

痛安注射液组方药材白屈菜提取物精制工艺研究

杨绪芳^{1,2}, 康小东^{1,2}, 刘俊超^{1,2}, 韦迎春^{1,2}, 李雪峰^{1,2}, 孙永成^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 优化痛安注射液组方药材白屈菜提取物精制纯化工艺, 提高白屈菜提取物中白屈菜碱的量。 **方法** 分别考察平板直联式离心、高速管式离心、碟片离心不同离心技术方法, 对白屈菜酸沉液分离的效果; 分别考察不同 pH 值酸水液对白屈菜萃取干膏溶解效果的影响; 分别考察减压滤过、高速管式离心、平板直联式离心不同分离方式对白屈菜酸水溶解液分离的效果; 以白屈菜碱转移率、干膏得率为评价指标, 确定可行的白屈菜碱精制纯化工艺。 **结果** 采用碟片离心技术对白屈菜酸沉液分离效果最好; 酸水液 pH 值在 3~4 时酸溶解效果及白屈菜碱转移率最佳; 高速管式离心对白屈菜酸水溶解液分离效果最好。 **结论** 该工艺制备白屈菜提取物, 操作简单, 稳定可行。

关键词: 痛安注射液; 白屈菜; 精制工艺; 离心; 生物碱; 白屈菜碱

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)18-2631-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.011

Study on purification of celandine extract from Tong'an Injection

YANG Xu-fang^{1,2}, KANG Xiao-dong^{1,2}, LIU Jun-chao^{1,2}, WEI Ying-chun^{1,2}, LI Xue-feng^{1,2}, SUN Yong-cheng^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To optimize the purification process of celandine in *Celandine Alkali* from Tong'an Injection, and to improve the content of celandine in *Celandine Alkali* extract. **Methods** In order to select the best way to separate celandine acid liquid, a study was carried out in three different ways of separation such as plate straight association-like centrifuge, high speed tubular centrifuge, and disc centrifuge; We investigated the dissolving effect caused by different pH values of hydrochloric acid to celandine dry extract; Three separation methods on celandine acidic lysate were investigated to choose the best, such as vacuum filtration, high-speed centrifuge tube, and flat direct-coupled centrifugal. *Celandine Alkali* transfer rate, and dry paste rate were as used evaluation indexes, so as to determine the feasible celandine refining purification process. **Results** It was the best way to separate celandine acid liquid by using disc centrifuge; Hydrochloric acid could have the best dissolving effect on celandine dry extract when the pH values were 3—4, and the transfer rate of chelidonium was also the highest; High-speed tubular centrifuge was the best separation method for the celandine acidic dissolution liquid. **Conclusion** The optimized process is simple, stable and viable, and it could be used for the preparation of qualified celandine intermediates.

Key words: Tong'an Injection; *Celandine Alkali*; purification process; centrifuge; alkaloid; celandine

痛安注射液由汉桃叶、青风藤、白屈菜 3 味药材组成, 活血通络、散瘀止痛。其主要用于治疗放疗或非放疗的肺癌、肝癌、胃癌等属血瘀引发的癌性中度疼痛等^[1]。

白屈菜为罂粟科植物白屈菜 *Chelidonium majus*

L. 的干燥全草, 味苦、性凉、有毒, 是我国传统中药, 主要用于止咳、平喘、镇痛、消炎^[2], 分布于东北、华北地区及长江中下游和四川、陕西、新疆等省区^[3]。白屈菜生物碱有明显的抗流感病毒作用, 对五型、十二型腺病毒及单纯性疱疹等病毒有明显

收稿日期: 2014-04-01

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 杨绪芳, 女, 主要从事中药新药研究及制药新技术研究。Tel: 15896105429 E-mail: lafang2008@126.com

*通信作者 萧伟, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。E-mail: wzzh-nj@tom.com

作用^[4];宗永立等^[5]、于敏等^[6]报道其具有抗癌活性;黄金竹^[7]报道白屈菜地上部分提取物和化合物,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)临床分离株具有抗菌作用;何志敏等^[8]报道白屈菜碱具有很好的镇痛作用,并且镇痛机制是外周神经性,不同于吗啡。

产业化研究过程中无法制得白屈菜碱量及干膏得率均合格的白屈菜提取物,且提取物颜色太深,影响制剂的澄明度。为提高提取物中白屈菜碱量及其干膏得率,同时改善提取物的性状,本研究通过考察采用平板直联式离心机、高速管式离心机、碟片离心机等对白屈菜酸沉液分离的效果,不同 pH 值的酸水液对白屈菜萃取干膏溶解效果以及减压过滤、高速管式离心、平板直联式离心不同分离方式对白屈菜酸水溶解液分离效果的影响,以白屈菜碱的量、转移率以及干膏得率为指标对白屈菜碱精制工艺进行优化,为制备合格的白屈菜提取物提供稳定可行的工艺。

1 仪器与材料

Waters 2695—2487 高效液相色谱仪,美国 Waters; PS800—NC 平板直联式离心机,辽宁中联制药机械有限公司; GQ105B 型高速管式离心机,上海天本离心机有限公司; BTS15 型碟片离心机,宜兴市华鼎粮食机械有限公司; 减压过滤设备,含 15 L 抽滤瓶及配套布氏漏斗、真空系统; Mettler Toledo 实验室 pH 计,深圳市怡华新电子有限公司。

白屈菜药材产地东北,经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主管药师鉴定为罂粟科植物白屈菜 *Chelidonium majus* L. 的干燥全草,白屈菜酸沉液(江苏康缘药业股份有限公司,批号 130701、130702、130703)、白屈菜萃取干膏(江苏康缘药业股份有限公司,批号 130801、130802、130803)、白屈菜酸水溶解液(江苏康缘药业股份有限公司,批号 130801、130802、130803); 白屈菜碱(BioChemika, Lot & Filling code, 批号 450411/1、54904193, 质量分数 98%)。

乙腈(色谱纯, Tedia Company), 超纯水(Milli-Q 超纯水系统); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试样品制备^[9]

2.1.1 白屈菜酸沉液的制备 白屈菜药材(共 3 个批次, 140 kg/批), 分别加入 8 倍量 80%乙醇浸泡 30 min, 每次 2 h, 合并提取液后浓缩至相对密度

1.04~1.05, 趁热用 1 mol/L 磷酸调节 pH 值 2.0~3.0, 冷藏 24 h, 备用。

2.1.2 白屈菜萃取干膏的制备 称取白屈菜药材共 3 个批次(140 kg/批), 按“2.1.1”项下制备方法制备白屈菜酸沉液, 冷藏 24 h, 冷藏液用碟片离心机离心, 收集离心液用 40% NaOH 调节 pH 值至 10~11, 等倍药材量(140 kg)氯仿搅拌萃取, 合并萃取液回收氯仿, 浓缩至无明显氯仿层的稠膏, 干燥得萃取干膏备用。

2.1.3 白屈菜酸水溶解液制备 上述萃取干膏用 10 倍量一定 pH 值(0~1、1~2、2~3、3~4、4~5)的盐酸溶液溶解煮沸 10 min, 室温静置冷却后倾出上层酸溶解液, 残渣继续酸溶 2 次, 合并 3 次酸溶解液, 备用。

2.2 检测方法

采用痛安注射液成品中白屈菜碱定量测定的方法^[10]对白屈菜中间体制备过程中白屈菜碱的量进行检测。

2.2.1 色谱条件 Waters 2695—2487 高效液相色谱仪; 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 保护柱为 Phenomenex Gemini 柱(25 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾(25:75); 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 290 nm; 进样量 10 μL; 理论塔板数按白屈菜碱峰计算不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取白屈菜碱对照品适量, 加甲醇制成含白屈菜碱 0.05 mg/mL 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取各纯化工序前后样品溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.2.4 样品测定 分别精密吸取白屈菜碱对照品和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 按外标法计算, 即得。

2.3 白屈菜碱精制工艺优化

2.3.1 白屈菜酸沉液分离效果的考察 分别称取 3 批次白屈菜酸沉液各 40 kg, 每个批次平均分成 3 份, 分别用平板直联式离心机、高速管式离心机、碟片离心机离心, 记录各个设备离心相同量药液所需时间, 收集离心液称定质量并取样进行白屈菜碱量及干膏得率的测定, 计算白屈菜碱转移率。

干膏得率测定: 按《中国药典》2010 年版附录

X A 规定的浸出物测定方法进行测定, 称定质量并计算。

干膏得率 = 固含物量 / 药液质量

白屈菜碱转移率 = 离心液中白屈菜碱总量 / 离心前药液中白屈菜碱总量

由表 1 可见, 比较分离时间, 平板直联式离心机、高速管式离心机、碟片离心机没有较大差异; 采用高速管式离心机所得离心液白屈菜碱转移率均

最低, 不予考虑使用, 采用碟片离心机对酸沉液进行分离, 所得的离心液的白屈菜碱转移率最高, 且干膏得率与平板直联式离心机相比较低, 说明所得离心液中白屈菜碱纯度优于平板直联式离心机, 而且操作比平板直联式离心机简便, 既保证了白屈菜碱转移率又保证了干膏得率, 故白屈菜酸沉液除杂采用碟片离心机进行分离。

2.3.2 白屈菜萃取干膏酸溶用酸水 pH 值考察 产

表 1 不同分离方式对白屈菜酸沉液分离效果的影响

Table 1 Effect of different separation methods on separation of acid heavy liquid in *Celandine Alkali*

分离方式	分离时间 / min	离心液干膏得率 / %	离心液中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)	白屈菜碱转移率 / %
平板直联式离心	23	12.55	1.15	82.68
	23	12.64	1.17	82.91
	23	12.49	1.14	82.06
高速管式离心	20	9.86	1.09	75.36
	20	9.93	1.10	76.18
	20	9.72	1.07	74.91
碟片离心	25	11.67	1.24	88.26
	25	11.51	1.21	89.13
	25	11.61	1.23	90.04

分离时间是指离心时药液进入设备到结束此操作所需要的时间

Disengaging time is when liquid into the equipment to the end of the time required for this operation

化研究过程中发现, 白屈菜碱在酸溶液浓缩、干燥工序转移率降低幅度较大, 且中间体性状颜色为黑褐色, 有刺鼻性酸气味, 分析原因可能是白屈菜酸水溶解液在浓缩和减压干燥过程中随着水分的挥发, 酸浓度变大, 浓缩、干燥受热时强酸破坏了白屈菜碱; 因白屈菜碱只有与酸成盐后其溶解度才高, 酸溶解液 pH 值过高可能会导致其溶解不完全, 故考虑在保证白屈菜碱酸水溶解工序转移率正常的基础上, 适当调整白屈菜酸溶解液的 pH 值, 从而避免其在浓缩和干燥过程中由于酸浓度增加造成的破坏。

称取 5 份白屈菜氯仿萃取干膏, 每份 100 g, 共

取 3 组, 分别用 10 倍量 pH 值为 4~5、3~4、2~3、1~2、0~1 盐酸溶液煮沸 10 min, 放置室温后倾出上层酸溶解液, 残渣重复上述操作 2 次, 合并 3 次酸溶解液, 滤过, 减压浓缩, 减压干燥得白屈菜提取物, 测定酸水溶解液及提取物中白屈菜碱的量及酸溶液干膏转移率, 并计算白屈菜碱转移率。结果见表 2。

酸溶液干膏转移率 = 酸溶液中固含物的总量 / 萃取干膏质量

白屈菜碱转移率 = 酸溶解液中白屈菜碱总量 / 萃取干膏中白屈菜碱总量

表 2 不同酸水 pH 值对白屈菜萃取干膏溶解的影响

Table 2 Effect of different pH values on dissolution of dry extract in *Celandine Alkali*

酸水 pH 值	萃取干膏中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)	酸溶液干膏转移率 / %	酸溶液中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)	中间体中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)	白屈菜碱转移率 / %	提取物性状
4~5	41.76	36.28	1.74	100.51	90.23	浅黄棕色
3~4	41.76	38.61	1.83	105.36	97.40	黄棕色
2~3	41.76	37.42	1.61	93.21	93.92	深棕色
1~2	41.76	38.57	1.49	80.90	83.88	棕褐色
0~1	41.76	37.15	1.47	80.20	79.57	黑褐色

由表 2 可以看出, 提取物中白屈菜碱的量随着酸水 pH 值的增大而呈上升趋势, 当酸水 pH 值在 3~4 时白屈菜碱的量最高, 而酸水 pH 值在 4~5 时白屈菜碱的量及转移率开始略有下降, 考虑是酸水 pH 值增大, 含酸量降低, 白屈菜碱未能与盐酸充分成盐溶解于水中; 酸水 pH 值在 3~4 时制备得到的提取物中白屈菜碱的转移率明显高于其他浓度, 且提取物性状符合要求, 故确定白屈菜萃取干膏酸水溶解时盐酸溶液的 pH 值为 3~4。

2.3.3 白屈菜酸水溶解液分离效果的考察 白屈菜碱等生物碱与盐酸成盐溶于酸水中, 但酸水溶解液还含有一些油脂性杂质和不溶性沉淀, 为进一步去

除杂质, 纯化富集白屈菜碱, 同时考虑大批量生产的适应性, 以白屈菜碱转移率、干膏得率及中间体提取物中白屈菜碱量为指标, 考察减压滤过、高速管式离心、平板直联式离心不同分离方式对白屈菜酸水溶解液的分离效果。

称取 3 组白屈菜酸溶液, 各 30 kg, 每组平均分成 3 份, 分别采用减压滤过、高速管式离心和平板直联式离心方式进行分离, 记录各个设备离心相同量药液所需时间, 收集滤过液(离心液), 称定质量, 混合均匀后取样, 浓缩离心液, 干燥得中间体。配制成供试品, 测定其中的白屈菜碱量并计算其转移率, 结果见表 3。

表 3 不同分离方式对白屈菜酸水溶解液分离效果

Table 3 Effect of different separation methods on separation of acid water soluble liquid in *Celandine Alkali*

分离方式	分离时间	离心前药液中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)	干膏得率 / %	离心液中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)	白屈菜碱转移率 / %	中间体中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)
减压滤过	8 h	1.78	7.88	1.51	84.97	125.23
	7.5 h	1.78	7.81	1.52	85.12	125.61
	8.2 h	1.78	7.96	1.51	84.90	124.94
高速管式离心	15 min	1.78	8.37	1.55	86.81	123.12
	15 min	1.78	8.43	1.54	86.73	122.81
	15 min	1.78	8.32	1.56	86.92	122.43
平板直联式离心机	13 min	1.78	8.92	1.39	78.23	107.31
	13 min	1.78	9.14	1.40	79.06	107.75
	13 min	1.78	9.05	1.39	78.64	106.83

由表 3 可以看出, 采用减压抽滤进行分离时, 白屈菜碱转移率及所得中间体中白屈菜碱量最高, 而且药液澄清, 但是滤过介质容易被杂质堵塞, 需要频繁更换滤纸, 且生产周期过长, 不适合大批量生产的要求; 高速管式离心和平板直联式离心的生产周期均较短, 但平板直联式离心机分离得到的离心液中仍含有少量油性杂质, 导致所得中间体中白屈菜碱的量较低, 达不到精制的最佳效果; 高速管式离心机分离得到的离心液呈淡黄色, 澄清, 不含明显的杂质, 白屈菜碱转移率较高, 而且操作简单, 故应采用高速管式离心机对白屈菜酸水溶解液进行离心。

2.4 验证试验

称取 3 份白屈菜药材各 140 kg, 按最佳白屈菜碱精制工艺条件平行进行 3 组试验: 白屈菜药材加入 8 倍量 80% 乙醇浸泡 30 min, 每次 2 h, 合并提取液后浓缩至相对密度 1.04~1.05, 趁热用 1 mol/L

磷酸调节 pH 值 2.0~3.0, 冷藏 24 h, 冷藏液用碟片离心机离心, 收集离心液用 40% NaOH 调节 pH 值至 10~11, 等倍药材量 (140 kg) 氯仿搅拌萃取, 合并萃取液回收氯仿, 浓缩至无明显氯仿层的稠膏, 干燥得萃取干膏, 萃取干膏用 10 倍量 pH 值 3~4 盐酸溶液煮沸 10 min, 室温静置冷却后倾出上层酸溶解液, 残渣继续酸溶 2 次, 合并 3 次酸溶解液, 高速管式离心, 浓缩干燥得白屈菜提取物。结果表明指标成分白屈菜碱药材转移率较高, 且具有良好的稳定性和重复性, 同时提取物中白屈菜碱量及其性状得到较好地改善, 结果见表 4。

白屈菜碱药材转移率 = 提取物中白屈菜碱总量 / 药材中白屈菜碱总量

3 讨论

白屈菜提取物酸沉淀中含有较多的杂质, 在采用高速管式离心时, 由于提取物中固体杂质质量较大, 在离心时, 固体粒子附着于转鼓内壁, 随着离心时

表4 验证试验
Table 4 Test of verification

试验号	药材中白屈菜碱 / %	白屈菜碱药材转移率 / %	提取物中白屈菜碱 / (mg·g ⁻¹)	提取物性状
1	0.12	41.32	122.8	黄棕色
2	0.12	43.56	125.7	黄棕色
3	0.12	42.91	124.1	黄棕色

间的增加,管鼓内壁上的固相杂质堆积,造成其分离能力的降低,因此部分白屈菜提取物中的沉淀与清液不能有效分离,这也可能是导致白屈菜碱转移率降低的主要原因之一。

当高速管式离心机管壁上的固体杂质较多时,分离效果变差,必须停止工作进行清理,表现为间歇式的工作模式,大批量生产时严重影响生产能力。碟片式离心机属于沉降离心机,相比于管式高速离心机,其在离心机中添加了碟片,增大了转鼓的沉降面积,增大了分离的生产能力,因此能适用于中药提取液的初步分离。管式离心机由于分离时转速较大,在分离液中固体含量较低时,其分离因素大,可以运用于中药精制产品的分离中。

白屈菜碱是从白屈菜中提取纯化得到的生物碱,是白屈菜中有效成分,也是痛安注射液中的有效成分。本实验通过乙醇提取,氯仿有机溶剂萃取的方式富集纯化白屈菜碱中间产物,其中加入一定浓度的盐酸,使白屈菜碱以盐的形式存在中水溶液中,最终得到白屈菜碱提取物。然而在对酸水溶液进行浓缩时,随着浓缩液体积的减小,浓缩液酸度增大,会破坏白屈菜碱,使得造成白屈菜碱转移率降低。因此在白屈菜碱的纯化工艺中,酸水溶解时选择合适的酸水 pH 值是影响白屈菜碱纯化工艺的重要一步环节。

由此推断,在该类型的生物碱提取纯化工艺中需要在酸溶时对酸水的 pH 值进行考察,以保证生物碱有较理想的转移率。

参考文献

[1] 关洁珊,景 娇,林丽珠. 痛安注射液对中度癌性疼痛的治疗作用 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(1): 12-15.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第9卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

[4] Sokoloff B. The oncostatic and oncolytic factors present in certain plants [J]. *Oncology*, 1968, 22(1): 49-60.

[5] 宗永立,刘艳平. 白屈菜红碱诱导细胞凋亡的机理综述 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 2068-2071.

[6] 于 敏,陈红卫,焦连庆. 白屈菜的研究进展 [J]. 特产研究, 2008, 30(2): 76-78.

[7] 黄金竹. 对 MRSA 临床分离株具有抗菌作用的白屈菜生物碱 [J]. 国外医药: 抗生素分册, 2009, 30(2): 143.

[8] 何志敏,佟继铭,宫凤春. 白屈菜碱镇痛作用研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 837-838.

[9] 张 平. 一种用于癌性疼痛镇痛的药物及其制备方法: 中国, 02114986. 0 [P]. 2002-03-21.

[10] 萧 伟,戴翔翎. 一种治疗癌性疼痛中药组合物的质量控制方法及应用: 中国, 200410097191. 4 [P]. 2006-06-21.