

• 制剂工艺 •

苦参总生物碱提取纯化工工艺研究

全燕^{1*}, 王锦玉¹, 张锴镔², 孙小丽², 闫家福¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京振东光明药物研究院, 北京)

[摘要] 目的: 研究苦参总碱的提取纯化工工艺。方法: 以总生物碱提取率为指标考察冷浸、渗漉、水煎煮三种提取工艺; 以总生物碱及氧化苦参碱含量为指标, 优选纯化工工艺路线及阳离子树脂纯化工工艺的技术参数, 包括树脂用量, 流速, 解吸附方法等。结果: 最佳提取工艺为: 1% 醋酸水溶液冷浸3次, 以1/3(生药重)量的阳离子树脂纯化, 5% 氨水乙醇回流解吸附。提取物中苦参总生物碱含量可达95%以上, 总生物碱的提取纯化转移率可达80%左右。结论: 工艺简单, 周期短, 成本低, 提取物中总碱转移率及纯度均高。

[关键词] 苦参; 提取纯化; 阳离子树脂; 总生物碱; 氧化苦参碱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)01-0019-04

苦参总生物碱是用于制备苦参总碱注射剂等药剂的原料, 常用的工业化制备工艺为: ①粉碎, 碱化, 苯回流提取。提取液浓缩至干后用1% HCl 溶液溶解过滤, 滤液碱化以氯仿萃取, 浓缩而得总碱。②粗粉用甲醇冷浸, 真空浓缩回收甲醇, 加水稀释, 调 pH 值= 3~ 4, 用乙醚洗涤, 再浓缩呈稀膏状, 碱化, 用二氯甲烷萃取, 真空浓缩回收二氯甲烷蒸至残留液为深色油状物, 以 CHCl₃ 提取即为苦参碱的总碱。③粗粉用 0.1% 盐酸溶液渗漉, 强酸性阳离子交换树脂纯化, 树脂晾干, 加 10% 氨水适量, 搅拌均匀, 以氯仿回流提取生物碱, 回收氯仿至干, 用丙酮重结晶得结晶性总生物碱。近年针对苦参生物总碱的提取分离有一些研究报道, 与以上工艺类似^[1,2], 工艺中使用了大量有毒、易燃的有机溶剂, 容易造成环境污染及有机溶剂残留, 提取物中总生物碱的含量标准仅为 70%, 难以保证制剂的质量。本研究通过工艺优化, 确定了最佳提取工艺及最佳纯化工工艺, 有机溶剂仅用了相对安全无毒的乙醇, 成本低, 操作简单, 所得的苦参总碱可达 95% 以上, 为工业化生产苦参总碱提供了科学的方法。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪; 乙腈色谱纯(天津四友), 高纯水; 实验中所用其他试剂均为分析

纯。氧化苦参碱对照品: 购于中国药品生物制品检定所, 纯度 99% 以上。

2 含量测定方法

2.1 苦参总生物碱的测定方法 采用酸性染料比色法^[3,4]。

对照品的制备 精密称取经氧化五二磷减压干燥至恒重的氧化苦参碱对照品适量, 加水溶解, 制成每 1 mL 含氧化苦参碱 3.0 mg 的溶液, 即得。

供试品溶液的制备 精密称取苦参提取物粉末 0.1 g, 加水定容至 25 mL 定量试管中, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 既得。

测定法 精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液 15 μL, 分别置于 20 mL 试管中, 于 80 °C 水浴蒸干, 精密移取 pH 为 7.6 的溴麝香草酚蓝缓冲溶液 4 mL、氯仿 6 mL, 振摇 2 min, 加至分液漏斗中, 放置 2 h, 取下层, 于波长 416 nm 处比色, 外标两点法测定, 以氧化苦参碱计算总生物碱含量。

2.2 氧化苦参碱含量测定方法^[5] 色谱条件和系统适用性条件 以氨基键和硅胶为填充剂; 乙腈-3% 磷酸溶液-无水乙醇(80: 10: 10) 为流动相; 检测波长为 220 nm, 柱温为 30 °C。理论板数按氧化苦参碱计算应不低于 2 000。

对照品的制备 精密称取经氧化五二磷减压干燥至恒重的氧化苦参碱对照品适量, 加乙腈-无水乙醇(80: 20) 溶解, 制成每 1 mL 含氧化苦参碱 0.206 mg 的溶液, 即得。

[收稿日期] 2006-05-24

[通讯作者] * 全燕, Tel: (010) 84027721

供试品溶液的制备 精密称取本品 25 mg, 加水定容至 25 mL 定量试管中, 摇匀。精密吸取 5 mL 分液漏斗中, 加入浓氨试液约 5 mL, 用 45 mL 氯仿分 3 次萃取(15, 15, 15 mL), 收集氯仿液, 蒸干, 残渣加无水乙醇适量使溶解, 并转移至 25 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 既得。

测定法 分别精密吸取上述对照品溶液 5 μL 与供试品溶液 5~ 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得。

3 苦参提取精制工艺研究

3.1 提取工艺路线 ①冷浸工艺: 苦参饮片, 分别加 8, 5, 5 倍量 1% 醋酸水溶液冷浸 3 次, 每次 8 h, 滤过, 定容。

②渗漉工艺: 苦参饮片, 粉碎成粗粉, 用 2 倍量 1% 醋酸水溶液浸润 30 min, 装入渗漉缸中, 压紧, 再加入 1% 醋酸水溶液渗漉, 流速 12 mL/kg·min, 收集 13 倍量渗漉液, 定容。

③水煎煮工艺: 苦参饮片, 分别加入 10, 8, 6 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h, 冷却至室温, 定容。

④总生物碱测定结果见表 1:

表 1 提取工艺路线考察

样品工艺	总生物碱提出量(g)	总生物碱转移率(%)
冷浸	3.44	68.8
渗漉	2.76	55.2
水煎者	3.57	71.4

冷浸及水煎煮样品总生物碱含量较高, 由于冷浸样品工艺简单、节能, 提取液杂质较少, 对今后的精制较有利, 故确定采用冷浸的提取工艺路线。

3.2 冷浸提取工艺优选 称取 9 份苦参饮片, 再按 L9(3×4) 表规定的条件分别冷浸提取制备 9 份样品, 溶液定容, 测定总生物碱含量, 计算提出量, 进行方差分析。(见表 2~ 4)

表 2 因素水平设计表

水平	A 提取次数	B 提取时间(h)	C 水用量(倍)	D 乙酸浓度(%)
1	1	4	4	1
2	2	8	6	2
3	3	12	8	3

表 3 实验安排及试验结果

实验序号	A	B	C	D	总碱提出量(mg)
1	1	1	1	1	628.2
2	1	2	2	2	826.8
3	1	3	3	3	572.8
4	2	1	2	3	1 083.0
5	2	2	3	1	1 495.2
6	2	3	1	2	1 330.4
7	3	1	3	2	1 390.8
8	3	2	1	3	1 444.8
9	3	3	2	1	1 540.8
\bar{K}_1	675.93	1 034.00	1 134.47	1 221.40	
\bar{K}_2	1 302.87	1 255.60	1 150.20	1 182.67	
\bar{K}_3	1 458.80	1 148.00	1 152.93	1 033.53	

表 4 方差分析

因素	S 值	f	方差	F 比	显著性
a	1 030 240.83	2	515 120.41	1 728.51	*
b	73 680.32	2	36 840.16	123.62	*
c	596.03	2	298.01	1.00	
d	59 034.91	2	29 517.45	99.05	*
误差 e	596.03	2.00	298.01		

结果: 冷浸次数是主要影响因素, 应选 3 次, 提取时间为 8 h, 加水倍数 3 水平 K_2 , K_3 值非常接近, 可采用 6 倍的加水量。1% 醋酸浓度较好。最佳工艺: 加 6 倍量 1% 醋酸-去离子水冷浸 3 次, 每次 8 h。

3.3 精制工艺路线选择 苦参提取液分别采用 3 次醇沉法、大孔吸附树脂法及阳离子树脂法进行了精制处理。结果, 阳离子树脂吸附法精制效果明显优于其他方法。

3.3.1 3 次醇沉法 苦参 1% 醋酸水冷浸提取液, 减压浓缩至相对密度 1.15~ 1.20(60 °C), 70% 乙醇沉淀, 放置过夜, 滤过; 取上清液减压回收乙醇、减压浓缩至相对密度 1.15~ 1.20(60 °C), 80% 乙醇沉淀, 放置过夜, 滤过; 取上清液减压回收乙醇、减压浓缩至相对密度 1.15~ 1.20(60 °C), 90% 乙醇沉淀, 放置过夜, 滤过, 取上清液减压回收乙醇, 浓缩, 真空干燥, 测定总生物碱含量。结果见表 5。

3.3.2 大孔吸附树脂法 苦参用醋酸水提取液用 20% NaOH 液调 pH7~ 7.8, 离心, 取上清液过 2 倍量大孔吸附树脂, 分别用 4 BV 水、10% 乙醇、60% 乙醇洗脱, 收集 60% 乙醇溶液, 减压浓缩, 真空干燥, 测定

总生物碱含量。见表 5。

3.3.3 阳离子树脂吸附法 苦参醋酸水冷浸提取液,通过 1 BV 的 732 强酸型阳离子树脂柱,用 4 BV 蒸馏水洗,取出树脂,用 1.5 倍量 5% 氨水乙醇溶液 80~ 85 °C 水浴回流提取 3 次,每次 1 h。合并乙醇溶液,减压回收乙醇,真空干燥。测定总生物碱含量。见表 5。

表 5 精制工艺路线考察 (n= 2)

精制方法	出膏率 (%)	总生物碱含量 (%)	总生物碱转移率 (%)
第一次醇沉	14.59	21.87	63.8
第二次醇沉	11.57	25.98	60.1
第三次醇沉	10.26	28.20	57.9
大孔吸附树脂法	5.32	43.64	46.4
阳离子树脂吸附法	4.13	84.26	69.6

3.4 阳离子树脂精制工艺参数考察

3.4.1 阳离子树脂用量考察 取已知总生物碱含量的苦参 1% 醋酸水提取液,通过 732 型阳离子树脂,分段收集流出液,测定总生物碱含量。计算总生物碱泄露率。结果苦参总碱的泄漏点在树脂:生药 1: 3~ 1: 4 之间。选用 1: 3 树脂量基本不泄露。见图 1。计算每 g 树脂泄漏前可吸附总生物碱 88 mg。将上述吸附饱和的树脂柱用 10 倍(树脂量)蒸馏水洗至 pH4.0,取出树脂,用 3 倍量 5% 氨水-乙醇溶液 80~ 83 °C 水浴回流 3 次,每次 1 h,合并提取液,减压回收乙醇,真空干燥 24 h,测总生物碱含量(以氧化苦参碱计),为 85.15%。计算树脂对总生物碱的最大吸附量为 99.9(mg/g 树脂)。

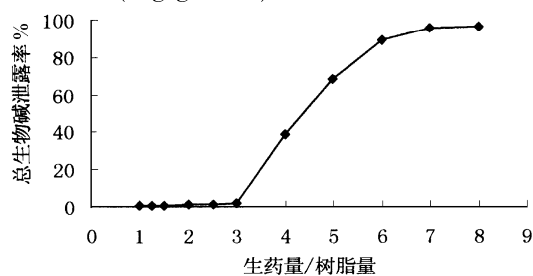


图 1 树脂用量与总碱泄露关系图

3.4.2 水洗倍数考察 取苦参酸水提取液,通过 1/3 生药量阳离子树脂柱,用蒸馏水洗除杂,水洗出液每 2 倍生药量为 1 份,收集 10 份,再用 60%、80% 乙醇各 2 倍量洗除杂质,检查洗出液是否有生物碱反应 pH 值;洗出液挥干溶剂,105 °C 烤 5 h 至恒重,测定干浸膏重量,结果见表 6。各段洗出液均无生物碱反应,由于提取物为供注射剂的原料,应尽量除去杂质,根据实验结果确定用 14 倍量水洗后,以 2 倍

量 60% 乙醇洗除杂质。

表 6 树脂水洗除杂用量的确定

批号	样品	pH 值	干浸膏重量 (g/300g 生药)	除杂相对比例 (%)
	提取原液(过柱前)	3.3	—	—
	过树脂流出液	2.3	—	—
1	2 倍量水洗出液	2.6	4.720 8	73.6
2	4 倍量水洗出液	3.1	0.607 5	83.1
3	6 倍量水洗出液	3.6	0.294 1	87.7
4	8 倍量水洗出液	3.6	0.151 9	90.0
5	10 倍量水洗出液	3.6	0.147 2	92.4
6	12 倍量水洗出液	3.6	0.117 2	94.2
7	14 倍量水洗出液	3.6	0.101 7	95.8
8	16 倍量水洗出液	3.9	0.046 8	96.5
9	18 倍量水洗出液	3.9	0.038 6	97.1
10	20 倍量水洗出液	3.9	0.029 9	97.6
11	2 倍量 60% 乙醇洗出液	4.0	0.108 9	97.7
12	2 倍量 80% 乙醇洗出液	4.7	0.047	100.0

3.4.3 解吸附工艺考察

①热氨水乙醇溶液洗脱法:吸附生物碱近饱和的树脂柱用热 5% 氨水乙醇溶液洗脱,加入液温度 75 °C,流出液温度 40~ 45 °C,流速 1 BV/h。按表 7 收集流出洗脱液,结果见表 7。

表 7 热 5% 氨水乙醇溶液洗脱工艺的研究结果

样品序号	热 5% 氨水乙醇收集倍数(倍树脂重)	洗脱溶液颜色	总生物碱析出量(mg)
1	2	黄色	440
2	3	无色	251
3	4	无色	118
4	5	无色	134
5	6	无色	114
6	1 倍 5% 氨水乙醇回流 2 h	黄色	530

热 5% 氨醇洗脱 6 倍量,还有大量生物碱未洗脱出来,可能是温度较低,时间较短,故改用回流解析法。

②氨水乙醇溶液回流法:苦参饮片,按优选的工艺提取,过树脂柱,水洗除杂。树脂取出抽干,称重,分为 10 份,1~ 9 号做 5% 氨水乙醇回流解析正交试验,10 号按 8 号方法将氨水加量至 10%,溶液定容,取样品测定总生物碱含量,计算提出量,进行方差分析。(见表 8~ 10)

表 8 因素水平设计表

	A 提取 次数(次)	B 提取 时间(min)	C 5% 氨水乙醇 用量(倍树脂)
1	1	30	1
2	2	60	2
3	3	90	3

表 9 实验安排及试验结果

实验序号	A	B	C	总生物碱解析量 氧化苦参碱解析量	
				(mg/100 g 苦参)	(mg/100 g 苦参)
1	1	1	1	1 586	448
2	1	2	2	2 441	1 176
3	1	3	3	2 500	1 160
4	2	1	2	2 320	512
5	2	2	3	3 114	1 098
6	2	3	1	2 622	1 134
7	3	1	3	3 537	1 017
8	3	2	1	3 075	1 173
9	3	3	2	3 960	1 434
10				3 148	1 245
总生物碱	\bar{K}_1	2 175.67	2 481.00	2 427.67	2 886.67
	\bar{K}_2	2 685.33	2 876.67	2 907.00	2 866.67
	\bar{K}_3	3 524.00	3 027.33	3 050.33	2 631.67
氧化苦参碱	\bar{K}_1	928.00	659.00	918.33	993.33
	\bar{K}_2	914.67	1 149.00	1 040.67	1 109.00
	\bar{K}_3	1 208.00	1 242.67	1 091.67	948.33

表 10 总生物碱方差分析 $F_{0.05} = 19.00$

因素	S 值	f	方差	F 比	显著性
a	2 781 124.67	2	1 390 562.33	23.05	*
b	477 732.67	2	238 866.33	3.96	
c	638 018.67	2	319 009.33	5.29	
误差 e	120 650.00	2.00	60 325.00		

表 11 氧化苦参碱方差分析 $F_{0.05} = 19.00$

因素	S 值	f	方差	F 比	显著性
a	164 622.22	2	82 311.11	3.99	
b	589 540.22	2	294 770.11	14.30	
c	47 610.89	2	23 805.44	1.16	
误差 e	41 217.56	2.00	20 608.78		

结果: 回流次数是主要影响因素, 应选 3 次, 提

取时间无显著性差异, 90 min 与 60 min K 值较接近, 为节约成本, 可选第 1 次 90 min, 2 3 次 60 min; 溶剂用量无显著性差异, 3 倍量与 2 倍量 K 值接近, 为节约成本, 可选 2 倍(树脂量)。5% 与 10% 氨水含量无明显差别。优选解吸附工艺为: 分别加 2 倍量 5% 氨水乙醇溶液回流提取 3 次, 第 1 次 90 min, 2 3 次 60 min。

4 苦参总碱提取物中试 3 批试验

苦参药材饮片, 按优选工艺制备 3 批中试产品。结果 3 批提取物干浸膏得率为 3%, 总生物碱含量以氧化苦参碱计为 102% ~ 104% (由于总生物碱含量是以氧化苦参碱计的, 所以含量超过 100% 是合理的)。详见表 12。

表 12 苦参总碱提取物中试考察结果

批号	1	2	3
苦参投料量(kg)	9.00	9.00	9.00
提取物干浸膏得量(g)	282	300	305
干浸膏得率(%)	3.1	3.3	3.4
总生物碱含量(%)	102.0	103.8	103.9
氧化苦参碱合理(%)	38.5	40.3	41.5
总生物碱转移率(%)	63.9	69.2	70.4
氧化苦参碱转移率(%)	54.8	61.1	63.9

注: 苦参药材总生物碱含量 5.0%, 氧化苦参碱 2.2%。

5 结论

本工艺方法简便, 成本低, 总生物碱纯度及转移率高, 适合工业化生产。

[参考文献]

- [1] 刘勇, 熊阳, 黄绳武. 不同提取方法对苦参生物总碱的影响[J]. 河南中医学院学报, 2004, 06.
- [2] 孔令明, 章臣桂, 金兆祥, 等. 苦参总碱提取条件的优化研究[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 03.
- [3] 杨毅恒, 翟所迪. 酸性染料比色法测定鞣苦胶囊中苦参总生物碱的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(6): 63-65.
- [4] 刘斌, 石任兵, 周素蓉. 苦参汤有效部位总生物碱含量测定方法研究[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(2): 76-79.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 141.