

表3 正交设计及结果

实验号	A	B	C	延胡索乙 素提取量 (mg/g)	总碱 /%	浸膏率 /(%)
1	1	1	1	0.57	0.23	7.76
2	1	2	2	1.76	0.28	9.68
3	1	3	3	2.06	0.45	12.18
4	2	1	2	1.58	0.34	10.30
5	2	2	3	2.64	0.45	13.92
6	2	3	1	1.26	0.28	9.04
7	3	1	3	2.87	0.79	14.56
8	3	2	1	1.39	0.51	10.72
9	3	3	2	2.15	0.57	9.78
延胡索乙 素	K ₁	4.39	5.02	3.22		
	K ₂	5.48	5.79	5.49		
	K ₃	6.41	5.47	7.57		
	R	0.67	0.26	1.45		
总生物碱	K ₁	0.96	1.36	1.02		
	K ₂	1.07	1.24	1.19		
	K ₃	1.87	1.30	1.69		
	R	0.30	0.04	0.23		
醇浸膏	K ₁	29.62	32.62	27.52		
	K ₂	33.26	34.32	29.76		
	K ₃	35.06	31.00	40.66		
	R	1.81	1.11	4.38		

表4 延胡索乙素方差分析表

方差来源	SS	V	MS	F	P
A	0.6815	2	0.3408	5.44	
B	0.0998	2	0.0499	0.80	
C	3.1558	2	1.5779	25.17	<0.05
误差	0.1254	2	0.0627		

表5 总生物碱方差分析表

方差来源	SS	V	MS	F	P
A	0.1645	2	0.0823	102.75	<0.01
B	0.0024	2	0.0012	1.33	
C	0.0809	2	0.0405	50.63	<0.05
误差	0.0016	2	0.0008		

表6 醇浸膏方差分析表

方差来源	SS	V	MS	F	P
A	5.12	2	2.56	7.26	
B	1.84	2	0.92	2.61	
C	32.94	2	16.47	46.72	<0.05
误差	0.71	2	0.35		

表7 提取次数对提取结果的影响

提取次数	2	3
延胡索乙素提取量/(mg/g)	2.83	2.89
总生物碱/%	0.79	0.81

由上表可以看出3次提取虽比2次提取的活性成分多,但提高的量有限,已无增加提取次数的必要,故仍采用确定的条件提取。

3 讨论

3.1 本法采用高效液相法测定延胡索的有效成分延胡索乙素的含量,测定结果准确、可靠,专属性强。

3.2 延胡索、乌药的粉碎粒度为影响提取结果的主要因素,药材粒度越小,提取效果越好。但是如果继续减小粉碎粒度,则造成提取后药液的分离困难,因此粉碎粒度选用粗粉。

参考文献:

- [1] 中国药典一部[S]. 2005:90.
- [2] 赵翠仙,杨来秀,王晓东. 延胡索碱的药学研究概况[J]. 内蒙古科技与经济,2001,2:125.
- [3] 黄松,杜方麓. 罂粟科白屈菜族的化学成分及植物化学分类依据的研究进展[J]. 湖南中医药导报,2002;8(10):584.
- [4] 创桂新,王峰涛,徐璐珊,等. 乌药的化学成分及药理作用[J]. 中国野生植物资源,2006,18(3):5-9.
- [5] 房方,丁选胜. 延胡索药材中延胡索乙素的含量测定[J]. 现代中药研究与实践,2005,19(1):54-56.
- [6] 秦洛宜,刘运涛. 活血伸筋丸提取方法的研究[J]. 河南医药信息,2001,9(10):47.
- [7] 翟凌,任海霞,张文利. 益肤霜的制备工艺研究[J]. 山东中医杂志,2001,6(20):369-370.

X-5型大孔树脂纯化黄连巴布膏中黄连的工艺研究

杜茂波¹, 金日显, 李军红, 刘淑芝*
(中国中医科学院 中药研究所,北京 100700)

关键词:X-5; 大孔树脂; 黄连; 小檗碱; 巴马汀

收稿日期:2008-06-15

基金项目:十一五国家科技支撑计划(2006BA109B08-13)

作者简介:杜茂波(1985-),男,在读研究生,中药制剂专业

*通讯作者:刘淑芝,女,研究员,博士生导师。Tel:(010)84043227

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2009)01-0139-02

黄连巴布膏由黄连等3味药组成,其中黄连所占比例较大,几乎占全方的2/3。黄连所含生物碱具水溶性,因此采用大孔吸附树脂对全方水溶性部分进行精制,使有效成分高度富集,方便制剂。黄连为中医临床常用药物,味苦性寒,长于泻火解毒;文献对大孔树脂分离纯化小檗碱的有几篇报道^[1-3]为了探讨大孔树脂对生物碱类成分,分离纯化的可行性,我们选择盐酸巴马汀和盐酸小檗碱为指标进行考察,并为进一步的制剂学研究打下基础。

1 材料与仪器

黄连药材(购自亳州芳草堂饮片厂),AB-8、NKA-9和X-5型大孔吸附树脂(南开大学化工厂),HPD100 HPD400型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司);巴马汀标准品(中国药品生物制品检定所,批号0732-9604),小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号0713-9906);色谱仪Waters2487 Dual λ Absorbance Detector,紫外检测器,Waters 1515 Isocratic HPLC Pump,Waters 717 Plus Autosampler;色谱柱Kromasil C₁₈(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 含量测定

色谱条件:RainBow 5 μ Kromasil-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 4 μ m),流动相乙腈-0.1%磷酸二氢钾(28: 72 磷酸调 pH = 3),检测波长:345 nm,柱温:25 $^{\circ}$ C,流速:1 mL/min。

标准曲线的绘制 精密称取盐酸小檗碱对照品6.31 mg,盐酸巴马汀对照品3.44 mg,置于25 mL的棕色瓶中,用盐酸-甲醇(1:100)超声溶解,定容至25 mL,使巴马汀和对照品小檗碱的浓度分别为:0.137 6 mg/mL,0.252 4 mg/mL。分别精密量取巴马汀和小檗碱对照品溶液2,4,6,8,10,12 μ L进样,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得巴马汀的回归方程如 $Y = 4 \times 10^6 X - 23\ 105$, $r = 0.999\ 9$,线性范围:0.275 2 ~ 1.651 μ g;小檗碱的回归方程为: $Y = 4 \times 10^6 X + 4\ 000.5$, $r = 0.999\ 9$,线性范围:0.504 8 ~ 3.023 μ g。

样品测定:将洗脱液浓缩至干,精密称取干粉一定量,用50 mL 甲醇超声30 min使其充分溶解,放置过夜,补重,过微孔滤膜,取10 μ L供HPLC分析,测定样品中巴马汀和小檗碱的含量;吸附曲线和洗脱曲线为了便于操作,直接将洗脱液过微孔滤膜,取10 μ L,用HPLC法测定其中小檗碱和巴马汀的含量。

2.2 黄连提取液的制备

称取黄连药材740 g,用浓度为70%的乙醇提取3次,每次1.5 h;过滤,滤液回收乙醇浓缩至无醇味,约400 mL,将该药液用4倍量的水转溶,静置,离心,取上清液加水定容到2 000 mL,作为供试液(生药0.37 g/mL)。

2.3 大孔吸附树脂的预处理

大孔吸附树脂HPD100、HPD400、NKA-9、X-5型以95%乙醇浸泡树脂24 h,充分溶胀后,除去上浮树脂碎片和杂物,

用湿法装柱,继续用95%乙醇以适当流速通过树脂柱,洗至流出液与水(1: 5)混合不呈浑浊,再用水洗至无醇味,备用。树脂AB-8型用丙酮浸泡数天,装柱后用丙酮洗至流出液与水混合不产生混浊,改用大量水洗,95%乙醇浸泡备用,上柱前用蒸馏水洗至无醇味,备用。

2.4 树脂型号的筛选^[4]

分别取大孔树脂HPD100^[5],HPD400,AB-8^[6],NKA-9^[7],X-5^[8]各50 mL,置于干净的三角瓶中;分别加入供试液100 mL,使其充分吸附24 h,过滤,用50 mL水洗,再用过量95%的乙醇洗脱,弃去水洗液,将醇洗液水浴浓缩至干,真空干燥,测定小檗碱和巴马汀的含量,计算吸附量。结果见表1。

表1 几种大孔树脂对黄连生物碱的吸附量及吸附率

编号	名称	供试液浓度 /(mg/mL)*	上样量 /g*	吸附量 /g*	吸附率 /%
1	HPD100	27.4	2.739	1.326	48.4
2	HPD400	27.4	2.739	1.158	42.3
3	AB-8	27.4	2.739	1.384	50.5
4	NKA-9	27.4	2.739	0.965	35.2
5	X-5	27.4	2.739	1.423	52

*其中上样量和吸附量为小檗碱和巴马汀总生物碱的含量的总和,供试液的浓度为100 mL 供试液中含有小檗碱和巴马汀含量的总和与其体积之比。

从表1可见X-5型树脂无论从吸附率还是从吸附量来看都要优于其他几种型号的树脂,而且由于X-5型树脂为非极性的,对生物碱类成分分离效果较好,在中草药成分分离应用比较广泛,综合以上因素选择X-5型大孔树脂作为精制黄连生物碱的树脂。

2.4.1 径高比的考察

取3种不同粗细的柱子,加入50 mL已经处理好的X-5型大孔树脂,树脂按2.3项中的方法进行处理使其径高比分别为1:1,1:3,1:7,依次标为1,2,3。湿法上柱50 mL,以2.5 mL/min的流速,上样40 mL供试液,然后分别用50 mL水和80 mL 95%的乙醇洗脱,收集醇洗液,测定其中小檗碱和巴马汀的含量,结果如表2。

表2 不同径高比对黄连生物碱吸附的影响

编号	径高比	巴马汀含量/g	小檗碱含量/g	总碱含量/g
1	1:1	0.11	0.47	0.58
2	1:3	0.16	0.68	0.84
3	1:7	0.15	0.74	0.89

由表2可见径高比1:1时的吸附量和其他两个差别较大,2号和3号差别不大,综合考虑拟选用径高比为1:3作为黄连生物碱X-5型树脂精制的径高比。

2.4.2 泄漏曲线的绘制

向树脂柱中加入已经处理好的X-5型大孔树脂150 mL,取400 mL供试液上样,上样流速为2.5 mL/min,分段收集泄漏液,其中第一份收集50 mL,以后每10 mL收集一份,

收集液根据情况进行适当稀释,过微孔滤膜,测定其中小檗碱和巴马汀的浓度,根据总浓度绘制泄漏曲线,泄漏曲线见图1,从图1在中可以看到在15流份的时候泄漏液的浓度开始明显变大,所以确定最大上样量为150 mL过柱前药液,此时吸附的黄连生物碱吸附总量为3.15 g,每 mL 吸附 21 mg 黄连生物碱,此时树脂对该药液的吸附率为77%。

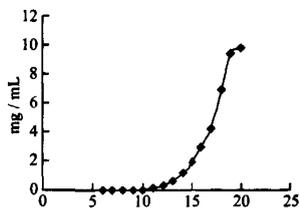


图1 X-5型大孔树脂精制黄连泄漏曲线

2.4.3 洗脱溶剂的考察

按上述确定的吸附条件,取上样液通过4根X-5型大孔树脂,进行动态吸附,按上述确定的树脂条件上样,然后分别用150 mL蒸馏水洗,再分别用60%,70%,80%,95%的乙醇洗脱,收集醇洗液,水浴蒸干,真空干燥,测定黄连总生物碱的含量,四根树脂柱的解析率分别为79%,74%,82%,81%;考虑95%的乙醇洗脱能力比较强,在实验过程中发现95%的乙醇洗脱较快,并且配制使用方便,综合以上因素选择浓度为95%的乙醇为洗脱溶剂,结果见表3。

表3 不同浓度的乙醇洗脱后黄连生物碱量及解析率

样品编号	乙醇浓度/%	黄连总生物碱量/g	解析率/%
1	60	2.49	79
2	70	2.36	74
3	80	2.58	82
4	95	2.54	81

2.4.4 洗脱流速的考察

根据上述确定的吸附及洗脱条件,取3根大孔树脂柱,分别湿法上柱150 mL X-5型大孔树脂,上样,用150 mL水洗,然后用3倍量的乙醇洗脱;3根树脂柱的流速分别为1.5 mL/min、2.5 mL/min、3.5 mL/min,收集醇洗液,水浴蒸干,真空干燥,称重,测定其中黄连总生物碱的含量(以小檗碱和巴马汀的和计),结果见表4,从表4可以看出流速为3.5 mL/min时,所得的洗脱液中黄连总生物碱的含量最高,因此选择该流速作为洗脱流速。

表4 洗脱流速对X-5型大孔树脂吸附的影响

编号	流速/(mL/min)	黄连生物碱总量/g
1	1.5	2.05
2	2.5	2.04
3	3.5	2.52

2.4.5 洗脱曲线的考察

按上述确定的吸附和洗脱条件,湿法上柱150 mL X-5型大孔树脂,上样,用150 mL水洗,然后用450 mL 95%的乙

醇洗脱,分段收集洗脱液,每份30 mL,共收集15份,根据收集流份的浓度适当进行稀释,测定其中小檗碱和巴马汀的含量;以小檗碱和巴马汀的浓度和份数绘制洗脱曲线,洗脱曲线见图2,根据图2可以看出在第10流份的时候其中小檗碱和巴马汀已基本洗脱完全,所以选择截止到该流份时的乙醇用量作为洗脱乙醇的体积,确定最佳乙醇用量为300 mL,即两倍树脂量。

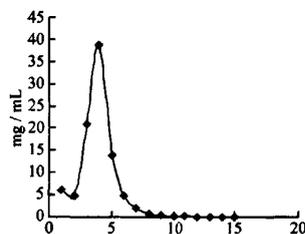


图2 黄连洗脱曲线

3 结论与讨论

3.1 X-5树脂纯化黄连巴布膏最佳工艺为上样液浓度含生药0.37 g/mL,最佳径高比为1:3,最大吸附量为每毫升X-5型大孔树脂吸附21 mg 黄连总生物碱,吸附77%,最佳洗脱溶剂为95%的乙醇,洗脱流速为3.5 mL/min,解析率在81%以上,最佳乙醇用量为两倍树脂量。

3.2 有文献报道^[9]药液浓度对指标成分的吸附影响较大,药液浓度越大吸附量越高;但药液浓度太大会阻塞并污染树脂柱,降低树脂寿命,不利于树脂的再生利用,故本实验选择浓度为0.37 g/mL药液作为供试液。

参考文献:

- [1] 侯世祥,朱浩,孙毅毅,等.影响大孔吸附树脂吸附纯化黄连提取液因素的初步考察[J].中国中药杂志,2000,25(11):666-668.
- [2] 刘映,李志忠.大孔树脂预分离后测定黄连及左金丸含量[J].中国药师,2001,4(2):113-114.
- [3] 魏英勤,房海燕,袁久荣.正交设计法优化黄连提取液大孔树脂洗脱条件[J].制剂技术,2003,12(6):46-47.
- [4] 曾元儿,王凤云,江滨,等.绵茵陈提取液的大孔树脂静态吸附工艺影响因素考察[J].中成药,2007,29(2):199-201.
- [5] 张亚军,徐莲英.HPD100大孔吸附树脂在白芍纯化工艺中的应用研究[J].中药材,2006,29(9):968-970.
- [6] 李冬梅,尹晓飞,蔡大伟.AB-8大孔树脂分离纯化淫羊藿中总黄酮的研究[J].中国药师,2006,9(12):1109-1111.
- [7] 李进飞,黄可龙,李春华.NKA-9型树脂对绿原酸吸附分离性能的研究[J].华西药学杂志,2004,19(1):1-4.
- [8] 李文兰,王艳萍,季宇彬,等.X-5大孔树脂纯化新乌头碱和乌头总碱[J].中国中药杂志,2007,32(5):396-400.
- [9] 李文兰,王艳萍,季宇彬.应用AB-8大孔树脂纯化新乌头碱和乌头总碱[J].中国天然药物,2006,4(5):355-358.

X-5型大孔树脂纯化黄连巴布膏中黄连的工艺研究

作者: [杜茂波](#), [金日显](#), [李军红](#), [刘淑芝](#)
作者单位: [中国中医科学院, 中药研究所, 北京, 100700](#)
刊名: [中成药](#) 
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL PATENT MEDICINE](#)
年, 卷(期): 2009, 31(1)
被引用次数: 4次

参考文献(9条)

1. 侯世祥, [朱浩](#), [孙毅毅](#) [影响大孔吸附树脂吸附纯化黄连提取液因素的初步考察](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2000(11)
2. 刘映, [李志忠](#) [大孔树脂预分离后测定黄连及左金丸含量](#)[期刊论文]-[中国药师](#) 2001(02)
3. [魏英勤](#), [房海燕](#), [袁久荣](#) [正交设计法优化黄连提取液大孔树脂洗脱条件](#)[期刊论文]-[制冷技术](#) 2003(06)
4. [曾元儿](#), [王风云](#), [江滨](#) [绵茵陈提取液的大孔树脂静态吸附工艺影响因素考察](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2007(02)
5. [张亚军](#), [徐莲英](#) [HPD100大孔吸附树脂在白芍纯化工艺中的应用研究](#)[期刊论文]-[中药材](#) 2006(09)
6. [李冬梅](#), [尹晓飞](#), [蔡大伟](#) [AB-8大孔树脂分离纯化淫羊藿中总黄酮的研究](#)[期刊论文]-[中国药师](#) 2006(12)
7. [李进飞](#), [黄可龙](#), [李春华](#) [NKA-9型树脂对绿原酸吸附分离性能的研究](#)[期刊论文]-[华西药学杂志](#) 2004(01)
8. [李文兰](#), [王艳萍](#), [季宇彬](#) [X-5大孔树脂纯化新乌头碱和乌头总碱](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2007(05)
9. [李文兰](#), [王艳萍](#), [季宇彬](#) [应用AB-8大孔树脂纯化新乌头碱和乌头总碱](#)[期刊论文]-[中国天然药物](#) 2006(05)

引证文献(4条)

1. [朱鹏飞](#), [冯伟红](#), [刘淑芝](#) [三黄喷雾剂中黄芩、栀子提取物的大孔吸附树脂纯化工艺](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2010(17)
2. [肖谷清](#), [龙立平](#), [王姣亮](#), [陈莉](#) [大孔PNaA树脂对黄连素的吸附性能研究](#)[期刊论文]-[化学研究与应用](#) 2010(8)
3. [崔秀华](#), [崔淑芹](#), [张艳](#), [崔元勇](#), [张翠芳](#) [国内巴布剂的研究现状及展望](#)[期刊论文]-[德州学院学报](#) 2010(4)
4. [李莹](#), [李艳丹](#), [刘圆](#), [夏清](#) [大孔树脂富集纯化红毛五加中总苷类成分的工艺优选](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2012(19)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhongcy200901042.aspx