

大孔吸附树脂分离纯化延胡索总生物碱

周文威¹, 叶益萍² (1.宁波第二医院, 浙江 宁波 315010; 2.浙江省医学科学院药物所, 杭州 310013)

摘要: 目的 用大孔吸附树脂对延胡索总生物碱进行分离纯化研究。方法 以总生物碱的吸附量和解吸附率为考察指标, 选择纯化工艺。结果 D101 型大孔吸附树脂对延胡索生物碱具有较大吸附量。洗脱方法为先以纯水除去杂质, 再以 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸 50% 乙醇洗脱, 收集洗脱液。结论 用本法分离纯化延胡索总生物碱简单、可行。

关键词: 大孔吸附树脂; 延胡索; 生物碱

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)03-0268-04

Separation and Purification Processes of Total Alkaloids from *Corydalis Yanhusuo* with Macroporous Adsorption Resins

ZHOU Wenwei¹, YE Yiping² (1.Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, China; 2.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the optimal separation of the total alkaloids from *Corydalis yanhusuo* by selecting appropriate macroporous adsorption resins. **METHODS** To evaluate the separating efficiency by measuring the adsorption ratio, eluting ratio of the total alkaloids as indexes. **RESULTS** The D101 macroporous adsorption resins have the best adsorption capacity and the optimal separating efficiency with the following eluting method: the extract liquid was applied to resin column, then the resin was washed by water to remove impurity and the total alkaloids were desorbed by 0.2 mol·L⁻¹ hydrochloride 50% ethanol. **CONCLUSION** This method is simple, feasible and can be used for separation and purification of the total alkaloids from *Corydalis yanhusuo*.

KEY WORDS: macroporous adsorption resins; *Corydalis yanhusuo*; alkaloids

延胡索为罂粟科植物延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W.T. Wang) 的干燥根茎, 是镇痛、活血化淤的传统中药^[1]。生物碱是延胡索的主要成分, 包括叔胺碱和季铵碱, 具有镇痛和治疗心血管疾病的作用^[2-3]。近年来, 大孔吸附树脂在中药有

效成分的提取分离, 尤其是水溶性成分的分离中, 显示着越来越重要的作用。文献报道了应用大孔树脂分离纯化延胡索生物碱, 但一般采用延胡索乙素作为含量测定指标或以延胡索乙素测定总碱^[4-5]。本实验应用大孔吸附树脂法对延胡索中

作者简介: 周文威, 女, 副主任药师 Tel: (0574) 83870359 E-mail: y19710712@163.com

的总生物碱进行富集、纯化, 并采用盐酸脱氢延胡索碱测定总生物碱含量来考察分离纯化工艺, 对于优化工业化生产工艺具有一定的参考价值。

1 实验材料

1.1 仪器 TU-1800型紫外可见分光光度仪(北京普析通用仪器公司); 5 L 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); BP211D Sartorius 电子天平(德国)。

1.2 材料 D101, D201A, D401 大孔吸附树脂(天津农药股份有限公司树脂分公司, 批号: 0510016), HPD-600(河北沧州保恩化工有限公司, 批号: 0408013), HP-20 大孔吸附树脂(北京慧德易科技有限责任公司, 批号: 051109); 延胡索药材(杭州市中药饮片厂, 批号: 20061207); 盐酸脱氢延胡索碱对照品(浙江省药品检验所, 纯度: 98.6%, 批号: 20070318); 所用试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 含量测定

2.1.1 测定方法 采用酸性染料比色法测定, 即精密量取对照品溶液或样品溶液 1 mL, 置预先精密加入 10 mL 氯仿的分液漏斗中, 精密加入溴甲酚绿溶液 4 mL, 振摇提取 3 min, 静置 40 min 使分层, 分取氯仿层, 以醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)经同法操作的氯仿液为空白, 置紫外分光光度计比色皿中, 于 415 nm 波长处测定吸收度。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的盐酸脱氢延胡索碱对照品 2.56 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(每 1 mL 含盐酸脱氢延胡索碱 0.256 mg)。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mL, 置预先精密加入氯仿 10 mL 的分液漏斗中, 再分别补加 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 然后精密加入 4 mL 溴甲酚绿溶液, 振摇 3 min, 分别静置 40 min, 分取氯仿层, 按照紫外可见分光光度法(中国药典 2005 年版一部附录 VA)在 415 nm 波长处测定, 以吸光度(A)为纵坐标, 盐酸脱氢延胡索碱浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标作图, 得线性回归方程 $Y=0.0432X+0.0131$, 相关系数 $r=0.9994$, 说明对照品浓度在 2.56~17.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 与吸收度之间呈良好的线性关系。

2.2 工艺参数考察

2.2.1 大孔吸附树脂的预处理 称取大孔树脂 20 g, 湿法装柱。用 95%乙醇洗涤至流出液加等量水混合不混浊即可, 再用纯水(2~3 BV)洗涤。

2.2.2 样品溶液的制备 称取 500 g 延胡索, 加 5 倍量 80%乙醇回流提取 2 h, 提取 3 次, 过滤, 合并 3 次滤液, 回收乙醇后, 加水稀释至 1 000 mL(相当于原生药 0.5 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 备用。

2.2.3 大孔吸附树脂类型的筛选 不同吸附树脂比吸附量的测定: 分别称取预处理好的各种树脂 20 g, 装柱。另取不同吸附树脂各 20 g, 烘干, 称重, 得干树脂重。将制备好的样品溶液(相当于原生药 0.5 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入净化好的树脂柱内, 同时用大量纯化水洗, 边加边洗, 并随时用碘化铋钾及硅钨酸检测洗出物, 直到刚有生物碱阳性反应发生时停止上样。

2.2.4 洗脱溶剂的选择和洗脱曲线的绘制 最初的方法是延胡索提取液上 D101 大孔吸附树脂柱层析, 先用水洗脱, 再依次用 30%, 50%, 70%, 90%乙醇洗脱, 结果发现生物碱很难被较完全洗脱下来(总解吸附率仅为 65%)。生物碱用大孔吸附树脂纯化, 在酸性溶液中解吸附效果较好^[6], 因此考虑采用在乙醇-水体系中加入一定浓度的酸进行解吸附。

取延胡索提取液 40 mL(总生物碱的浓度 4.50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入到已经净化好的 D101 大孔吸附树脂柱中, 依次用水, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 10%乙醇, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 30%乙醇, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 70%乙醇, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇各 200 mL, 以 5 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱, 分别收集洗脱液每 50 mL 1 份, 减压浓缩, 残留物用醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)溶解并定容至 50 mL, 编号为 1~28 号。精密吸取 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)稀释至刻度, 摇匀, 以下操作按“2.1.1”项下测定洗脱液中总生物碱浓度, 绘制洗脱曲线, 并计算生物碱解吸附率。

根据上述试验结果, 取延胡索提取液 40 mL 3 份(总生物碱的浓度 4.50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)分别加入到已经净化好的 D101 大孔吸附树脂柱中, 依次用水, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇各 200 mL, 以 5 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱, 分别收集各洗脱液每部分 200 mL, 分别减压浓缩, 加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)溶解并稀释至 50 mL, 精密

吸取 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 加醋酸钠缓冲液(pH 4.5)稀释至刻度, 摇匀, 按照药材总生物碱含量测定方法按照“2.1.1”操作测定洗脱液中总生物碱浓度, 计算解吸率。

2.2.5 总生物碱保留率考察 精密吸取延胡索提取液 40 mL(总生物碱的浓度 $4.50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入到已经净化好的 D101 大孔吸附树脂柱中, 先以纯化水洗去水溶性杂质, 再用 200 mL $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收溶剂得纯化总生物碱, 平行 3 份。用酸性染料比色法测定纯化前、后样品固体物中生物碱含量, 另分别测定纯化前、后样品液总固体物量, 计算总固体物保留率和纯化后总生物碱保留率。

3 结果

3.1 大孔吸附树脂类型的筛选

将上柱样品体积折合成延胡索药材重, 即上柱吸附量, 根据上柱吸附量及干树脂重计算比吸附量, 见表 1。由表 1 结果可见, 以 D101 大孔吸附树脂比吸附量最大, 因此选择 D101 大孔吸附树脂对延胡索生物碱进行分离纯化。

表 1 5 种树脂对延胡索提取物吸附量、比吸附量的测定
Tab 1 Determination results of adsorption capacity of the extracts from *Corydalis yanhusuo* by five resins

树脂型号	上柱体积/ mL	上柱吸 附量/g	干树 脂重/g	比吸附量
D101	41	20.50	7.58	2.70
D201A	12	6.00	9.20	0.65
D401	36	18.00	8.09	2.22
HP-20	31	15.50	8.55	1.81
HPD-600	9	4.50	7.62	0.59

3.2 洗脱溶剂和洗脱曲线

采用酸性染料比色法测定洗脱液中总生物碱浓度, 以收集样品编号为横坐标和洗脱液中总生物碱量为纵坐标绘制洗脱曲线, 见图 1。其中 1~4 号系纯水洗脱液, 5~8 号系 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液洗脱液, 9~12 号系 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 10%乙醇溶液洗脱液, 13~16 号系 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 30%乙醇溶液洗脱液, 17~20 号系 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇溶液洗脱液, 21~24 号系 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 70%乙醇溶液洗脱液, 25~28 号系 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇溶液洗脱液。计算生物碱解吸率, 解吸率=洗脱液中总生物碱量/上柱液中总生物碱量 $\times 100\%$ 。从洗脱结果计算可知, 总生物碱的总解吸率为 96.33%, 其中 1~12 号样品不能解吸附, 13~16 号样品洗脱了 69.94%的总生物碱, 17~20 号样品洗

脱了 18.33%的总生物碱, 而 21~28 号样品只洗脱了 8.06%的总生物碱。可见总生物碱主要集中在 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 30%和 50%乙醇洗脱液中, 占全部洗脱液中总生物碱的 91.63%。

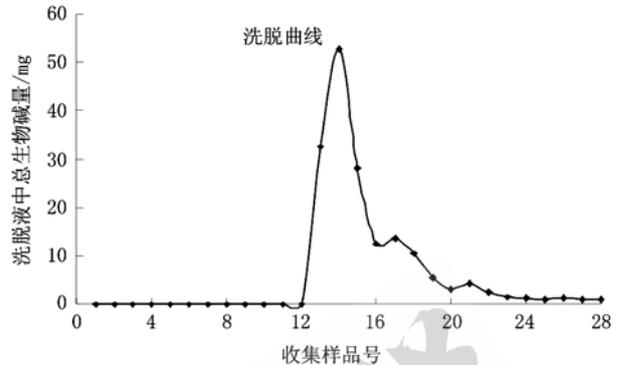


图 1 延胡索总生物碱大孔树脂吸附梯度洗脱曲线

Fig 1 Gradient eluting curve of total alkaloids from *corydalis yanhusuo* with macroporous adsorption resin

根据上述试验结果, 重复试验 3 份, 先用纯水洗脱, 再依次用 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇洗脱和 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇洗脱, 测定洗脱液中总生物碱浓度, 计算生物碱解吸率, 结果见表 2。由表 2 可见, 延胡索提取物上 D101 大孔吸附树脂, 先用水洗脱, 再用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇解吸附, 解吸率可分别达到 85.62%, 87.27%, 88.91%, 而 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇解吸附部分占总解吸量很少, 从节约生产成本考虑, 宜选 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇洗脱。

表 2 D101 大孔吸附树脂柱洗脱液中总生物碱量测定
Tab 2 Determination results of the total alkaloids in the eluted solution from D101 macroporous adsorption resin column

洗脱剂	吸光度	洗脱液中总生 物碱量/mg	解吸 率/%
水	—	—	—
$0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇	0.545 7	154.11	85.62
$0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇	0.067 8	15.83	8.79
水	—	—	—
$0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇	0.556 0	157.09	87.27
$0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇	0.063 2	14.50	8.06
水	—	—	—
$0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇	0.566 2	160.04	88.91
$0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 90%乙醇	0.061 1	13.89	7.72

3.3 总生物碱保留率考察

延胡索提取液上 D101 大孔吸附树脂柱, 先以纯化水洗去水溶性杂质, 再用 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50%乙醇洗脱, 用酸性染料比色法测定纯化前、后样品固体物中生物碱含量, 另分别测定纯化前、后

样品液总固体物量，计算总固体物保留率和纯化后总生物碱保留率，总固体保留率(%)=(纯化后洗脱液总固体物/纯化前样品液总固体物)×100%；总生物碱保留率=(纯化后固体物中总生物碱含量/纯化前固体物中总生物碱含量)×100%；结果见表3。

化前固体物中总生物碱含量)×100%；纯化前 40 mL 提取液总固体物为 2.853 g。经大孔吸附树脂柱处理后，延胡索总生物碱含量由 7.92%提高到 50.06%，总生物碱保留率达到 89.13%。结果见表 3。

表 3 大孔吸附树脂分离纯化延胡索总生物碱工艺参数

Tab 3 Separation and purification parameters of total alkaloids from *Corydalis yanhusuo* with macroporous adsorption resins

试验号	洗脱液总固体物/mg	总固体物保留率/%	纯化前固体物中总生物碱含量/%	纯化后固体物中总生物碱含量/%	总生物碱保留率/%
1	401.20	14.06	7.92	50.70	90.02
2	405.30	14.21	7.92	49.62	89.00
3	400.50	14.04	7.92	49.85	88.36
均值	402.33	14.10	7.92	50.06	89.13

4 讨论

通过对 5 种大孔吸附树脂的吸附和解吸附特性的比较，发现树脂的极性、比表面积和平均孔径的大小直接影响树脂吸附容量和解吸附率。洗脱剂的选择，首先考虑用水和不同浓度的乙醇，但乙醇对延胡索生物碱的解吸附作用不完全，可能与延胡索中既含脂溶性的叔胺碱，又含水溶性的季铵碱有关，所以在乙醇溶液中加入一定浓度的酸，具有较好的解吸附作用。本实验采用 D101 大孔吸附树脂对延胡索总生物碱进行纯化，先用水洗去杂质，然后用 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸 50% 乙醇解吸附，总固体物的量大约是纯化前总固体物的 14.10%，总生物碱保留率为 89.13%，经大孔吸附树脂分离纯化后固体物中总生物碱的含量达到 50.06%。

REFERENCES

- [1] Ch.P (2005) Vol I (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 94.
- [2] QIN Y Q, YANG Q Z. Study on effective constituents for the treatment of coronary artery disease from *Corydalis yanhusuo* [J]. Tianjin Med J (天津医药), 1978, (10):450-453.
- [3] JIANG X R, WU Q X, SHI H L, et al. Pharmacological actions of dehydrocorydaline on cardiovascular system [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1982, 17(1): 61-64.
- [4] LIU J H, WEI J F, WANG H Z, et al. Application to extraction and separation of the alkaloids from *Corydalis yanhusuo* with macroporous adsorption resin [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2002, 33(1): 37-38.
- [5] ZHANG L Z, ZHU Z, HAO X Y. Comparison on two methods of total alkaloids from *Corydalis yanhusuo* [J]. J Guiyang Med Coll (贵阳医学院学报), 2006, 31(3): 280-282.
- [6] GAO P, YANG G L. Application to separation and purification of natural products with macroporous adsorption resin [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2006, 18(2): 63-66.

收稿日期: 2009-04-07