

黄柏总生物碱提取方法及工艺研究

刘丽梅¹,王瑞海¹,陈琳¹,陈韩英²,杨立新³,刘凤华^{4*},许剑琴⁵

- (1. 中国中医科学院中医基础理论研究所,北京 100700; 2. 石河子大学药学院,新疆石河子 832000;
3. 中国中医科学院中药所,北京 100700; 4. 北京农学院,北京 102206;
5. 中国农业大学动物医学院,北京 102206)

【摘要】 目的:筛选二类中兽药畜禽抗应激颗粒中黄柏总生物碱提取工艺。方法:采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法对黄柏药材提取时所用乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数进行考察;采用单因素考察法对黄柏药材提取粒度进行考察。结果:黄柏提取总生物碱最佳提取工艺为:黄柏细丝2~3 mm,用药材10倍量75%乙醇回流提取3次,每次提取1.5 h。结论:该工艺稳定,质量可控,可用于产业化生产。

【关键词】 黄柏;总生物碱;提取;正交设计

【中图分类号】 R283.6 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1005-9903(2010)02-0003-03

畜禽抗应激颗粒由黄柏、苍术、藿香、石膏以不

同比例组成的二类复方中兽药。在兽医临床研究中发现,该复方可提高猪等畜禽对高热环境的适应能力,黄柏是其中的主药。黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮。黄柏含有多种生物碱,主要为小檗碱,其它生物碱有巴马丁、药根碱、黄柏碱、蝙蝠葛任碱、白瓜蒌碱、木兰花碱等^[1]。资料表明黄柏总生物碱具有抗溃疡及抗腹泻

【收稿日期】 2008-05-18

【基金项目】 北京市科技计划课题(Y0705003041631;
2008BADB4B07)

【通讯作者】 *刘凤华, Tel: (010) 80799147; E-mail: liulimeihrb@ sina. com

作用,对免疫功能具有调节作用^[2],是本课题提取的有效部位,课题以黄柏总生物碱提取率为考察指标,对资料报道的黄柏总生物碱 4 种提取方法:酸提法、碱提法、醇提法、酸醇提法^[3-4]进行试验对比,确定乙醇提取法,并对乙醇提取方法的工艺参数进行优选。

1 仪器与试剂

SPS202 OHAUS 电子天平(梅特勒-托利多(常州)称重设备系统有限公司),RR-182 电磁炉(尚朋堂(广州)电器有限公司),ZDHW 电热套(北京中星伟业仪器有限公司),RE-5205 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司),Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国)。

硫酸,生石灰,乙醇均为分析纯。

黄柏药材购自河北安国,经中国中医科学院中药研究所冯学峰副研究员鉴定为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮,其盐酸小檗碱的含量为 3.65%。

2 方法与结果

2.1 盐酸小檗碱含量测定方法

2.1.1 色谱条件 仪器:WATERS-717-2487 高效液相色谱仪;色谱柱:WATERS-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 磷酸溶液(50:50),每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.1 g;波长:265 nm;流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温:35 °C。

2.1.2 标准曲线的制备 取干燥至恒重的盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加乙醇制成每 1 mL 含 0.14 mg 的溶液。分别精密吸取 2,4,6,8,10 μL 注入液相色谱仪,连续进样 3 次,测定峰面积,以对照品进样量为横坐标,对照品峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明,盐酸小檗碱在 0.28 ~ 1.40 μg 范围内线性良好。其回归方程为 $Y = 4.57 \times 10^6 X - 1.57 \times 10^5$, $r = 0.9998$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备 取上述样品约 50 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加乙醇 80 mL,超声处理 30 min,加乙醇至刻度,摇匀,过 0.2 μm 滤膜,即得。

2.1.4 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱 1.5 mg,置 10 mL 量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 黄柏总生物碱含量测定方法

2.2.1 仪器 T6 新世纪紫外分光光度计,方法:比

色法:精密量取上述溶液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 0.05 mol · L⁻¹ 硫酸溶液稀释至刻度,摇匀,另取乙醇 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 0.05 mol · L⁻¹ 硫酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为空白对照溶液,检测波长:345 nm。

2.3 黄柏总生物碱提取方法的考察 取黄柏药材粉碎成最粗粉,共 4 份,每份 100 g,按文献^[3-6]工艺进行提取。采用紫外分光光度法测定提取物中总生物碱百分含量。提取物总生物碱含量、总生物碱收得率结果见表 1。

表 1 黄柏药材不同提取方法样品含量、总生物碱收得率测定(%)

提取工艺	干膏收率	总生物碱含量	总碱得率
酸水提取法	53.6	0.30	0.16
碱水提取法	28.8	0.76	0.21
乙醇提取法	26.6	13.60	3.62
酸醇提取法	39.0	4.68	1.83

实验结果表明,4 种提取方法中乙醇提取法黄柏总生物碱提取率最高,故本研究采用乙醇提取黄柏总生物碱。

2.4 黄柏总生物碱提取工艺的正交优选 根据对黄柏提取可能有影响的因素:乙醇浓度、乙醇用量、提取次数、提取时间 4 个因素,采用 L₉(3)⁴ 正交表进行正交设计。取同一批黄柏药材粉碎成最粗粉,均匀称取 9 份,每份 100 g,按表 2 条件进行试验,提取、浓缩、干燥得提取物。采用紫外可见分光光度法测定提取物中黄柏总生物碱含量,计算总生物碱提取率。试验设计的因素水平表、正交试验表、方差分析表见表 2~4。

表 2 因素水平表

水平	因素			
	A(乙醇浓度) (%)	B(乙醇用量) (倍)	C(提取次数) (h)	D(提取时间) (h)
1	95	6	1	1.0
2	75	8	2	1.5
3	55	10	3	2.0

由方差分析可以看出,提取次数 C 对黄柏总生物碱提取率有显著性影响,其它 3 个因素对黄柏总生物碱提取率没有显著性影响。根据直观分析,乙醇浓度选 A₂、乙醇用量选 B₃、提取时间选 D₂。由于提取次数对黄柏总生物碱提取率有显著性影响,在筛选出的其它参数不变的情况下,对提取次数继续进行考察,结果见表 5。

表 3 黄柏提取正交实验

实验号	A	B	C	D	总碱提取率(%)
1	1	1	1	1	3.38
2	1	2	2	2	5.39
3	1	3	3	3	5.15
4	2	1	2	3	4.52
5	2	2	3	1	5.42
6	2	3	1	2	4.51
7	3	1	3	2	5.21
8	3	2	1	3	3.65
9	3	3	2	1	5.24
K1	13.9200	13.1100	11.5400	14.0400	42.4700
K2	14.4500	14.4600	15.1500	15.1100	1803.7009
K3	14.1000	14.9000	15.7800	13.3200	CT=200.4112
R	0.5300	1.7900	4.2400	1.7900	

表 4 黄柏提取总生物碱方差分析表

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
B	0.5800	2	0.2900	11.9835	
C	3.4896	2	1.7448	72.0992	<0.05
D	0.5408	2	0.2704	11.1736	
误差	0.0484	2	0.0242		

$F_{0.01}(2,2) = 99.0, F_{0.05}(2,2) = 19.0$

表 5 黄柏提取次数考察(%)

提取次数(次)	出膏率	总生物碱含量	总生物碱提取率
3	26.90	14.61	3.94
4	30.46	14.83	4.50

实验结果表明,黄柏提取 3 次、4 次样品中总生物碱百分含量没有差别,总生物碱提取率相差不大,从生产周期和成本角度考虑,黄柏提取次数定为 3 次。

2.5 黄柏总生物碱提取粉碎粒度的考察 取同一批黄柏分别炮制成最粗粉(10 目)、细丝(2~3 mm)、块(10~20 mm),每份各 100 g,按上述优选的工艺参数 A₂B₃C₃D₂ 提取,以干膏总生物碱提取率为考察指标,优选黄柏总生物碱提取的最佳粉碎粒度。实验条件及结果见表 6。

表 6 黄柏总生物碱提取粉碎粒度的考察条件及结果(%)

样品	粉碎粒度	出膏率	总生物碱含量	总生物碱提取率
1	最粗粉	25.93	21.59	5.59
2	细丝(2~3 mm)	18.70	29.77	5.57
3	块(10~20 mm)	13.83	29.63	4.10

实验结果表明,黄柏药材粉炮制成最粗粉和细丝,其总生物碱提取率优于炮制成块,而且此时二者

总生物碱提取率几乎没有差别。从生产实际情况考虑,细丝便于加工和提取,故黄柏药材宜制成细丝进行提取。黄柏提取的最佳工艺为黄柏细丝(2~3) mm,用生药 10 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次,每次提取 1.5 h。

2.6 黄柏药材提取工艺的验证实验 取同一批黄柏药材,称取 3 份各 100 g,按优选的最佳工艺进行提取,样品减压干燥。采用高效液相色谱法测定样品中盐酸小檗碱含量,采用紫外分光光度法测定总生物碱百分含量,计算出膏率、盐酸小檗碱转移率、总生物碱提取率。实验结果见表 7。

表 7 黄柏药材提取工艺的验证实验(%)

样品	出膏率	盐酸小檗碱含量	盐酸小檗碱转移率	总生物碱含量	总生物碱提取率
1	29.64	12.10	98.26	14.98	4.50
2	30.06	11.97	98.58	15.86	4.76
3	30.60	11.93	100.00	14.89	4.54
平均	30.10	12.00	98.95	15.24	4.60

结果表明黄柏总生物碱提取工艺稳定,出膏率平均为 30.10%,盐酸小檗碱转移率平均为 98.95%,总生物碱含量平均为 15.24%,总生物碱提取率平均为 4.60%。

3 讨论

在文献^[2~3]报道的黄柏总生物碱 4 种提取方法中,传统工业生产中常用酸水提取法提取小檗碱。本研究结果表明该方法虽然提取收率高,但总生物碱的含量较低。本研究采用乙醇提取法提取物总生物碱含量、提取率均很高,但相比之下成本要更高些,采用该方法的主要原因是便于下一步纯化达到二类中兽药有效部位含量大于提取物的 50% 的要求。

[参考文献]

[1] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津:天津科学技术出版社,2004:1385.
 [2] 高红旺,张文希,田济民,等. 不同工艺对黄柏中黄连素提取量的影响[J]. 第四军医大学吉林医学院学报,2003,25(1):29.
 [3] 郭书好,李素梅,张复兴,等. 酸醇法从黄柏中提取黄连素[J]. 暨南大学学报(自然科学版),1994,15(1):130.
 [4] 尹蓉莉,杨军宣,李化. 黄柏中盐酸小檗碱提取实验方法的改进[J]. 基层中医药杂志,2000,14(6):27.