

## 乌药总生物碱提取工艺的优选及镇痛作用的研究

张 玉, 武一玫, 潘真真, 李亚楠, 聂 宁, 陶 蕊, 赵 骏\*

天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:** 目的 优选乌药总生物碱(TALR)的提取工艺并研究其镇痛作用。方法 采取乙醇回流法提取, 考察乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数影响, 进行  $L_9(3^4)$  正交试验设计, 以乌药总生物碱的紫外吸收峰最大吸光度  $A$  值为指标进行优选。镇痛实验取最佳提取方法所得 TALR 的不同浓度水溶液 ig 给予小鼠后, 采用醋酸小鼠扭体法研究 TALR 的镇痛作用。结果 优选工艺为: 加入 14 倍量 95%乙醇提取 1 h, 酸溶碱沉得 TALR, 因其  $A$  值远高于其他工艺, 故判断此法所得 TALR 质量分数相对最高。药理实验表明 TALR 可显著减少小鼠扭体次数。结论 优选工艺简单可行, 质量分数较高; TALR 具有较强的镇痛作用。

**关键词:** 乌药; 总生物碱; 提取工艺; 镇痛作用

中图分类号: R284.2 R971.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)05-0348-03

## Optimization of extraction technology and analgesic effect of total alkaloids from *Linderae Radix*

ZHANG Yu, WU Yi-mei, PAN Zhen-zhen, LI Ya-nan, NIE Ning, TAO Rui, ZHAO Jun

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To optimize the extraction technology of total alkaloids from *Lindera Radix* (TALR) and to study the analgesic effect. **Methods** The extraction technology of TALR was optimized by orthogonal experiment with concentration of ethanol, amount of ethanol, extraction time, and extraction times as factors, and with the maximum absorbance of ultraviolet absorption peak ( $A$ ) of TALR as index. In analgesic experiments, different concentration of TALR aqueous solution extracted by the optimized method was ig administered to mice, and the analgesic effect of TALR was observed by acetic acid writhing method. **Results** The optimum technology was 1 h extraction with 14 times amount of 95% alcohol and TALR was got after acid-dissolution and alkali-precipitation. The  $A$  value of optimum technology outclassed others, so the content of TALR was higher. Pharmacologic experiments indicated TALR could obviously decrease mouse writhing times. **Conclusion** The optimum technology is easy to be operated and extracted TALR has higher content. TALR has obvious analgesic effect.

**Key words:** *Linderae Radix*; total alkaloids; extraction technology; analgesic effect

乌药为樟科山胡椒属植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根, 为传统常用中药, 是重要的温中散寒理气止痛药。临床上常与多种中药配伍, 治疗胃寒气滞、胸闷脘痛、气厥头痛以及一切气痛等症<sup>[1]</sup>。乌药含有多种异喹啉生物碱、缩合鞣质、挥发油及倍半萜内酯等化学成分<sup>[2-3]</sup>, 但研究主要集中在挥发油及倍半萜类成分<sup>[4-5]</sup>。近年研究发现, 乌药药材的水、醇提取物具有抗炎和镇痛活性<sup>[6]</sup>, 但其有效成分至今尚未十分明确, 以往对乌药总生物碱(TALR)的镇痛作用有少量报道。

本实验采用正交试验及紫外吸光度对比进行分析, 以紫外吸光度的最大值来确定 TALR 质量分数相对高的提取方法, 并对 TALR 的镇痛作用进行了研究。

### 1 材料及仪器

#### 1.1 实验药材

乌药药材购自安徽惠隆中药饮片有限公司, 经天津中医药大学李天祥副教授鉴定为乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根。

#### 1.2 试验仪器

日本岛津 UV2401 型紫外-可见分光光度计;

收稿日期: 2012-06-25

作者简介: 张 玉 (1991—), 女, 本科在读, 研究方向为中药化学和中药药理学。Tel: 13116165312 E-mail: 1329909385@qq.com

\*通讯作者 赵 骏 E-mail: zhaojun\_022@sina.com

FA1004A 型电子分析天平(上海精科公司); GZK—40 电热真空干燥箱(天津市华北实验仪器有限公司); RE—52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHB—III 循环水多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

1.3 试剂

95%乙醇、浓盐酸、氨水、冰醋酸均为分析纯, 由天津市江天化工技术有限公司提供。阿司匹林(阿斯利康制药有限公司, 0.5 g/片)

1.4 动物

昆明种雄性小鼠, 体质量 18~20 g, 解放军第四研究所, 动物许可证号 SCXK-(军)-2009-003。

2 方法与结果

2.1 TALR 提取工艺优选

2.1.1 正交试验设计 通过预实验证实, TALR 易

溶于乙醇, 难溶于水。因此, 选择乙醇为溶剂, 以 TALR 紫外最大吸光度 *A* 的大小为指标, 选择影响醇提取率的乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)、提取次数(D) 4 个因素为考察因素, 采用  $L_9(3^4)$  正交设计表进行试验, 提取 TALR。正交因素水平见表 1, 实验设计及数据处理结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	乙醇体积分数(A)/%	乙醇用量(B)/倍	提取时间(C)/h	提取次数(D)/次
1	50	6	0.5	1
2	70	10	1	2
3	95	14	2	3

表 2  $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

实验号	因素				$A_1$	$A_2$	$A_1+A_2$
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	0.181 0	0.138 9	0.319 9
2	1	2	2	2	0.124 9	0.105 1	0.230 0
3	1	3	3	3	0.233 3	0.293 5	0.526 8
4	2	1	2	3	0.501 7	0.453 0	0.954 7
5	2	2	3	1	0.326 0	0.398 7	0.524 0
6	2	3	1	1	0.426 8	0.503 6	0.724 7
7	3	1	3	2	0.918 6	0.917 5	0.930 4
8	3	2	1	1	0.720 0	0.705 4	1.425 4
9	3	3	2	1	1.146 8	1.140 6	2.287 4
I	1.076 7	3.210 7	2.470 0	3.537 7			
II	2.609 8	2.585 8	3.472 1	2.890 8			
III	5.648 9	3.538 9	3.393 3	2.906 9			
极差 R	1.491	0.455	0.365	0.142			
SSj	1.722	0.155	0.053	0.017			

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和(SS)	自由度( <i>f</i> )	方差(S)	<i>F</i> 值	显著性
A	1.722	2	0.861	353.342	$P < 0.01$
B	0.155	2	0.078	31.897	$P < 0.01$
C	0.053	2	0.026	10.852	$P < 0.01$
D	0.017	2	0.008	3.435	

2.1.2 供试品溶液的制备 称取乌药粗粉 25 g, 共 9 份, 分别按正交表安排进行加热回流提取, 提取液滤过, 加入 2%盐酸至无沉淀产生, 滤过, 再向滤液中加入氨水至 pH 为 9, 静置, 滤过, 得 TALR, 真空干燥。把 9×2 份 TALR 样品粉末分别用 95%乙醇配制成 0.04 mg/mL 的供试液。

2.1.3 吸光度(A)的测定 TALR 中主含异喹啉类生物碱, 大多数异喹啉生物碱的紫外吸收峰在 285

nm 左右<sup>[8]</sup>, 在实验中检测到 TALR 在 282 nm 有一强吸收峰, 在此吸收峰下进行测定。

**2.1.4 结果与方差分析** 由表 2 直观分析知, 各因素对 TALR 的吸光度影响大小顺序为: A>B>C>D, 即乙醇体积分数>乙醇用量>提取时间>提取次数。方差分析结果显示, 乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间对 TALR 的吸光度均有显著影响, 而提取次数对 TALR 吸光度无显著影响, 故综合考虑, 优选工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>。

## 2.2 小鼠扭体法镇痛实验

雄性昆明种小鼠 50 只, 体质量 18~20 g, 随机分为 5 组。即对照组, 阿司匹林组 (0.5%), TALR 高、中、低剂量 (25、10、5 mg/mL) 组。以 20 μL/g 给药后 60 min 每只小鼠 ip 给予 1% 醋酸溶液 0.2 mL, 立即观察注射醋酸后 20 min 内的动物扭体数, 结果见表 4。

表 4 TALR 对小鼠扭体反应的影响 (n = 10)  
Table 4 Effect of TALR on writhing of mice (n = 10)

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	扭体次数/次
对照组	—	49.9**
阿司匹林		19.8**
TALR	25	24.1**
	10	30.7**
	5	28.2**

与对照组比较: \*\*P<0.01

\*\*P<0.01 vs control group

由表 4 可见, TALR 高、中、低剂量均能减少动物的扭体数, 且均与对照组比较有极显著差异。TALR 高、中、低剂量组与阿司匹林组比较, 差异无显著性。结果显示, TALR 有一定的镇痛作用, 且与阿司匹林组比较无显著差异。

## 3 结论

以供试液紫外吸收峰的最大吸光度为考察指标, 采用正交设计法, 得 TALR 提取优选工艺: 乌药饮片加 95% 乙醇 14 倍量提取 1 次, 提取时间 1 h, 后加 2% 盐酸至无沉淀产生, 滤过后以氨水调节 pH 至 9, 再次滤过, 得沉淀, 真空干燥。TALR 有明显的镇痛作用, 低剂量即可见效。

## 4 讨论

乌药所含生物碱较少, 其中主要特征活性物质为异喹啉类生物碱, 现已得到其中 9 种异喹啉生物碱的结构及含量<sup>[3]</sup>, 主要为含酚羟基类的生物碱, 故在 TALR 提取过程中, 应尽量避免接触空气和光。

在药理预实验中, 曾进行甩尾实验的探究, 但由于小鼠尾神经的完好程度及仪器灵敏度等不定因素较多, 数据虽显示 TALR 具有镇痛作用的趋势, 但总体不稳定, 统计意义不强, 故选择了小鼠扭体法镇痛实验进行研究。由于 TALR 水溶液在 3 h 内稳定性较高<sup>[9]</sup>, 而中剂量组与高、低剂量组的实验进行时间有所偏差, 故在数值上与高、低两组出现反差。药理实验表明, 乌药总生物碱具有明显的镇痛作用。据文献记载, 乌药无毒性、无致突变性<sup>[10]</sup>, 有望用于相关痛症的预防与治疗。

## 参考文献

- [1] 俞桂新, 王峥涛, 徐珞珊, 等. 乌药的化学成分及药理作用 [J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(3): 5-10.
- [2] 俞桂新, 李庆林, 王峥涛, 等. 乌药活性组分 LEF 的化学成分及抗风湿作用 [J]. 植物资源与环境, 1999, 8(4): 1-6.
- [3] 俞桂新, 中村宪夫, 马超美, 等. 乌药中异喹啉类生物碱 [J]. 中国天然药物, 2005, 13(15): 273-275.
- [4] 程显隆, 魏 锋, 冯玉飞. RP-HPLC 法测定乌药中乌药醚内酯和乌药内酯的含量 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(3): 225-227.
- [5] 蔡立红, 俞桂新, 王峥涛, 等. 高效液相色谱法测定乌药中乌药醚内酯的含量 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 657-659.
- [6] 李庆林, 俞桂新, 窦昌贵, 等. 乌药提取物的镇痛、抗炎作用研究 [J]. 中药材, 1997, 20: 629-631.
- [7] 俞桂新, 王长虹, 王峥涛. 乌药总生物碱对大鼠佐剂关节炎的影响及其机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3/4): 63-66.
- [8] 邓 婕, 高雅英. 综述异喹啉类生物碱分离与分析研究进展 [J]. 化工时刊, 2010, 24(1): 45-50.
- [9] 谭 蓉, 俞桂新, 冯年平, 等. 乌药总生物碱的大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中成药, 2011, 33(5): 787-790.
- [10] 来伟旗, 朱染枫, 陈建国, 等. 乌药的毒性研究 [J]. 职业与健康, 2003, 19(12): 78-80.