单因素法优化两面针提取工艺

赵森¹ 慕杨娜² 姜黎¹ 邹明¹

(1 大连大学附属中山医院,大连,116001; 2 辽宁中医药大学附属第二医院,沈阳,110032)

摘要 目的:优化两面针药材的提取工艺。方法:采用单因素考察方法,以提取时间,提取次数,提取溶剂、用量、浓度及 PH 值作为优选因素,以两面针中的氯化两面针碱提取量和出膏率作为定量指标,优化提取工艺。结果:最佳的提取工艺条件是:乙醇浓度 80%,加醇量为 8 倍,提取 2 次,每次提取 2 h,加入 0.1 mol/L 盐酸调乙醇 pH 至 5,出膏率和有效成分提取率比较高,重现性好。结论:优化的提取工艺稳定可行,适合工业大生产要求。

关键词 两面针;总生物碱;单因素法;高效液相色谱

Single-factor Optimization for Extraction Process of Radix Zanthoxyli

Zhao Sen¹, Mu Yangna², Jiang Li¹, Zou Ming¹

(1 Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China; 2 The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

Abstract Objective: To optimize extraction process of Radix zanthoxyli. **Methods:** By using a single factor optimization method, we selected a reasonable extraction process via ethyl alcohol. Optimizing factors are extraction time, number of extractions, extraction solvent, dosage, concentration, PH value; using yield rate and Nitidine Chloride extracted weight as parameters. **Results:** The optimum extraction process is 80% concentration of ethyl alcohol, extract 2 h each time, extract twice, controlling pH = 5 using 0.1 mL/L HCL. **Conclusion:** The optimized extraction process is suitable for industrial production.

Key Words Radix Zanthoxyli; Total alkaloid; Single factor optimization method; HPLC

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.11.038

两面针,又称双面针、山椒^[2]。主产于云南、广西、海南、广东福建等地。《中华人民共和国药典》收载^[1]的两面针主要功效为行气止痛,活血化瘀,祛风通络,具有良好的活血化瘀止痛药用价值^[3],氯化两面针碱(Nitidine Chloride)是两面针的主要有效成分,具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、心血管系统、抗真菌,强心、降血压等药理作用^[4]。实验以单因素法预选了影响提取工艺的重要因素,并以提取物中有效成分氯化两面针碱和两面针提取物的提取率作为指标,优化两面针提取工艺^[5]。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);CLSS-VP 色谱工作站;XL-204 电子天平(梅特勒-托利多);KQ128 型超声仪;LG-08A 粉碎机(深圳市百源堂公司);对照品购于中国药品生物制品检定所,批号:737-1101;两面针购自安国药材公司,经贾天柱教授鉴定为正品;实验试剂均为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersol BDSC₁₈ (4.6 mm × 200 mm);流动相:磷酸二氢钾溶液-乙腈(55:45),磷酸调节 pH = 3.17;检测波长 329 nm;柱温:室温;流速 1 mL/min;测定方法:分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得^[4]。

1.2.2 对照品溶液的配制 取氯化两面针碱对照品适量,精密称定,加无水甲醇配制成 0.2448 mg/mL 的溶液。

1.2.3 样品的处理和供试品溶液的配制 取两面针药材,加入乙醇,置电热套中,加热回流 2 次,每次 2 h,滤过,水浴干燥成干膏。取干膏适量,精密称定,置容量瓶中,精密加入甲醇 100 mL,超声处理 30 min,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

1.2.4 线性关系考察 精密吸取 0.2448 mg/mL 的氯化两面针碱对照品溶液 5、10、12.5、15、20 μL 分别注入液相色谱仪,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标得标准曲线,回归方程为: $Y = 233.15X - 216.74$, $r = 0.9994$ ($n = 5$),结果显示在 0.1224 μg ~

作者简介:赵森(1981.8—),男,硕士,主管中药师,药剂科科员,研究方向:主要从事中药新剂型及新药开发,E-mail:179786627@qq.com

通信作者:邹明(1970.9—),女,本科,主任药师,药剂科副主任,研究方向:主要从事药事管理与临床药学,E-mail:zsyjyk@sina.com,Tel:(0411)62893535

0.489 6 μg 范围内线性关系良好。

1.2.5 精密度 分别吸取对照品溶液,按色谱条件,重复进样6次,每次10 μL ,按1.2.1项下色谱条件测定峰面积,相对标准偏差(*RSD*)为0.93%,结果表明该方法精密度符合规定。

1.2.6 重复性 按1.2.3项下操作,精密吸取10 μL ,进样6次,测定峰面积,*RSD*=0.84%,小于3%,表明该方法重复性符合规定。

1.2.7 稳定性 精密吸取样品试液,在室温条件下分别放置0、2、4、6、8、10、12 h后进样测定,相对标准偏差(*RSD*)为0.76%,小于3%,结果表明样品在12 h内稳定。

1.2.8 加样回收率试验 精密称定已知氯化两面针碱含量的两面针提取物0.2 g,分别加入定量的氯化两面针碱对照品溶液,按1.2.3项下方法进行的操作,按1.2.1项下色谱条件测定峰面积,计算回收率和*RSD*,结果见表1。

表1 氯化两面针碱加样回收率考察结果

编号 (Sample)	样品量(g)	氯化两面针碱含量(mg)	对照品加量(mg)	氯化两面针碱实测总量(mg)	回收率平均值 (%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.0513	1.037	0.9792	2.013	99.6	100.8
2	0.0506	1.023	0.9792	2.017	101.4	
3	0.0532	1.076	0.9792	2.064	100.8	
4	0.0496	1.003	0.9792	1.981	99.8	
5	0.0503	1.017	0.9792	2.022	102.4	

由表1可见,氯化两面针碱回平均收率为100.81%,*RSD*为1.1%,表明方法的回收率良好。

2 结果

出膏率 = $m/M \times 100\%$,其中 *m* 为干膏的重量(g),*M* 为药材的重量(g)。综合评分:氯化两面针碱含量权重系数0.5,出膏率权重系数0.5,进行综合评价。

2.1 提取溶剂 取等量两面针药材2份,分别加入加酸的水溶液和乙醇溶液,各提取1次,1 h/次,将提取液的续滤液浓缩并定容,得供试品溶液。由表2可见,醇提液比加酸水溶液氯化两面针碱得率高,且水溶液极性大,易提取出色素^[6],黏液质等极性大的杂质,不利于滤过和储存,故选择乙醇作为提取溶剂。

表2 提取溶剂

溶剂 (Solvent)	提取率 (%) (Extraction Rate)	氯化两面针碱含量 (%) (Nitidine Chloride Content)
加酸水溶液	2.43	0.125
95%乙醇	6.98	0.276

2.2 乙醇浓度 取4份等量药材,分别加入10倍

量50%、60%、70%、80%、90%乙醇,提取1次,2 h/次,测定出膏率及氯化两面针碱含量。从表3可以看出,用80%的乙醇对两面针的出膏率和氯化两面针碱有较好的提取效果,通过出膏率和氯化两面针碱的综合评分,所以选择80%的乙醇。

表3 乙醇浓度

不同浓度乙醇 (Ethanol)	出膏率 (%) (Extraction Rate)	氯化两面针碱含量 (%) (Nitidine Chloride Content)
50%	6.12	0.15
60%	7.32	0.18
70%	7.93	0.20
80%	9.13	0.28
90%	9.18	0.28

2.3 提取时间 取3份等量药材,分别加入80%乙醇浸泡2 h,提取1次,分别提取1 h、2 h、3 h,将提取液滤过、浓缩、定容,测定出膏率及氯化两面针碱含量。由表4可见,提取时间短(1 h)有效成分溶出不完全,随着提取时间的延长(2 h)有效成分被提取完全,时间增加(3 h),故选择提取时间为2 h。

表4 提取时间结果

时间(h) (Time)	出膏率 (%) (Extraction rate)	氯化两面针碱含量 (%) (nitidine chloride content)
1.0	7.53	0.19
2.0	9.07	0.28
3.0	9.32	0.28

2.4 提取次数 取3份等量药材,加入80%乙醇,分别提取1次、2次、3次,2 h/次,测定出膏率及氯化两面针碱含量。由表5可见,有效成分随着提取次数的增加而增加,多次提取率较高,但提取次数不适当的增加,提取率增加不明显,且浪费成本,选择提取次数为2次。

表5 回流次数

提取次数(次) (Extraction time)	出膏率 (%) (Extraction rate)	氯化两面针碱含量 (%) (Nitidine Chloride Content)
1	5.07	0.22
2	9.14	0.29
3	9.32	0.29

2.5 溶媒用量 取3份等量药材,分别加入10倍、8倍、6倍药材量的80%乙醇,提取2次,2 h/次,测定出膏率及氯化两面针碱含量。由表6可知,乙醇用量为10倍、8倍时,两面针的出膏率和氯化两面针碱含量最高,为降低生产成本,故选择乙醇用量为8倍。

2.6 乙醇pH值对提取效率的影响 取4份等量药材,加入不同pH值的80%乙醇,分别提取2次,2 h/

次,测定出膏率及氯化两面针碱含量。两面针中药材中主要成分为总生物碱,其中氯化两面针碱为主要镇痛成分^[8]。本实验采用了加入少量乙酸来增加生物碱的溶出率,由表 7 可见,乙醇液的 pH 值降低,提取率明显增加,pH=5 时,两面针的出膏率和氯化两面针碱含量最高。

表 6 溶媒用量

溶剂用量 (Dosage of Solvent)	提取率(%) (Extraction Rate)	氯化两面针碱含量(%) (Nitidine Chloride Content)
6	8.01	0.24
8	9.15	0.28
10	9.16	0.39

表 7 乙醇 pH 值

pH 值	提取率(%) (Extraction rate)	氯化两面针碱含量(%) (nitidine chloride content)
80% 乙醇 pH=4	10.21	0.30
80% 乙醇 pH=5	12.51	0.38
80% 乙醇 pH=6	10.33	0.31
80 乙醇	9.25	0.28

2.7 工艺重现性考察 取两面针药材 100 g,按照单因素考察的结果提取,即用 80% 的乙醇溶液提取两次,加入 0.1 mol/L 盐酸调乙醇 pH=5,加醇量为 8 倍,提取 2 h。测定结果见表。

表 8 工艺重现性考察

批次 (Batch)	两面针(g) (Zanthoxylum nitidum)	提取率(%) (Extraction Rate)	氯化两面针碱含(mg/g) (Nitidine Chloride Content)
1	100	12.83	41.2
2	100	12.73	40.5
3	100	12.92	40.8

结果表明,此方法稳定可行。

3 讨论

本文选取了溶媒、乙醇浓度、溶媒用量、溶媒 pH 值、提取时间、提取次数等 6 个因素考察两面针药材的提取工艺。乙醇的提取效果明显优于水的提取效果,80% 乙醇更适合有效成分溶出且杂质溶出较少,从生产成本考虑,乙醇用量为 8 倍量,提取时间 2 h,提取次数为 2 次,考虑到两面针中主要成分为生物碱类,且镇痛的主要成分为氯化两面针碱,本次实验首次采用加入少量酸调节提取溶剂的 pH 值来增加

两面针总生物碱的溶出度,结果有效成分氯化两面针碱的提取率显著增加。最终确定两面针的最佳工艺为:乙醇浓度为 80%,加醇量为 8 倍,提取 2 次,提取 2 h,加入 0.1 mol/L 盐酸调乙醇 pH 至 5,生物碱转移率和出膏率均较高,工艺重现性稳定可行。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 版一部[S]. 北京: 化学工业出版社,2005:116-117.
- [2] 柏帆. 中药两面针碱的质量控制研究进展[J]. 中国民族民间医药杂志,2013,22(12):18-19.
- [3] 韩建军,宁娜. 两面针的药理作用研究进展[J]. 药学研究,2013,32(8):473-474.
- [4] 陆世惠,李秀霞. 酶法辅助浸渍提取两面针中氯化两面针碱[J]. 医药导报,2013,32(3):363-366.
- [5] 陆世惠,龙盛京. 大孔吸附树脂纯化两面针总生物碱[J]. 西北药学杂志,2013,28(1):7-9.
- [6] 王希斌,刘华钢. 两面针中木脂素化合物结晶-8 对伤害性大鼠 c-fos 基因表达的影响[J]. 医药导报,2012,31(9):1113-1116.
- [7] 贾昌平,黄雪丽,李允,等. HPLC-DAD/ESI-Q-TOF-MS 分析两面针中的生物碱[J]. 中国中药杂志,2013,38(8):1198.
- [8] 黄庶识,李自达. 多种红外光谱校正法两面针产地鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(2):364-369.
- [9] 杨永清,江霞. 不同产地两面针浸出物的研究[J]. 中国医药指南,2012,10(5):75-76.
- [10] 欧国灯,李慧慈,等. 双波长薄层扫描法测定风湿宁注射液中氯化两面针碱的含量[J]. 中药新药与临床药理,2002,13(1):43-44.
- [11] 方琳乔,卢凌春,龙盛京,等. HPLC 法同时测定两面针中氯化两面针碱与乙氧基白屈菜红碱的含量[J]. 西北药学杂志,2011,26(1):18-20.
- [12] 赖茂禅,饶伟源,严克俭,等. 两面针及其伪品的生药鉴别[J]. 中药材,1994,17(3):18-21.
- [13] 李文仕. RP-HPLC 测定复方两面针含片中氯化两面针碱的含量[J]. 中国药事,2011,25(5):490-492.
- [14] 袁东升. 两面针的药理及其作用[J]. 牙膏工业,2003,3(1):34-35.
- [15] 欧阳熙琳,欧尚瑶,王朝阳,等. 薄层色谱法测定毛两面针三种生物碱含量[J]. 广西植物,2010,30(5):710-712.
- [16] 陈钧,殷更利,等. 反相高效液相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,2001,28(5):436-437.

(2014-08-19 收稿 责任编辑:张文婷)