

鱼腥草总生物碱的大孔吸附树脂纯化工艺

孟江*, 梁慧超, 陈磊, 卢国勇, 巫丹凤
(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选鱼腥草总生物碱大孔吸附树脂的分离纯化工艺。方法: 以盐酸小檗碱、胡椒内酰胺及马兜铃内酰胺 B 含量为指标, 比较不同型号树脂和不同工艺条件对鱼腥草总生物碱的分离纯化能力。结果: HPD-100 型大孔树脂对鱼腥草总生物碱有良好的吸附分离性能, 最佳工艺条件为药液质量浓度 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 3, 吸附流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 洗脱溶剂为氨水乙醇溶液(氨水浓度 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙醇体积分数 80%), 洗脱剂用量 4 BV, 洗脱速度 $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结论: HPD-100 型大孔树脂可用于鱼腥草总生物碱的提取纯化。

[关键词] 鱼腥草; 总生物碱; 大孔树脂; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0013-05

Purification Process of Total Alkaloids from *Houttuynia cordata* by Macroporous Resin

MENG Jiang*, LIANG Hui-chao, CHEN Lei, LU Guo-yong, WU Dan-feng

(College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of total alkaloids from *Houttuynia cordata* by macroporous resin. **Method:** With the content of berberine hydrochloride, pepper lactam and aristololactam B as indexes, separation and purification capacity of total alkaloids from *H. cordata* was compared with different types of macroporous resin and different technology conditions. **Result:** HPD-100 macroporous resin had the best separation and purification capacity for total alkaloids in following technology conditions: sample concentration was $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with pH 3, flow rate was $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, eluting reagent was ethanol solution of ammonia (ammonia concentration $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the volume fraction of ethanol 80%) with the amount of 4 BV, eluting velocity was $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. **Conclusion:** HPD-100 macroporous resin could be applied to purify alkaloids from *H. cordata*.

[Key words] *Houttuynia cordata*; total alkaloids; macroporous resin; purification

鱼腥草为三白草科蓴菜属植物蓴菜的干燥地上部分及新鲜全草, 具有清热解毒、消肿排脓、利尿通淋的功效^[1]。现代药理学研究表明鱼腥草中的生物碱类具有显著的抗肿瘤作用, 其中生物碱成分在体外对于多种人肿瘤细胞株有一定的细胞毒作用^[2]。本研究通过筛选, 确定鱼腥草总生物碱的最

佳纯化树脂型号, 并对其纯化工艺条件与参数进行优选, 为鱼腥草生物碱的进一步深入研究奠定基础。

1 材料

UV-2450 型紫外分光光度计(日本岛津公司), AY120 型电子天平(SHAMAOZU CORPOPAITION JAPAN), 鱼腥草采自广东省梅州市五华县, 经本校中药鉴定教研室程轩轩博士鉴定为三白草科植物蓴菜 *Houttuynia cordata* Thumb, 小檗碱对照品(北京中西远大科技有限公司, 批号 MST6-CDAO151), AB-8, D101 型大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂), HPD-100 型大孔吸附树脂(河北沧洲宝恩化工有限公司), 732 型阳离子交换树脂(广州金美时树脂化

[收稿日期] 20111110(009)

[基金项目] 广东省教育厅育苗工程(粤财教(2008)342号)

[通讯作者] * 孟江, 博士, 副教授, 从事中药炮制及饮片质量标准化研究, Tel: 020-39352169, E-mail: jiangmeng666@126.com

工有限公司), 胡椒内酰胺、马兜铃内酰胺 B 均为实验室自制, 经鉴定纯度 > 98%, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总生物碱的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥的盐酸小檗碱、胡椒内酰胺、马兜铃内酰胺 B 对照品适量, 加 95% 乙醇分别配置成 0.494, 1.100, 0.275 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.2 鱼腥草总生物碱提取液的制备^[3] 称取鱼腥草干品 500 g, 粉碎成粗粉, 加 95% 乙醇溶液回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液。减压回收乙醇至无醇味, 加 0.5% HCl 溶液调 pH 2~3, 滤过, 滤液加 1% NaOH 溶液, 调 pH 5~7, 静置, 离心, 除去沉淀, 继续滴加 1% NaOH 溶液使 pH 9~11, 即得。

2.1.3 测定波长的选择 取盐酸小檗碱、胡椒内酰胺、马兜铃内酰胺 B 对照品溶液及其供试液, 于 200~900 nm 扫描, 分别在 265, 276, 255 nm 处有最大吸收。故分别选择 265, 276, 255 nm 作为测定波长。

2.1.4 标准曲线的绘制 将盐酸小檗碱、胡椒内酰胺、马兜铃内酰胺 B 对照品溶液分别稀释成 5 个不同质量浓度的标准溶液, 分别在 265, 276, 255 nm 处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 结果见表 1。

表 1 3 种化合物标准曲线及线性范围

化合物	标准曲线	R ²	线性范围/mg·L ⁻¹
盐酸小檗碱	Y = 52.826X + 0.058	0.999 7	1.967 ~ 19.76
胡椒内酰胺	Y = 109.78X - 0.028	0.993 5	1.650 ~ 9.901
马兜铃内酰胺 B	Y = 6.364X - 0.113	0.999 8	5.501 ~ 27.502

2.2 树脂的筛选

2.2.1 树脂的预处理^[4] 大孔树脂 取 AB-8, D101, HPD-100 型大孔吸附树脂用 95% 乙醇溶液浸泡 24 h 使其充分溶胀, 取干燥洁净的玻璃柱 (1.8 cm × 30 cm), 湿法装柱, 用 95% 乙醇以 1 BV·h⁻¹ 流速冲洗, 洗至乙醇流出液与纯水混合 (体积比 1:1)

没有白色混浊现象出现, 去离子水同样的流速洗至流出液无醇味即可。

阳离子树脂 取 732 阳离子树脂, 以去离子水浸泡过夜, 洗至去离子水近无色, 加 5 BV 7% HCl 溶液浸泡 1 h, 随时搅拌, 去离子水洗至洗出液接近中性, 加 5 BV 8% NaOH 溶液浸泡 1 h, 随时搅拌, 去离子水洗至洗出液接近中性, 加 5 BV 7% HCl 溶液浸泡 2 h, 使阳离子交换树脂转为 H 型, 去离子水洗至近中性, 备用。

2.2.2 静态吸附与解吸附

2.2.2.1 静态吸附 精密称取各型号预处理干树脂 1.0 g, 分别加至 10 mL 2.1.2 项下的总生物碱提取液中, 室温静置吸附 24 h, 适时振摇, 测定静态吸附前后溶液中的总生物碱质量浓度, 计算饱和吸附量和吸附率。

2.2.2.2 静态解析 取上述已吸附饱和的树脂, 加 95% 乙醇 20 mL, 静置 24 h, 适时振摇, 测定总生物碱的质量浓度, 计算静态洗脱率。结果见表 2。

吸附量 = $(C_0V_0 - C_1V_1)/W$; 吸附率 = $(C_0V_0 - C_1V_1)/C_0V_0 \times 100\%$; 洗脱率 = $C_2V_2/(C_0V_0 - C_1V_1) \times 100\%$ 。

式中 C_0 为上样质量浓度; C_1 为吸附后剩余液的质量浓度; C_2 为洗脱液的质量浓度; V_0 为上样的体积; V_1 为吸附后剩余溶液体积; V_2 为洗脱液体积; W 为树脂质量。

结果显示 HPD-100 型大孔吸附树脂的吸附能力和解析能力均优于其他 3 种树脂, 故选取 HPD-100 型大孔吸附树脂分离纯化鱼腥草总生物碱。

2.3 纯化工艺研究

2.3.1 洗脱溶剂的考察 称取 4 份已吸附饱和 HPD-100 大孔吸附树脂, 过滤, 晾干, 置 100 mL 锥形瓶中, 分别加入 90% 甲醇、90% 乙醇、氨水乙醇 (氨水浓度 0.5 mol·L⁻¹, 90% 乙醇)、1% Na₂CO₃ 溶液各 20 mL, 使其充分解析。测定吸光度并计算静态洗脱率, 结果见表 3。由结果可知, 氨水乙醇溶液对各成分的洗脱率较高且安全无毒, 故本试验采用氨水乙醇溶液作为洗脱溶剂。

表 2 4 种树脂的静态吸附率和解析率

树脂型号	吸附量/mg·g ⁻¹			吸附率/%			洗脱率/%		
	盐酸小檗碱	胡椒内酰胺	马兜铃内酰胺 B	盐酸小檗碱	胡椒内酰胺	马兜铃内酰胺 B	盐酸小檗碱	胡椒内酰胺	马兜铃内酰胺 B
732 阳离子	0.05	0.03	0.071	33.55	40.59	48.62	23.58	33.00	40.09
HPD-100	0.15	0.07	0.158	78.56	75.53	77.09	67.71	75.21	86.21
AB-8	0.12	0.06	0.137	48.25	52.33	55.99	60.17	69.06	76.35
D101	0.13	0.06	0.145	45.96	50.64	54.11	67.37	76.78	83.23

表3 洗脱溶剂的考察

洗脱溶剂	洗脱溶液质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			洗脱率/%		
	盐酸小檗碱	胡椒内酰胺	马兜铃内酰胺 B	盐酸小檗碱	胡椒内酰胺	马兜铃内酰胺 B
90% 甲醇	0.126	0.061	0.154 0	51.95	53.25	54.20
90% 乙醇	0.121	0.058	0.150 5	46.92	47.76	50.93
氨水乙醇	0.130	0.063	0.1583	51.89	53.36	54.52
1% Na_2CO_3 溶液	0.009	0.005	0.0103	3.54	3.74	3.49

2.3.2 上样液浓度考察 将不同质量浓度的鱼腥草总生物碱提取液(质量浓度 4.01, 5.02, 6.69, 10.04, 20.07, 26.76, 40.14 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 以 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速分别通过 HPD-100 树脂, 6 BV 蒸馏水以 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速冲脱, 6 BV 氨水乙醇溶液以 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速洗脱, 测定吸光度, 并计算各生物碱含量, 结果见表 4, 当上样液浓度约为 $20.07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 各生物碱的吸附量均较高, 故采用 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液浓度。

表4 上样液浓度考察

上样液中总生物碱浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	吸附量/mg		
	盐酸小檗碱	胡椒内酰胺	马兜铃内酰胺 B
4.01	14.37	5.66	15.44
5.02	14.43	5.71	15.60
6.69	14.41	5.73	15.69
10.04	14.38	5.74	15.77
20.07	14.34	5.76	15.86
26.76	14.29	5.74	15.80
40.14	14.05	5.64	15.59

2.3.3 上样液 pH 考察 精密量取生物质量浓度为 $6.82\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的鱼腥草总生物碱提取液 10 mL, 共 9 份, 将其 pH 分别调为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 上样液流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 按 2.3.2 项下的洗脱条件进行洗脱, 分别计算洗脱液中总生物碱含量, 结果当上样液 pH 3.0 时, 鱼腥草总生物碱离子化强度较高, HPD-100 型树脂对其动态吸附效果最好, 故确定样品液 pH 3.0。

2.3.4 泄漏曲线的考察 精密量取生药质量浓度为 $20.07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 鱼腥草总生物碱提取液, pH 3.0, 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 以每 10 mL (1 BV) 为一个流份, 测定各流份中生物碱含量, 绘制泄漏曲线。结果见图 1。由泄露曲线可知上样液从第 5 个树脂体积开始泄露, 故选取 4 个树脂体积为最大上样量。

2.3.5 吸附流速的考察 精密量取生药质量浓度为 $20.07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 鱼腥草总生物碱提取液, pH 3.0, 每

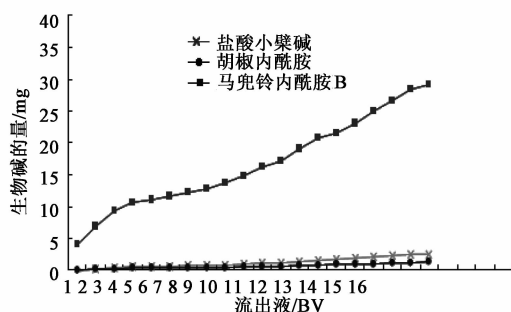


图1 鱼腥草总生物碱的泄漏曲线

份 10 mL, 共 5 份, 分别以 0.5, 0.75, 1.2, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速吸附, 按 2.3.2 项下方法洗脱, 计算各生物碱含量, 结果盐酸小檗碱吸附量分别为 14.66, 14.33, 14.09, 13.83 mg; 胡椒内酰胺吸附量分别为 5.44, 5.30, 5.21, 5.12 mg; 马兜铃内酰胺 B 吸附量分别为 14.36, 14.05, 13.85, 13.61 mg。由结果可知, 当上样液吸附流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 乙醇洗脱液中各生物碱含量最高, 故采用上样吸附流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3.6 吸附时间的影响 精密量取生药质量浓度为 $20.07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 鱼腥草总生物碱提取液, pH 3.0, 流速 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 分别静置吸附 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h, 6 BV 蒸馏水以 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速冲脱, 洗脱液弃去, 6 BV 氨水乙醇溶液以 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速洗脱, 收集洗脱液, 测定吸光度并计算各生物碱含量, 结果盐酸小檗碱吸附量分别为 14.45, 14.50, 14.66, 13.98 mg; 胡椒内酰胺吸附量分别为 5.35, 5.37, 5.44, 5.43 mg; 马兜铃内酰胺 B 吸附量分别为 14.17, 14.21, 14.36, 14.85 mg。鱼腥草各生物碱的吸附量随着时间的增加而增大, 故确定静置吸附时间为 2.0 h。

2.3.7 洗脱溶剂的考察 精密量取生药质量浓度为 $20.07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 鱼腥草总生物碱提取液, 分别用不同浓度氨水 (0.5, 1.0, 2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 80% 乙醇溶液以 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 计算洗脱液中各生物碱的含量和洗脱率。结果见图 2, 由图看出 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水乙醇液洗脱能力最强。

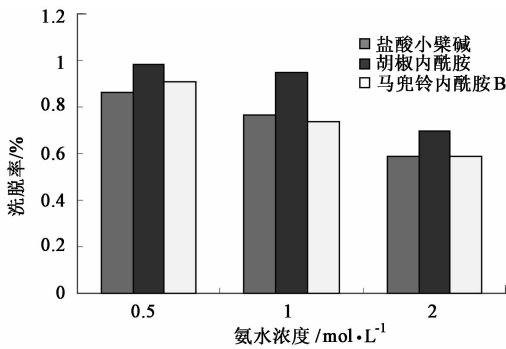


图 2 氨水浓度对鱼腥草生物碱洗脱率的影响

精密量取 20.07 g·L⁻¹ 鱼腥草总生物碱提取液, pH 3.0, 每份 10 mL, 共 4 份, 分别用 0.5 mol·L⁻¹ 氨水不同体积分数乙醇 (20%, 40%, 60%, 80%) 洗脱, 计算洗脱液中总生物碱的量和洗脱率, 结果见图 3, 随着乙醇体积分数的增大, 洗脱率增强, 故采用 80% 乙醇。

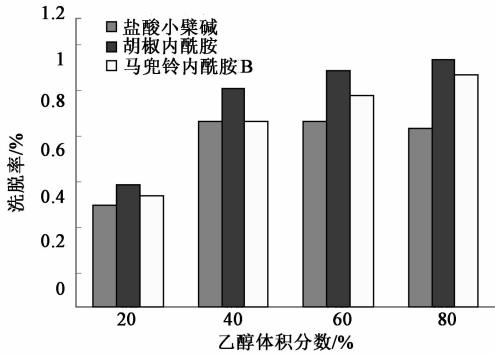


图 3 乙醇体积分数对鱼腥草生物碱洗脱率的影响

2.3.8 洗脱速度的考察 精密量取质量浓度为 20.07 g·L⁻¹ 总生物碱提取液, 分别以 0.75, 1.5, 3.0 mL·min⁻¹ 流速氨水乙醇溶液洗脱, 结果盐酸小檗碱洗脱率分别为 76.78%, 78.11%, 81.90%; 胡椒内酰胺洗脱率分别为 83.18%, 83.45%, 86.35%; 马兜铃内酰胺 B 解析率分别为 80.62%, 82.36%, 86.07%。由结果得知, 当洗脱流速为 3.0 mL·min⁻¹ 时, 洗脱效果优于其他流速, 故选择洗脱流速为 3.0 mL·min⁻¹。

2.3.9 水洗体积的确定 按上述所确定的吸附及洗脱条件, 精密量取样品液 20 mL, 以 0.5 mL·min⁻¹ 的流速进行动态吸附, 用蒸馏水以 2.0 mL·min⁻¹ 的流速冲脱, 每个树脂体积收集 1 份, 观察溶液颜色并测定吸光度, 检测各流份水洗液中总生物碱含量。结果 10 份样品中总生物碱的损失量依次为 23.94, 14.93, 10.75, 9.11, 8.21, 7.70, 7.30, 6.83, 6.35, 6.13 mg。第 6 个流份以后的样品溶液颜色已趋于无色, 杂质基本洗下, 考虑到总生物碱的损失量和最

终产物纯度, 本试验确定水洗体积为 6 BV。

2.3.10 洗脱溶剂用量的考察 精密量取 20 g·L⁻¹ 的鱼腥草总生物碱提取液 20 mL, 动态吸附后, 蒸馏水洗脱除杂, 氨水乙醇溶液以 3.0 mL·min⁻¹ 流速洗脱, 收集流出液, 每个树脂体积收集 1 份, 共收集 10 份。计算各流份生物碱的含量。结果见图 6, 可知第 4 份洗脱液中总生物碱含量已经很低, 故确定氨水乙醇溶液用量为 4 BV。

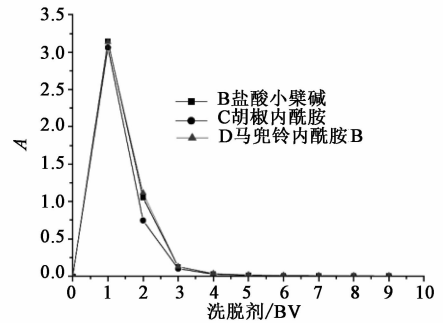


图 4 总生物碱洗脱剂用量考察

2.4 纯化工艺验证 为了确保该提取工艺的可行性与合理性, 按优选大孔吸附树脂纯化工艺进行 3 次验证试验, 结果盐酸小檗碱平均吸附率和平均洗脱率分别为 82.47%, 86.33%; 胡椒内酰胺平均吸附率和平均洗脱率分别为 77.71%, 93.01%; 马兜铃内酰胺 B 平均吸附率和平均洗脱率分别为 79.68%, 85.62%。同时鱼腥草总生物碱提取物中盐酸小檗碱、胡椒内酰胺、马兜铃内酰胺的纯度分别由纯化前的 4.74%, 2.29%, 5.32% 提高到 16.55%, 4.10%, 19.04%。说明优选工艺条件分离纯化鱼腥草总生物碱, 吸附率和吸脱率稳定, 纯化效果明显, 工艺可行。

3 讨论

本研究以盐酸小檗碱、胡椒内酰胺和马兜铃内酰胺 B 作为考察指标, 多指标优选鱼腥草总生物碱的最佳树脂, 并对其分离纯化的工艺进行优选, 优选工艺条件下, HPD-100 型大孔吸附树脂吸附分离鱼腥草总生物碱, 各成分的洗脱率和吸附率分别均在 85%, 77% 以上。表明采用大孔吸附树脂纯化鱼腥草总生物碱是一种可行的、值得推广的纯化方法。

树脂对化学成分的吸附, 按操作方法的不同可分为静态吸附和动态吸附 2 种。本文采用静态吸附法考察了最优树脂类型和洗脱溶剂, 动态吸附方法得到 HPD-100 型大孔吸附树脂分离纯化鱼腥草总生物碱的适宜工艺条件。由实验可知, 静态吸附方法与动态吸附方法相比, 吸附效果好, 但洗脱效果不如动态洗脱。

散瘀软膏成型工艺优选

尹华^{1*}, 周爱珍^{1,2}, 王知青¹

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

[摘要] **目的:** 优选散瘀软膏的成型工艺。**方法:** 筛选不同配比乳剂型基质; 以外观性状和稳定性为指标, 采用正交试验对散瘀软膏的成型工艺进行优化。**结果:** 最佳成型工艺为药物浓缩液加入三乙醇胺、甘油及尼泊金乙酯 85 °C 加热溶解为水相; 硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、液体石蜡、白凡士林、羊毛脂 85 °C 加热熔融为油相。将油相以细流状加至水相中, 550 r·min⁻¹ 速度搅拌至完全冷却。**结论:** 优选的成型工艺合理可行, 制剂稳定性好, 适用于工业化生产。

[关键词] 散瘀软膏; 成型工艺; 软膏

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0017-03

Optimization of Forming Technology of Sanyu Ointment

YIN Hua^{1*}, ZHOU Ai-zhen^{1,2}, WANG Zhi-qing¹

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;
2. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize forming technology of Sanyu ointment. **Method:** Emulsion-type matrix was screened in different ratio; Using appearance and stability as evaluation indexes, forming technology of Sanyu ointment was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimal forming technology was: Took drug concentrated liquid was added triethanolamine, glycerol and ethylparaben heating to 85 °C as aqueous phase; Took stearic acid, glyceryl monostearate, liquid paraffin, white vaselin and lanolin heating to melt at 85 °C as oil phase. Then added oil phase to aqueous phase with small-streams flowing, stirring at a speed of 550 r·min⁻¹ to cool completely. **Conclusion:** Optimized forming technology was reasonable and feasible, which could produce stable preparation and was suitable for industrial production.

[Key words] Sanyu ointment; forming technology; ointment

散瘀软膏由大黄、黄芩、黄柏等药物组成, 是课题组在浙江省中医院医院制剂的基础上研制的局部

[收稿日期] 20110826(011)

[基金项目] 浙江省教育厅高校科研基金项目(20060717); 浙江省科技厅重点项目(2007C23020); 浙江省中药现代化专项; 浙江省中医药科研基金项目(2006C038)

[通讯作者] * 尹华, 教授, 博导, 从事中药质量标准及新药研发, Tel: 0574-86613604, E-mail: maryinhua@163.com

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:208.
- [2] Kim S K, Ryu S Y, No J, et al. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata* [J]. Arch Pharm Res, 2001, 24(6): 518.
- [3] 赵骏, 李小年. 利用大孔吸附树脂纯化荷叶生物碱[J]. 中药材, 2003, 26(9): 669.
- [4] 柳伟, 王宏洁, 边宝林. 大孔吸附树脂纯化莲子心总生物碱的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3): 23.
- [5] 曾永长, 梁少瑜, 邢学峰, 等. 白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 26.

[责任编辑 全燕]