

砂生槐子总生物碱纯化工艺的优化

胡春晖, 杨涛, 李永平, 程时磊, 王树林, 张发斌*
(青海大学医学院, 青海 西宁 810001)

摘要: 目的 优化藏药砂生槐子总生物碱的纯化工艺。方法 盐酸和氨水调节总生物碱水溶液 pH 值后, HPLC 法测定总生物碱(氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱、苦参碱)含量, 考察 5 种大孔树脂(D101、HPD600、H103、NKA-9、LAS-5B)吸附和解吸附行为。结果 H103 大孔树脂静态吸附量最大, 最佳条件为上样 pH 值 10, 上样量 5 BV (体积流量 15 mL/h), 水洗用量 8 BV, 70% 乙醇洗脱用量 11 BV (体积流量 2 BV/h), 4 种生物碱平均洗脱率分别为 81.54%、88.37%、90.35%、94.28%, 平均含量分别为 0.15、0.08、0.09、0.15 mg/g, 比优化前分别提高了 1.87、20.41、9.72、7.65 倍。结论 H103 大孔树脂对砂生槐子总生物碱具有较强的吸附能力, 富集效果好。

关键词: 砂生槐子; 苦参碱; 氧化苦参碱; 槐果碱; 槐定碱; 纯化工艺; 大孔树脂

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2157-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.012

Optimization of the purification of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* seeds

HU Chun-hui, YANG Tao, LI Yong-ping, CHENG Shi-lei, WANG Shu-lin, ZHANG Fa-bin*
(Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the purification of total alkaloids from Tibetan medicine *Sophora moorcroftiana* seeds. **METHODS** After the pH value of aqueous extract of total alkaloids was adjusted with chloric acid and ammonia water, HPLC was applied to determining the contents of total alkaloids (matrine, oxymatrine, sophocarpine and sophoridine). The adsorption and desorption behaviors of five kinds of macroporous resins (D101, HPD600, H103, NKA-9, LAS-5B) were investigated. **RESULTS** H103 macroporous resin showed the largest static adsorption capacity. The optimal conditions were determined to be 10 for pH value, 5 BV for sample volume at a flow rate of 15 mL/h, 8 BV for water consumption, and 11 BV for elution volume of 70% ethanol at a flow rate of 2 BV/h. The average elution rates of four alkaloids were 81.54%, 88.37%, 90.35% and 94.28%, whose average contents were 0.15 mg/g, 0.08 mg/g, 0.09 mg/g and 0.15 mg/g (1.87, 20.41, 9.72 and 7.65 times of those before the optimization), respectively. **CONCLUSION** H103 macroporous resin holds strong adsorption ability for total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* seeds, therefore can bring forth a good enrichment effect for it. **KEY WORDS:** *Sophora moorcroftiana* seeds; matrine; oxymatrine; sophocarpine; sophoridine; purification; macroporous resins

包虫病是人兽共患寄生虫病, 已成为世界性公共卫生问题^[1], 在我国青海、新疆等地为高发区, 有上百万以上患者, 已成为当地牧民“因病致贫、

因病返贫”的重要原因之一。目前世界卫生组织(WHO)推荐使用以苯并咪唑类为主的化疗药物(如阿苯达唑^[2])进行治疗, 但这类药物不溶于水

收稿日期: 2015-12-08

基金项目: 青海大学医学院中青年团队项目(2013-KT-1); 青海省科技厅项目(2014-ZJ-716)

作者简介: 胡春晖, 男, 讲师, 研究方向为中药新剂型。Tel: (0971) 5312252, E-mail: chunhuihu@hotmail.com

* 通信作者: 张发斌, 男, 教授, 研究方向为地方病防治(鼠疫、包虫病方向)。Tel: (0971) 6128585, E-mail: 874931073@qq.com

及多数有机溶剂，口服后胃肠道吸收相对较差，病灶囊内药物浓度仅占血液浓度1%~10%，而且容易使棘球绦虫产生耐药性，长期服用会引起脱发、中毒性肝炎、骨髓抑制等不良反应，降低患者的顺应性^[34]。

砂生槐 *Sophora moocroftiana* 又名刺柴、西藏狼牙刺，为豆科槐属多年生矮灌木植物，分布于西藏地区，具有极强的抗旱特性^[5]，其多以种子入药，味苦性凉，可消炎、解毒、催吐。现代药理研究表明^[6]，砂生槐子总生物碱在杀死棘球绦虫、调节免疫力、抗炎、抗过敏等方面具有显著效果，特别是利用中藏药多组分、多靶点的特性作用于棘球绦虫，发挥多重功效，从多个角度“攻击”寄生虫，达到杀虫的目的。前期已建立 HPLC 法定量检测氧化苦参碱的含有量，并定性鉴定槐定碱、苦参碱、氧化槐果碱以评价砂生槐子总生物碱的质量^[7]，而本研究旨在采用大孔树脂对其进行纯化，为下一步制剂学研究打下基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱系统，包括自动进样器、在线脱气机、四元梯度泵、柱温箱和紫外检测器；LG-02 高速中药粉碎机（瑞安市百信药机器械厂）；XS205 电子分析天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；SHZ-D 循环水式真空泵（河南巩义市予华仪器厂）。

1.2 试药 氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱、苦参碱对照品（南京奥多福尼生物科技有限公司，批号 519-02-8、16837-52-8、145572-44-7、641-39-4）。磷酸氢二钠、磷酸二氢钠（分析纯，天津市永大化学试剂有限公司，批号 YD20140303、YD20140117）；大孔树脂（D101、HPD600、H103、NKA-9、LAS-5B，西安蓝晓科技有限公司）。甲醇为色谱纯；乙醇为工业纯；水为娃哈哈矿泉水；其他试剂均为分析纯。砂生槐子购自西藏林芝地区，经青海大学医学院杨仕斌副教授鉴定为豆科槐属植物砂生槐 *Sophora moocroftiana* 的干燥种子。砂生槐子总生物碱水提取液制备方法为将砂生槐子粉碎后过 3 号筛，置于锥形瓶中，加入用氨水调至 pH10 的 90% 乙醇中，超声（205 W、50 kHz）提取 1 h，减压回收溶剂，得总生物碱浸膏，加入一定体积水溶液，超声以使其均匀分散为淡黄色混悬液，即得。

2 方法与结果

2.1 含有量测定 采用本课题组前期建立的 HPLC 法^[8]进行测定。分析采用 Diamonsil C₁₈₍₂₎ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，3 μm）；流动相 0.02 mol/L 磷酸缓冲盐（pH = 8）：甲醇（55 : 45）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 220 nm；柱温 35 ℃。结果，氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱、苦参碱分别在 0.46~59.00、0.40~51.60、0.55~70.00、0.59~75.00 μg/mL 范围内线性关系良好，相关系数分别为 0.999 9、0.999 9、0.999 9、0.999 8，加样回收率分别为 99.98%、100.30%、99.69%、100.20%，4 种生物碱的含有量分别为 59.37、0.99、0.26、15.36 μg/g。

2.2 砂生槐总生物碱的纯化工艺^[9-13]

2.2.1 树脂的预处理 用 0.5 倍于树脂体积的丙酮或甲醇浸泡 24 h。2 BV 丙酮或甲醇以 2 BV/h 体积流量通过树脂层，并浸泡 8~10 h，再以 2 BV/h 体积流量通过树脂层至流出液加水后不浑浊，用水洗净丙酮或甲醇。2BV 5% 盐酸溶液以 4~6 BV/h 体积流量通过树脂层，并浸泡 2~4 h，再用水以同样体积流量洗涤至出水 pH 呈中性。树脂连续运行时不必进行预处理，停运前要充分解吸，以水洗净，并用 10% NaCl 浸泡，以免细菌在树脂中繁殖。

2.2.2 大孔树脂型号的筛选

2.2.2.1 静态吸附量的测定 取已处理好的大孔树脂（D101、HPD600、H103、NKA-9、LAS-5B）装柱，加入砂生槐子总生物碱水溶液（氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱、苦参碱的含有量分别为 80.10、3.92、9.26、19.60 μg/g，下同），25 ℃ 下振荡水浴 24 h，测定吸附平衡后药液中生物碱的含有量，计算静态吸附量 A ，公式为 $A = (C_0 - C_t) V / m$ （ C_0 为总生物碱初始质量浓度， C_t 为总生物碱 t 时刻质量浓度， V 为药液体积， m 为大孔树脂质量）。结果见表 1。

表 1 静态吸附量（不同大孔树脂， $n=3$ ）

Tab. 1 Static adsorption capacities of different macroporous resins ($n=3$)

成分	静态吸附量/(mg·g ⁻¹)				
	D101	HPD600	H103	NKA-9	LAS-5B
氧化苦参碱	16.74	18.89	24.19	15.29	13.09
槐果碱	0.37	0.42	0.41	0.35	0.30
槐定碱	0.08	0.07	0.07	0.04	0.09
苦参碱	6.53	6.38	6.93	4.93	5.13
总和	23.72	25.76	31.60	20.61	18.61

2.2.2.2 静态吸附动力学 取已处理好的大孔树

脂装柱,加入砂生槐子总生物碱水溶液,25℃下振荡水浴24h,在规定时间点取样,测定生物碱的含有量,计算静态吸附量A。以吸附时间(t)为横坐标,静态吸附量(A)为纵坐标绘制静态吸附曲线。结果见图1。

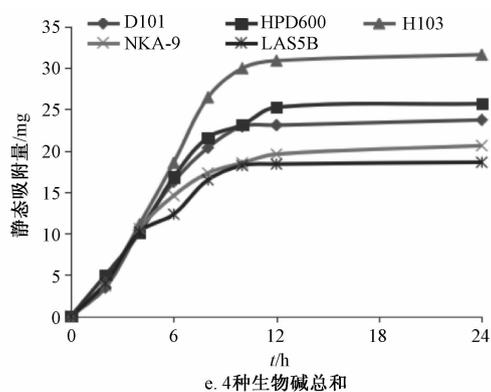


图1 静态吸附曲线

Fig. 1 Static adsorption curves

由图可知, H103型大孔树脂对氧化苦参碱、槐果碱、苦参碱的静态吸附量较大,而且对4种生物碱静态吸附量的总和远大于其他4种,故其可作为富集砂生槐子总生物碱的树脂。

2.2.3 上样液pH值 取已处理好的H103型大孔树脂,加入不同pH的砂生槐子总生物碱水溶液(分别用盐酸和氨水调至所需pH值),25℃下振荡水浴24h,测定药液中生物碱的含有量,计算H103型大孔树脂对其静态吸附量,结果见表2。

表2 静态吸附量(不同pH值, n=3)

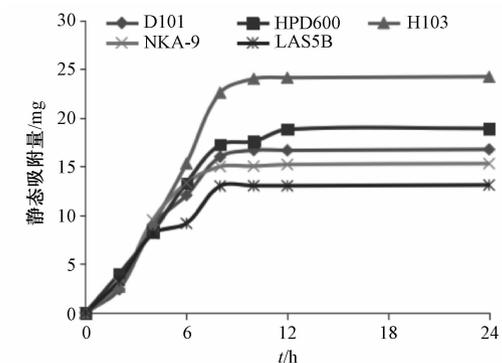
Tab. 2 Static adsorption capacities at different pH values (n=3)

成分	静态吸附量/(mg·g ⁻¹)					
	3.0	5.0	7.0	9.0	10.0	11.0
氧化苦参碱	4.45	10.39	16.33	19.30	22.26	18.23
槐果碱	0.07	0.17	0.27	0.32	0.37	0.22
槐定碱	0.02	0.05	0.07	0.08	0.10	0.07
苦参碱	1.15	2.69	4.22	4.99	5.76	4.23
总和	5.69	13.30	20.89	24.69	28.49	19.23

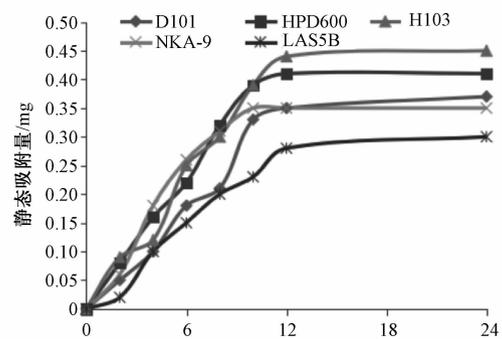
由表可知,随着pH值升高,H103型大孔树脂对总生物碱的吸附量增加,但当pH大于10.0时反而降低,可能是由于pH值过高导致生物碱溶解度的下降。因此,选择pH 10.0作为最佳上样液pH值。

2.2.4 泄露曲线 取已处理好的H103型大孔树脂装柱,加入pH 10.0的砂生槐子总生物碱水溶液,以15 mL/h体积流量进行动态吸附,收集过柱液,测定生物碱含有量,结果见图2。由图可知,上样液体积为4 BV时,氧化苦参碱和槐定碱达到饱和,而苦参碱和槐果碱在5 BV时达到饱和,故确定最佳上样量为5 BV。

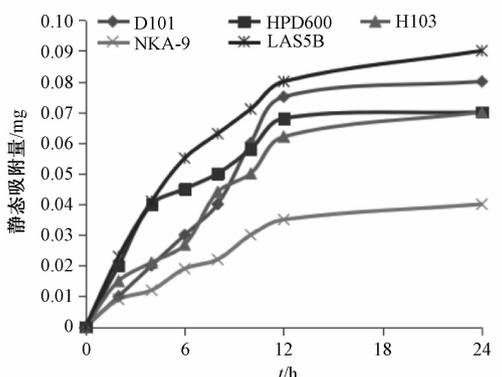
2.2.5 水洗用量 取已处理好的H103型大孔树脂



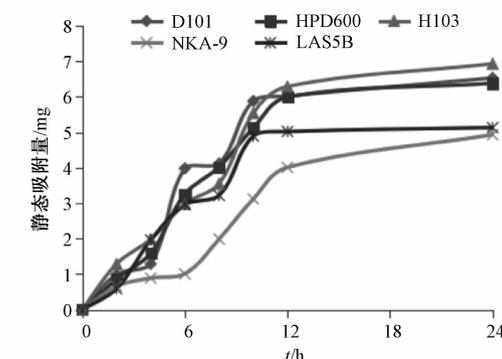
a.氧化苦参碱



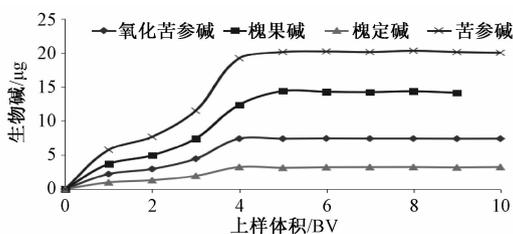
b.槐果碱



c.槐定碱



d.苦参碱



注：图中氧化苦参碱含有量为原含有量的 1/100，苦参碱含有量为原含有量的 1/10

图2 泄露曲线

Fig. 2 Leakage curves

脂装柱，加入 pH 10.0 的砂生槐子总生物碱水溶液，以 15 mL/h 体积流量和 5 BV 上样量进行吸附。待充分吸附后，先以去离子水洗脱，再用 20 BV 70% 乙醇洗脱，收集洗脱液，浓缩，干燥，称定质量，测定出膏量。同时，对生物碱含有量进行检测，计算损失率，结果见表 3。

表3 水洗用量 (n=3)

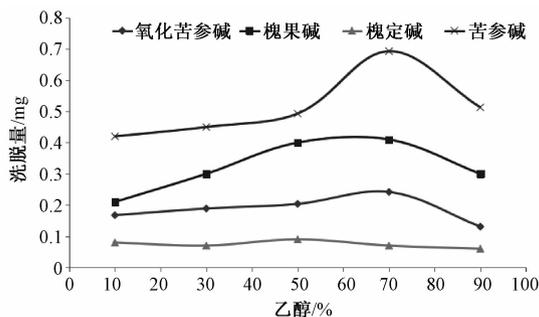
Tab. 3 Water consumption (n=3)

指标	成分	水洗用量/BV			
		2	4	8	12
损失率/%	氧化苦参碱	0.66	0.87	1.36	2.59
	槐果碱	0	0.55	0.78	1.11
	槐定碱	0.12	0.52	0.89	1.02
	苦参碱	0.68	1.23	2.55	3.26
出膏量/mg	—	158.21	125.98	102.11	68.23
生物碱/%	氧化苦参碱	6.16	8.21	10.26	9.23
	槐果碱	3.77	5.03	6.29	5.66
	槐定碱	4.96	6.61	8.26	7.43
	苦参碱	7.93	10.58	13.22	11.9

由表可知，采用去离子水冲洗时，生物碱也有一定程度的损失，水洗次数越多，生物碱损失量越大，但水洗可以提高其纯度。当用水量从 2 BV 增加到 12 BV 时，4 种生物碱的损失率呈上升趋势，而其含有量在 8 BV 时达到最大。因此，最终定洗脱用水量为 8 BV。

2.2.6 梯度洗脱曲线的绘制 取已处理好的 H103 型大孔树脂装柱，加入 pH 10.0 的砂生槐子总生物碱水溶液，以 15 mL/h 体积流量和 5 BV 上样量进行吸附。待充分吸附后，用 8 BV 去离子水冲洗，再用 4 BV 乙醇（10%、30%、50%、70%、90%）进行洗脱，收集洗脱液，检测 4 种生物碱的质量浓度，计算洗脱量 M ，计算公式为 $M = \rho V$ （ ρ 为洗脱液中生物碱的质量浓度， V 为洗脱液用量）。以乙醇体积分数为横坐标，洗脱量为纵坐标绘制洗脱曲线（图 3），发现除槐定碱外其他 3 种

生物碱 70% 乙醇的洗脱量最大，故选择 70% 乙醇作为洗脱剂。



注：图中氧化苦参碱含有量为原含有量的 1/100，苦参碱含有量为原含有量的 1/10

图3 不同体积分数乙醇下的洗脱曲线

Fig. 3 Elution curves at different concentrations of ethanol

2.2.7 乙醇洗脱用量和洗脱终点 取已处理好的 H103 型大孔树脂装柱，加入 pH 10.0 的砂生槐子总生物碱水溶液，以 15 mL/h 体积流量和 5 BV 上样量进行吸附。待充分吸附后，用 8 BV 去离子水冲洗，70% 乙醇溶液动态解吸，1.0、2.0、3.0 BV/h 体积流量洗脱，每 1 BV 收集 1 份，测定 4 种生物碱含有量，计算累计洗脱率 A ，公式为 $A = Z/N \times 100\%$ （ A 为累计洗脱率， Z 为生物碱洗脱量总和， N 为生物碱总含有量）。以解析液体积为横坐标，生物碱质量浓度为纵坐标绘制动态洗脱曲线（图 4），当洗脱量占上样总量的 85% 以上时，定为洗脱终点结果（图 5）。

由图可知，4 种生物碱在 2.0 BV/h 体积流量下洗脱效果最好，而且当洗脱用量为 11 BV 时，洗脱量占上样总量的 80% 以上。

综上所述，最佳工艺条件为以 H103 大孔树脂进行吸附，加入 pH 10.0 的砂生槐总生物碱提取液，以 15 mL/h 体积流量和 5 BV 上样量进行吸附。待充分吸附后，用 8 BV 去离子水除杂质，70% 乙醇溶液进行解吸附，体积流量为 2.0 BV/h，洗脱终点为 11 BV。

2.3 验证试验 结果见表 4。

3 讨论

本研究以氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱和苦参碱为考察指标，优选砂生槐子总生物碱的最佳纯化工艺。结果表明，4 种生物碱的含有量分别为 0.15、0.08、0.09、0.15 mg/g，比优化前分别提高了 1.87、20.41、9.72、7.65 倍，表明 H103 型大孔树脂纯化砂生槐子总生物碱是一种可行的、值

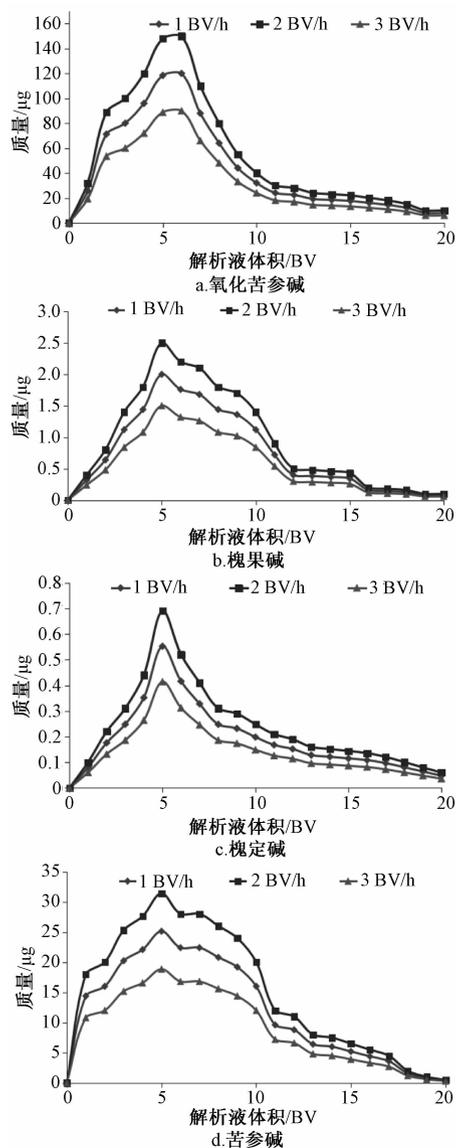


图4 不同体积流量下的洗脱曲线

Fig. 4 Elution curves at different volume flow rates

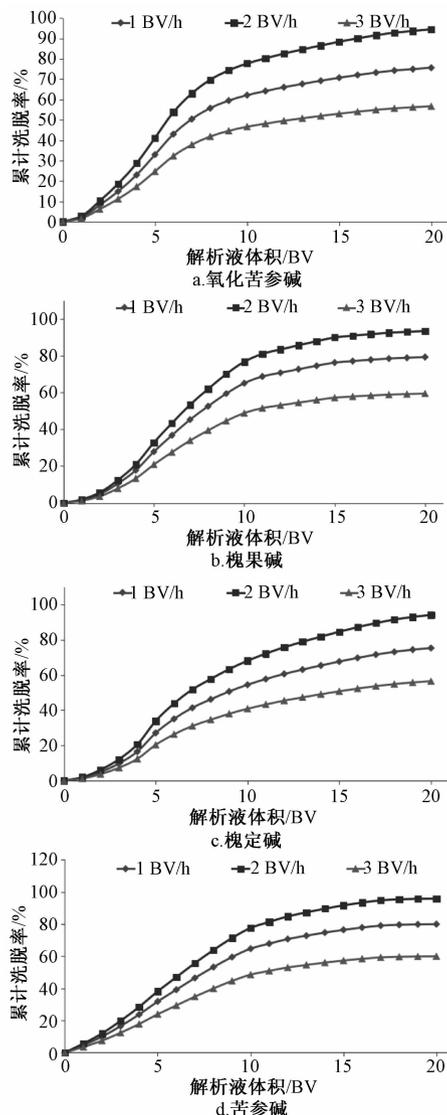


图5 不同体积流量下的累积洗脱率

Fig. 5 Accumulation desorption rates at different volume flow rates

表4 验证试验结果 (n=3)

Tab. 4 Results of verification tests (n=3)

成分	吸附量/mg	吸附率/%	洗脱率/%	出膏量/mg	相对含量/%	含量/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
氧化苦参碱	55.32	93.18	78.24	761.96	14.47	0.14	
	58.23	98.08	82.36	802.06	15.23	0.15	3.62
	59.39	100.04	84.01	818.10	15.53	0.16	
槐果碱	0.94	95.00	84.80	761.96	7.85	0.08	
	0.99	100.00	89.26	802.06	8.26	0.08	3.65
	1.01	102.00	91.05	818.10	8.43	0.08	
槐定碱	0.24	91.34	86.70	761.96	8.65	0.09	
	0.25	96.15	91.26	802.06	9.11	0.09	3.66
	0.26	98.07	93.09	818.10	9.29	0.09	
苦参碱	14.56	94.81	90.47	761.96	14.55	0.15	
	15.33	99.80	95.23	802.06	15.32	0.15	3.67
	15.64	101.80	97.13	818.10	15.63	0.16	

得推广的纯化技术。

大孔树脂的性质参数,特别是极性对生物碱的吸附和解吸有直接影响。5种大孔树脂中,D101、H103为非极性大孔树脂,NKA-9、LAS-5B、HPD600为极性大孔树脂,由于砂生槐子总生物碱是在弱碱性条件下提取,即总生物碱以分子型存在,根据相似相溶原理,在吸附时会选择非极性大孔树脂。静态吸附试验表明,H103型大孔树脂对总生物碱具有较好的吸附能力,富集效果好。

上样药液的pH值对化合物的吸附效果至关重要,根据生物碱特性,其在碱性条件下为分子型,极性较小,可吸附在非极性大孔树脂上。实验显示,当pH值大于10时,吸附率反而下降,这可能是与生物碱的稳定性及在较高pH下树脂的稳定性有关,故选择pH 10作为上样液的最佳pH值。同理,洗脱液的极性对其洗脱率至关重要,理论上乙醇体积分数越大,其溶液的极性就越小,实验发现70%乙醇洗脱总生物碱的效果最好,而90%乙醇会导致总生物碱含有量下降,具体原因还需作进一步研究。

参考文献:

[1] Valour F, Khenifer S, Della-Schiava N, *et al.* Unusual growth rate during cystic echinococcosis[J]. *Parasitol Int*, 2014, 63(2): 275-277.
[2] 鲍佳春,袁凤来,陆伟国.包虫病治疗进展[J].中国血吸虫病防治杂志,2010,22(2):197-199.
[3] Samuel F, Degarege A, Erko B. Efficacy and side effects of albendazole currently in use against *Ascaris*, *Trichuris* and hook-

worm among school children in Wondo Genet, southern Ethiopia [J]. *Parasitol Int*, 2013, 63(2): 375-385.
[4] Eckardt K, Kaltenhäuser J, Kilb C, *et al.* Relative potency of albendazole and its sulfoxide metabolite in two *in vitro* tests for developmental toxicity: the rat whole embryo culture and the mouse embryonic stem cell test[J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 34(3): 378-384.
[5] 王文娟,贺达汉,刘军和.西藏砂生槐研究现状及其利用价值评价[J].安徽农业科学,2008,36(33):14513-14515.
[6] 马兴铭,李红玉,尹少甫,等.砂生槐子生物碱杀灭原头蚴及抗炎作用[J].中国寄生虫病防治杂志,2004,17(4):217-219.
[7] 周军辉,王答祺,李思锋.4种豆科植物种子中氧化苦参碱的含量分析和其他3种生物碱的定性分析比较[J].西北药学杂志,2012,27(1):11-13.
[8] 胡春晖,张发斌,丁李,等.高效液相色谱法测定藏药砂生槐子中4种生物碱含量[J].药物分析杂志,2015,35(3):56-60.
[9] 胡春晖,邱祥建,尹月森.基于正交试验设计的猫爪草中小毛茛内酯提取工艺的优化[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):24-26.
[10] 李晓静,李岩,程雪梅,等.大孔树脂分离纯化秋水仙总生物碱的研究[J].中成药,2013,35(8):1667-1671.
[11] 孙宗喜,徐桂花,李艳芳,等.大孔树脂纯化绵茵陈中总有机酸和绿原酸的研究[J].中药材,2012,35(2):306-310.
[12] 李成帅,杜爱玲,李霞,等.H103大孔吸附树脂分离纯化苦参碱和氧化苦参碱[J].精细化工,2013,30(3):293-298.
[13] 李岩,赵欣,李晓静,等.大孔树脂分离纯化天仙子总生物碱研究[J].中成药,2015,37(1):89-94.