References:

- [1] Zheng P, Dai G D, Li H Q. The pharmacological advance of ephedrine and pseudoephedrine [J]. *Ningxia Med J* (宁夏医学杂志), 2002, 24 (2): 126-127.
- [2] Ru Q H, Luo G A. Internal standard quantitative method of tetrodotoxin by capillary electrophoresis [J]. *Anal Lett*, 2000, 33 (14): 3013-3023.
- [3] Li L, Chen J. Extraction process and analysis of ephedrine and pseudoephedrine [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2003, 34 (4): 202-205.
- [4] Fan Z G, Zhang Y P, Sun Y, et al. The quantity effect of lixiviated ephedrine from *Herba Ephedrae* using microwave technology [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22 (7): 520-521.
- [5] Lu C H, Jia Y, Zhang J S, et al. Study on membrane extraction method for alkaloids of *Ephedra Herba* and *Rhizoma Coptidis* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24 (4): 251-254.
- [6] Gao L H, Zhao P, Cai S H, et al. Resolution of dl-pseudoephedrine by supercritical fluid extraction [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2002, 37 (12): 959-962.
- [7] Song F R, Liu Z Y, Sun W X, et al. New method of mass spectrometry for distinguishing ephedrine and isoephedrine [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1999, 27 (9): 1 000-1 002.
- [8] Li J L, Feng X, Yuan Y J. Conversion of (+) - pseudoephedrine to (-) - ephedrine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (2): 108-110.

超滤膜纯化夏天无总碱的研究

朱才庆^{1,2}, 余 华^{1*}, 范其坤¹, 熊胜泉¹, 徐丽英¹, 魏东芝²

(1. 江西省药物研究所 天然药物研究室, 江西 南昌 330029; 2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:目的 探讨应用超滤膜分离技术纯化夏天无总碱工艺。方法 采用不同截留分子的膜组件、操作参数进行正交设计, 以与原阿片碱相关的各种指标考察不同膜组件及操作参数对膜分离效果的影响。结果 截留相对分子质量为 $6 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 的 PS 膜具有较好的膜分离效果, 选择压力 0.08 MPa、料液温度 40 ℃、进料体积流量 2.8 L/min 的操作参数工作效率更高。结论 利用膜分离工艺制备的夏天无注射液澄清、色泽好, 显示出更强的药效作用。

关键词:夏天无总碱; 原阿片碱; 膜分离; 药效作用

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)09-1319-04

Purification of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* total alkaloids by ultrafiltration membrane technology

ZHU Cai-qing^{1,2}, YU Hua^{1*}, FAN Qi-kun¹, XIONG Sheng-quan¹, XU Li-ying¹, WEI Dong-zhi²

(1. Department of Natural Medicine, Institute of Materia Medica of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Objective To explore the possibility for application of ultrafiltration membrane technology to purify *Rhizoma Corydalis Decumbentis* total alkaloids (RCDTA). **Methods** Based on the index related to protopine, to investigate the effect of different aperture membrane and orthogonal test of separation parameters on membrane separation efficiency of Xiatianwu Injection. **Results** The PS membrane with $6 \times 10^3 - 1.0 \times 10^4$ interception molecular weight had better separation efficiency and the preferred operation parameters were 0.08 MPa of pressure, 40 ℃ of liquid temperature, and 2.8 L/min of liquid speed. **Conclusion** Xiatianwu Injection prepared by ultrafiltration membrane technology is clear with good colour and better drug function.

Key words: *Rhizoma Corydalis Decumbentis* total alkaloids (RCDTA); protopine; membrane separation; drug function

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎, 是一种有

镇痉止痛、活血去瘀和降压行气功效的民间常用中草药。目前临床上用于各种类型的高血压和其后遗

收稿日期: 2004-11-28

基金项目: 江西省重大科技攻关项目(赣科发计字[2002]64号)

作者简介: 朱才庆(1973—), 男, 江西信丰人, 工学博士, 现为华东理工大学与江西省药物研究所联合培养博士后, 研究方向为天然药物有效成分的分离纯化。Tel: (0791) 8105994 E-mail: zhucqing@sohu.com

* 通讯作者 余 华 Tel: (0791) 8106317 Fax: (0791) 8101739 E-mail: jxyuhua@sina.com

症、小儿麻痹后遗症、坐骨神经痛、风湿关节痛、跌打损伤所致的瘀血肿痛和青少年近视的治疗^[1]。夏天无在预防和治疗中枢神经系统退化性疾病,特别是阿尔茨海默病可能有疗效^[2,3]。夏天无有效部位主要为生物碱。提取总生物碱方法有水煎醇沉、醇提碱沉、酸提-交换树脂、超临界萃取等^[4]。酸提-交换树脂工艺是夏天无注射液制备时最常用的提取方法,然后经过溶解、调节 pH 及活性炭吸附等系列步骤制成品。但该工艺存在周期长、有效成分损失大、杂质去除不尽、易产生絮凝物等不足。膜分离技术具有常温操作、无相变、能耗低等其他分离纯化手段无法比拟的优点。随着我国中药现代化战略的提出,将膜分离技术应用于中药制药工艺中的报道也增多^[5~8]。本实验对采用超滤膜分离技术制备夏天无总碱及其药效学进行研究。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司,带 P200 I 型高压恒流泵、UV200 I 紫外可变波长检测仪、南京千谱软件有限公司的 HW 色谱工作站);M3 型百万分之一电子天平(瑞士 Mettler 公司);TYXN-96 多功能智能血液凝集仪(上海通用机电技术研究所);TP10-20 型中空纤维膜分离装置及不同类型的 PS 材质膜组件(天津膜天膜工程技术有限公司);GL-20B 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

夏天无注射液(江西天施康中药股份有限公司生产,批号 031007);膜技术制备夏天无注射液(本实验室自制);夏天无总碱(江西天施康中药股份有限公司生产,批号 021209);原阿片碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110853-200201)。

2 方法与结果

2.1 夏天无总碱药液的配制:取夏天无总碱干浸膏(夏天无药材粗粉 1% 盐酸渗鹿提取,经树脂初步纯化而得),加 1% 盐酸稀释至 200 倍,搅拌至完全溶解,1 × 10⁵ r/min 高速离心 5 min 后即得(含生药 0.312 5 g/mL)。

2.2 不同孔径膜分离效果比较:为了提高专属性,在本研究中原阿片碱的测定采用 HPLC 法^[9]。首先就不同截留相对分子质量的膜组件对膜分离夏天无总碱的效果进行了考察,结果见表 1,其中膜分离前初始药液体积都为 2 000 mL,原阿片碱质量浓度为 0.708 7 mg/mL,干膏中原阿片碱质量分数为 153.2 mg/g,膜设备操作参数为:压力 0.08 MPa、料液温度 40 ℃、进料体积流量 2.8 L/min。可知,随

着截留相对分子质量增加,原阿片碱的膜透过率、膜透过液中原阿片碱的量及膜通量都呈增加趋势,但干膏中原阿片碱的量却呈下降趋势,至截留相对分子质量为 20 000 时,与初始药液的相当,并没有提高。从提高膜设备的工作效率等各方面综合考虑,选择 UEIS503 型膜组件用于分离制备夏天无注射液。

$$\text{原阿片碱膜透过率} = (\text{透过液中原阿片碱质量浓度} \times \text{透过液体积}) / (\text{膜分离前原阿片碱质量浓度} \times \text{药液体积}) \times 100$$

表 1 不同膜组件类型对夏天无总碱膜分离效果的影响
Table 1 Effect of different types of membrane unit on membrane separation efficiency of RCDTA

膜组件类型	截留相对分子质量	透过液中原阿片碱/(mg·mL ⁻¹)	透过液体积/mL	原阿片碱膜透过率/%	干膏中原阿片碱/(mg·g ⁻¹)
UEOS 503	6 × 10 ³	0.578 5	1 780	72.6	216.9
UEIS 503	6 × 10 ³ ~1.0 × 10 ⁴	0.583 7	1 800	74.1	163.7
UPIS 503	2 × 10 ⁴	0.601 6	1 810	76.8	152.9

2.3 膜分离操作参数的选择:除了膜组件本身的性能外,膜设备操作参数不同也会影响膜分离效果。一般来说,膜分离时尽量提高效率,透过膜的有效成分尽量多,而杂质尽量少。在本研究中,就操作压力(B)、进料体积流量(A)、药液温度(C)对膜分离效果进行了考察,正交设计的因素水平见表 2,其中初始药液体积为 1 000 mL,原阿片碱的质量浓度为 0.696 5 mg/mL,在剩余的浓缩液体积很少时加入 200 mL 注射用水。

表 2 因素与水平

Table 2 Factors and levels

水 平	因 素		
	A 体积流量/ (L·min ⁻¹)	B 操作压 力/MPa	C 料液温 度/℃
1	2.8	0.08	25
2	2.4	0.06	10
3	1.8	0.04	40

正交试验结果及直观分析见表 3。可见,以平均膜通量和干膏中原阿片碱的质量分数为考察指标时,影响因素的主次关系为:B>C>A,而以原阿片碱膜透过率为考察指标时,影响因素的主次关系为:B>A>C,不过因素 A 和 C 的极值相差很小。表 4~6 的方差分析表明,所考察各因素除对平均膜通量有特别显著性的影响外,对干膏中原阿片碱的质量分数和原阿片碱膜透过率都没有显著性的影响。因此,为了提高膜的工作效率,选择膜分离最佳的操作参数为:压力 0.08 MPa,料液温度 40 ℃,进料体积流量 2.8 L/min。

通过正交设计获得了最佳膜分离工艺操作参

表3 膜分离夏天无注射液的正交试验结果和直观分析

Table 3 Results and visual analysis of orthogonal test of Xiatianwu Injection treated by membrane separation technology

试验号	A	B	C	D (空白)	平均膜通量/ (mL·min ⁻¹ · m ⁻²)	原阿片 碱膜透 过率/%	干膏中原 阿片碱/ (mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	209.6	63.9	197.77
2	1	2	2	2	144.6	69.4	197.85
3	1	3	3	3	166.7	64.2	155.17
4	2	1	2	3	192.3	63.8	192.11
5	2	2	3	1	187.6	67.4	183.41
6	2	3	1	2	102.9	68.9	180.95
7	3	1	3	2	228.0	67.9	198.52
8	3	2	1	3	120.7	66.2	179.80
9	3	3	2	1	83.4	63.9	176.24
平均膜通量							
I	173.6	210.0	144.4	160.2			
II	160.6	151.0	140.1	158.5			
III	144.0	117.7	194.1	159.9			
R	29.6	92.3	54.0	1.7			
原阿片碱膜透过率							
I	65.8	65.2	66.3	65.1			
II	66.7	67.7	65.7	68.7			
III	66.0	65.7	66.5	64.7			
R	0.9	2.5	0.8	4.0			
干膏中原阿片碱							
I	183.60	196.13	186.17	185.81			
II	185.49	187.02	188.73	192.44			
III	184.85	170.79	179.03	175.69			
R	1.89	25.35	9.70	16.75			

表4 以平均膜通量为指标时的方差分析

Table 4 Variance analysis based on average flux through membrane

方差来源	SS	f	F值	显著性
A	1 323.1	2	267.8	P<0.01
B	13 109.2	2	2 653.2	P<0.01
C	5 404.6	2	1 094.1	P<0.01
D(误差)	4.940	2		

$F_{0.05}(2,2)=19.00$ $F_{0.01}(2,2)=99.00$

表5 以原阿片碱膜透过率为指标时的方差分析

Table 5 Variance analysis based on percentage of protopine through membrane

方差来源	SS	f	F值
A	1.269	2	0.043
B	10.30	2	0.35
C	1.069	2	0.036
D(误差)	29.57	2	

$F_{0.05}(2,2)=19.00$

数,取1 000 mL药液进行验证,结果平均膜通量为227.4 mL/(min·m²),原阿片碱膜透过率为66.8%,干膏中原阿片碱的质量分数为195.97 mg/g (n=2)。与膜分离前的药液相比,干膏中的原阿片碱质量分数提高了近30%,表明药液得到了进一步

表6 以干膏中原阿片碱质量分数为指标时的方差分析

Table 6 Variance analysis based on protopine in dissoluble solid materials

方差来源	SS	f	F值
A	5.569	2	0.013
B	989.027	2	2.318
C	151.622	2	0.355
D(误差)	426.733	2	

$F_{0.05}(2,2)=19.00$

抑制率=(给药组血小板最大聚集率-空白组血小板最大聚集率)/(空白组血小板最大聚集率)×100%

纯化。

2.4 药效学试验:夏天无具有活血通络、行气止痛等功效,为此,本实验还考察了膜分离工艺制备的夏天无注射液对ADP诱导的大鼠血小板聚集的影响。每组取7只SD大鼠(300~350 g,雄性,购自中国科学院上海实验动物中心),实验前禁食12 h,实验开始时将大鼠以戊巴比妥钠35 mg/kg麻醉,背位固定,腹主动脉取血,加入抗凝管中,抗凝剂采用3.8%枸橼酸钠,抽血量与抗凝剂应为9:1。制备PRP(富血小板血浆)和PPP(贫血小板血浆)。将各管血浆置于TYXN-96多功能智能血液凝集仪上,分别加入传统工艺和膜分离工艺制备的夏天无注射液,测定5 min内血小板最大聚集率,以ADP为诱导剂,统计各组数据^[10],结果见表7。可见,无论是低剂量还是高剂量,两种工艺所得药液均能对抗ADP诱导的大鼠血小板聚集,且具有特别显著性的影响(P<0.01)。但在相同的剂量下,膜分离工艺所得药液比传统工艺所得药液具有更高的抑制率,且增加的幅度较大,显示出更强的药效作用。

表7 不同工艺制备的夏天无注射液对ADP诱导的大鼠血小板聚集的影响(n=7)

Table 7 Effect of Xiatianwu Injection prepared by different technologies on blood platelet aggregation of rat induced by ADP (n=7)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	血小板最大 聚集率/%	抑制率 /%
对照组	—	52.9±7.4	—
膜分离工艺药液	9	17.8±6.9**	66.4
	18	5.9±2.6**	88.8
夏天无注射液	9	35.8±5.0**	32.3
	18	21.4±6.8**	59.5

与对照组比较:*P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group

3 讨论

采用传统方法提取的夏天无总生物碱要经过长时间反复处理才能制成成品,存在步骤多、有效成分

保留率低、热原、鞣质等杂质去除不彻底、长期保存时易产生絮状物问题,影响产品的质量和临床用药安全。在传统工艺中采用活性炭吸附虽然可去除内毒素、色素、蛋白质等杂质,然后会导致生物碱的大量损失。随着活性炭量增加,生物碱损失就越多,当加入量为 0.5% 时,原阿片碱损失接近 50%。

膜分离技术是以浓度差和压力差为驱动力的操作单元,当采用相同质量浓度的药液和操作参数时,分离效果完全取决于膜组件的性能。正交试验结果表明,要通过所考察 3 个膜设备操作参数的改变来提高原阿片碱膜透过率和干膏中原阿片碱的质量分数两个指标并不能取得很理想的效果,但对膜通量的影响却极为显著。因此,为了提高工作效率,根据膜组件的性能和药液的特性,应尽量选择较高的压力、体积流量及温度。原阿片碱膜透过率较低主要与膜设备导管与膜组件中滞留的浓缩液体积较大有关,不过这可以通过增加初始药液的体积和浓缩液较少时加入注射用水冲洗的方法解决。与膜分离前的药液相比,膜透过液干膏中原阿片碱质量分数增加。表明通过膜分离步骤药液得到了纯化,而且也大大高于传统工艺产品,外观、药效都有很大的改善。需要特别指出的是,采用 $6 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 截留相对分子质量的超滤膜分离不仅可以除去鞣质等大分子杂质,而且可以很好地清除热原,大大提高了产品的依从性和安全性。TLC 实验结果显示,膜分离工艺与传统工艺药液的斑点颜色及位置相同,HPLC 图谱的特征峰位置也基本一致,表明含有的

成分基本相似。

References:

- [1] Chen R, Yang S H, Tang X L. Advances in the studies on *Corydalis decumbentis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (2): 948-949.
- [2] Sheng R, Gu Z L, Jiang H, et al. Effects of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* on ability and brain acetylcholinesterase learning and memory activity in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (6): 543-545.
- [3] Deng X P, Gu Z L, Xie M L. Effects of total alkaloids from *Rhizoma Corydalis Decumbentis* on scopolamine and D-galactose-induced learning and memory impairment in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (4): 350-352.
- [4] Wang Z Z, Peng G P. Study on extraction of contents in *Rhizoma Corydalis Decumbentis* by CO₂ SFE technology [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27 (8): 585-586.
- [5] Liu H Q, Qu L B, Jia J F. Study on ultrafiltration membrane technology for preparing Shengmai Oral Liquid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27 (4): 209-211.
- [6] Luo F L, Liang G M, Liu Z Y, et al. Exploration of application of large pore size ultrafiltration membrane in Chinese medicine production [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23 (8): 556-559.
- [7] Li S Z, Wu L L, Chen W. New process and its equipment for production of TCM oral liquid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (12): 120-122.
- [8] Li S L, Ou X C, Du Q Y. The comparison of several pre-treatment methods in ultrafiltrating traditional Chinese herbs [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, 13 (2): 76-78.
- [9] Zhu C Q, Fan Q K, Xiong S Q, et al. Determination of the content of protopine in *Rhizoma Corydalis Decumbentis* Injection by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36 (5): 699-700.
- [10] Gao J, Wang T Y. Effect of total alkaloids from *Rhizoma Corydalis Decumbentis* on platelet aggregation function [J]. *Suzhou Univ J: Med Sci* (苏州大学学报:医学版), 2004, 24 (2): 137-140.

大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的研究

石忠峰¹, 陈蔚文^{1,3*}, 李卫民¹, 高 英²

(1. 广州中医药大学脾胃研究所 消化室, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广东 广州 510405; 3. 上海中医药大学 上海市高校中医内科学 E-研究院, 上海 201203)

摘要:目的 研究黄芪总皂苷的大孔吸附树脂分离纯化工艺,为黄芪总皂苷的工业化生产提供参考。方法 采用 AB-8 大孔吸附树脂对黄芪总皂苷进行吸附纯化,以黄芪总皂苷的收率、质量分数为考察指标综合评价。结果 60%乙醇提取树脂吸附后用不同体积分数乙醇洗脱,黄芪总皂苷主要集中在 40%~80%乙醇部位。树脂对黄芪总皂苷的动态吸附率为 10.78 mg/mL 树脂;不同浓度 NaOH 溶液对杂质的洗脱效果不同,以 0.1% NaOH 溶液洗脱效果较好。结论 黄芪提取物上 AB-8 树脂柱,以水和 0.1% NaOH 洗脱后以 80%乙醇洗脱黄芪总皂苷部位可使黄芪总皂苷的收率和质量分数达到较满意效果。

收稿日期:2004-11-25

基金项目:广东省教育厅资助课题(B01039);上海市教委 E-研究院建设计划项目资助(E03008)

作者简介:石忠峰(1975—),男,在读博士生,中西医结合临床专业,研究方向为调理脾胃中药新药开发研究。

Tel: (020) 33611027 E-mail: shizhongfeng@hotmail.com

* 通讯作者 陈蔚文