

大孔吸附树脂纯化延胡索总生物碱工艺研究

胡锦涛¹, 吴瑾瑾¹, 王群星², 徐菲拉², 石森林^{1*}

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

2. 金华市中心医院, 浙江 金华 321000

摘要: 目的 确定大孔吸附树脂纯化延胡索总生物碱的工艺条件。方法 以酸性染料比色法测定延胡索总生物碱, HPLC法测定延胡索中盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素及延胡索甲素; 以延胡索总生物碱和4种生物碱的吸附率、洗脱率及质量分数为指标, 利用静态吸附和动态吸附实验相结合的方法, 对6种大孔吸附树脂进行筛选。通过考察上样量、体积流量、除杂溶剂和体积、洗脱溶剂和体积等因素, 优选延胡索总生物碱纯化工艺条件, 以5、10倍放大试验考察纯化工艺的稳定性。结果 选取D141型大孔树脂用于延胡索总生物碱纯化, 纯化工艺为生药0.6 g/mL的上样液, 加入径高比1:5~1:9的D141大孔吸附树脂柱, 以体积流量2 BV/h上样2 BV, 1.3 BV纯水除杂, 6 BV 95%乙醇以2 BV/h体积流量洗脱。纯化后延胡索总生物碱质量分数高达68.19%, 盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素及延胡索甲素的质量分数分别为1.95%、11.74%、4.93%、6.36%。经5、10倍放大试验得到的延胡索总生物碱质量分数能达到65%以上。结论 该工艺经验证试验, 总生物碱质量分数能达到65%以上, 且延胡索总生物碱及4种生物碱单体的转移率均能达到85%以上, 表明D141型大孔吸附树脂能有效纯化延胡索中总生物碱, 且适用于工业大生产。

关键词: 延胡索; 总生物碱; 大孔吸附树脂; 纯化; 酸性染料比色法; HPLC; 盐酸巴马汀; 脱氢紫堇碱; 延胡索乙素; 延胡索甲素; 吸附率; 洗脱率; 静态吸附; 动态吸附

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)18-4302-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.014

Purification process of alkaloids from *Corydalis Rhizoma* by macroporous adsorption resin

HU Jin-xiang¹, WU Jin-jin¹, WANG Qun-xing², XU Fei-la², SHI Sen-lin¹

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Jinhua Center Hospital, Jinhua 321000, China

Abstract: Objective To determine the technological conditions for the purification of the total alkaloid from the *Corydalis Rhizoma* (CR) by macroporous adsorption resin. **Methods** Total alkaloids of CR were determined by acid dye colorimetry, palmitine hydrochloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmitine, and corydaline were determined by HPLC. Six macroporous adsorption resins were investigated with the absorption rates, elution rates, and the content of the total alkaloid and four alkaloids of CR by static and dynamic adsorbing experiments. The purification process conditions of the total alkaloid of CR were optimized by the loading amount and volume flow of sample, the type and volume of the impurity removal of solvent and elution solvent and so on. The stability of the purification process was investigated by 5, 10 times enlargement. **Results** D141 type macroporous adsorption resin was the best choice for the purification of the total alkaloid from CR, the optimized parameters were as follows: Drug concentration was 0.6 g/mL of medicinal material and was added to the D141 macroporous resin column that the ratio of diameter to height range from 1:5 to 1:9 at a flow rate of 2 BV/h to 2 BV, 1.3 BV of purified water was used to remove impurities, and then 6 BV 95% ethanol was used as eluent at a flow rate of 2 BV/h. The purity of the total alkaloid of CR was up to 68.19% after purification, and the content of palmitine hydrochloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmitine, and corydaline was 1.95%, 11.74%, 4.93%, and 6.36%, respectively. The

收稿日期: 2018-01-23

基金项目: 浙江省科学技术厅公益技术研究社会发展项目(2015C33124); 金华市科技局社会发展类重点项目(2015-3-002)

作者简介: 胡锦涛(1994—), 女, 硕士, 从事药物新剂型及制剂新技术研究。Tel: 17367074653 E-mail: 1405407599@qq.com

吴瑾瑾(1973—), 女, 副主任中药师, 从事中药制剂新技术与医院制剂研究。E-mail: hzbjwj@163.com

*通信作者 石森林(1970—), 男, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型及制剂新技术研究。Tel: (0571)86613756 E-mail: pjstone@163.com

purity of the total alkaloid of the CR can reach more than 65% by 5 times and 10 times enlargement. **Conclusion** The purity of the total alkaloids can reach more than 65% after verification test, and the transfer rate of total alkaloids and four alkaloid monomers of CR can reach more than 85%, indicating that D141 macroporous adsorption resin can effectively purify total alkaloids from CR, and can be applied to industrial production.

Key words: *Corydalis Rhizoma*; total alkaloids; macroporous adsorption resin; purification; acid dye colorimetry; HPLC; palmatine hydrochloride; dehydrocorydaline; tetrahydropalmatine; corydaline; adsorption rate; elution rate; static adsorption; dynamic adsorption

延胡索 *Corydalis Rhizoma* 为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎^[1], 具有活血化瘀、理气止痛等功效^[2], 主产地浙江, 为著名的浙八味之一^[3]。目前普遍认为延胡索生物碱是其主要活性成分, 其中包括叔胺、季胺类生物碱^[4-8]。中药有效成分是中药发挥药效作用的物质基础^[9], 通过现代分离纯化技术, 从复杂中药成分中提取和纯化中药有效成分或有效成分群, 以保证中药临床应用的确切疗效, 是现代中药研究的关键与前提。目前应用于中药化学成分纯化的手段主要有大孔树脂吸附^[10-11]、水提醇沉^[12]、离心、萃取、膜分离等多种方法, 这些方法在中药有效成分的纯化中得到不同程度的应用。其中大孔树脂吸附技术以其吸附量大、选择性好、再生容易等优点在中药有效成分的分离纯化中显示出极大的优越性^[13], 是提取中药有效成分最为有效的纯化技术、最具竞争力的纯化方法。近年来, 大孔吸附树脂已较广泛应用于中药新药的开发和中成药的生产中, 主要用于中药分离和提纯过程^[14-17]。

在大孔吸附树脂分离纯化延胡索生物碱的文献报道中^[18], 基本采用延胡索乙素^[19]或延胡索总生物碱^[20]为含量测定指标, 未见以延胡索总生物碱和 4 种单体生物碱含量为指标进行工艺优化的文献报道。本研究旨在优选出一种适合纯化延胡索生物碱的大孔吸附树脂^[21-22], 并对优选出的大孔吸附树脂纯化延胡索生物碱时的工艺条件及参数进行研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

JA2003N 电子天平, 上海精密仪器有限公司; XS105 分析天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; KH-250DB 型数控超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; TC-15 恒温电热套, 海宁市华星仪器厂; RE-3000 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器有限公司; Agilent1200 Series 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; DFY-500 高速万能粉碎机, 温岭市林大机械有限公司; DK-S26 电热恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; SHB-III 循环水式多用真

空泵, 郑州长城科工贸有限公司; DGG-9053A 电热恒温鼓风干燥箱, 上海森信实验仪器有限公司; DZF6050 型真空干燥箱, 上海顿克仪器科技有限公司; UV-2450 紫外可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; Millipore Synergy 超纯水系统, 美国密理博公司; Avanti J-26XP 系列高效离心机, 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司。

1.2 材料与试剂

延胡索, 浙江中医药大学中药饮片有限公司, 产地为浙江, 批号 140801, 经浙江中医药大学陈孔荣副教授鉴定为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎; 盐酸巴马汀(质量分数 86.20%, 批号 110732-201108)、延胡索乙素(质量分数 99.80%, 批号 110726-201414), 中国食品药品检定研究院; 脱氢紫堇碱(质量分数 98.52%, 批号 FY19600707)、延胡索甲素(质量分数 98.30%, 批号 FY21460705), 南通飞宇生物科技有限公司; 溴甲酚绿, 批号 20140817, 广东省精细化学品工程技术研究开发中心; 无水硫酸钠(批号 2014092901)、无水乙酸钠(批号 20130315), 成都市科龙化工试剂厂; 水为超纯水; 乙腈、甲醇为色谱纯, 美国 Tedia 公司; 水为 Millipore 超纯水; 其他试剂均为分析纯, 成都科龙化工试剂厂; 大孔吸附树脂 XDA-8、NKA-9、D101、D141、HPD200A, 郑州华溢科技新材料股份有限公司; AB-8, 安徽三星树脂科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 上柱样品液的制备

取延胡索药材适量, 用 8 倍量 60%乙醇, 水浴回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩, 于冷冻离心机(4 ℃、7 000 r/min、30 min)离心, 取上清液, 制成生药 0.6 g/mL 的延胡索上柱样品液(延胡索总生物碱 9.21 mg/mL、盐酸巴马汀 0.22 mg/mL、脱氢紫堇碱 1.36 mg/mL、延胡索乙素 0.54 mg/mL、延胡索甲素 0.44 mg/mL), 备用。

2.2 延胡索中总生物碱的含量测定方法

2.2.1 对照品溶液的配制 称取延胡索乙素对照品

约 10 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 振摇后即得质量浓度为 191.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 将上柱样品液过大孔树脂柱, 收集洗脱液, 取洗脱液 10 mL 置蒸发皿中蒸干, 残渣再用甲醇溶解, 转移到 10 mL 量瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 振摇, 滤过后取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密移取对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。精密移取不同质量浓度的延胡索乙素对照品溶液 1 mL 分别置于分液漏斗中, 各加 pH 4.5 缓冲液 12 mL, 加入溴甲酚绿溶液 3 mL, 氯仿 9 mL, 振摇 2 min, 静置 30 min 后分取氯仿液于预置有 0.4 g 无水硫酸钠的容器中, 随行试剂作空白, 在 411 nm 波长处分别测定供试品溶液与对照品溶液的吸光度 (A) 值。以延胡索乙素质量浓度 (X) 为横坐标, 以 A 值为纵坐标 (Y), 作标准曲线进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.0048X-0.0465$, $r=0.9994$, 表明延胡索乙素对照品在 18.92~189.20 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈良好的线性关系。

2.2.4 样品测定 精密吸取供试品溶液 1 mL, 按上述方法操作测定 A 值, 计算样品中延胡索总生物碱的质量分数。

2.3 延胡索中 4 种生物碱的含量测定方法

2.3.1 混合对照品溶液的配制 取盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素对照品适量, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 得混合对照品溶液 (盐酸巴马汀 32.2 $\mu\text{g/mL}$ 、脱氢紫堇碱 96.5 $\mu\text{g/mL}$ 、延胡索乙素 76.2 $\mu\text{g/mL}$ 、延胡索甲素 79.2 $\mu\text{g/mL}$)。

2.3.2 供试品溶液的制备 将上柱样品液过大孔树脂柱, 收集洗脱液, 取洗脱液 10 mL 置蒸发皿中蒸干, 残渣再用甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 振摇, 滤过后取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3.3 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱为 Kromascil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.04 mol/L 磷酸水溶液 (三乙胺调 pH 值至 6.0), B 为乙腈, C 为甲醇, 梯度洗脱程序: 0~20 min, 75%~68% A, 25%~32% B; 21~50 min, 30%A, 70% C; 检测波长: 0~30 min, 340 nm; 31~50 min, 281 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.8 mL/min; 进样

量 5 μL 。分别精密吸取甲醇溶液、对照品溶液、供试品溶液, 进行色谱分析, 结果见图 1。在该色谱条件下, 甲醇溶液对样品测定无干扰, 对照品和供试品溶液色谱峰良好, 样品中的 4 种成分均能达到基线分离, 分离度大于 1.5, 对称因子均在 0.95~1.05, 理论塔板数均大于 10 000, 满足样品分析检测要求。

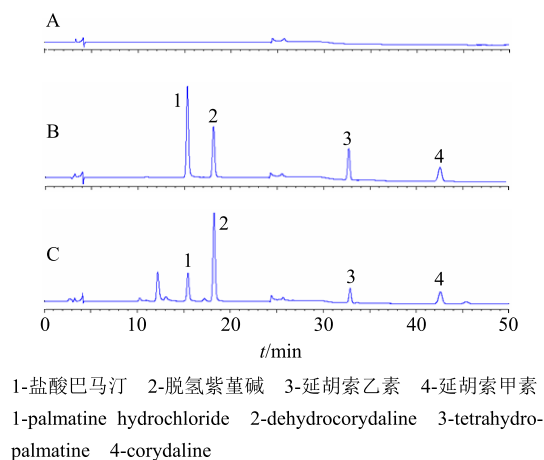


图 1 空白溶液 (A)、延胡索生物碱对照品溶液 (B) 和延胡索供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank solution (A), CR alkaloid reference solution (B), and CR solution (C)

2.3.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液, 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。在上述色谱条件下进行峰面积测定, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 所得线性方程分别为盐酸巴马汀 $Y_1=27651X_1-2.7115$, $r=0.9999$, 表明盐酸巴马汀在 1.61~16.10 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 脱氢紫堇碱 $Y_2=20028X_2-1.9592$, $r=0.9999$, 表明脱氢紫堇碱在 4.83~48.30 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 延胡索乙素 $Y_3=5299X_3+0.9052$, $r=0.9999$, 表明延胡索乙素在 3.81~38.10 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 延胡索甲素 $Y_4=5219.1X_4+0.1337$, $r=0.9998$, 表明延胡索甲素在 3.96~39.60 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.5 样品测定 精密吸取供试品溶液 5 μL , 注入 HPLC 色谱仪, 记录色谱图, 测定盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素的峰面积, 计算其含量。

2.4 大孔吸附树脂的预处理

分别称取 XDA-8、NKA-9、D101、D141、HPD200A、AB-8 大孔吸附树脂, 用 2 倍量的 95%

乙醇浸泡 24 h, 滤过。将树脂湿法上柱, 继续用 95% 乙醇以 2 BV/h 的体积流量冲洗, 洗至洗脱液与蒸馏水 1:3 混合澄清为止, 然后用蒸馏水以同样的体积流量洗至无醇味, 备用。

2.5 大孔吸附树脂的筛选

2.5.1 静态吸附实验 称取经静态吸附实验预试验选择的 6 种树脂各 3 g 于锥形瓶中, 精密量取 25 mL 生药 0.6 g/mL 样品, 置于恒温振荡器中 (160 r/min, 32 ℃) 振荡 24 h, 分别测定原液及滤液中延胡索中 4 种单体的含量, 计算比吸附量和吸附率。

$$\text{比吸附量} = (C_0V_0 - C_1V_1)/M$$

$$\text{吸附率} = (C_0V_0 - C_1V_1)/C_0V_0$$

C_0 为吸附前生物碱浓度, C_1 为吸附后生物碱浓度, V_0 为吸附前溶液体积, V_1 为吸附后溶液体积

取吸附后的树脂, 抽滤至干, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 置于恒温振荡器中 (160 r/min, 32 ℃) 振荡 14 h, 取洗脱液测定延胡索 4 种单体的含量, 计算比洗脱量和洗脱率。结果见表 1、2。

$$\text{比洗脱量} = C_2V_2/M$$

$$\text{洗脱率} = C_2V_2/(C_0V_0 - C_1V_1)$$

C_2 为解吸后生物碱浓度, V_2 为解吸后溶液体积

表 1 延胡索 4 种单体生物碱静态吸附实验的吸附率和洗脱率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Adsorption rate and elution rate of static tetrahydropalmatine in four monomeric alkali tests ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

树脂型号	吸附率/%				洗脱率/%			
	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素
D101	99.99±0.00	99.99±0.00	99.98±0.00	99.99±0.00	88.84±1.17	75.98±0.38	35.78±0.48	24.02±0.18
D141	97.07±0.13	98.63±0.07	99.84±0.01	99.93±0.01	90.20±1.08	82.29±1.20	43.26±1.51	30.45±1.67
AB-8	99.67±0.10	99.88±0.05	99.93±0.01	99.96±0.00	90.32±1.70	82.00±1.07	34.43±0.43	22.69±0.99
NKA-9	99.93±0.05	99.97±0.03	99.96±0.00	99.99±0.00	95.02±3.33	86.04±2.08	30.34±0.10	20.06±0.34
XDA-8	99.52±0.02	99.79±0.01	99.93±0.00	99.95±0.00	88.44±1.27	72.12±1.26	40.53±1.13	27.95±1.15
HPD200A	99.73±0.04	99.89±0.02	99.95±0.01	99.98±0.02	87.55±2.23	67.64±1.15	37.70±0.38	25.96±0.18

表 2 4 种生物碱加和结果 ($n = 3$)

Table 2 Four kinds of alkaloid addition results ($n = 3$)

树脂型号	比吸附量/(mg·g ⁻¹)	比洗脱量/(mg·g ⁻¹)
D101	12.21	6.67
D141	12.10	7.33
AB-8	12.20	6.91
NKA-9	12.21	6.99
XDA-8	12.19	6.70
HPD200A	12.20	6.33

由表 1、2 可知, 6 种大孔树脂对盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素的吸附率皆大于 97%; 盐酸巴马汀与脱氢紫堇碱洗脱结果较一致, 其中 D141、AB-8、NKA-9 3 种树脂洗脱最好 (D141、AB-8、NKA-9 中盐酸巴马汀的洗脱率分别为 90.20%、90.32%、95.02%, 脱氢紫堇碱的洗脱率分别为 82.29%、82.00%、86.04%); 延胡索甲素与延胡索乙素洗脱结果较一致, 其中 D141、XDA-8、HPD200A 3 种树脂洗脱最好 (D141、XDA-8、HPD200A 中延胡索甲素的洗脱率分别为 30.45%、27.95%、25.96%, 延胡索乙素的洗脱率分别为 43.26%、40.53%、37.70%)。因此, 将延胡索总生

物碱 4 种单体的比吸附量和比洗脱量的加和作为选择依据, 发现 6 种大孔树脂的比吸附量皆在 12.10~12.21 mg/g 且相差非常小, 且 D141、AB-8、NKA-9 3 种树脂的比洗脱量相对较高, 结合 4 种生物碱的吸附率和洗脱率结果, 最终选择这 3 种树脂进行动态吸附实验。

2.5.2 动态吸附实验 称取 5 g 处理过的树脂湿法装柱 (1 cm×7 cm), 每个平行 3 份, 以 0.8 mL/min 体积流量上样约生药 0.6 g/mL 的提取液 60 mL。100 mL (约 11 BV) 超纯水洗至无色, 100 mL 80% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 计算吸附率、洗脱率和质量分数, 结果见表 3、4。可见 AB-8 树脂对 4 种生物碱的吸附率最高, 在盐酸巴马汀和脱氢紫堇碱的洗脱率中 AB-8 树脂较好; D141 树脂对 4 种生物碱单体的吸附率>94%, 对延胡索乙素和延胡索甲素的洗脱率最好, 分别为 91.50%和 81.51%; 对延胡索总生物碱和 4 种生物碱单体的质量分数进行分析, 可知这 3 种树脂对 4 种生物碱单体的质量分数影响较小, D141 和 AB-8 树脂对延胡索总生物碱纯化的结果最好, 总生物碱的质量分数分别为 72.72%和 71.61%。

表 3 延胡索 4 种单体碱动态试验的吸附率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Adsorption rate and elution rate of four kinds of monomer alkali dynamic test of CR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

树脂型号	吸附率/%				洗脱率/%			
	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素
D141	94.34±1.34	96.78±0.88	99.61±0.12	99.75±0.15	45.68±0.83	67.39±0.71	91.50±1.20	81.51±1.40
AB-8	99.52±0.13	99.69±0.17	99.98±0.05	99.99±0.00	76.49±1.75	86.87±1.01	86.59±3.15	70.94±4.97
NKA-9	97.91±0.72	98.62±0.51	99.61±0.18	99.85±0.12	78.72±2.18	84.64±1.41	74.20±3.64	60.13±5.66

表 4 延胡索总生物碱及 4 种单体的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Purity of total alkaloids and four monomers from CR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

树脂型号	质量分数/%				
	总生物碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素
D141	72.72±0.98	1.94±0.02	14.23±0.15	7.23±0.12	9.36±0.38
AB-8	71.61±1.93	2.09±0.04	15.05±0.28	7.36±0.14	5.37±0.16
NKA-9	57.06±1.87	2.20±0.08	13.78±0.38	5.24±0.17	5.66±0.37

综合吸附率、洗脱率和质量分数的实验结果,并结合实验设计的新颖性,最终选择 D141 树脂纯化延胡索总生物碱。

2.6 纯化工艺参数的确定

2.6.1 上样量及上样体积流量的考察 取处理好的 D141 树脂 1:5 (2 cm×10 cm) 湿法上柱,取约生药 0.6 g/mL 体积流量的延胡索上样液(盐酸巴马汀 0.22 mg/mL、脱氢紫堇碱 1.36 mg/mL、延胡索乙素 0.54 mg/mL、延胡索甲素 0.44 mg/mL)分别以 1、2、3 BV/h 上样 120 mL,每 10 毫升收集 1 次流出液,测定每 10 毫升中 4 种生物碱的质量分数。结果表明,当体积流量为 3 BV/h 时,第 8 份流出液中,盐酸巴马汀和脱氢紫堇碱开始出现泄漏;当体积流量为 2 BV/h 时,第 9 份流出液中,盐酸巴马汀和脱氢紫堇碱开始出现泄漏;当体积流量为 1 BV/h 时,第 10 份流出液中,盐酸巴马汀和脱氢紫堇碱开始出现泄漏。为确保效果及效率,最终选取上样体积流量 2 BV/h,上样质量浓度为生药 0.6 g/mL 的延胡索上样液,上样量为 60 mL (约 2 BV)。

2.6.2 径高比的考察 称取处理好的 D141 树脂以 1:5 (2 cm×10 cm)、1:7 (2 cm×14 cm)、1:9 (2 cm×18 cm) 湿法上柱,以 2 BV/h 分别上样 60、85、110 mL (约 2 BV),分别以 40、55、75 mL (约 1.3 BV) 超纯水作为除杂溶剂,分别以 180、270、330 mL (约 6 BV) 95%乙醇作为洗脱溶剂,收集洗脱液,真空干燥得干浸膏,计算总生物碱及 4 种生物碱转移率、质量分数。结果显示,径高比 1:5~1:9 时,延胡索总生物碱的转移率均在 80%以上,

质量分数均在 60%以上,故径高比在 1:5~1:9 均可满足纯化的要求。

2.6.3 除杂溶剂的选择 取处理好的 D141 树脂 15 g (2 cm×10 cm) 湿法上柱,以 2 BV/h 体积流量上样 60 mL 生药 0.6 g/mL 的延胡索上样液,然后分别以 100 mL 超纯水、80 mL 0.3% NaCl+20 mL 超纯水、100 mL 10%乙醇作为除杂溶剂,HPLC 测定除杂溶液中有效成分的含量,取 50 mL 除杂溶液干燥后称定质量,得除杂溶液中的固化物的质量、盐酸巴马汀及脱氢紫堇碱的损失量及损失率,因为延胡索乙素及延胡索甲素水溶性差,未在流出的除杂液中检测到,故仅将盐酸巴马汀和脱氢紫堇碱的损失量及损失率列表显示,结果见表 5。由表 5 结果可知,3 种除杂溶剂下,浸膏质量差异较小,但是 10%乙醇除杂时,有效成分损失最高,超纯水及 0.3% NaCl 损失较少。因此,选取 100 mL 超纯水、80 mL 0.1% NaCl+20 mL 超纯水、80 mL 0.2% NaCl+20 mL 超纯水、80 mL 0.3% NaCl+20 mL 超纯水进一步考察,并用 100 mL 80%乙醇进行洗脱,收集洗脱液,测定延胡索总生物碱及 4 种生物碱单体的质量分数,结果见表 6。结果显示,0.3% NaCl 及超纯水的除杂效果较好,结合新颖性及经济性,最终选取超纯水作为除杂溶剂。

损失率=除杂溶液中生物碱质量/上样液中生物碱质量

2.6.4 除杂溶剂用量考察 称取处理好的 D141 树脂 15 g (2 cm×10 cm) 湿法上柱,以 2 BV/h 上样约 60 mL 生药 0.6 g/mL 的延胡索上样液,以超纯水作为除杂溶剂,平行 3 份,每 10 毫升收集 1 份,挥

表 5 不同除杂溶剂下浸膏重及盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱的损失量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Weight of extracts and loss of palmatine hydrochloride and dehydrocorydaline in different demising solvents ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

除杂溶剂	浸膏质量/g	盐酸巴马汀		脱氢紫堇碱	
		损失量/mg	损失率/%	损失量/mg	损失率/%
100 mL 超纯水	0.62±0.03	0.47±0.06	4.44±0.59	0.82±0.18	1.21±0.26
80 mL 0.3% NaCl+20 mL 超纯水	0.86±0.04	0.11±0.04	1.09±0.35	0.18±0.08	0.27±0.00
100 mL 10%乙醇	0.80±0.03	2.53±0.14	23.98±1.36	7.02±0.64	10.39±0.95

表 6 除杂溶剂对延胡索总生物碱及 4 种单体质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effects of miscellaneous solvents on quality scores of total alkaloids and four kinds of monomers in CR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

除杂溶剂	质量分数/%				
	总生物碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素
80 mL 0.1% NaCl+20 mL 超纯水	64.03±0.21	2.10±0.02	12.99±0.04	4.35±0.08	2.34±0.21
80 mL 0.2% NaCl+20 mL 超纯水	59.75±0.81	2.15±0.08	13.18±0.16	4.18±0.21	2.18±0.06
80 mL 0.3% NaCl+20 mL 超纯水	73.40±1.89	2.25±0.03	13.27±0.19	4.38±0.06	2.56±0.24
100 mL 超纯水	72.88±1.16	2.28±0.07	13.90±0.63	4.36±0.36	2.27±0.36

干溶剂,称量洗脱液中固化物的质量,按 HPLC 测定峰面积,计算其中盐酸巴马汀与脱氢紫堇碱的含量。结果见图 2~4。结果显示,超纯水用量为 40 mL 后,固化物的增重较少,其中有效成分在固化物中所占的比例也较小,因此选取 40 mL (约 1.3 BV) 的超纯水作为除杂溶剂用量。

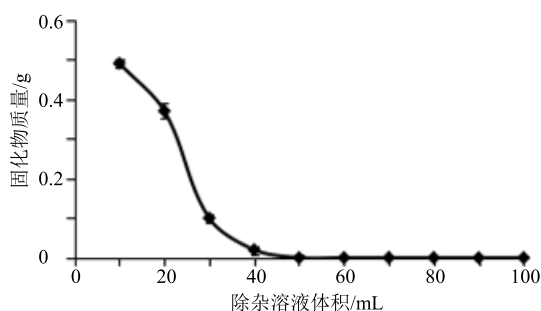


图 2 超纯水的除杂曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Purity curve of ultrapure water ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

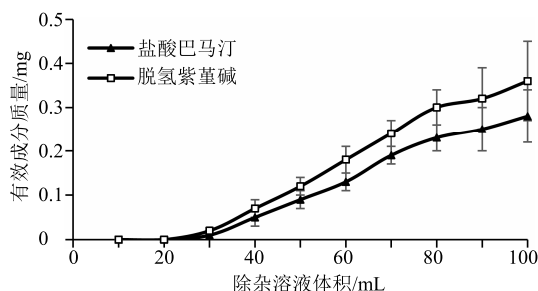


图 3 盐酸巴马汀及脱氢紫堇碱的泄漏曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Leakage curve of palmatine hydrochloride and dehydrocorydaline ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

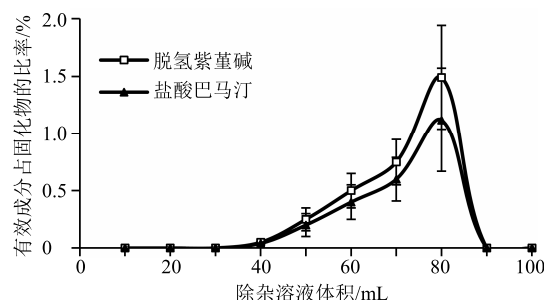
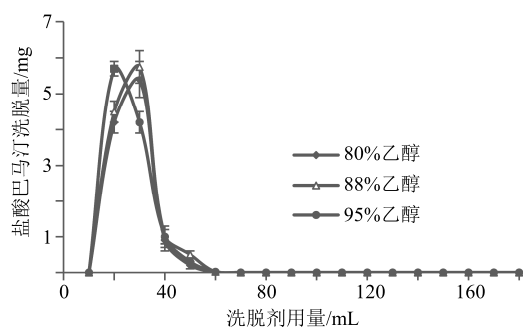
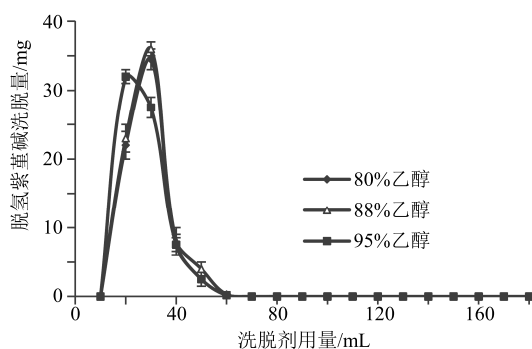
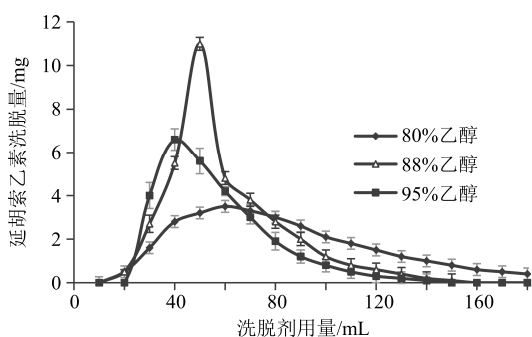
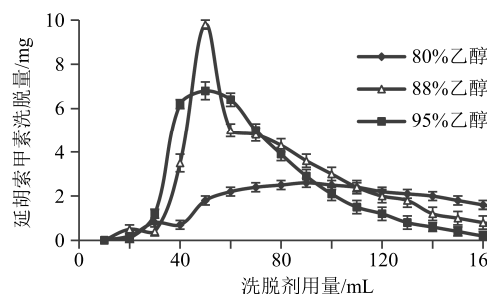


图 4 固化物中有效成分的损失率曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Loss rate curve of active component in solidified substance ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6.5 洗脱溶剂及用量考察 称取处理好的 D141 树脂 15 g (2 cm×10 cm) 湿法上柱,以 2 BV/h 上样 60 mL 生药 0.6 g/mL 的延胡索上样液,以 40 mL 超纯水作为除杂溶剂,分别用 80%、88%、95%乙醇作为洗脱溶剂,洗脱体积流量为 2 BV/h,各平行 3 份。收集各洗脱液,每 10 毫升收集 1 次,HPLC 法测定 4 种生物碱单体质量分数,绘制洗脱曲线。结果见图 5~8。结果显示,80%、88%、95%乙醇对于盐酸巴马汀和脱氢紫堇碱洗脱效果基本一致;80%乙醇对延胡索乙素与延胡索甲素洗脱效果均较差,88%乙醇及 95%乙醇对于延胡索乙素洗脱效果基本一致;95%乙醇在 170~180 mL (约 6 BV) 对于延胡索甲素基本洗脱完全。因此,最终选取 95%乙醇 180 mL (约 6 BV) 进行洗脱。

2.6.6 洗脱体积分量的考察 称取处理好的 D141 树脂 15 g (2 cm×10 cm) 湿法上柱,以 2 BV/h 上

图 5 盐酸巴马汀的洗脱曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Leakage curve of palmatine hydrochloride ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 6 脱氢紫堇碱的洗脱曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Leakage curve of dehydrocorydaline ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 7 延胡索乙素洗脱曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 7 Leakage curve of tetrahydropalmatine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 8 延胡索甲素洗脱曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 Leakage curve of corydaline ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样 60 mL (约 2 BV) 生药 0.6 g/mL 的延胡索上样液, 以 40 mL (约 1.3 BV) 超纯水作为除杂溶剂, 以 180 mL (约 6 BV) 95%乙醇作为洗脱溶剂, 洗脱体积流量分别为 2、3、4 BV/h, 各平行 3 份。收集各洗脱液, 测定 4 种生物碱单体及总碱的转移率及质量分数。结果显示, 洗脱体积流量越快, 延胡索总生物碱的转移率及质量分数越低, 当体积流量为 2 BV/h 时, 延胡索总生物碱的转移率及质量分数最高。延胡索总生物碱的转移率及质量分数分别为 91.26% 和 66.57%, 4 种单体生物碱的转移率及质量分数分别为 101.20、2.06% (盐酸巴马汀); 101.83%、12.54% (脱氢紫堇碱); 96.54%、5.28% (延胡索乙素); 90.76%、5.89% (延胡索甲素)。故洗脱体积流量宜选择 2 BV/h。

转移率 = 纯化产品中指标成分质量 / 上柱样品液中指标成分质量

2.6.7 纯化工艺的验证试验 称取处理好的 D141 树脂 15 g (2 cm × 10 cm, 径高比 1 : 5) 湿法上柱, 以 2 BV/h 上样 60 mL (约 2 BV), 以 1.3 BV 超纯水作为除杂溶剂, 以 6 BV 95%乙醇作为洗脱溶剂, 收集洗脱液, 真空干燥得干浸膏, 计算总生物碱及 4 种单体生物碱转移率、质量分数, 结果见表 7。

结果显示, 延胡索总生物碱及 4 种单体的转移率均能达到 85% 以上; 延胡索总生物碱质量分数能

表 7 验证试验结果 ($n = 3$)Table 7 Results of verification test ($n = 3$)

批次	纯化前质量分数/%					纯化后质量分数/%					转移率/%				
	总生物碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素	总生物碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素	总生物碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素
1	14.2	0.36	1.76	0.94	1.46	68.25	2.01	11.99	4.94	6.47	89.96	104.06	100.20	95.21	89.88
2						70.91	1.92	11.65	4.94	6.33	94.29	100.40	98.23	95.99	88.74
3						65.42	1.92	11.57	4.89	6.27	88.52	102.23	99.26	96.77	89.31
均值						68.19	1.95	11.74	4.93	6.36	90.93	101.31	99.23	95.99	89.31

达到 65% 以上。

2.6.8 放大试验 经过上样、除杂、洗脱确定的工艺参数,以 5、10 倍进行纯化放大试验。分别称取处理好的 D141 树脂 75、150 g 湿法上柱(径高比 1:5~1:7),以 2 BV/h 上样 2 BV 生药 0.6 g/mL 的上样液,以 1.3 BV 超纯水作为除杂溶剂,以 6 BV 95%

乙醇作为洗脱溶剂,收集洗脱液,真空干燥得干浸膏,计算总生物碱及 4 种单体生物碱转移率、质量分数,结果见表 8。结果显示,在纯化工艺放大 5、10 倍时,所得的延胡索总生物碱及 4 种单体生物碱的转移率均能达到 85% 以上;延胡索总生物碱质量分数能达到 65% 以上,工艺较为稳定。

表 8 放大试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Results of magnification test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

放大 倍数	转移率/%					质量分数/%				
	总碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素	总碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素
5	91.26±0.68	111.20±5.59	101.83±1.33	96.54±1.42	90.76±0.86	66.57±0.64	2.06±0.10	12.54±0.17	5.28±0.09	5.89±0.04
10	93.37±4.95	94.65±5.52	93.00±5.33	98.11±0.45	101.91±1.07	65.90±3.30	1.91±0.09	12.24±0.56	5.46±0.07	6.60±0.14

3 讨论

HPLC 法具有高效、高灵敏度、高准确度的优点,适用于盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱等延胡索中有效成分的含量测定;酸性染料比色法灵敏度较高,在测定小剂量或样品量较少时有优势,专属性较好,目前是一种测量总生物碱的较好的方法。本实验结合 HPLC 及酸性染料比色法,测定延胡索中 4 种有效单体及延胡索总生物碱的含量,为中药延胡索的定量分析和质量评价及含量测定提供了快速、准确、有效的分析方法。

在酸性染料比色法测定延胡索总生物碱的含量中,由于微量水分会使氯仿层发生浑浊,并因水而导致过量染料带有有机相,影响测定结果。因此采用无水硫酸钠吸收萃取液当中的水分,减少有效成分的损失。

在上样药液小批量制备中,常采用水浴锅或电热套对圆底烧瓶加热以进行回流提取,采用水浴锅对其进行加热时,由于水浴的水蒸汽蒸腾会遇到冷凝管发生冷凝,冷凝水会滞留在冷凝管与圆底烧瓶连接处,需定时清理,否则会导致平行 3 份提取的提取液相差较大。若用电热套对圆底烧瓶进行加热,则不存在这个问题,平行性相对较好。

本课题组前期通过静态试验预试验,考察了 XDA-8、NKA-9、D101、D141、HPD200A、AB-8 大孔吸附树脂以及 732、D152 型离子交换树脂的吸附及解吸效果,根据动态吸附实验结果结合新颖性发现,D141 型大孔树脂纯化效果较好。

在延胡索纯化过程中发现,刚加入洗脱溶剂时将流速调整为 2 BV/h,因除杂溶剂(纯水)还未流完,一段时间内色谱柱里同时存在除杂溶剂和洗脱

溶剂,这个时间段内体积流量会发生变化,若不对其进行校准,会使洗脱体积流量变慢,洗脱时间延长,且总生物碱和 4 种单体生物碱的质量分数下降。所以在延胡索纯化过程中,各个阶段的体积流量一定要控制好,需定期对体积流量进行校准,否则易使总生物碱和 4 种单体碱质量分数降低。

在浓缩干燥过程中,真空干燥及喷雾干燥得到的延胡索总生物碱干燥粉末,其延胡索乙素及延胡索甲素均有一定程度的降低,可确定延胡索乙素与延胡索甲素对干燥温度较敏感,在高温条件下不稳定,因此选择真空干燥进行干燥温度的研究。本实验通过对洗脱液及洗脱液经浓缩后、干燥前各生物碱质量分数进行考察,结果发现,延胡索乙素及甲素在浓缩过程中稳定性较好,而在干燥过程中可能发生了转化。通过对干燥温度和干燥时间进行了考察,最终确定浓缩温度为 60 °C,真空干燥温度为 60 °C,干燥 24 h。

该工艺经验证,总生物碱质量分数能达到 65% 以上,且延胡索总生物碱及 4 种生物碱单体的转移率均能达到 85% 以上,符合中药 5 类新药相关规定。该工艺稳定可靠,可较好的纯化延胡索总生物碱。

参考文献

- [1] 张铁军,许 浚,韩彦琪,等. 中药质量标志物(Q-maker)研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [2] 王桂彩,应森林. 重用延胡索(元首汤、二胡汤)从肝论治顽固性失眠 [J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(8): 57-58.
- [3] 赵丽沙,董 宇,寿 旦. 延胡索生物碱类化学成分及质量控制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 299-302.

- [4] 王磊, 王媛, 李爱主, 等. 基于靶细胞萃取的延胡索药效成分的筛选和含量测定 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 990-994.
- [5] 杜巍娟. 延胡索提取物在小鼠体内的药代动力学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [6] 李秋月. 延胡索生物碱谱-效关系及相互作用研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 中国医学科学院, 清华大学医学部, 2014.
- [7] 张晓峰, 张宏, 李小云, 等. 高速逆流色谱-UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分离制备延胡索中脱氢紫堇碱和海罂粟碱 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4351-4356.
- [8] 施婷婷, 王建新, 李希. 延胡索总生物碱类有效部位的研究进展 [J]. 中药与临床, 2015, 6(2): 110-113.
- [9] 郭倩, 田成旺, 任涛, 等. 中药药效物质基础研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(3): 648-654.
- [10] 汤如莹, 王玉杰, 李伟, 等. D101 型大孔吸附树脂分离纯化沙苑子总黄酮工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3342-3346.
- [11] 任慧梅, 盛萍. 大孔吸附树脂纯化富集伊贝母总生物碱的工艺研究 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(6): 695-699.
- [12] 李士杰, 肖连冬. 水提醇沉法提取苦瓜多糖条件研究 [J]. 中国酿造, 2016, 35(5): 166-170.
- [13] 刘丹, 吴叶红, 李玮桓, 等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [14] Zhu S, Bo T, Wang X, *et al.* Separation of succinic acid from aqueous solution by macroporous resin adsorption [J]. *J Chem Eng Data*, 2016, 61(2): 856-864.
- [15] Zhao Y, Chen Z, Liu D, *et al.* Separation of flavonoids in the leaves of *Sophora japonica* by macroporous adsorption resin mixed-bed technology [J]. *Pigm Resin Technol*, 2017, 46(3): 235-243.
- [16] Liu C, Liu R, Zhang P, *et al.* Separation of capsaicin from capsaicinoids by macroporous resin adsorption chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(23): 4141-4145.
- [17] 韩璐, 杨杰, 王丽莉, 等. 大孔吸附树脂纯化黄花草木犀的工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(7): 800-804.
- [18] 吕子明, 刘文娟, 于向红, 等. 大孔吸附树脂纯化延胡索总生物碱工艺研究 [J]. 中国医药导报, 2012, 20(9): 109-112.
- [19] 罗雪芹, 何道惠, 秦秀蓉, 等. 延胡索有效成分提取纯化的工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 23-25.
- [20] 徐丽琳, 熊雪丰, 何三民, 等. 元胡总生物碱的大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(6): 1358-1361.
- [21] 蒲忠慧, 王力, 高宇, 等. 大孔吸附树脂纯化富集川芎总生物碱的工艺 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(11): 85-91.
- [22] 季慧, 陈斌斌, 黄越燕. 大孔吸附树脂分离纯化生物碱类化合物研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(1): 72-75.