

# 盐酸甲醇正交提取法优选永思小檗中盐酸小檗碱研究

王 绪 英, 向 红, 左 经 会, 林 长 松

(六盘水师范学院 生命科学系, 贵州 六盘水 553004)

**摘 要:**采用超声提取法,以盐酸甲醇为溶媒,以盐酸小檗碱含量为考察指标,通过单因素试验及正交设计  $L_9(3^4)$  研究了提取时间、提取温度、溶媒倍数对永思小檗中盐酸小檗碱提出率的影响。结果表明:永思小檗中盐酸小檗碱最佳超声提取工艺为:以 150 倍盐酸甲醇作溶媒,30℃ 下超声提取 50 min,其提出率最高,超声提取时间对盐酸小檗碱含量的影响显著。

**关键词:**永思小檗;盐酸甲醇;盐酸小檗碱;正交实验;超声提取

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)21-0095-03

小檗科小檗属植物俗称“三颗针”。该属植物大约有 50 多种在民间<sup>[1]</sup>。其根和茎或根皮、茎皮入药,常作土黄连、土黄柏使用,具有清热解毒、燥湿泻火的作用,临床常用于消炎、利胆、降压、对抗心肌梗塞、心率失常等<sup>[2]</sup>。其主要成分是盐酸小檗碱,具有清热解毒、泻火燥湿功能,临床上用于治疗细菌性痢疾、肠炎、黄疸性肝炎、下肢湿热肿痛、尿路感染等<sup>[3]</sup>。对痢疾杆菌、大肠杆菌、肺炎双球菌、金葡菌、链球菌、伤寒杆菌及阿米巴原虫有抑制作用,临床主要用于肠道感染及菌痢等<sup>[4]</sup>。近年来,随着临床药理学的不断深入研究,陆续发现其还有抗心率失常、改善充血性心理衰竭、降血糖、降血脂、抗肿瘤等药理作用,被广泛地应用于心律失常、糖尿病、高脂血症、高血压、癌症等的治疗<sup>[5-8]</sup>。在三颗针中盐酸小檗碱的提取工艺上只有杨志学等<sup>[9]</sup>用正交实验优选三颗针中盐酸小檗碱的提取工艺研究为 0.2% 的稀酸,12 倍量溶剂,石灰乳调 pH 10,盐酸调 pH 时温度 53℃;徐海星等<sup>[10]</sup>研究了芒齿小檗的乙醇提取液用强酸性 732 阳离子树脂进行交换纯化。杨宏健等<sup>[11]</sup>优选了三颗针中小檗碱的提取工艺为稀硫酸浓度 0.2%,16 倍量溶剂,石灰乳调 pH 9,精制时调酸的温度为 60℃。

永思小檗(*Berberis tsienii* Ying)是小檗科小檗属植物,分布于贵州盘县、水城,生于山谷灌丛中,海拔 2 100 m<sup>[12]</sup>,其根和根皮入药,是贵州特有药用植物及贵州药用新资源,夏秋季采收,清热燥湿,泻火解毒。主治湿热痢疾,肠炎,黄疸,目赤红肿,咽痛<sup>[13]</sup>。该研究以永思小檗为原料,盐酸小檗碱含量为指标,盐酸甲醇为提取溶剂,通过

超声波提取,用正交实验设计研究了超声时间、超声温度、超声体积等因素对盐酸小檗碱含量的影响,以期优选出永思小檗中盐酸小檗碱的最佳超声提取工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

盐酸小檗碱对照品由贵州迪大科技有限公司提供,永思小檗产于贵州省钟山区梅花山,试验前将永思小檗根加工成粗粉,50℃ 烘 24 h,置于干燥器备用。盐酸、甲醇为国产分析纯。试验仪器:JH-722 型可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)、METTER AE240 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)、BGZ 型电热鼓风干燥箱(上海博迅事业有限公司医疗设备厂)、HH-6 型数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司)、超声波提取仪(北京弘祥隆生物技术开发有限公司)、DFT-200 型高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 取置五氧化二磷真空干燥器干燥至恒重的盐酸小檗碱对照品 4.0 mg,用水溶解并移置 100 mL 容量瓶中定容,摇匀,即得浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  的盐酸小檗碱标准品储备液,备用。精密吸取盐酸小檗碱储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,同时蒸馏水作空白,分别测出吸光度(345 nm 波长处有最大光吸收),以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 样品含量的测定 精密称取药材粉末,装入具塞三角烧瓶中,超声提取,合并滤液,浓缩,置 100 mL 容量瓶,加水定容,摇匀,即得供试液。分别精密吸取供试液 1.0 mL,测定盐酸小檗碱含量。

1.2.3 正交实验设计 根据影响盐酸甲醇提取的主要因素,选择 A:超声时间、B:超声温度、C:溶媒倍数作为检测因素,每个因素 3 个水平,正交实验设计方案见表 1。

**第一作者简介:**王绪英(1971-),女,山东泰安人,硕士,副教授,现主要从事植物药用成分的研究工作。E-mail:lpwxy@126.com.

**基金项目:**贵州省教育厅自然科学基金资助项目(黔教研(2009)098 号)。

**收稿日期:**2012-06-11

表 1 盐酸甲醇正交实验方案

| 水平   | 时间(A)Time/min | 温度(B)Temperature/℃ | 固液比(C)Solid liquid ratio |
|------|---------------|--------------------|--------------------------|
| 水平 1 | 30            | 30                 | 1 : 100                  |
| 水平 2 | 40            | 40                 | 1 : 150                  |
| 水平 3 | 50            | 50                 | 1 : 200                  |

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线

用最小二乘法经线性回归,得盐酸小檗碱浓度  $C$  与吸光度  $A$  的回归方程:  $C = 0.1031A + 0.0033$ ,  $r = 0.9994$ 。结果表明,盐酸小檗碱在  $1.6 \sim 9.6 \mu\text{g/mL}$  浓度范围内线性关系良好。稳定性试验:取供试液室温放置 0、1、2、4、8、12、16、20、24 h 后分别测定吸光度,相对标准偏差(RSD)为 1.23%,说明供试液在 24 h 内基本保持不变。精密度试验:分别精密吸取供试液 1.0 mL,平行操作测定 5 次吸光度,结果 RSD 为 1.62%。

### 2.2 单因素试验

2.2.1 提取时间 称取 6 份 0.5 g 永思小檗根粗粉,分别置于 50 mL 1% 盐酸甲醇溶液中,浸泡 24 h,分别超声处理 0、10、20、30、40、50 min,过滤,浓缩至一定体积,置 100 mL 容量瓶中,定容,准确量取 1 mL 提取液,于 345 nm 处测吸光度。由表 2 可知,超声时间在 40 min 内,盐酸小檗碱的提取量随超声提取时间的延长而提高,超声时间大于 40 min,盐酸小檗碱的提取量略有下降,说明选择超声时间 40 min 较为合适。

表 2 提取时间对提取效果的影响

| 时间 Time/min                                  | 0      | 10     | 20     | 30     | 40     | 50     |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 小檗碱的含量 Content of berberine hydrochloride/mg | 5.2752 | 5.4350 | 5.5485 | 5.5536 | 5.8835 | 5.7960 |

2.2.2 提取温度 称取 6 份 0.5 g 永思小檗根粗粉,分别置于 50 mL 1% 的盐酸甲醇溶液中,浸泡 24 h,分别于 30、40、50、60、70℃ 下超声处理 40 min,过滤,浓缩至一定体积,置 100 mL 容量瓶中,定容,准确量取 1 mL 提取液,于 345 nm 处测吸光度。由表 3 可知,提高超声温度,盐酸小檗碱的提取量增加,温度大于 40℃ 时,提取率量有下降,因为随温度的升高,溶剂的渗透性增强,有利于盐酸小檗碱的提取,但盐酸甲醇的沸点较低,温度升高,易于挥发,浓度下降,影响提取液中盐酸小檗碱的含量,故选择 40℃ 较为理想。

表 3 温度对提取效果的影响

| 温度 Temperature/℃                                 | 30      | 40      | 50      | 60      | 70      |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| 小檗碱的含量 The content of berberine hydrochloride/mg | 4.76485 | 4.89540 | 4.60815 | 3.76480 | 4.58855 |

2.2.3 溶媒倍数 称取 6 份 0.5 g 永思小檗根粗粉,分别置于 1% 的盐酸甲醇溶液 50 mL(1 : 100)、75 mL(1 : 150)、100 mL(1 : 200)、125 mL(1 : 250)、150 mL(1 : 300)、

175 mL(1 : 350)中,浸泡 24 h,在 40℃ 下超声处理 40 min,过滤,浓缩至一定体积,置 100 mL 容量瓶中,定容,准确量取 1 mL 提取液,于 345 nm 处测吸光度值,由表 4 可知,随着浸提体积增加盐酸小檗碱的含量逐渐升高,当溶媒倍数大于 1 : 100 时,提取液中盐酸小檗碱含量反而减少,故选择 1 : 100 作为提取溶剂的最适体积。

表 4 固液比对提取效果的影响

Table 4 Influence of solid liquid ratio on extraction effect

| 固液比 Solid liquid ratio                       | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 150 | 1 : 200 | 1 : 250 | 1 : 300 |
|--|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 小檗碱的含量 Content of berberine hydrochloride/mg | 5.4402 | 5.9248  | 5.8784  | 5.8268  | 5.5876  | 5.1319  |

### 2.3 正交实验

对正交实验结果进行分析见表 5、6。从均值分析, A 因素第 3 个水平是最优水平,因素 B 的第 1 个水平是最优水平,因素 C 的第 2 个水平是最优水平。各因素的最佳水平为  $A_3B_1C_2$ ,即 1 : 150 的固液比,30℃ 下超声提取 50 min。由极差分析,因素 A 的变化对盐酸小檗碱含量的影响最大,因素 C 次之,因素 B 的影响最小,即影响盐酸小檗碱含量的因素主次依次排序为提取时间 > 盐酸甲醇用量 > 提取温度。由方差分析,超声提取时间对盐酸小檗碱含量的影响显著。

表 5 盐酸甲醇的正交实验设计结果(盐酸甲醇)

Table 5 The results of orthogonal experiments (hydrochloric acid-methyl alcohol)

| 因素 Factor | 时间 Time /min | 温度 Temperature /℃ | 固液比 Solid liquid ratio | 盐酸小檗碱的得率 Content of berberine hydrochloride/mg |
|-----------|--------------|-------------------|------------------------|--|
| 实验 1      | 30           | 30                | 100                    | 5.5450   |
| 实验 2      | 30           | 40                | 150                    | 5.6635   |
| 实验 3      | 30           | 50                | 200                    | 5.1583   |
| 实验 4      | 40           | 30                | 150                    | 5.6094   |
| 实验 5      | 40           | 40                | 200                    | 5.9316   |
| 实验 6      | 40           | 50                | 100                    | 5.7666   |
| 实验 7      | 50           | 30                | 200                    | 6.0140   |
| 实验 8      | 50           | 40                | 100                    | 5.4624   |
| 实验 9      | 50           | 50                | 150                    | 6.0965   |
| 均值 1      | 5.454        | 5.723             | 5.591                  | 5.858  |
| 均值 2      | 5.769        | 5.686             | 5.790                  | 5.815  |
| 均值 3      | 5.858        | 5.672             | 5.700                  | 5.409  |
| 极差        | 0.404        | 0.051             | 0.199                  | 0.449  |

表 6 方差分析结果(盐酸甲醇)

Table 6 The results of variance analysis (hydrochloric acid-methyl alcohol)

| 因素 Factor | 偏差平方和 SSD | 自由度 DF | F 值 F value | F 临 F critical value | 5% 显著性 Significance at 5% level |
|-----------|-----------|--------|-------------|----------------------|---------------------------------|
| 时间        | 0.270     | 2      | 67.5        | 19                   | *                               |
| 温度        | 0.004     | 2      | 1.0000      | 19                   |                                 |
| 体积        | 0.059     | 2      | 14.750      | 19                   |                                 |
| 误差 Error  | 0         | 2      |             |                      |                                 |

### 2.4 最佳工艺验证试验

为考察上述优选提取工艺的稳定性,取永思小檗 3 份,每份 1 g,按优选出的最佳工艺进行提取,测定盐酸小檗碱含量。由表 7 可知,按正交实验优选出的最佳提取工艺进行验证,3 次提取结果分别为 12.9887、12.9485

和 12.9527 mg, 均值为 12.9634 mg。均处于最高水平, 证明该提取工艺稳定、可靠。

表 7 盐酸小檗碱的提取率

| 序号 | 盐酸小檗碱含量 Content of berberine hydrochloride/mg |
|----|---|
| 1  | 12.9887                                       |
| 2  | 12.9485                                       |
| 3  | 12.9527                                       |

### 3 讨论

正交实验结果表明, 影响盐酸小檗碱含量的因素主次依次排序为提取时间>盐酸甲醇用量>提取温度。由方差分析可知, 超声提取时间对盐酸小檗碱含量的影响显著。各因素的最佳水平为  $A_3B_1C_2$ , 即 1:150 的固液比, 30℃下超声提取 50 min。这与席国萍等<sup>[14]</sup>从黄连中提取盐酸小檗碱的条件基本(50%乙醇以 1:9 的料液比, 60℃提取 2 次)悬殊较大, 这是由于盐酸甲醇的沸点较低。按正交实验优选的最佳提取工艺进行验证, 3 次结果均处于最高水平, 证明该提取工艺稳定、可靠。

从现有该属生物碱类化学成分研究的文献来看, 对该属植物所含生物碱类成分的提取多用甲醇、乙醇等有机溶剂或 1%左右的酸水(硫酸或醋酸)进行提取。实验室研究多用甲醇或乙醇对该属植物中生物碱类化学成分进行提取。工业生产多以酸水提取该属植物生物碱类化学成分<sup>[15]</sup>。乙醇回流提取法提取彻底、杂质少, 提取时间可大为缩短, 由于乙醇成本较高、易燃易爆、要求条件设备复杂等, 其在工厂化生产中受到一定限制, 但在试验研究中仍不失为较好的选择方法<sup>[16]</sup>, 但所得化合物往往纯度不高, 产量较低, 为了克服此缺点, 结合实际情况采取了超声波提取法<sup>[10]</sup>。经超声提取的小檗碱, 用

红外谱仪扫描, 核磁共振波谱仪测得的光谱和氢图谱图与常规浸泡法一致<sup>[17]</sup>。

### 参考文献

- [1] 肖培根, 刘国声, 陈碧珠. 三颗针植物资源的综合利用[J]. 药学通报, 1979, 14(8): 381-382.
- [2] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 57-65.
- [3] 徐宁. 紫外分光光度法测定黄柏中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业, 2010, 19(12): 48.
- [4] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 142-144.
- [5] 宣波. 小檗碱对大鼠实验性心肌梗塞的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1995, 11(3): 222-223.
- [6] 许桂芝, 王凤琴, 李凡, 等. 黄连素治疗顽固性室性心律失常 38 例疗效分析[J]. 吉林医学, 1994, 15(3): 168.
- [7] 林菁. 小檗碱对 K562 细胞生长的抑制作用[J]. 福建医学院学报, 1996, 30(4): 309-312.
- [8] 王志红, 林菁. 盐酸小檗碱对 HL-60 细胞增殖与分化的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(11): 1305.
- [9] 杨志学, 陈柏双, 黄爱华. 正交试验优选三颗针中盐酸小檗碱的提取工艺[J]. 中国民族医药杂志, 2004(S1): 184.
- [10] 徐海星, 何明三, 刘小平. 芒齿小檗提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(6): 333.
- [11] 杨宏健, 肖美凤, 袁丽, 等. 正交实验优选三颗针中小檗碱的提取工艺[J]. 中国药师, 2005(8): 673.
- [12] 中国科学院植物研究所. 中国植物志[M]. 19 卷. 北京: 科学出版社, 2005: 96.
- [13] 何顺志, 徐文芬. 贵州中草药资源研究[M]. 贵州: 贵州科技出版社, 2007.
- [14] 席国萍, 何照范. 黄连中小檗碱的提取工艺[J]. 山地农业生物学报, 2004, 23(6): 502-506.
- [15] 徐任生, 陈仲良. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海: 上海科技出版社, 1989: 271.
- [16] 马志刚, 马秀英, 杨平. 我国 30 年来对小檗属药用植物的研究[J]. 甘肃科学学报, 1999, 11(1): 76.
- [17] 程咏梅, 陈仁华. 小檗碱提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1445.

## Effect of Hydrochloric Acid-methyl Alcohol on Extraction Rate of Berberine Chloride from *Berberis tsienii* Ying

WANG Xu-ying, XIANG Hong, ZUO Jing-hui, LIN Chang-song

(Department of Life Science, Liupanshui Normal College, Liupanshui, Guizhou 553004)

**Abstract:** Taking Hydrochloric Acid-methyl Alcohol as solvent, the effect of Hydrochloric Acid-methyl Alcohol extraction time, temperature and solvent times on extraction rate of Berberine Chloride from *Berberis tsienii* Ying were studied by orthogonal experiment  $L_9(3^4)$  using irradiation extraction method. The results showed that the optimum extracting condition of Berberine Hydrochloride from *Berberis tsienii* Ying was as follows: adding 150 times amount of hydrochloric acid-methyl alcohol extracting by irradiation for 40 minutes at 30℃. The extraction rate was the highest, and irradiation extraction time had significant impact on the content of Berberine Hydrochloride. The optimized process was accurate, simple, rapid, stable and high efficient.

**Key words:** *Berberis tsienii* Ying; Hydrochloric Acid-methyl Alcohol; Berberine Hydrochloride; orthogonal experiment; irradiation extraction