

正交实验优选两面针的提取工艺

Orthogonal Test for Optimization of Extraction Procedure of *Zanthoxylum nitidum*(Roxb.) DC.雷鹏¹, 刘韶¹, 李新中¹, 戴智勇¹, 黄晓亮²

(1. 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学药学院99级实习生, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 目的:对两面针的提取工艺进行优选。方法:以氯化两面针碱转移率为评价指标,用RP-HPLC法测定其含量,采用正交实验法对两面针的提取工艺进行优选。结果:最佳提取工艺条件为两面针药材用60%的乙醇溶液提取两次,第1次9倍量,提取2h,第2次7倍量,提取1.5h。结论:优选出的工艺科学合理。

[关键词] 两面针;提取工艺;正交实验;氯化两面针碱;RP-HPLC

[Abstract] Object: To optimize the extracting procedure of *Zanthoxylum nitidum*(Roxb.) DC. . Method: Taking the extraction rate of nitidine chloride as evaluation targets, and determining the content of nitidine chloride by RP-HPLC. The optimum extraction procedure was selected with the orthogonal test. Result: The optimum extraction procedure was as follows: *Zanthoxylum nitidum*(Roxb.) DC. was extracted with 60% alcohol for two times, first was nine times volume, two hours for extraction; second was seven times volume, one point five hours for extraction. Conclusion: The optimum extracting procedure is scientific, reasonable and stable.

[Key words] *Zanthoxylum nitidum*(Roxb.) DC; Extraction procedure; Orthogonal test; Nitidine chloride; RP-HPLC

[中图分类号] R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951(2005)05-071-02

两面针系芸香科花椒属植物两面针(*Zanthoxylum nitidum*(Roxb.) DC.)的干燥根,在我国药用历史悠久,民间常用其根、根皮及茎皮入药治疗胃痛、牙痛等多种痛证,具有行气止痛、活血散瘀、祛风活络之功效^[1,2]。目前,两面针已广泛应用于医药、食品、化工,但未见两面针提取工艺研究的报道。现代药理研究表明,两面针的主要有效成分为氯化两面针碱为代表的生物碱,因此现采用正交实验法,以氯化两面针碱为指标,对两面针的提取工艺进行优化选择,为合理开发利用两面针提供科学依据。

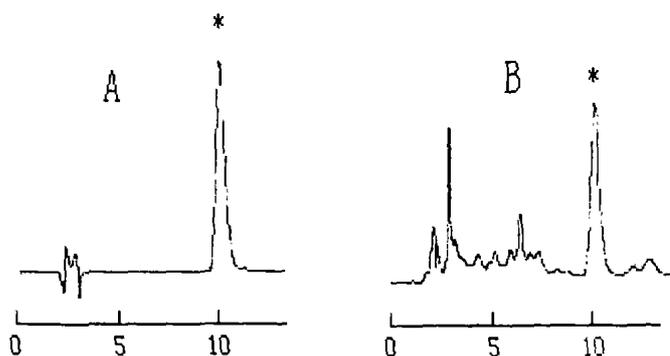
1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(美国惠普公司),VWD 紫外检测器,Agilent 化学工作站;AG285 型分析天平(METTLER);KS-600D 超声清洗机;氯化两面针碱对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:848-9901);两面针药材(湖南省九芝堂药业有限公司提供,经中南大学湘雅医院李新中教授鉴定);高效液相用甲醇、乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定氯化两面针碱的含量

2.1.1 色谱条件 色谱柱:钻石 C₁₈ 柱 Column Dimension (150 × 4.6mm);柱温:室温;检测波长:328nm;流速:1.0ml/min;流动相:水:乙腈:0.02mol/L磷酸二氢钾(加0.1%三乙胺和磷酸调pH3.17)=60:25:15;进样量:5μl。理论塔板数按氯化两面针碱计算应不低于3000,在上述色谱条件下,对照品和样品的色谱图。(见附图)



附图 氯化两面针碱(A)和两面针(B)的HPLC图谱

* 氯化两面针碱

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取氯化两面针碱对照品10.00mg置100ml容量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 0.51、1.02、2.04、3.06、4.08、5.10ml 分别置 5ml 容量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件进样 5 μ l,测定,以平均峰面积为纵坐标,氯化两面针碱溶液浓度 (ng/ μ l) 为横坐标作图,得线性回归方程: $Y = 26.5444X - 27.6048$, $r = 0.9998$ 。表明氯化两面针碱溶液在 10.2 ~ 102.0ng/ μ l 间线性关系良好。

2.1.4 药材中定氯化两面针碱的测定 称取两面针药材粉末约 1g,精密称定,置索氏提取器中,加甲醇 100ml,加热回流提取至回流液无色。提取液回收甲醇至约 45ml,完全转移至 50ml 容量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,取 10ml 过 0.45 μ m 微孔滤膜,在上述色谱条件下取 5 μ l 进样测定结果。依法制备 5 份样品溶液,测得其含量分别为 0.241%、0.234%、0.230%、0.233%、0.239%,平均含量为 0.236%,RSD 为 1.97%。

2.1.5 供试品溶液的制备及测定 精密量取两面针药材提取后所得的滤液 2.0 ~ 20.0ml (视滤液的浓度而定) 置蒸发皿中,水浴挥干,加甲醇溶解残渣,定容至 10ml,滤过,取续滤液作为供试品溶液。在上述色谱条件下取 5 μ l 进样测定。

2.2 正交实验

2.2.1 实验设计 通过预试,发现用水提取两面针,氯化两面针碱的转移率相当低,不到 30%;而用乙醇提取,氯化两面针碱的转移率可达 70%,故确定提取溶剂用乙醇。采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排两面针醇提工艺,以氯化两面针碱的转移率为评价指标,选择乙醇浓度、溶剂用量、提取时间 3 个因素,每个因素设 3 个水平。(见表 1)

表 1 因素水平表

水平	因 素		
	A 乙醇浓度 (%)	B 溶剂用量 (倍)	C 提取时间 (min)
1	60	5,4	60,45
2	70	7,5	90,60
3	80	9,7	120,90

2.2.2 正交实验方法及结果分析 称取两面针药材 20g,按正交设计表所列各条件回流提取,按 2.1 项下方法测定提取液中氯化两面针碱含量,并计算氯化两面针碱的转移率,有关实验数据(见表 2),方

差分析(见表 3)。

表 2 正交设计数据及结果

实验号	A	B	C	D (误差)	氯化两面针碱 的转移率 (%)
1	1	1	1	1	52.23
2	1	2	2	2	55.63
3	1	3	3	3	74.65
4	2	1	2	3	57.58
5	2	2	3	1	66.20
6	2	3	1	2	70.91
7	3	1	3	2	63.48
8	3	2	1	3	52.65
9	3	3	2	1	71.51
I	182.51	173.29	175.79	189.94	
II	194.69	174.48	184.72	190.02	
III	187.64	217.07	204.33	184.88	
R	12.18	43.78	28.54	5.14	

表 3 方差分析表

Sources	SSj	v	MS	F
A	24.93	2	12.47	4.31
B	414.67	2	207.34	71.74
C	142.09	2	71.05	24.58
e	5.78	2	2.89	

注: $F_{1-0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{1-0.01}(2,2) = 99.0$

由正交实验结果的直观分析和方差分析可知,影响氯化两面针碱转移率的因素大小顺序为 $B > C > A$,其中因素 B、C 对检测指标均有显著性影响,宜选 B_3 、 C_3 水平;而因素 A 无显著影响,为降低生产成本,宜选 A_1 水平。因此,最佳提取工艺条件是 $A_1 B_3 C_3$ 。即用 60% 的乙醇溶液提取两次,第 1 次 9 倍量,提取 2h,第 2 次 7 倍量,提取 1.5h。由于本研究选择的提取方案已在正交试验设计的方案中(3 号实验),故不做验证试验。

3 讨 论

为合理选择正交设计各水平,对提取溶剂(0、30%、50%、70%、90% 的乙醇)进行了预试。结果 70% 乙醇提取物中氯化两面针碱的含量最高,故在正交实验中,设计乙醇浓度的 3 个水平分别为 80%、70%、60%。另外,对药材形态及提取次数也进行了考察,发现采用丁状小块药材(约为 1cm³)进行提取效果最好,提取 2 次,相对转移率可达 90%。

(下转第 74 页)

表示;结果用计算机统计程序做方差分析,Q 值检验判断组间差异有无显著性意义。

3 结 果

3.1 麻仁胶囊对燥结型便秘小鼠排便功能的影响

与生理盐水组比较,给药后 4h,麻仁胶囊 2.0、4.0、8.0g/kg 和通便灵 2.4g/kg 对燥结型便秘小鼠排便粒数和排便重量无明显影响;给药后 8h 2.0、4.0、8.0g/kg 和通便灵 2.4g/kg 对燥结型便秘小鼠排便粒数和排便重量均明显增加。(见表 1)

表 1 麻仁胶囊对燥结型便秘小鼠排便功能的影响 ($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

药物	剂量(g/kg)	排便粒数		排便重量(mg)	
		4h	8h	4h	8h
生理盐水	—	0.70 ± 1.06	9.6 ± 6.9	11.7 ± 19.1	144 ± 110
麻仁胶囊	2.0	0.90 ± 1.10*	32.5 ± 11.0***	22.6 ± 27.2*	458 ± 93***
	4.0	1.60 ± 2.27*	15.8 ± 4.7**	35.7 ± 46.0*	231 ± 70**
	8.0	0.90 ± 1.20*	17.4 ± 6.0**	13.6 ± 19.1*	268 ± 62**
通便灵	2.4	0.40 ± 0.84*	23.4 ± 6.6***	9.7 ± 20.6*	410 ± 109***

注:与生理盐水比较,* $P > 0.05$,** $P < 0.05$;*** $P < 0.01$

0.01

3.2 麻仁胶囊对燥结型便秘小鼠胃肠推进功能的影响

与生理盐水对照比较,通便灵和麻仁胶囊小、中、大剂量对燥结型便秘小鼠胃肠推进功能具有明显增强作用。(见表 2)

表 2 麻仁胶囊对小鼠胃肠推进功能的影响 ($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

药物	剂量(g/kg)	小肠推进距离(cm)	小肠推进率(%)
生理盐水	—	22.3 ± 2.3	45.6 ± 5.5
麻仁胶囊	2.0	27.1 ± 2.7***	62.7 ± 5.6***
	4.0	24.7 ± 2.1**	50.6 ± 4.9**
	8.0	29.5 ± 2.9***	60.5 ± 6.6***
通便灵	2.4	30.5 ± 2.6***	56.1 ± 4.8***

注:与生理盐水比较,** $P < 0.05$;*** $P < 0.01$

(上接第 72 页)

两面针药材中氯化两面针碱的含量测定时,考察了甲醇液直接超声法,湿浸 15min 后超声法,加热回流提取法及索氏提取法^[3],其含量测定分别为 0.194%、0.199%、0.213%、0.236%,因此选用索氏提取法。色谱条件摸索时,在流动相中加入三乙胺,并用磷酸调节 pH 值,减少色谱峰拖尾,得到的色谱峰峰形尖锐,分离度高,且基线稳定。

参考文献:

3.3 麻仁胶囊对燥结型便秘小鼠血清 SOD 活性的影响

与生理盐水组比较,麻仁胶囊 2.0、4.0、8.0g/kg 和通便灵 2.4g/kg 对燥结型便秘小鼠血清 SOD 活性具有明显增加作用。(见表 3)

4 讨 论

麻仁胶囊具有润肠通便作用,临床用于肠燥便秘等的治疗。研究结果表明,麻仁胶囊能促进燥结型便秘小鼠的排便功能,增加胃肠推进率,提高血清 SOD 活性,有利于清除体内脂质过氧化物,保护肠粘膜。

表 3 麻仁胶囊对燥结型便秘小鼠血清 SOD 的影响 ($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

药物	剂量(g/kg)	SOD(nu/ml)
生理盐水	—	348 ± 32
麻仁胶囊	2.0	391 ± 31**
	4.0	447 ± 34***
	8.0	472 ± 50***
通便灵	2.4	399 ± 42**

注:与生理盐水比较,** $P < 0.05$;*** $P < 0.01$

参考文献:

- [1] 邱赛红,陈立峰.麻子仁丸和麻仁胶囊通便作用的试验研究[J].中药药理与临床,1990,(6):5
- [2] 李仪奎主编.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991.320~323
- [3] 贝敏敏,吴建方,吴湛仁.便通灵胶囊通便作用的药效学研究[J].南京中医药大学学报(自然科学版),2001,17(1):30

(收稿日期:2005-04-20 编辑:张金慧)

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用(第 3 卷)[M].北京:学苑出版社,1998.2275
- [2] 辛宁,甄汉深.两面针的研究[J].时针国药研究,1996,7(2):118
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2000.133
- [4] 陈钧,段更利,黄建明,等.反相高效液相色谱法测定两面针霜剂和生药两面针中氯化两面针碱含量[J].复旦学报(医学科学报),2001,28(5):436

(收稿日期:2005-03-17 编辑:张金慧)