

延胡索总生物碱纯化工艺

孙静¹, 张明², 张小飞¹

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西西安大唐制药集团有限公司, 西安 710075)

[摘要] 目的: 研究采用阳离子交换树脂法富集延胡索生物碱的工艺参数。方法: 以总生物碱交换量为考察指标, 经阳离子交换树脂法富集后, 采用紫外分光光度法测定。结果: 纯化工艺条件为药材-浓缩液 = 1:5 做为上柱液, 药材比树脂为 1:1, 流速 2 BV·h⁻¹, 径高比约为 1:10, 5 BV 的纯化水 2 BV·h⁻¹ 水洗除杂, 4 BV 的含 5% 氨水的 70% 乙醇 2 BV·h⁻¹ 洗脱树脂柱。结论: 该法富集纯化生物碱稳定可行。

[关键词] 延胡索; 树脂; 紫外-可见分光光度法; 分离纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0040-04

Studies on Purification Technology of Total Fumaric Alkaloids

SUN Jing¹, ZHANG Ming², ZHANG Xiao-fei¹

(1. School of Pharmacy, Shannxi University of Traditional Chinese Medicine, Xiayang 712046, China;
2. Shannxi Datang Pharmaceutical Co. Ltd, Xi'an 710075, China)

[Abstract] **Objective:** To study the method of enrichment of fumaric alkaloids by using cation resin. **Method:** Ultraviolet spectrophotometry was used to determine total fumaric alkaloid with exchange capacity as index. **Result:** The optimum purification condition was as follows: herbs: concentrate solution was about 1:5, herbs: cation resin was about 1:1; flow rate was 2 BV·h⁻¹, diameter:high of cation resin column was about 1:10; 5 BV of purified water eluted resin column to removed impurities, flow rate was 2 BV·h⁻¹, 4 BV of 70% ethanol as eluent consisted of 5% ammonia, 2 BV·h⁻¹ flow rate washing resin column. **Conclusion:** The optimum condition was stable and can be used for purification of alkaloids.

[Key words] Corydalis Rhizoma; resins; ultraviolet spectrophotometry; separation and purification

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 的干燥根茎。其性辛苦温, 具有活血, 行气, 止痛的作用^[1]。现代药理研究延胡索关于治疗消化性溃疡的作用^[2-6] 主要表现在镇痛作用、抗溃疡作用, 且已有研究成果表明, 抗溃疡的有效部位为生物碱部分。在开发以延胡索为主要药物治疗消化性溃疡制剂时, 提高有效成分的富集, 增强药物疗效显得极为重要。

本研究采用阳离子交换树脂吸附法纯化生物

碱, 以总碱的含量为考察依据, 为确定延胡总生物碱的纯化工艺提供实验依据。

1 材料

UV-1102 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); 延胡索乙素对照品(批号 110726-200409, 中国药品生物制品检定所); 延胡索购于西安盛兴中药饮片厂, 经陕西中医学院药学院程虎印教授鉴定, 均符合《中国药典》2010 年版一部有关规定。

强酸性阳离子交换树脂 732 型、D001 型均购自西安树脂厂; 磷酸氢二钠、溴甲酚绿、氢氧化钠、三氯甲烷、无水乙醇、盐酸均为分析纯。

2 方法和结果

[收稿日期] 20101123(005)

[第一作者] 孙静, 博士生, 研究方向: 中药制剂, Tel: 029-38185175, E-mail: ph.175@163.com

2.1 样品的制备 取延胡索药材适量,用9倍量的70%乙醇回流提取3次,每次1 h,趁热过滤,回收乙醇至无醇味,浓缩到4倍药材量,用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸调节pH 3,静置,过滤,调节体积,使药材-浓缩液(1:5),即药液中含生药量为 $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,作为样品备用溶液。

2.2 测定波长的选择 参考有关文献[7-16]和延胡索生物碱的性质,采用酸性染料显色后,用紫外分光光度法测定总生物碱的含量。

精密量取 $0.125\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 延胡索对照品溶1.0 mL和上述样品溶液1.0 mL,分别加三氯甲烷20 mL,pH 4.0缓冲溶液14 mL,溴甲酚绿溶液5 mL,振摇2 min,静置1 h,分取三氯甲烷液,同时做空白试验,于紫外-可见分光光度计上扫描(400~800 nm),结果表明,延胡索乙素对照品溶液和样品溶液在显色后的最大吸收波长均为411 nm,故选择411 nm为测定波长。

2.3 阳离子交换树脂预处理 延胡索主要有效成分为生物碱类,因此采用强酸性阳离子交换树脂对生物碱进行富集和纯化工艺的研究。根据生产厂家提供的预处理和再生方法,用去离子水浸泡过夜,并洗至去离子水近无色,装入色谱柱,用5倍体积量2%的氢氧化钠冲洗树脂柱,使树脂转化为钠型,并用去离子水洗至流出液近中性;最后用5倍体积量 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸冲洗树脂柱,使树脂转化为氢型,并用去离子水洗至流出液近中性,备用。

2.4 阳离子交换树脂型号的筛选 生物碱能与酸形成盐而溶于水中,形成的生物碱盐阳离子可被阳离子交换树脂的氢离子交换而吸附在树脂上。延胡索的主要成分是叔胺类生物碱,碱性较弱,故选用强酸性阳离子交换树脂效果会更好。交联度大的离子交换树脂,交换容量大,但交联网孔小,不利于大离子的进入;交联度小的树脂,交换容量小,但交联网孔大,易于离子的扩散和交换,因此,我们选用2种交联度不同的D001和732型强酸性阳离子交换树脂的交换能力进行了比较研究,以筛选出适宜于延胡索总生物碱纯化的树脂类型。

精确称取上述处理好的2种型号树脂各5 g,置锥形瓶中,分别加入50 mL上述样品液,每隔2 h振摇1次,室温下静置浸泡12 h后,在411 nm下测定提取液中剩余的总生物碱的含量,计算树脂的交换量,D001和732交换量分别为9.78,19.89 mg。结

果表明:通过静态吸附实验,732型阳离子交换树脂的交换量明显高于D001型阳离子交换树脂,因此用732型阳离子交换树脂对延胡索总生物碱进行纯化。

2.5 药液pH的筛选 精确称取上述处理好的732型阳离子交换树脂5 g,共4份,置锥形瓶中,分别加入pH 2,3,4,5的延胡索样品液(总生物碱量51.18 mg)各50 mL,每隔2 h振摇1次,室温下静置浸泡12 h后,测定提取液中剩余的总生物碱的含量,总生物碱的交换量分别为17.50,19.45,14.56,6.19 mg。表明当pH 3时,732型阳离子交换树脂的交换性能最佳。

2.6 树脂动态交换条件的筛选

2.6.1 上样药液浓度的考察 精密称取732型阳离子交换树脂约5 g,共4份,分别装柱,将不同质量浓度pH 3的延胡索样品液以不同的体积分别加入到树脂柱中,以相同的流速进行吸附,测定吸附后溶液中总生物碱的浓度,优化延胡索样品液最佳上样浓度,结果见表1。当以1:5的上样浓度时,树脂的交换量最大,故确立药液比1:5为最佳上样浓度。

表1 上样药液浓度对交换量影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

药液比	上样质量 浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	总生物碱量 /mg	上样体积 /mL	交换总生物 碱量/mg
1:2	1.79	26.86	15	20.94
1:5	1.02	25.59	25	23.19
1:8	0.68	27.30	40	17.77
1:10	0.54	26.91	50	16.65

2.6.2 吸附流速 选用3根同样的树脂柱,称取732型阳离子交换树脂各5 g,湿法装柱,径高比约1:10。以延胡索上述样品溶液为上柱液,上柱液通过树脂柱流速分别为1,2,3 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$,室温。分批收集流出液,每流出5 mL收集1份。测定每份流出液中总生物碱的含量,按下式计算每份流出液中总生物碱的泄漏率,并对流出液作树脂动态交换曲线,见图1。

$$\text{总生物碱泄漏率} = (\text{流出液中总生物碱质量浓度} / \text{上柱液中总生物碱质量浓度}) \times 100\%$$

从图1可以看出,流速对树脂动态交换有一定的影响。在上柱液浓度相同的条件下,在1 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 低流速下上柱液中总生物碱在树脂柱中充分交换,使树脂交换能力提高。随着流速继续增大,上柱液处理量减少。1 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 和2 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的操作流速下,树脂的交换效率基本相平,但明显优于3 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的

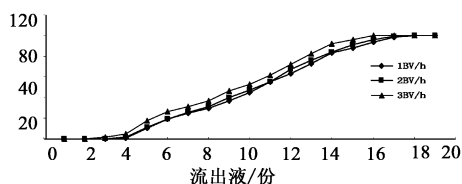


图 1 不同流速阳离子交换树脂动态交换总生物碱漏池曲线

操作流速下的树脂交换效率。故选择 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速。

2.6.3 径高比的确定 选用 3 根粗细不同的树脂柱,称取 732 型阳离子交换树脂各 5 g,湿法装柱,径高比分别约为 1:5,1:10,1:15。以延胡索上述样品溶液 25 mL 为上柱液,提取液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。收集流出液,测定泄漏率分别为 13.38%,13.29%,13.46%,结果表明:树脂的径高比对交换的影响很小,因此根据实际情况选用 1:10 作为本试验的径高比。

2.6.4 吸附容量的确定 上述的上样药液 1 次交换的泄漏率 13% 左右,考虑到多次交换有利于节约成本药材,因此对药液的交换次数进行研究,同时确定树脂的吸附容量。选用 3 根同样的树脂柱,称取 732 型阳离子交换树脂各 5 g,湿法装柱,径高比约为 1:10,以延胡索上述样品溶液 25 mL 为上柱液,药液分别交换的次数为 1,2,3 次,药液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。收集流出液,测定泄漏率分别为 13.55%,13.46%,13.21%。结果表明:交换 3 次、2 次和吸附 1 次的泄漏率基本没有差别,因此最终选择交换 1 次,同时计算树脂的吸附容量为 4.4 mg 总生物碱每 g 树脂。

2.7 树脂洗脱条件筛选

2.7.1 水洗除杂工艺的考察 选用 4 根同样的树脂柱,称取 732 型阳离子交换树脂各 5 g,湿法装柱,径高比约为 1:10,以延胡索上述样品溶液 25 mL 为上柱液,上柱液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。分别以不同柱体积的纯化水 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 水洗除杂,测定洗脱液中总生物碱的含量,并且将洗脱液浓缩、干燥至恒重,求算固形物的量,结果见表 2。最终选择 5 BV 的纯化水 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 水洗除杂。

表 2 水洗除杂工艺的考察

水洗体积数/倍	总生物碱/mg	干膏量/g
3	0.14	0.354 6
4	0.15	0.459 8
5	0.15	0.472 5
6	0.16	0.473 1

2.7.2 氨浓度对洗脱效果的影响 选用 4 根同样的树脂柱,称取 732 型阳离子交换树脂各 5 g,湿法装柱,径高比约为 1:10,以延胡索上述样品溶液 25 mL 为上柱液,上柱液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。分别以 5 BV 的纯化水 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 水洗除杂。然后分别用含有不同浓度氨水(1%,3%,5%,7%)的 70% 乙醇溶液 30 mL 进行洗脱,测定洗脱液中总生物碱的含量。并且移取部分低温烘至恒重,计算固形物的量,结果见表 3。当氨水浓度为 5%,7% 时,所得提取物中总生物碱纯度高,且干膏量少,两者的区别不大,因此本实验选择 5% 氨水乙醇作为洗脱溶剂。

表 3 洗脱剂氨水浓度的考察

氨水浓度/%	总生物碱/mg	干膏量/g
1	17.26	0.022 5
3	19.47	0.030 4
5	21.34	0.039 8
7	21.39	0.038 9

2.7.3 乙醇浓度对洗脱效果的影响 选用 4 根同样的树脂柱,称取 732 型阳离子交换树脂各 5 g,湿法装柱,径高比约为 1:10,以延胡索上述样品 25 mL 为上柱液,上柱液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。分别以 5 BV 的纯化水 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 水洗除杂。然后分别用 30 mL 含 5% 氨水含 30% 乙醇,50% 乙醇,70% 乙醇,90% 乙醇以相同的洗脱流速洗脱,测定洗脱液中总生物碱的含量。并且移取部分低温烘至恒重,计算固形物的量,结果见表 4。70% 乙醇的洗脱物中总生物碱含量比较高,而且干膏量少。因此本试验选择含 5% 氨水的 70% 乙醇作为洗脱溶剂。

表 4 洗脱剂乙醇浓度的考察

乙醇体积分数/%	总生物/mg	干膏量/g
30	13.26	0.024 3
50	15.47	0.028 6
70	21.47	0.039 9
90	21.56	0.045 1

2.7.4 洗脱剂流速的考察 选用 3 根同样的树脂柱,称取 732 型阳离子交换树脂各 5 g,湿法装柱,径高比约为 1:10,以延胡索上述样品溶液 25 mL 为上柱液,上柱液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。分别以 5 BV 的纯化水 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 水洗除杂。然后分别用 30 mL 的 5% 氨水的 70% 乙醇以不同的流速进行洗脱,测定洗脱液中总生物碱的含量。1,2,3 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 结果分别为 21.78,21.47,18.91 mg。

由结果可知,随着洗脱流速的减慢,洗脱液中总

生物碱含量增高,但生产周期长。当流速为 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时,洗脱效果没有明显差别,综合考虑各因素影响,本实验确定以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 作为洗脱流速。

2.7.5 洗脱剂用量的考察 称取 732 型阳离子交换树脂 5 g,湿法装柱,径高比约为 1:10,以延胡索上述样品溶液 25 mL 为上柱液,上样液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。以 5 BV 的纯化水 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 水洗除杂。然后分别用含 5% 氨水的 70% 乙醇洗脱,以 5 mL 为 1 份收集洗脱液,收集 8 份,测定每份洗脱液中总生物碱的含量。根据结果绘制洗脱曲线见图 2。选择洗脱剂的用量为 4 BV,可以将总生物碱类成分基本洗脱完全。

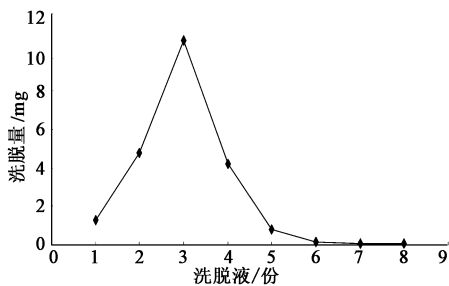


图 2 总生物碱洗脱曲线

2.8 验证试验 称取 732 型阳离子交换树脂 5 g,湿法装柱,径高比约为 1:10,以延胡索上述样品溶液 25 mL 为上柱液,上柱液通过树脂柱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,室温。分别以 5BV 的纯化水 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 水洗除杂。然后分别用 4 BV 的含 5% 氨水的 70% 乙醇洗脱,测定洗脱液中总生物碱的含量。分别精密移取上述洗脱液适量,水浴蒸干,低温烘至恒重,计算固形物的量,结果见表 5。3 批样品的验证试验结果表明,用 732 型阳离子交换树脂纯化延胡索总生物碱效果良好,工艺稳定、可行。

表 5 3 批样品验证试验

批次	洗脱液中总生物碱含量/mg	固形物的量/g
1	21.52	0.039 8
2	21.39	0.039 5
3	21.47	0.039 1

3 讨论

对于购买的延胡索药材进行了延胡索乙素的测定,其含量为 0.056%,符合《中国药典》该药材含量测定项下要求。对其有效部位的提取我们采用了醇提,然后运用强酸性阳离子交换树脂精制的方法提

取其有效部位总生物碱,对于提取和精制的具体条件进行了系统的研究,结果显示延胡索总生物碱纯度可以达到 50% 以上,并且对该纯化物进行了质量评价研究,其延胡索乙素质量分数可达 3.5% 以上,有效地增加了有效成分的富集。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:130.
- [2] 刘芳,罗跃娥.延胡索研究概况[J].天津中医学院学报,2005,24(4):240.
- [3] 吕清文,丛雅勤.延胡索药理作用及临床应用浅议[J].内蒙古中医药,2004:26.
- [4] 赵翠仙,杨来秀,王晓东.延胡索碱的药理学研究概况[J].内蒙古科技与经济,2001,(2):125.
- [5] 王义明,张效禹,李云兴等.延胡索全碱抗溃疡作用的实验研究[J].辽宁中医杂志,1980,(1):36.
- [6] 李毓,王建华,劳绍贤等.延胡索乙素对离体大鼠胃酸分泌的抑制作用[J].中国药理学通报,1993,9(1):44.
- [7] 刘喜纲,刘翠哲,常金花.应用酸性染料比色法测定总生物碱的含量[J].中国药房,2007,18(11):875.
- [8] 刘生肝,刘喜平,董钰明.延胡索与川楝子配伍中总生物碱含量变化的研究[J].中医儿科杂志,2006,2(5):42.
- [9] 陈志慧,宋光泉,周家容.酸性染料比色法测定断肠草总生物碱的含量[J].江西农业大学学报,2006,28(3):440.
- [10] 漆小梅,陈志果,陈柏年等.酸性染料比色法测定槲寄生总生物碱的含量[J].山西医科大学学报,2006,37(4):384.
- [11] 高继武,蒋山好.离子对萃取光度法测定雪上一枝蒿总生物碱含量[J].中国民族民间医药杂志,2000,(43):88.
- [12] 刘萍,辛勋,马汉林.离子对比色法测定元胡止痛片中总生物碱的含量[J].湖北医科大学学报,2000,21(3):196.
- [13] 迟玉明,赵瑛,吉泽丰吉等.离子交换树脂用于角蒿总生物碱的纯化研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(5):617.
- [14] 王洪新,王键,苦豆子种子生物碱离子交换分离的因素研[J].中草药,2002,33(12):1080.
- [15] 霍务贞,李苑新,姜红宇等.阳离子交换树脂纯化喘平复方总生物碱的工艺研究[J].中药新药与临床药理,2005,16(6):446.
- [16] 徐贤武,陈科力.阳离子交换树脂富集纯化益母草中总生物碱的工艺研究[J].医药导报,2007,26(9):1067.

[责任编辑 全燕]