杂质。本试验初步考察了离子交换树脂法^[11-13]富集纯比血散薯总生物碱粗品,以期得到高纯度的总生物碱。称取血散薯10 g,按照最佳提取工艺条件提取得到浸膏2.0 g,将浸膏溶于去离子水中,使上样溶液为生药质量浓度为0.10 g·mL⁻¹的药液^[14]。用去离子水浸泡阳离子交换树脂48 h后待用。将药液上样于已处理的径高比为1:9

的阳离子吸附树脂,过柱流出液重复2次,不吸附的杂质基本洗脱完全^[15]。用1 mol·L⁻¹ NaOH溶液洗脱,每1 BV收集1次。洗脱液用三氯甲烷萃取,水洗三氯甲烷中少量残留NaOH溶液,至水层显中性,回收溶剂得到总生物碱。检测其总生物碱含量为0.30 g,转移率达76.92%,总生物碱纯度为67.22%。离子交换树脂法对血散薯总生物碱粗品进行提取纯化过程中,由于使用的阳离子树脂成本低廉,对生物碱粗品的纯化效果显著,具有较高的工业生产应用价值。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第30(1)卷[M]. 北京:中国科学出版社,1996: 65.

[2] 《四川中药志》协作编写组. 四川中药志. 第1卷[M], 成都: 四川人民出版社,1979: 199, 230.

[3] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁: 广西科学技术出版社,1992: 13.

[4] 黄建明,郭济贤,潘胜利. 千金藤属植物化学分类学的初步研究 [J]. 华西药学杂志, 1999, 14 (2): 108.

[5] 谭晓梅,彭树灵. 萸黄连提取物中吴茱萸的鉴别与萸黄连总生物碱含量测定 [J]. 中药材, 2007, 30 (3): 297.

[6] 黄文华,张蕊,郭宝林,等. 雷公藤药材总生物碱含量及影响因素的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (1): 15.

[7] 杜弢,陈红刚,林丽,等. 正交试验优化铁棒锤生物碱提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (3):20.

[8] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等. 黄柏总生物碱提取方法及工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (2): 3.

[9] 李亚仲,单宇,吴志平,等. 紫外分光光度法测定石蒜鳞茎的总生物碱含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (7): 1695.

[10] 孙良顺,郭勇全,申金龙,等. 川贝中生物碱提取工艺优化[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(2): 424.

[11] 裴月湖. 天然药物化学实验指导[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2009: 76.

[12] 姚新生,吴立军.天然药物化学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 380.

[13] 王锋鹏. 生物碱化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2008:12.

[14] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 93.

[15] 窦月,周洪雷,齐冬梅,等. 离子交换树脂对钩藤总生物碱的纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18 (3):8.

[责任编辑 全燕]