

# 益髓通经方中马钱子生物碱纯化工艺优选

金文淑<sup>1</sup>, 张炜煜<sup>2\*</sup>

(1. 通化万通药业股份有限公司, 吉林 通化 134001; 2. 长春中医药大学, 长春 130117)

**[摘要]** 目的: 优选大孔吸附树脂纯化益髓通经方中马钱子生物碱的工艺条件。方法: 以马钱子碱和土的宁的含量为指标, HPLC 进行含量测定, 通过静态吸附和解吸试验筛选大孔吸附树脂型号, 采用单因素试验考察大孔树脂吸附和洗脱条件, 确定益髓通经方中马钱子生物碱的纯化工艺。结果: 最佳纯化工艺为采用 X-5 型大孔吸附树脂, 上样液质量浓度  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 上样速度  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 上样量 4 BV, 吸附时间 2 h, 加 1 BV 水洗除杂, 用 6 BV 50% 乙醇以  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度进行洗脱。结论: 采用大孔吸附树脂纯化马钱子提取物中生物碱是可行的, 优选的纯化工艺简单、经济。

**[关键词]** 马钱子; 生物碱; 纯化工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0010-04

## Optimization of Purification Process for Alkaloids from *Strychnos nux-vomica* in Yisui Tongjing Prescription

JIN Wen-shu<sup>1</sup>, ZHANG Wei-yu<sup>2\*</sup>

(1. Tonghua Wantong Pharmaceutical Co. Ltd, Tonghua 134001, China;

**[收稿日期]** 20120829(010)

**[基金项目]** 吉林省自然科学基金项目(201015111)

**[第一作者]** 金文淑, 高级工程师, 从事工艺研究及新产品研究, Tel: 18843583005, E-mail: jinwenshu@126.com

**[通讯作者]** \* 张炜煜, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事新剂型新技术研究与开发, Tel: 0431-86172198, E-mail: weiyuzhang2003@126.com

项进行方差分析, 显示甲醇体积分数对提取效果有显著影响, 甲醇用量、超声时间对槲皮苷提取率影响无显著性差异。确定最佳工艺条件为  $A_2B_2C_2D_2$ , 即加 50 倍量 75% 甲醇浸泡 1 h 后超声处理 45 min。

**2.4 验证试验** 取桑寄生粉末 0.5 g, 按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 结果槲皮苷平均提取率  $8.64 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 0.44%, 说明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

根据槲皮苷的化学性质, 分别以甲醇、乙醇、水作为提取溶剂, 提取液经 HPLC 测定。结果表明, 甲醇的提取效率高, 峰形好; 乙醇提取率较高, 但峰分离度不高; 水提取率最低, 且峰分离度较差, 故选用甲醇作为提取溶剂。

桑寄生在 2010 年版《中国药典》中以槲皮素为鉴别指标, 而桑寄生中有效成分主要以槲皮苷等黄酮苷形式存在<sup>[2]</sup>, 为了更全面地反应桑寄生的质量, 建议以槲皮苷作为定量指标。本实验为建立桑寄生药材的质量标准及人工种植提供了试验依据。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 280.
- [2] 张协君, 朱开昕, 赵明惠, 等. 不同寄主来源的桑寄生药材槲皮苷与槲皮素含量分析[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1604.
- [3] 朱开昕, 张协君, 赵明惠, 等. 桑树寄主的 4 种桑寄生科药用植物槲皮素含量测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2395.
- [4] 喻文进, 夏武云, 肖玥, 等. 正交试验法优选了哥王中西瑞香素的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 12.
- [5] 杨秀利, 曹艳萍. 苜蓿中槲皮苷提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 212.
- [6] 黄桦华, 黄月纯, 魏刚, 等. 正交试验法筛选侧柏叶中总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 34.

[责任编辑 全燕]

2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**[ Abstract ] Objective:** To optimize purification technology conditions of alkaloids from *Strychnos nux-vomica* in Yisui Tongjing prescription by macroporous adsorption resin. **Method:** With the content of brucine and strychnine as indexes, which were determined by HPLC, macroporous adsorption resin type was screened by static adsorption and desorption test, single factor test was used to investigate adsorption and elution conditions, such as adsorption speed, adsorption time, elution concentration, elution speed, the amount of elution and so on, to determine purification technology of alkaloids from *S. nux-vomica* in Yisui Tongjing prescription. **Result:** Optimum purification technology was: type of macroporous resin was X-5, the concentration of sample solution  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , loading speed  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , sample volume 4 BV, adsorption time 2 hours, washed with 1 BV water for eluting impurity, eluted with 6 BV 50% ethanol, elution rate  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . **Conclusion:** Optimized technology was simple and economical, it was feasible for taking macroporous adsorption resin to purify alkaloids from *S. nux-vomica*.

**[ Key words ]** *Strychnos nux-vomica*; alkaloids; purification technology

益髓通经方为赵建军教授经验处方,由马钱子、鹿茸等中药组成。前期研究表明,益髓通经方对格林-巴利综合征(GBS)的经典动物模型——实验性自身免疫性神经炎(EAN)有明显疗效,可使EAN家兔坐骨神经的髓鞘、神经纤维等异常病理形态得到明显改善,髓鞘脱失减少,髓鞘板层清晰程度增强;能提高EAN家兔坐骨神经运动传导速度,降低坐骨神经异常F波出现率;同时能使协同刺激分子CD80mRNA表达水平明显降低。马钱子具有通络止痛、消肿散结的功效<sup>[1-2]</sup>,为益髓通经方中君药,其所含生物碱类成分是益髓通经方治疗格林-巴利综合征的主要药效成分,前期研究已确定了马钱子的最佳提取工艺。为了提高提取物中生物碱的纯度以达到减少服药剂量的目的,本试验拟采用大孔吸附树脂对马钱子粗提物进行纯化,通过单因素试验确定其工艺条件,为益髓通经方的进一步开发利用提供试验基础。

## 1 材料

AR2140型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),DZF-6050型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),MA-10000型可调式电热套(北京科伟永兴仪器有限公司)。

土的宁、马钱子碱对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为110705-200306,110706-200505),马钱子提取物(实验室自制),AB-8,D101,S-8,X-5,HPD600型大孔吸附树脂均购于沧州宝恩吸附材料科技有限公司,甲醇、乙腈均为色谱纯

(Sigma公司),其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 马钱子总生物碱含量测定

**2.1.1 色谱条件** Agilent C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水-磷酸二氢钾-庚烷磺酸钠(等比例混合)-乙腈(81:19),检测波长260 nm,柱温25 ℃,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量10 μL,理论塔板数按土的宁峰计算不少于5 000。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取土的宁和马钱子碱对照品适量,精密称定,分别置于5 mL量瓶中,加三氯甲烷适量使溶解,稀释至刻度,摇匀,分别精密量取1.0 mL,置同一5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配置成土的宁、马钱子碱质量浓度分别为0.250,0.253  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

**2.1.3 标准曲线的绘制** 精密吸取混合对照品溶液0.2,0.5,1.0,2.5,3.0 mL置5 mL量瓶中,各加甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,进样量10 μL,按上述色谱条件进样,测定,记录峰面积,以对照品峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得马钱子碱回归方程 $Y = 20\ 492X - 46.23$  ( $r = 0.999\ 9$ ),土的宁回归方程 $Y = 24\ 538X - 58.833$  ( $r = 0.999\ 6$ ),表明马钱子碱、土的宁分别在7.284 ~ 182.1,7.44 ~ 186.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

**2.1.4 样品测定** 取洗脱液,滤过,精密吸取续滤液1.0 mL,置于蒸发皿中,水浴挥干,加10.0 mL硫酸(3→100)溶解,加氨水调pH 9 ~ 10,三氯甲烷萃取4次,每次10 mL,水浴挥干,加三氯甲烷适量使溶解,置25 mL量瓶中,加三氯甲烷稀释至刻度,摇

匀;精密量取 1.5 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,按上述色谱条件进样,计算马钱子碱和土的宁的含量。

**2.2 大孔吸附树脂的预处理** 取大孔吸附树脂用乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,用乙醇洗至溶液加适量水无白色浑浊现象为止,用水洗至无醇味,备用。

### 2.3 树脂类型筛选<sup>[3-5]</sup>

**2.3.1 静态吸附试验** 分别量取处理好的 S-8, X-5, AB-8, D101, HPD600 型湿树脂约 2.0 g,精密称定,置于锥形瓶中,加入马钱子提取液 50 mL,置摇床中 25 °C 振荡 24 h,滤过,精密吸取滤液 1.0 mL,依法进行含量测定,按公式计算饱和吸附量。结果马钱子碱饱和吸附量分别为 17.33, 24.74, 28.30, 24.91, 13.85 mg·g<sup>-1</sup>;土的宁依次 23.88, 33.85, 37.21, 32.96, 19.32 mg·g<sup>-1</sup>。

$$\text{饱和吸附量} = (\text{初始质量浓度} - \text{吸附后质量浓度}) \times \text{吸附液体积} / \text{树脂质量} (\text{湿重})$$

**2.3.2 静态洗脱试验** 将已吸附的 S-8, X-5, AB-8, D101, HPD600 型大孔树脂分别置于锥形瓶中,加入 70% 乙醇 50 mL,置摇床中,25 °C 下振荡 24 h,解吸完毕,滤过,精密吸取滤液 1.0 mL,依法进行含量测定,计算马钱子碱洗脱率分别 52.32%, 62.84%, 60.70%, 57.71%, 61.64%;土的宁洗脱率依次为 53.38%, 62.24%, 61.96%, 60.08%, 61.08%。

$$\text{洗脱率} = \frac{\text{洗脱液浓度} \times \text{洗脱液体积}}{\text{饱和吸附量}} \times 100\%$$

以上结果表明,马钱子碱的饱和吸附量 X-5 > D101 > AB-8 > S-8 > HPD600;洗脱量 X-5 > AB-8 > D101 > S-8 > HPD600;洗脱率 AB-8 > HPD600 > X-5 > D101 > S-8。土的宁的饱和吸附量 X-5 > AB-8 > D101 > S-8 > HPD600;洗脱量 X-5 > AB-8 > D101 > S-8 > HPD600;洗脱率 AB-8 > X-5 > HPD600 > D101 > S-8。综合考虑,确定选用 X-5 型大孔树脂。

### 2.4 上样条件的考察<sup>[6-8]</sup>

**2.4.1 上样液质量浓度考察** 将经预处理好的 X-5 型大孔树脂湿法装柱,分别取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 的马钱子提取液,以 3 mL·min<sup>-1</sup> 的流速上样 3 BV,收集流出液,按 2.1.3 项下方法含量测定。结果马钱子碱吸附率依次为 99.22%, 98.96%, 98.40%, 97.32%;土的宁分别为 99.47%, 99.06%, 98.89%, 98.54%。说明上样液质量浓度为 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 时,马钱子碱和土的宁的吸附率最高。

**2.4.2 泄露曲线的绘制** 将经预处理的 X-5 型大

孔树脂湿法装柱,取 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 的马钱子提取液,以 3 mL·min<sup>-1</sup> 的流速上样 6 BV,分别收集 1, 2, 3, 4, 5, 6 BV 的流出液,按 2.1.3 项下方法操作,进行含量测定,泄露曲线见图 1。故选择上样量为 4 BV。

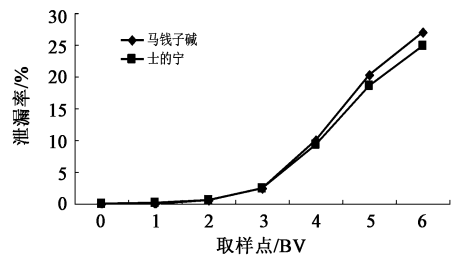


图 1 马钱子提取物泄露曲线

**2.4.3 上样流速考察** 将经预处理的 X-5 型大孔树脂湿法装柱,分别取 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 的马钱子提取液,以 1, 2, 3, 4 mL·min<sup>-1</sup> 的流速上样 4 BV,收集流出液,按 2.1.3 项下方法操作,进行含量测定。结果马钱子碱吸附率分别为 99.86%, 94.89%, 88.54%, 85.07%;土的宁则依次为 99.86%, 94.92%, 88.63%, 86.34%。说明当上样流速为 1 mL·min<sup>-1</sup> 时,吸附率最高。故上样流速选择 1 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.4.4 吸附时间考察** 将经预处理的 X-5 型大孔树脂湿法装柱,分别取 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 的马钱子提取液,以 1 mL·min<sup>-1</sup> 的流速上样 4 BV,吸附时间分别为 1, 2, 3, 4, 5 h,加 5 BV 70% 乙醇洗脱,接收洗脱液,按 2.1.3 项下方法操作,进行含量测定。结果马钱子碱洗脱率分别为 75.16%, 90.20%, 79.54%, 80.04%, 82.27%;土的宁洗脱率依次为 75.94%, 94.09%, 77.36%, 77.26%, 79.35%。因此确定吸附时间为 2 h。

### 2.5 洗脱条件考察<sup>[9-11]</sup>

**2.5.1 水洗脱条件的考察** 将经预处理的 X-5 型大孔树脂湿法装柱,取 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 的马钱子提取液,以 1 mL·min<sup>-1</sup> 的流速上样 4 BV,吸附 2 h,加水洗脱,分别收集 1, 2, 3, 4, 5 BV 洗脱液,加 8 BV 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,按 2.1.3 项下方法操作,进行含量测定。结果马钱子碱洗脱率分别为 90.16%, 68.14%, 76.84%, 73.07%, 54.16%;土的宁洗脱率依次为 84.90%, 64.12%, 72.13%, 69.62%, 52.54%。因此选择水用量为 1 BV。

**2.5.2 乙醇体积分数考察** 将经预处理的 X-5 型大孔树脂湿法装柱,取 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 的马钱子提取液,以 1 mL·min<sup>-1</sup> 的流速上样 4 BV,吸附 2 h,用 1 BV 水洗除杂,分别加 5 BV 体积分数分别为 40%,

50%,60%,70%,80%的乙醇进行洗脱,接收洗脱液,按2.1.3项下方法操作,进行含量测定。结果马钱子碱洗脱率分别为95.16%,97.76%,93.19%,87.58%,81.26%;土的宁洗脱率依次为76.55%,86.74%,85.60%,81.72%,77.41%。因此选用50%乙醇洗脱。

**2.5.3 洗脱剂用量的考察** 将经预处理的X-5型大孔树脂湿法装柱,取 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的马钱子提取液,以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速上样4 BV,吸附2 h,用1 BV水洗除杂,加10 BV 50%乙醇进行洗脱,接收洗脱液,每1 BV为1份,按2.1.3项下方法操作,进行含量测定,结果见图2。说明洗脱剂用量增加至6 BV时,马钱子碱和土的宁的洗脱量分别为0.519 5 mg,同时考虑到马钱子和土的宁的转移率,确定洗脱剂用量为6 BV。

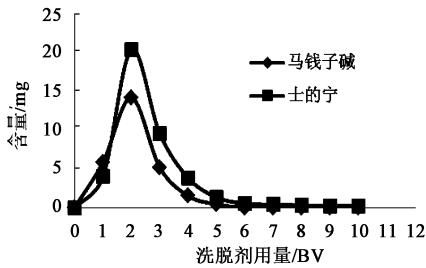


图2 马钱子提取物大孔树脂纯化工艺洗脱剂用量的考察

**2.5.4 洗脱速度的考察** 将经预处理的X-5型大孔树脂湿法装柱,取 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的马钱子提取液,以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速上样4 BV,吸附2 h,用1 BV水洗除杂,加6 BV 50%乙醇进行洗脱,洗脱流速分别为1,2,3,4,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,接收洗脱液,按2.1.3项下方法进行含量测定。结果马钱子碱洗脱率分别为94.24%,95.40%,88.22%,83.83%,78.84%;土的宁洗脱率依次为80.47%,81.56%,76.90%,74.24%,70.46%。故选择洗脱速度 $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.6 验证试验** 按优选的纯化工艺条件进行3次验证试验,采用HPLC测定纯化物中马钱子碱和土的宁的含量。结果3批样品中马钱子碱平均质量分数18.82%,土的宁平均质量分数32.33%,总生物碱平均纯度51.15%,平均回收率82.35%,符合申报新药中“有效成分质量分数>50%”的要求,表明该纯化工艺稳定可行。

### 3 讨论

马钱子中生物碱的种类较多,药理学试验已证明马钱子碱和土的宁对GBS有一定治疗作用<sup>[12]</sup>,

故选用二者作为指标成分。考察了流动相水-磷酸二氢钾-庚烷磺酸钠(等比例混合)-乙腈的比例对色谱峰的影响,分别为70:30,75:25,80:20,82:18,81:19,最终确定流动相比例为81:19。

生物碱纯化采用大孔吸附树脂可避免传统阴离子交换树脂中酸或碱洗脱带来的不便<sup>[13]</sup>,本试验在筛选树脂型号时,通过静态法综合考虑指标成分的吸附量和洗脱率,结果表明X-5型大孔吸附树脂更适合益髓通经方中马钱子生物碱的纯化富集。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:47.
- [2] 房丹,刘维,刘晓亚,等. 马钱子药理学研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2007,24(7):1018.
- [3] 管庆霞,王录娜,李永吉,等. 大孔吸附树脂纯化马钱子总生物碱的工艺研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1429.
- [4] 孙志明,段志刚,焦亮,等. 四逆散总生物碱分离纯化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):11.
- [5] 周文威,叶益萍. 大孔吸附树脂分离纯化延胡索总生物碱[J]. 中国现代应用药学,2010,27(3):268.
- [6] 孙静,张明,张小飞. 延胡索总生物碱纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):40.
- [7] 况晓,冯年平,张永太,等. 大孔吸附树脂分离纯化黄连黄柏总生物碱的工艺研究[J]. 中成药,2010,32(3):396.
- [8] 李倩霞,蒋林,杨得坡,等. 大孔吸附树脂分离岩黄连总生物碱的研究[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(10):750.
- [9] 张英,李卫民. 大孔树脂AB-8动态吸附黄柏总生物碱的工艺研究[J]. 广州中医药大学学报,2010,27(3):267.
- [10] 董洁,朱会敏,胡凯文,等. 大孔树脂纯化浙贝母中总生物碱工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):18.
- [11] 李近. 可生物降解载药微球的制备和释药动力学的研究[D]. 北京:清华大学,2008:1.
- [12] 张二力. 益髓通经方对实验性自身免疫性神经炎大鼠调节性T细胞的影响[D]. 吉林:长春中医药大学,2011:1.
- [13] 梁少玲,蔡宇,杨燕霞,等. 大孔树脂吸附在黄酮及皂苷类成分分离纯化中的应用[J]. 时珍国医国药,2006,17(2):277.

[责任编辑 仝燕]