

3 讨论

各大孔吸附树脂对肿节风总黄酮的最大吸附能力差别不大,但各树脂在不同溶剂中的解吸性能却有很大差异。HPD400 树脂表现出较好的解吸性能,其吸附、分离肿节风总黄酮的工艺条件为:肿节风总黄酮上样质量浓度为 10 mg/mL,肿节风总黄酮最大吸附量为 9.5 mg/mL,吸附体积流量为 2.5 mL/min,洗脱剂为 70%乙醇,洗脱剂用量为 3 倍柱体积,树脂可重复使用 3 次。在此条件下,用 HPD400 大孔吸附树脂吸附分离肿节风总黄酮,总黄酮回收率为 85%左右。

树脂对化学成分的吸附及解吸研究,目前文献报道的有动态吸附法和静态吸附法。动态吸附法筛选大孔吸附树脂工作量大,静态吸附法则相对工作量小。本实验采用静态吸附法筛选适合目标分离的大孔吸附树脂,其结果是否与动态法相一致,还有待进一步研究。

影响树脂吸附分离中药化学成分的因素很多。

目前,大孔吸附树脂分离纯化中药中的化学成分还有许多问题尚未解决,如工艺条件研究的规范性方法和技术要求等^[4]。在实际应用中,只有综合考虑各种因素,才能确定树脂的型号及最佳吸附分离条件。本文报道的实验结果是在实验室条件下获得,可为肿节风总黄酮的提取分离提供实验方法,为大孔吸附树脂在大生产中的应用提供技术参数。

References:

- [1] Ma Z S. The study and application of macroporous adsorptive resins in pharmacy [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1997, 19 (12): 40-41.
- [2] Wang B Y. The urgent spreading high technology of Chinese tradition pharmacy in China [J]. *World Sci Tech; Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术:中医药现代化), 2000, 2(2): 18-23.
- [3] Wang D Q, Li X C. Studies on total flavonoids from root, stem, and leaf of *Glabrous Sarcandra* (*Sarcandra glabra*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27 (6): 337-338.
- [4] Hou C X, Tian H K. The application of macroporous adsorption resin in separation and purification of the compound Chinese tradition drug [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2000, 11 (3): 131-133.

制备色谱系统从岩黄连中分离岩黄连碱

蒋伟哲,莫长林,黄兴振,凌 玲

(广西医科大学第一附属医院 新药研究开发中心,广西 南宁 530021)

摘要:目的 采用制备色谱系统从岩黄连中分离纯化其活性单体岩黄连碱,建立其纯化工艺和技术。方法 用醇-酸水-氯仿的方法从岩黄连中提取出总生物碱,然后采用制备色谱系统 AKTA Explorer 100 从中分离出岩黄连碱。结果 产品经 HPLC 检测质量分数达 99%以上。结论 该方法先进,重复性好,可用于分离纯化岩黄连碱。

关键词:岩黄连;岩黄连碱;制备色谱;AKTA Explorer 100

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)07-1017-03

Separation of dehydrocavidine from *Corydalis saxicola* by preparative chromatography

JIANG Wei-zhe, MO Chang-lin, HUANG Xing-zhen, LING Ling

(Center of Drug Research and Development, The First Affiliated Hospital,
Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Key words: *Corydalis saxicola* Bunting; dehydrocavidine; preparative chromatography; AKTA Explorer 100

岩黄连是罂粟科紫堇属植物石生黄堇 *Corydalis saxicola* Bunting 的全草,产于广西、贵州、西藏、湖北、甘肃等地,具有清热、消肿、止痛等作

用。广西民间将其全草用于消肿、止痛、拔毒、治疗疥疮肿毒,也用于治疗肝炎,肝硬化等疾病^[1]。岩黄连的有效部位为总生物碱。用其总生物碱注射液对

收稿日期:2005-10-15

基金项目:广西科技厅科技攻关项目(桂科攻 032204-5G)

作者简介:蒋伟哲(1968—),男,广西宜州人,副主任药师,副教授,硕士生导师,1991年同济医科大学药学院毕业,从事天然药物、药物化学研究和新药开发。现承担和参加 15 项国家和广西省级科研课题,获得 2000 年度广西壮族自治区科技进步奖三等奖 1 项,2005 年广西医药卫生适宜技术推广奖一等奖 1 项,已发表研究论文 40 篇。

Tel: (0771) 5355725 E-mail: jiangweizhe6812@yahoo.com.cn

100 例肝炎病例观察,发现总的有效达 76.5%^[2]。其总生物碱成分包括卡维丁、消旋岩黄连碱、岩黄连碱、(+)-四氢巴马汀等。对其单体进行的药理作用研究表明,其主要活性成分为岩黄连碱脱氢卡维汀(dehydrocavidine),其对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、白喉杆菌有抑制作用,对耐青霉素的白色和金黄色葡萄球菌亦有抑制作用,并有一定的镇静、止痛作用^[3]。

由于岩黄连中生物碱多为性质相近的异喹啉类生物碱,相对分子质量相差不大,因此对于单体的分离具有很大的难度。采用传统的分离纯化方法,难以获得高纯度的单体,本研究运用制备色谱系统 AKTA Explorer 100,根据目标产物岩黄连碱的性质特点,优化色谱条件进行分离纯化,并采用 HPLC 进行纯度测定,证实可获得高纯度的岩黄连碱,相比其他的方法更先进、可靠,适用于工业推广。

1 材料和仪器

岩黄连干燥全草由广西河丰药业有限公司提供,经广西食品药品检验所中药室黄捷副主任药师鉴定;岩黄连碱对照(中国药品生物制品检定所,批号 111651-200301);乙腈(色谱纯);高纯水。所有溶剂配制后,均用超声溶解,脱气 15 min,并在 0.45 μm 微孔过滤器中滤过。

制备色谱系统 AKTA Explorer 100 (安玛西亚公司);Agilent 1100 液相色谱系统(德国安捷伦科技有限公司);旋转蒸发仪(上海申生仪器厂)。Sartorius ME 215S 电子天平(北京赛多丽斯仪器系统有限公司);AS5150A 超声波仪器(天津奥特比赛恩斯有限公司);OL-5000B-Ⅱ 飞鸽离心机(上海安亭科学仪器厂制造)。

2 实验方法

2.1 粗品的制备:将岩黄连药材洗净晒干,粉碎成粗粉,称取岩黄连粗粉 10 kg,用 5 倍量 90% 乙醇浸渍 24 h,回流提取,连续 4 次,每次 1 h,合并提取液,减压回收乙醇并浓缩至相对密度为 0.92~1.02 (60 $^{\circ}\text{C}$) 的清膏,放冷,滤过,滤液浓缩至相对密度为 1.16~1.20 (60 $^{\circ}\text{C}$) 的稠膏。于稠膏中加入适量蒸馏水,用 10% 盐酸溶液,调节 pH 值 2~3,搅拌充分,滤过,用 10% 盐酸溶液洗 4~5 次,合并酸水液,用碳酸钠调节 pH 值 9~10,析出棕褐色沉淀,滤过,滤渣用 5 倍氯仿提取 5~6 次,合并氯仿液,加无水硫酸钠脱水,滤过,回收氯仿至近干,再加少量乙醇,减压回收溶剂,干燥,即得岩黄连总碱粗品。

2.2 样品预处理:称岩黄连总碱粗品约 4 g,用流动

相溶解并定容至 100 mL,超声 20 min,超速离心 5 min (5 000 r/min),取上清液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,所得的粗品用于分离纯化使用。

2.3 岩黄连碱的分离和纯化:色谱条件:色谱柱 (600 mm $\times$ 16 mm,以安玛西亚的 SOURCE 30 RPC 为柱填充料),流动相为 0.2 mol/L Na_2HPO_4 (pH 8.5)-乙腈,梯度洗脱(前 40 min 乙腈比例由 10% 升至 40%,40 min 之后为 50%),体积流量为 3 mL/min,紫外检测波长为 347 nm。

进样方式:样品泵 P-960 自动进样,样品环定量;收集器:Prac-900 自动收集器;上样量:2 mL。

收集方式:运用 Prac-900 进行峰收集。方式为 UV Slope, UV Start slope 100 mAu/min, UV End slope 75 mAu/min, Minimum Peak Width 1.0 min。分离的图谱见图 1。

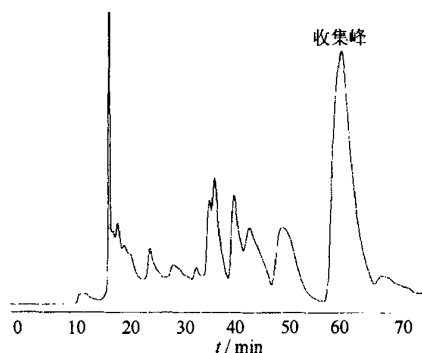


图 1 岩黄连总碱粗品的分离图谱

Fig. 1 Preparative HPLC chromatogram of crude product of *C. saxicola* total alkaloids

2.4 样品的去盐处理:把所收集的样品浓缩以后再次过柱,通过 Pharmadex G-20 的色谱柱,上样量为 2 mL,然后以 3 mL/min 的水为流动相冲柱子约 3 个柱体积以除去混在样品中的盐,然后用甲醇把样品洗脱下来并进行收集。经旋转蒸发仪浓缩,浓缩液冷冻干燥后,可以得到淡黄色粉末。

3 岩黄连碱薄层色谱定性鉴别

取 20 cm $\times$ 5 cm 的玻璃板,硅胶 G (加以 0.5% 的羧甲基纤维素钠为黏合剂)制板活化备用,展开剂为醋酸乙酯-氯仿-甲醇-浓氨(10:2:2:2),点样量约为 2 μL ,展开,取出晾干,置紫外灯(365 nm)下检视,得薄层色谱图,见图 2。可以看出:在这个收集峰样品和对照品相应位置上,显相同颜色荧光斑点,说明所收集峰的样品里面含有岩黄连碱,初步判断此收集峰为目标峰。

4 HPLC 法对制备的样品进行纯度测定

4.1 色谱条件:色谱柱为日本 HiQ SilC₁₈ 柱(250

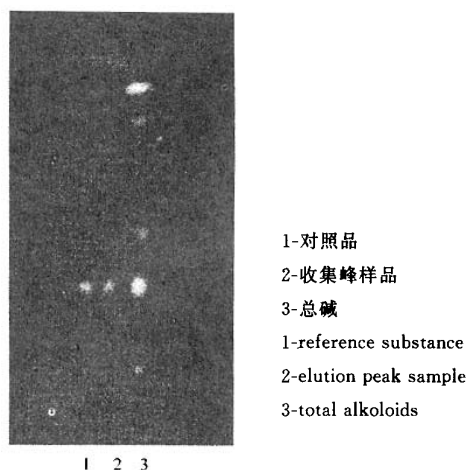


图 2 薄层色谱图

Fig. 2 TLC Chromatogram

mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(50:50, 含 0.34% 磷酸二氢钾和 0.17% 十二烷基硫酸钠); 体积流量为 1 mL/min; 紫外检测波长 347 nm; 柱温 20 °C, 进样量为 20 μL。理论板数按岩黄连碱峰计算, 应不低于 6 000。

4.2 待测液的制备: 把制备所得样品, 用流动相定容于 100 mL 量瓶中, 超声溶解 15 min, 在 0.45 μm 微孔过滤器中滤过, 作为待测液。

4.3 测定: 用外标法测定相应样品纯度, 平行测定 5 次并取平均值, 结果岩黄连的保留时间为 11.968 min, 理论塔板数为 21 055, 质量分数为 99.17%, 见图 3。可以看出, 通过对制备色谱系统 AKTA Explorer 100 的色谱条件优化, 从岩黄连粗品中可分离出岩黄连碱, HPLC 纯度测定结果表明其质量分数达到了 99% 以上, 该方法适用于分离纯化岩黄连碱单体, 为工业生产提供了有利的依据。

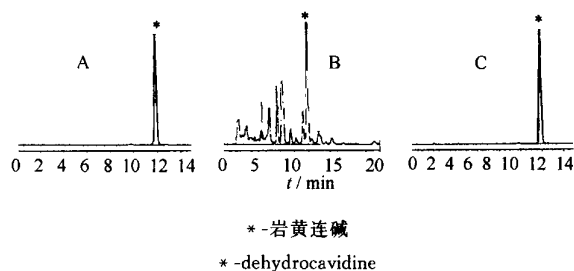


图 3 对照品(A)、粗品(B)和纯化品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of reference substance (A), crude product (B), and purified samples (C)

5 讨论

本实验的探索所用的技术是依托于制备色谱系统 AKTA Explorer 100, 采用的是 SOURCE 30RPC 为填充剂, 即反向技术。分离生物碱一般都使用的阳离子交换树脂, 但是运用阳离子交换树脂进行分离的时候, 因为岩黄连中生物碱多为性质相近的异喹啉类生物碱, 而且均为季胺类的生物碱, 极性很大, 也很接近, 较难洗脱下来, 而且其梯度洗脱操作较为麻烦, 不利于工业生产。而本法具有简便、快捷、周期短、自动化程度高、收集全面等优点, 而且样品纯度高, 适合工业的推广。

在实验条件的探索中发现当体积流量增大的时候, 岩黄连碱的保留时间会降低, 但是分离度也随之降低, 而且压力很大; 减小体积流量后虽然分得开但是峰变宽保留时间变长, 因此选择了 3 mL/min 的体积流量既使保留时间缩短又能达到良好的分离度。同样在上样量一定的情况下, 上样体积的增加使分辨率逐渐降低, 峰扩散; 当上样体积大于 2 mL 后, 峰就开始不对称了, 所以上样体积定在 2 mL。

对于梯度洗脱, 根据制备色谱系统 AKTA Explorer 100 本身具有的条件优化功能, 经过多次实验的优化, 决定采用前 40 min 乙腈比例由 10% 升至 40%, 40 min 之后为 50%, 是由于岩黄连碱在流动相的 pH 条件下的极性较小, 考虑到系统的平衡时间所以采取较为缓和的梯度。当梯度拉得太快的时候分离度也随之减小。而且在除盐的选择上采用的是葡聚糖凝胶的方法, 比离子交换法除盐更为简便。AKTA Explorer 100 先进的柱切换技术使之更容易操作。用安玛西亚的制备色谱系统 AKTA Explorer 100 进行中药的分离和纯化, 具有简便、快捷、周期短、自动化程度高、收集全面等优点。除此之外还可以连接网络, 进行远程的控制, 对于科研和生产都具有重要的意义。

References:

- [1] Huang F N, Liu G X, Zhang X D. Preliminary observations on anti-inflammatory analgesic activities and cholagogic action of *Corydalis saxicola* Bunting total alkaloids [J]. *Acta Acad Med Zunyi* (遵义医学院学报), 1981, 4 (2): 22-25.
- [2] Ke M M, Zhang X D, Wu L Z, et al. Studies on active principles of *Corydalis saxicola* Bunting [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1982, 24 (3): 289-291.
- [3] Huang X N, Liu G X, Zhang Y. Tranquillizing effects of total alkaloids from *Corydalis saxicola* [J]. *Acta Pharm Sin* (中国药理学报), 1981, 2 (3): 156-159.