

伸筋草总生物碱提取工艺

何凡¹, 刘威¹, 徐秋阳², 于跃龙¹

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 辽宁省食品药品检验所, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:对伸筋草总生物碱提取工艺进行研究,为工业化生产奠定基础。方法:以伸筋草中总生物碱为指标,建立分析方法,采用正交设计方法考察盐酸水浸提的最佳工艺和使用阳离子交换树脂工艺纯化总生物碱。结果:盐酸水浸提的最佳工艺为加入 15 倍 1% 盐酸,浸提 3 次,每次 24 h,滤过,合并酸水液,以 3 BV·h⁻¹ 流速上 001 × 7 阳离子交换树脂柱,10 倍柱体积 8% 氨水乙醇洗树脂柱。结论:该方法工艺较简单,成本低,产率高,可作为伸筋草总生物碱的工艺。

[关键词] 伸筋草 总生物碱 阳离子交换树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0025-03

Study on Extraction of Total Alkaloids from *Lycopodium japonicum*

HE Fan¹, LIU Wei¹, XU Qiu-yang², GAO Wan-nan¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;
Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the extraction technological parameters of the total alkaloids from *Lycopodium japonicum*. **Method:** The orthogonal test was used to optimize extracting conditions in the process of acid water extraction. Then the optimized conditions for purification using cation exchange resin were investigated. **Result:** The optimized conditions in the process of acid water extraction were 0.5% hydrochloric acid as much as 15 times of the medicine amount for 24 h and three times. Then the extraction of acid water was purified with a column of macroporous cation exchange resin 001 × 7 at 3 BV·h⁻¹ of flow rate, then eluted with 10 BV of 8% aqueous ammonia ethanol. **Conclusion:** This technology is rapid and accurate for the purification of total alkaloids from *L. japonicum*.

[Key words] *Lycopodium japonicum*; total alkaloids; cation exchange resin

伸筋草为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb 的干燥全草^[1],其为较常用中药,历届《中国药典》收录的品种,全国大部分地区盛产,药源丰富。广泛应用于风湿病的治疗,具有祛风除湿、舒筋活络之功效。其化学成分主要有生物碱和三萜醇化合物。现代药理实验表明其成分具有解热、镇痛,抗菌作用,对血压、心脏及平滑肌有调节作用^[2]。伸筋草总生物碱可采用碱性乙醇提取,浓缩,三氯甲烷萃取的方法制备,但该方法比较烦琐,且不适合大规模制

备。本文以苦参碱为指标,考察酸水浸泡后,阳离子交换树脂法制备伸筋草生物碱的工艺条件。

1 仪器与试剂

伸筋草购自河北安国药材市场,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为石松植物石松的 *Lycopodium japonicum* 干燥全草;001 × 7, D001, D113 型阳离子交换树脂(上海劲凯树脂有限公司)。所用试剂均为分析纯,购置于天津市科密欧化学试剂有限公司,水为蒸馏水。苦参碱(购于中国生物制品检验所,批号 110805-2005508)。UV-3010 紫外-可见分光光度计(日本日立)。

2 方法和结果

2.1 伸筋草总生物碱的含量测定^[3]

[收稿日期] 20101208(013)

[第一作者] 何凡,讲师,在读博士, Tel: 0411-87586005,

E-mail: nisahe@126.com

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取苦参碱对照品 12.5 mg 置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,取 1 mL 转移到 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.05 mg 的苦参碱对照品溶液。

2.1.2 含量测定方法 分别量取对照品溶液 0.0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL 置分液漏斗中,加入 pH 6.8 的缓冲液 10 mL,再精密加入三氯甲烷 10 mL 和 0.05% 溴麝香草酚蓝溶液 1.0 mL,振摇 5 min,静置分层,取三氯甲烷层,在 420 nm 处测定吸光度。以“0 mL”的三氯甲烷为空白。以质量浓度 (C) 为横坐标,吸光度 (A) 为纵坐标,绘制标准曲线。

2.1.3 方法学考察 苦参碱的线性回归方程 $A = 177.3C + 0.1653$ ($r = 0.9993$)。苦参碱在 $1 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吸收度有良好的线性关系;精密度试验 RSD 1.4% ($n = 6$); 样品稳定性试验 RSD 1.6% ($n = 6$); 显色后稳定性试验 RSD 1.3% ($n = 6$) 显色后 1 h 内测量样品稳定;重现性试验 RSD 1.9% ($n = 6$); 加样回收试验 平均回收率为 99.5% RSD 2.3% ($n = 9$)。方法学考察结果显示,本文建立的伸筋草总生物碱含量测定方不准确、灵敏、可靠。

2.1.3 样品溶液的测定 精密吸取伸筋草提取液 1.0 mL,如标准曲线项下的制备方法进行测定,从“置分液漏斗于 420 nm 处测定吸光度”,计算。

2.2 伸筋草药材酸水浸提工艺优化^[4] 根据对伸筋草总生物碱酸水提取可能有影响的因素,选择了盐酸体积分数、溶媒用量、提取次数 3 个因素,按 $L_9(3^4)$ 正交实验表设计试验。取同一批伸筋草药材,均匀称取 9 份,每份 50 g,按表 1 条件进行试验,提取、浓缩、干燥得提取物。以苦参碱为对照,采用酸性染料比色法测定提取物中总生物碱含量,其正交试验因素水平、试验结果,见表 1,2。

表 1 正交试验设计因素水平表

| 水平 | A 盐酸体积分数/% | B 酸水量/倍 | C 提取次数/次 |
|----|------------|---------|----------|
| 1 | 0.1 | 10 | 1 |
| 2 | 0.5 | 15 | 2 |
| 3 | 1 | 20 | 3 |

从正交试验结果的各因素极差来看,各因素对醇提取影响大小顺序为 $A > C > B$ 。综合考虑,最终确定 $A_2B_2C_3$ 为最佳提取工艺,即加入药材 15 倍量的 0.5% 的盐酸水溶液,提取 3 次,每次提取 24 h。

表 2 醇提工艺正交试验

| No | A | B | C | D | 总生物碱 /mg·g ⁻¹ |
|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.100 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.265 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.396 |
| 4 | 2 | 1 | 3 | 2 | 0.180 |
| 5 | 2 | 2 | 1 | 3 | 0.688 |
| 6 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0.445 |
| 7 | 3 | 1 | 2 | 3 | 0.183 |
| 8 | 3 | 2 | 3 | 1 | 0.025 |
| 9 | 3 | 3 | 1 | 2 | 0.065 |
| K_1 | 0.254 | 0.154 | 0.190 | 0.84 | |
| K_2 | 0.438 | 0.326 | 0.170 | 0.298 | |
| K_3 | 0.091 | 0.302 | 0.422 | 0.200 | |
| R | 0.347 | 0.172 | 0.252 | 0.098 | |

2.3 阳离子交换树脂分离伸筋草总生物碱的工艺研究

2.3.1 树脂预处理 用蒸馏水浸泡新购的树脂,使其充分膨胀后,加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸搅拌 2 h,除去酸后水洗至中性,加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液搅拌 2 h,除去碱后水洗至中性。

2.3.2 树脂的筛选 选用 3 种树脂(001×7, D001, D113)测定静态吸附量以筛选树脂。准确称取预处理好的湿树脂 1 g,装入磨口锥形瓶中,精密加入 100 mL 经浸提酸水液,密塞,静置 24 h。充分吸附后,滤过,测定吸附液中总生物碱的浓度,计算吸附量。从表 3 可见,强酸性阳离子交换树脂 001×7 对伸筋草中总生物碱的吸附容量最大,所以选择 001×7 型阳离子交换树脂作为分离用树脂。

表 3 不同树脂对伸筋草总碱的静态吸附量

| 树脂型号 | 吸附容量/mg |
|-------|---------|
| 001×7 | 0.748 |
| D001 | 0.623 |
| D113 | 0.581 |

2.3.3 不同吸附流速对吸附效果的影响 取经预处理好的湿 001×7 树脂 10 g,装入色谱柱中,分别以 1,3,5 BV·h⁻¹ 吸附流速加入浸提后的酸水液,以改良碘化铋钾检测术下流出液生物碱反应为阳性时,停止上样,计算流过的酸水量。从表 4 可见,随着吸附流速度加快,吸附体积越小,生物碱的泄漏越

严重,但流速过慢会使生产周期变长,故综合考虑,选择吸附流速为 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 为宜。

表 4 不同吸附流速对吸附效果的影响

| 流速/ $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ | 吸附量/ mg |
|-------------------------------------|------------------|
| 1 | 63.13 |
| 3 | 67.72 |
| 5 | 59.91 |

2.3.4 洗脱溶剂的选择 将静态吸附后的 001×7 树脂进行静态洗脱,测定静态洗脱量以选择洗脱溶剂。取静态吸附后树脂,分别加入氨水质量浓度为 2%,4%,6%,8%,10% 的乙醇溶液 100 mL,在室温下静置 24 h,滤过,测定洗脱液中总碱的浓度,计算洗脱率。从表 5 可见,2% 氨水乙醇的洗脱率略低,8%~10% 氨水乙醇的洗脱率相近,综合考虑后,选择 8% 氨水乙醇作为洗脱溶剂。

表 5 不同溶剂的洗脱离作用比较

| 洗脱溶剂 | 洗脱率/% |
|----------|-------|
| 2% 氨水乙醇 | 62.1 |
| 4% 氨水乙醇 | 70.2 |
| 6% 氨水乙醇 | 78.5 |
| 8% 氨水乙醇 | 84.3 |
| 10% 氨水乙醇 | 87.1 |

2.3.5 洗脱曲线考察 取动态吸附后的树脂,水洗至流出液中性,以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 用 8% 氨水乙醇洗脱,每 1 个柱体积收集为 1 份,测定每份中总生物碱的浓度,以洗脱体积是树脂体积的倍数为横坐标,以总生物碱洗脱率为纵坐标绘制动态洗脱曲线。从图 1 可见,10 倍柱体积,8% 氨水乙醇进行洗脱时的洗脱率为 85.7%。

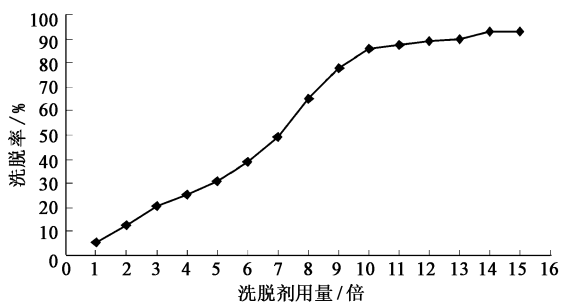


图 1 总生物碱动态洗脱曲线

2.3.6 工艺验证试验 取伸筋草药材 500 g,加入 15 倍 1% 盐酸,浸提 3 次,每次 20 h,滤过,合并酸水液,以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上 001×7 阳离子交换树脂柱,至改良碘化铋钾试剂检测流出液生物碱反应为阳性时停止,水洗至中性,10 倍柱体积 8% 氨水乙醇洗树脂柱,合并洗脱液回收溶剂,干燥,即得。结果 3 批伸筋草提取物中总物碱的质量分数分别为 0.678%,0.667%,0.665%。

3 讨论

文献报道伸筋草中生物碱主要为石松碱,伸筋草碱等。由于无市售石松碱或伸筋草碱,故此选用与这 2 种生物碱结构相近的苦参碱为对照品测定总生物碱含量。

使用乙醇提取,碱化后三氯甲烷萃取的方法制备,不适于大规模制备。本文采用盐酸水浸提,酸水液质量浓度为 0.5%,使生物碱呈离子状态,直接上阳离子交换树脂柱分离,得到的纯度较高的总生物碱。同时,本实验利用强酸性阳离子交换树脂分离伸筋草总生物碱,强酸性阳离子交换树脂具有吸附量大、选择性好、易解吸、易再生、效率高等优点,已被国内外研究者广泛应用^[5]。

使用碱性洗脱剂洗脱树脂上的生物碱,由于在碱性环境下,生物碱多以游离态的形式存在,降低了生物碱在水溶液中的溶解性,最终影响离子交换树脂的洗脱效果。因此本实验使用氨水乙醇作为洗脱剂,取得较好的洗脱效果,使伸筋草总生物碱有大幅提高。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:123.
- [2] 黄泰康.常用中药成分与药理手册[M].北京:中国医药科技出版社,1994:1071.
- [3] 邵晶,倪京满,郭玫,等.苦参药材中总生物碱含量的测定[J].安徽农业科学,2008,36(36):15950.
- [4] 李义平,杨广德,贺浪冲.红毛七总生物碱提取工艺研究[J].中药材,2007,30(2):200.
- [5] 霍务贞,李苑新,姜红宇,等.阳离子交换树脂纯化喘平复方总生物碱的工艺研究[J].中药新药与临床药理,2005,16(6):446.

[责任编辑 全燕]