

高速离心分配色谱法去除夏天无总生物碱中荷包牡丹碱的工艺研究

谢欣辛, 孙百玲, 杨义芳*

中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200040

摘要: 目的 采用高速离心分配色谱 (FCPC) 方法去除夏天无总生物碱中的毒性成分荷包牡丹碱 (BI)。方法 以体积流量、转速、样品浓度为考察因素, 通过正交试验优化各工艺参数, 同时对优化后的工艺结果与溶剂萃取法比较, 并对最优工艺进行线性放大实验。结果 最佳工艺为样品质量浓度 80 mg/mL, 转速 1 200 r/min, 体积流量 4 mL/min。通过放大实验制得相应去除 BI 的夏天无总生物碱部位, BI 去除率 >94.0%, 其余生物碱回收率 >85.0%, 优于传统溶剂萃取法。该工艺分离时间短, 重现性好, 操作简便。结论 该工艺操作简单、快速、环保, 不仅为提高夏天无总生物碱的安全性提供思路, 而且为去除毒性成分的夏天无总生物碱产业化道路提供了方法。

关键词: 高速离心分配色谱; 夏天无; 总生物碱; 去除率; 荷包牡丹碱; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)19-2787-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.011

Study on removing (-)-bicuculline from *Corydalis Decumbentis Rhizoma* total alkaloids by fast centrifugal partition chromatography

XIE Xin-xin, SUN Bai-lin, YANG Yi-fang

State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

Abstract: Objective Using fast centrifugal partition chromatography (FCPC) to remove (-)-bicuculline from *Corydalis Decumbentis Rhizoma* total alkaloids. **Methods** The technological parameters of orthogonal experiment of FCPC was optimized by flow rate, rotation speed, and loading sample size. The optimized process was compared with the solvent extraction method, and the linear amplification experiments were carried out using the optimal process. **Results** The optimized parameters were as follows: rotation speed was 1 200 r/min, flow rate was 4 mL/min, and loading sample size was 80 mg/mL. The new prepared alkaloids fraction of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* using amplification experiments has > 94.0% removed rate of BI and >85.0% recovery of the other alkaloids, which were higher than those of the solvent extraction method. This simple method with good repeatability could be completed in a short time. **Conclusion** The simple and fast method could improve the safety of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* total alkaloids, and provide the industrialization of non-toxic total alkaloids.

Key words: fast centrifugal partition chromatography; *Corydalis Decumbentis Rhizoma*; total alkaloids; removing rate; (-)-bicuculline; orthogonal test

夏天无系罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎, 主产于江西, 广泛分布于江苏、安徽、浙江、福建、台湾、湖南等省, 是我国常用中药^[1-2]。夏天无具活血、通络、行气、止痛等功效。主治高血压、脑血栓引起的中风偏瘫, 并对风湿性关节炎、坐骨神经痛、小儿麻

痹后遗症等有较好的作用, 其主要活性成分为生物碱类^[3]。但总生物碱在临床使用中具有潜在毒性隐患, 致惊厥毒性不利于临床使用时剂量的增大。总生物碱中的荷包牡丹碱 (BI) 成分已经是已经得到确认的致惊厥剂^[4-5], 与经典惊厥剂相比, 具有作用快、持续时间短的特点。且目前研究证实 BI 在致惊厥过程中

收稿日期: 2014-04-30

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301-007); 2012 年上海市国际合作项目 (12120701400); 上海市自然科学基金资助项目 (09ZR1431100); 2010 年上海市中药现代化专项资助项目 (10DZ1971300); 2010 年上海市科委西部开发科技合作项目 (10495801000)

作者简介: 谢欣辛 (1987—), 硕士, 研究方向为中药药效物质基础及质量标准研究。E-mail: yuanshukuang@163.com

*通信作者 杨义芳 Tel/Fax: (021)62473018 E-mail: yangyf4912@163.com

通过多种途径损伤神经元细胞^[6], 而脑卒中治疗中提高神经元对于缺血缺氧的耐受、抵抗作用是治疗手段之一^[7]。降低夏天无总生物碱中 BI 的量将是提高夏天无总生物碱安全性、提高其神经保护作用的一个有效途径^[8]。

高速离心分配色谱 (FCPC) 利用待分离物质在互不相溶的两相溶液中的分配系数不同, 经过类似于连续萃取的过程, 对物质进行分离。它与高速逆流色谱 (HSCCC) 稍有不同, HSCCC 属于流体动力平衡系统, 由聚四氟乙烯软管绕制成的色谱柱除绕离心轴旋转外, 还围绕自轴旋转产生变化的重力场; FCPC 属于流体静力平衡系统, 色谱柱由一系列刻在圆盘上的腔室组成, 通过单轴旋转产生恒定的离心力场从而实现固定相的保留。与 HSCCC 相比具有分离时间短、耐高压、高转速、具有较高的固定相保留率等优点; 新设计的 2 个连接的腔室增加了固定相与流动相传质的面积, 使得分辨率与效率都得到提高。同时 FCPC 配有 4 种容量的转子, 可以根据需要进行更换, 实现从分析、半制备到制备的要求, 制备量从克级到千克级。FCPC 已广泛应用于化学、医药、农业、石油、生物工程、食品工程等领域。在天然活性产物分离纯化方面, FCPC 成功地分离了生物碱^[8], 氨基酸、多肽、蛋白质^[9], 黄酮^[10], 有机酸^[11], 氧杂蒽酮^[12]等成分。

本课题组已经建立夏天无总生物碱的超临界提取工艺, 可快速、高效地得到高质量分数的夏天无总生物碱提取物。在此工作基础上, 建立方便易行的工艺方法, 得到去除 BI 的夏天无总生物碱部位。预期新的总生物碱部位与夏天无超临界总生物碱部位相比, 毒性降低同时保持了对神经细胞氧化损伤的保护作用^[13]。

1 仪器和材料

Agilent HP1260 型高效液相色谱仪、四元梯度泵、HP cheme 色谱工作站, 美国 Agilent 公司; MSU224S—100—Duz 天平, 德国 Sartorius 公司; FCPC 具有 25 mL 和 200 mL 可替换转鼓, 分别用于分析、条件优化及放大制备, 其中 FCPC A—25 mL 转速 600~3 000 r/min, 体积流量 1~10 mL/min; FCPC A—200 mL 转速 600~2 000 r/min, 体积流量 2~15 mL/min, 配有 Kromaton 四元泵, 法国 Rousselet Robotel 公司; N2000 工作站, 浙江大学智达信息工程有限公司; Shimdzu LC—10AD 泵、Shimdzu—7725i 进样器, 日本 Shimdzu 公司; 超临

界萃取仪 HA121—50—01—C, 江苏南通华安超临界有限公司; HD—21—2 紫外检测器, 上海嘉鹏科技有限公司。

无水乙醇、醋酸乙酯、氢氧化钠均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 中国百灵威科技有限公司; 水为自制双蒸水, 4.5 μm 微孔滤膜滤过。

各生物碱单体对照品为本课题组自制^[14], 经 HPLC 检测各碱质量分数均大于 98%。夏天无总生物碱, 实验室自制, 批号 XTW-SFE20130107, 经测定含 BI 9.26%、夏无宁碱 (EGE) 14.70%、原阿片碱 (PRO) 21.49%、延胡索乙素 (THP) 23.18%、盐酸巴马汀 (PAL) 0.09%。

2 方法与结果

2.1 检测方法

2.1.1 对照品溶液的配制 定量称取各生物碱对照品, 用流动相溶解, 配制含 BI 53.2 μg/mL、EGE 120.2 μg/mL、PRO 76.4 μg/mL、THP 125.4 μg/mL、PAL 44.6 μg/mL 混合对照品溶液。

2.1.2 样品的配制 定量称取各检测样品约 50.0 mg, 用流动相定容于 25 mL 量瓶中, 即得。

2.1.3 色谱条件^[15] 色谱柱为 Discovery C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测条件为 A 相: 8 mL 三乙胺, 30 mL 冰醋酸加至水中定容到 1 L; B 相: 甲醇-乙腈 (1:4); 洗脱比例: 0~50 min, 88% A; 50~75 min, 88%~75% A; 体积流量 1 mL/min; 进样体积 10 μL; 检测波长 282 nm。

2.2 样品前处理方法

配制 0.02 g/mL 的夏天无总生物碱超临界提取物无水乙醇溶液, 加入 0.5 mol/L 的氢氧化钠水溶液 (体积比为 4:1), 然后在加热搅拌的条件下反应 2 h, 反应完成后, 将反应液减压蒸干。取蒸干后的样品 0.8 g, 溶于 10 mL (6 mL 上相, 4 mL 下相) 溶液中, 配制成质量浓度为 80 mg/mL 的样品溶液。

2.3 FCPC 操作方法

以醋酸乙酯-水 (1:1) 系统为分离系统, 分别将各种溶剂按其比例加入分液漏斗中, 剧烈震荡使各溶剂充分混合, 平衡后, 分别取为上相和下相, 使用前用超声脱气 30 min。在 ascending 模式下, 用低转速 (600 r/min)、高体积流量 (体积流量 8 mL/min) 将 FCPC 柱内充满固定相 (下相)。待充满固定相后, 在各以 descending 和 ascending 模式下, 体积流量 8 mL/min, 转速 600 r/min 泵入 2 min 以排

除气泡,再将仪器调回 ascending 模式,调节参数至需要的体积流量(4 mL/min)和转速(1 200 r/min),开始泵入流动相,直至两相平衡,即可进样,进样质量浓度 80 mg/mL,进样量 1 mL。

选择 282 nm 为检测波长,收集制备好的样品。将收集好的样品蒸干,称定质量,后转移至 50 mL 量瓶中定容,送入 HPLC 检测。

2.4 FCPC 工艺条件优化

BI 的去除率主要受到样品质量浓度(A)、转速(B)以及体积流量(C)3个因素的影响。样品质量浓度、转速、体积流量通过影响固定相保留率和出峰时间,从而影响分离效率。结合仪器参数以及前期预试验结果,样品质量浓度在 20~80 mg/mL,转速在 1 200~2 000 r/min,体积流量在 2~4 mL/min 时 BI 的去除率较高。选取这3个因素,每个因素各3个水平,用 $L_9(3^4)$ 安排实验并进行正交分析。

FCPC 法在去除夏天无总生物碱毒性成分 BI 的同时又要兼顾其余各生物碱要有较高的回收率,以 BI 去除率和其余生物碱回收率为指标,用综合加权评分法确定最佳工艺。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化,再给出不同的权重。为去除 BI 降低毒性,保证夏天无总生物碱的安全性,BI 去除率的权重系数设为 0.40;其余4个生物碱的回收率保证夏天无总生物碱的有效性,其回收率的权重系数均设为 0.15。用综合评分计算 K 值和 R 值

并进行方差分析,综合评价各因素各水平的影响大小以及最优组合。各实验项按下式评分:综合评分 = $(Y_{BI}/94.87) \times 100 \times 0.40 + [(Y_{EGE}/88.31) + (Y_{PRO}/90.50) + (Y_{THP}/90.79) + (Y_{PAL}/237.45)] \times 100 \times 0.15$ 。

正交试验设计和结果见表1,方差分析见表2,各碱定量测定结果以及仪器压力、固定相保留率(S_f)等参考数据见表3。BI 去除率、生物碱回收率和固定相保留率按公式计算。

BI 去除率 = $(BI \text{ 在去除前样品中的质量} - BI \text{ 在除去后产品中的质量}) / BI \text{ 在去除前样品中的质量}$

生物碱回收率 = $生物碱在除去后产品中的质量 / 生物碱在去除前样品中的质量$

$S_f = \text{固定相在 FCPC 柱内的体积} / \text{FCPC 的柱体积}$

由表1的直观分析结果可知,在所选的因素水平范围内,各因素对综合评分的影响程度从大到小为 $A > C > B$,即样品质量浓度 > 体积流量 > 转速。最优的工艺为 $A_3B_1C_3$ 。从方差分析结果可以看出进样质量浓度、转速、体积流量对综合评分均无显著性影响。因此根据实验结果得到最优化的 FCPC 工艺条件为样品浓度 80 mg/mL,转速 1 200 r/min,体积流量 4 mL/min。

2.5 验证实验

为进一步考察该工艺的稳定性和可靠性,按上述正交试验确定的最佳工艺,平行操作3份,验证实验结果,测定数据见表4。FCPC 色谱图见图1,各生物碱对照品 HPLC 色谱图见图 2-A,夏天无总

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表与结果
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal tests and results

试验号	A / (mg·mL ⁻¹)	B / (r·min ⁻¹)	C / (mL·min ⁻¹)	D (误差)	BI 去除率 / %	回收率 / %				综合评分
						EGE	PRO	THP	PAL	
1	20 (1)	1 200 (1)	2 (1)	(1)	92.36	75.31	75.28	78.66	146.99	86.49
2	20 (1)	1 600 (2)	3 (2)	(2)	92.55	80.14	88.96	86.86	113.07	88.87
3	20 (1)	2 000 (3)	4 (3)	(3)	92.16	74.70	90.31	83.75	169.61	91.07
4	50 (2)	1 200 (1)	3 (2)	(3)	94.69	71.71	87.15	84.78	237.45	97.42
5	50 (2)	1 600 (2)	4 (3)	(1)	92.34	70.96	90.50	90.13	217.35	94.61
6	50 (2)	2 000 (3)	2 (1)	(2)	85.25	68.92	88.91	87.62	192.22	89.01
7	80 (3)	1 200 (1)	4 (3)	(2)	94.87	88.31	82.87	90.79	230.25	98.28
8	80 (3)	1 600 (2)	2 (1)	(3)	93.47	81.71	88.26	83.29	216.83	95.38
9	80 (3)	2 000 (3)	3 (2)	(1)	93.16	62.66	82.21	77.81	205.52	89.39
K_1	266.43	282.19	270.88	270.49						
K_2	281.04	278.86	275.68	276.16						
K_3	283.05	269.47	283.96	283.87						
R	16.62	12.72	13.08	13.38						

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
进样质量浓度	54.857	2	1.824	无
转速	29.007	2	0.965	无
体积流量	29.187	2	0.971	无
误差	30.069	2		

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

生物碱去除 BI 前后的 HPLC 色谱图见图 2-B、C。实验结果表明, 该工艺稳定、可行, BI 去除率达 94.0%以上, 其余各生物碱的回收率达 85.0%以上, 达到预期的目标。

2.6 不同工艺的比较

溶剂萃取法是经典的成熟的样品前处理技术之一, 广泛用于中药有效成分的分离纯化。因此, 本实验比较了醋酸乙酯-水溶剂萃取法与 FCPC 法对

表 3 各生物碱定量测定和 FCPC 仪器参数

Table 3 Determination of alkaloids and instrument parameters of FCPC

试验号	BI / %	EGE / %	PRO / %	THP / %	PAL / %	S_f / %	压力 / MPa
原样品	9.26	14.70	21.49	23.18	0.09	-	-
1	0.81	11.07	16.18	18.23	0.13	55	1.7
2	0.82	11.78	19.12	20.13	0.10	61	2.7
3	0.84	10.98	19.41	19.41	0.15	57	3.7
4	0.54	10.54	18.73	19.65	0.21	58	1.8
5	0.81	10.43	19.45	20.89	0.19	53	2.9
6	1.54	10.13	19.11	20.31	0.17	58	3.8
7	0.59	12.98	17.81	21.05	0.20	47	1.9
8	0.78	12.01	18.97	19.31	0.19	61	2.8
9	0.77	9.21	17.67	18.04	0.18	55	3.5

表 4 验证实验测定结果

Table 4 Determination of verified experiment

实验号	BI / %		EGE / %		PRO / %		THP / %		PAL / %		S_f / %
	质量分数	去除率	质量分数	回收率	质量分数	回收率	质量分数	回收率	质量分数	回收率	
原样品	9.26	-	14.70	-	21.49	-	23.18	-	0.09	-	-
1	0.63	94.63	17.31	88.32	23.46	81.87	27.71	89.64	0.26	220.65	58
2	0.60	94.88	16.79	92.81	22.91	86.61	27.31	95.70	0.25	229.84	57
3	0.48	95.92	17.13	91.77	24.59	90.10	26.74	90.82	0.26	231.68	58
平均值	0.57±0.08	95.14±0.68	17.08±0.26	90.97±2.35	23.65±0.86	86.19±4.13	27.25±0.49	92.05±3.22	0.26±0.01	227.39±5.91	-

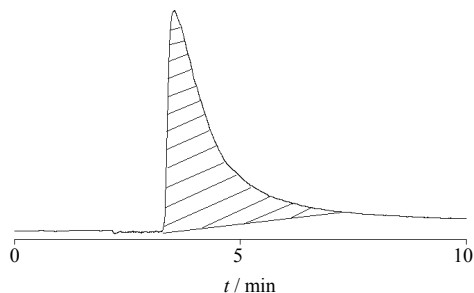


图 1 夏天无总生物碱去除 BI 的 FCPC 色谱图
Fig. 1 FCPC of (-)-bicuculline removed from total alkaloids

夏天无总生物碱的纯化效果, 结果见表 5。溶剂萃取法在对 BI 的去除率以及其他各生物碱的回收率方面均低于 FCPC 法, 且溶剂萃取法操作时间长, 容易产生乳化现象。因此, 相对于经典的溶剂萃取法, FCPC 法在去除夏天无总生物碱的毒性成分 BI 具有明显的优势, 值得推广。

2.7 工艺放大实验

由正交工艺得出的最佳工艺, 根据 FCPC 转鼓体积 200 mL, 进行线性放大。以体积流量 4 mL/min, 转速 1 200 mL/min, 进样质量浓度 80 mg/mL, 进样

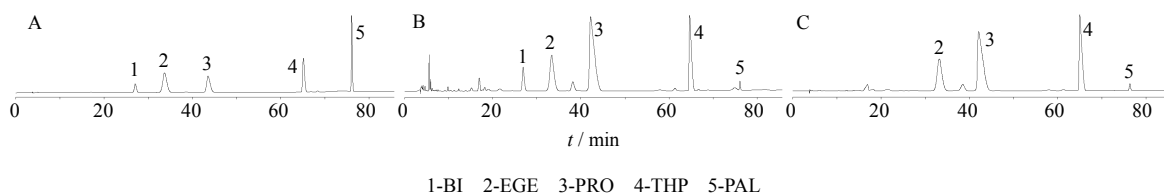


图 2 生物碱混合对照品 (A)、夏天无总生物碱提取物 (B) 和夏天无总生物碱去除 BI 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of alkaloid mixed standard substance (A), total alkaloids extracted from *Corydalis Decumbentis Rhizoma* (B), and total alkaloids without (-)-biccuculline (C)

表 5 FCPC 法与溶剂萃取法比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Comparison on FCPC and solvent extraction ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分离方法	操作时间	BI 去除率 / %	回收率 / %				乳化现象
			EGE	PRO	THP	PAL	
FCPC 法	0.5 h	94.61 ± 2.32	97.34 ± 2.14	92.28 ± 3.23	92.93 ± 2.71	208.45 ± 1.52	无
溶剂萃取法	1 h × 3	69.77 ± 3.13	45.56 ± 1.92	39.98 ± 2.94	48.67 ± 2.12	46.67 ± 2.38	有

体积 8 mL 进行实验。3 批样品经 FCPC 分离后，BI 的去除率分别为 97.26%、96.75%、96.69%，各生物碱的回收率可达 90% 以上，结果见表 6。

结果表明，该工艺稳定可靠、操作简便，为去除毒性成分 BI 的夏天无总生物碱工业化生产提供了理论依据。

表 6 工艺放大实验各生物碱的测定

Table 6 Determination of alkaloids from magnified experiment

试验号	BI / %		EGE / %		PRO / %		THP / %		PAL / %		S _F / %
	质量分数	去除率	质量分数	回收率	质量分数	回收率	质量分数	回收率	质量分数	回收率	
原样品	9.26	-	14.70	-	21.49	-	23.18	-	0.09	-	-
1	0.33	97.26	17.99	94.09	24.89	89.03	27.77	92.10	0.24	208.62	60
2	0.36	96.75	17.25	98.29	24.31	94.73	26.89	97.16	0.23	217.81	58
3	0.38	96.69	17.67	96.92	24.89	93.37	27.12	94.34	0.24	218.80	59
平均值	0.36	96.90	17.64	96.43	24.70	92.37	27.26	94.53	0.24	215.08	
	±0.03	±0.31	±0.37	±2.14	±0.33	±2.98	±0.46	±2.53	±0.01	±5.61	

2.8 BI 的鉴定

将 FCPC 转鼓内的固定相以及流动相回收，减压蒸干，用水复溶，加 1 mol/L 盐酸与其反应（样品溶液体积-盐酸溶液体积 5 : 1），反应完成后，用氨水调节 pH 值至中性，减压回收溶剂，残留物经反复硅胶（200~300 目）柱色谱分离（正己烷-氯仿-甲醇-二乙胺 15 : 1 : 1 : 1），收集流分，相同部位合并，浓缩放置，经重结晶得到化合物（10.0 mg），ESI-MS 谱给出 m/z 368 [M+H]⁺，相对分子质量为 367，分子式为 C₂₀H₁₇NO₆。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 2.56 (3H, s, N-CH₃), 4.05 (1H, d, J = 4 Hz, H-1), 2.22 (2H, m, H-3), 2.87 (2H, m, H-4), 6.46 (1H, s, H-5), 5.93 (2H, s, C_{6,7}-O-CH₂-O-), 6.58 (1H, s, H-8), 5.58 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-9), 6.21 (1H, d, J =

7.5 Hz, H-2'), 6.92 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-3'), 6.16 (2H, s, C_{4,5}-O-CH₂-O-)。该化合物的 ¹H-NMR 数据与文献对照基本一致^[16]，因此鉴定为 BI。

3 讨论

夏天无总生物碱中的毒性成分 BI 的结构中含有内酯环官能团，在碱性条件下，内酯环开环，变为水溶性的羧酸盐，而其余各生物碱因结构中不含内酯环，在碱性溶剂体系中较稳定，仍为脂溶性，导致在溶剂系统中分布差异大，即 K 远大于 10。在 ascending 模式下，经过 FCPC 的分离，待去除的 BI 羧酸盐即会保存在固定相中，新制得的总生物碱部位即随流动相流出，收集此部分流动相蒸干便得目标产物。再通过优化 FCPC 工艺条件，提高 BI 去除率和其他生物碱回收率，最终制得 BI 高去除

率的夏天无总生物碱部位。

实验中发现 PAL 的回收率远大于 100%，这是由于上样前对样品进行了碱化处理，THP 在碱性条件下易氧化为巴马汀季铵碱，巴马汀季铵碱和 PAL 在本实验 HPLC 缓冲溶液流动相条件下出峰时间相同，由于 PAL 的量非常低，从而使计算所得回收率大幅度提高。THP 会转化为 PAL 的现象也有文献报道^[17]。

FCPC 分离方法当中，溶剂系统的选择颇为关键，即要保证溶剂系统对所分离的成分有明显的选择性，又要考虑溶剂本身的性质，对样品有一定的溶解性，易去除，无毒害等。生物碱极性中等，BI 水解后产物为水溶性，选用中等极性系统即可。选用二氯甲烷、三氯甲烷、醋酸乙酯 3 种试剂作为备选溶剂，由于三氯甲烷、二氯甲烷毒性大，且其余各碱回收率比醋酸乙酯低，综合考虑选用醋酸乙酯-水体系。醋酸乙酯-水（1：1）体系对样品有足够的溶解性， K_{BI} 远大于 10。 $K = A_U/A_L$ ， A_U 为上相中化合物的峰面积， A_L 为下相中化合物的峰面积。此次研究的思路为首先由正交试验得出最优工艺参数，再进行验证，并将该参数运用到放大的 BI 去除实验中去。从实验所得的一系列结果可以看出无论是验证还是放大实验均有较高的 BI 去除率以及其余生物碱较高的回收率，且放大实验的结果优于小试，一方面这可能于 FCPC 本身的性能有关，柱体积越大，理论塔板数越高，分离效果越好，另一方面可能是由于样本取样量越大，实际操作引入误差影响越小。

BI 是夏天无总生物碱当中确认的毒性成分，由于它的强致惊厥作用导致夏天无总生物碱在临床方面的应用受到限制。FCPC 应用到夏天无总生物碱中 BI 的敲除，该方法具有创新性，扩大了 FCPC 技术的应用领域，为开辟更多新应用提供了思路。该实验方法 BI 去除率高达 94.0% 以上，其余各生物碱回收率高达 85.0% 以上，也去除了大量杂质，分离时间短至 0.5 h，重现性好，操作简便，绿色环保，为夏天无总生物碱创新中药开发提供可行性支撑^[13]，同时为夏天无的进一步研究提供原料药，易于夏天无总生物碱中去除 BI 产业化的推广。

参考文献

[1] 赵学敏. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
[2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[3] 中国药科大学. 中药辞海 (第二卷) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996.
[4] 邹 冈, 沈念慈, 屠国瑞, 等. γ -氨基丁酸拮抗剂苏玄胡硷惊厥作用与复苏作用的研究 [J]. 新医学, 1976, 2(2): 75-81.
[5] Salvatore P, Chun R L, Karen G. Intracerebral site of convulsant action of bicuculline [J]. *Life Sci*, 1985, 36(13): 1295-1298.
[6] Hu B, Li X R, Zhou Y F, *et al.* Effects of bicuculline on direction-sensitive relay cells in the dorsal lateral geniculate nucleus (LGNd) of cats [J]. *Brain Res*, 2000, 885(1): 87-93.
[7] Gleichman A J, Carmichael S T. Astrocytic therapies for neuronal repair in stroke [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 565(SI): 47-52.
[8] Toribio A, Delannay E, Richard B, *et al.* Preparative isolation of huperzines A and B from *Huperzia serrata* by displacement centrifugal partition chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1140(1/2): 101-106.
[9] Roullier C, Chollet-Krugler M, Bernard A, *et al.* Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea* [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(22): 2067-2073.
[10] Michel T, Destandau E, Pecher V, *et al.* Two-step centrifugal partition chromatography (CPC) fractionation of *Butea monosperma* (Lam.) biomarkers [J]. *Sep Purif Technol*, 2011, 80(12): 32-37.
[11] Maciuk A, Toribio A, Zeches M, *et al.* Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2005, 28(12/13): 1947-1957.
[12] Destandau E, Toribio A, Lafosse M, *et al.* Centrifugal partition chromatography directly interfaced with mass spectro-metry for the fast screening and fractionation of major xanthones in *Garcinia mangostana* [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(9): 1390-1394.
[13] 袁 辉, 吴春珍, 杨义芳, 等. 夏天无中两种生物碱和总生物碱羟丙基- β -环糊精包合物的急性毒性 [J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(12): 79-82.
[14] 蒋爱芳. 夏天无总生物碱及其口腔速崩片的研究 [D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2006.
[15] 张荣劲. 夏天无超临界提取物中主要生物碱及其药理学研究 [D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2009.
[16] Maurya M, Srivastava S K. Preparative-scale separation of anticancer triterpenes from *Eucalyptus* hybrid by centrifugal partition chromatography [J]. *Sep Sci Technol*, 2011, 46(7): 1189-1194.
[17] 霍佩琼. 金不换总生物碱提取工艺研究及其药理作用实验研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2008.