白屈菜总生物碱的提取纯化工艺优化及其体外抗肿瘤活性

孙 琳[1]，李天娇[1,2,3]，杨欣欣[1,2,3]，包永睿[1,2,3]*，王 帅[1,2,3]*，孟宪生[1,2,3]

（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁大连 116600；2. 辽宁省中药多维分析专业技术创新中心，辽宁大连 116600；
3. 辽宁省现代中药研究工程实验室，辽宁大连 116600）

摘要：采用均匀设计法，以总生物碱含量为评价指标，通过优化料液比、乙醇体积分数等条件，获得白屈菜总生物碱的优化提取工艺。采用大孔吸附树脂法，进一步优化径高比、上样液质量浓度、洗脱液用量等参数，获得其纯化工艺。结果显示，白屈菜总生物碱的优化提取工艺为：料液比 1 ∶ 30，以 95％乙醇提取 3 次，每次 1.7 h；纯化工艺为：采用 X-5 型大孔吸附树脂，上样液质量浓度 0.20 g/mL，径高比 1 ∶ 11，上样液 pH 7，上样流速 1 BV/h，用 6 BV 水除杂，用 10 BV 的 95％乙醇以 2 BV/h 的流速洗脱。经纯化后，白屈菜总生物碱含量为 95.10％，收率为 2.75％。Pearson 相关性分析结果显示，白屈菜总生物碱含量与其对结肠癌细胞的抑制率呈显著正相关，即总生物碱含量与细胞抑制率呈现良好的量效关系。该研究所得的提取和纯化工艺稳定、可行，可为抗结肠癌药物的研发提供帮助。

中图分类号：R284.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2025)07-0929-08

关键词：白屈菜；总生物碱；结肠癌；提取；纯化；抗肿瘤活性

引用：孙 琳，李天娇，杨欣欣，等．白屈菜总生物碱的提取纯化工艺优化及其体外抗肿瘤活性［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(7)：929-936．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.07.012

Optimization of Extraction and Purification Process of Total Alkaloids from *Chelidonium* and *in vitro* Antitumor Activity

SUN Lin[1], LI Tianjiao[1,2,3], YANG Xinxin[1,2,3], BAO Yongrui[1,2,3]*, WANG Shuai[1,2,3]*, MENG Xiansheng[1,2,3]

(*1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600; 2. Professional Innovation Technology Center for Multidimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600; 3. Liaoning Province Modern Chinese Medicine Research Engineering Lab., Dalian 116600*)

ABSTRACT: The solid-liquid ratio and ethanol volume fraction for extraction of total alkaloids from *Chelidonium* were optimized by uniform design method with total alkaloid content as evaluation index. The purification process was further established via macroporous adsorption resin method by adjusting the diameter-to-height ratio, sample concentration, and eluent volume. The optimal extraction process parameters of total alkaloids from *Chelidonium* were as follows: solid-liquid ratio of 1 ∶ 30, 95％ ethanol, 3 cycles (1.7 h each). The optimal purification process was as follows: using X-5 macroporous adsorption resin, mass concentration of sample liquid of 0.20 g/mL, diameter-to-height ratio of 1 ∶ 11, sample liquid pH 7, sample flow rate of 1 BV/h, impurity removal with 6 BV of water, and elution with 10 BV of 95％ ethanol at 2 BV/h. The final purity and yield of total alkaloids were 95.10％ , and 2.75％ , respectively. Pearson correlation analysis revealed a significant positive correlation between alkaloid content and colon cancer cell inhibition rate. These results demonstrate a clear dose-effect relationship between alkaloid content and anti-tumor activity, indicating the feasibility of the extraction and purification process for developing anti-colon cancer drugs.

Key Words: *Celandine*; total alkaloid; colon cancer; extraction; purification; antitumor activity

罂粟科白屈菜属植物白屈菜（*Chelidonium majus* L.）首载于明代植物学典籍《救荒本草》，药用其干燥全草，主要化学成分为生物碱类，还含有黄酮类、皂苷类、挥发油类等成分[1]。白屈菜性凉、味苦，具有清热解毒、止咳、利尿、镇痛、抗菌、抗炎、利胆等多种功效，在治疗肿瘤、消化系统疾病、呼吸道疾病、抗肝纤维化等方面具有良好的研究价值；并且，其抗肿瘤效果在国外有一定的临床数据支持[2—3]。但作为具有潜力的抗肿瘤药物，目前未见有研究报道其药效部位在新药开发中的应用。

中药药效部位是中药新药研发的重要来源之一，高含量的药效部位具有物质基础明确、服用量小、质量易于控制等优势，能够克服中药制剂普遍存在的药效物质基础不清、质量控制体系不完善等问题。

现代药理学研究[4]表明，白屈菜中的生物碱类成分是发挥抗结肠癌作用的主要药效活性成分。文献[5]报道白屈菜经提取和纯化后总生物碱含量约为70%。本试验旨在优化白屈菜提取和纯化工艺条件，并考察了总生物碱含量与其对结肠癌细胞的抑制作用[6]，检验生物碱类成分是否为白屈菜治疗结肠癌的主要药效部位，为抗肿瘤新药的开发提供帮助。

1　仪器与试药

ME55 型电子天平（瑞士梅特勒－托利多仪器有限公司）；UV-1750 型岛津紫外 - 可见分光光度计［岛津仪器（苏州）有限公司］；Sunrise 型酶标仪（瑞士 Tecan 公司）。

白屈菜药材［大连康缘中药材有限公司，批号20230616，经辽宁中医药大学张建逵教授鉴定为罂粟科植物白屈菜（*Chelidonium majus* L.）的干燥根茎］；白屈菜碱（chelidonine）对照品（含量≥ 98 %，批号 WP23100913）、白屈菜红碱（chelerythrine）对照品（含量≥ 98 %，批号 WP23030808）均购自维克奇生物科技有限公司；NKA-9、HPD400、HPD100、AB-8、X-5、D101 型大孔吸附树脂和 D61、D001、D113、D152、732、D410 型阳离子交换树脂（沧州宝恩吸附材料科技有限公司）；Leibovitz's L-15 培养基（批号 MA0547）、细胞增殖及毒性检测试剂盒（CCK8，批号 MA0218-1）均购自大连美仑生物技术有限公司；DMSO（含量≥ 99.9 %，批号 D8371）、氯化钠（含量≥ 98 %，批号 S8210）均购自北京索莱宝科技有限公司；氨水（批号 10002108）、氢氧化钠（含量≥ 98%，批号 10019719）、盐酸（批号 10011018）均购自国药集团化学试剂有限公司；枸橼酸－枸橼酸钠缓冲液（pH 4.8，北京百奥莱博科技有限公司，批号 GL1721-RTV）；95%乙醇（天津市大茂化学试剂厂）。

人结肠癌细胞［SW620 细胞，赛百慷（上海）生物技术股份有限公司］。

2　方法与结果

2.1　白屈菜总生物碱的含量测定

2.1.1　白屈菜提取物的基础制备方法

精密称取白屈菜粉末（过 3 号筛，孔径 355 μm）约 5.0 g，加入 30 倍量 95 % 乙醇，回流提取 3 次，每次 2 h，合并提取液，回收乙醇至无醇味，冻干成粉，备用。

2.1.2　溶液配制

参考文献[5,7]中的对照品比较法，精密称取白屈菜碱对照品 1.2 mg 置 10 mL 量瓶中，用 95%乙醇溶解，定容，即得白屈菜碱对照品溶液。精密称取“**2.1.1**”项下的提取物 1.2 mg，置 10 mL 量瓶中，用 95%乙醇溶解并定容，即得供试品溶液。

2.1.3　测定方法

将对照品溶液和供试品溶液于紫外－可见分光光度计上扫描（200 ～ 800 nm）。结果表明，二者最大吸收波长均为 290 nm，故选择 290 nm 为测定波长。

2.1.4　标准曲线的绘制

精密称取白屈菜碱对照品适量，置 10 mL 量瓶中，用 95%乙醇溶解并定容，并用其稀释得质量浓度分别为 0.01、0.03、0.05、0.07、0.09、0.11 mg/mL 的白屈菜碱对照品溶液[7]。分别于 290 nm 处测定吸光度（*D*）值；以 *D* 为纵坐标、对照品质量浓度（*c*）为横坐标，线性回归，得标准曲线方程为 *D*=21.364*c* － 0.002 5（*r*=0.999 9），可见白屈菜碱在

收稿日期：2024-10-24

基金项目：辽宁省教育厅 2024 年度高等学校基本科研项目（LJ212410162064）

作者简介：孙　琳，女，硕士研究生，专业方向：药物分析。

通信作者：包永睿，男，博士，正高级试验师，从事中药化学物质组学及作用机制的整合研究。

E-mail：byr1026@163.com

王　帅，女，博士，高级试验师，从事中药化学物质组学及作用机制的整合研究。

E-mail：christina8673028@126.com

10 ～ 110 μg/mL 内线性关系良好。

2.1.5 精密度考察

精密称取“**2.1.1**”项下的提取物约 2 mg，置 25 mL 量瓶中，用 95%乙醇溶解并定容，连续测定 6 次。结果显示，6 次所得吸光度的 RSD 为 0.63%，表明精密度良好。

2.1.6 稳定性考察

取“**2.1.5**”项下的溶液，分别在室温放置 0、15、30、60、90、120 min 时取样测定吸光度。结果显示，6 个时间点所得吸光度的 RSD 为 1.53%，表明供试品溶液在 2 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性考察

精密称定“**2.1.1**”项下的提取物约 2 mg，共 6 份，按“**2.1.5**”项下方法制备，分别测定。结果显示，吸光度的 RSD 为 2.50%，表明该方法重复性良好。

2.2 体外药效学试验

2.2.1 细胞培养

按常规贴壁细胞培养法将 SW620 细胞接种于 Leibovitz's L-15 培养基中，在 37 ℃、无 CO_2、饱和湿度的条件下常规培养。隔日换液、传代，取对数生长期细胞进行后续试验。

2.2.2 含药培养基的配制

精密称取表 1 中 6 种不同提取条件下的白屈菜提取物，加至 Leibovitz's L-15 培养基中，再加入 0.5% DMSO 溶液作助溶剂，配制成白屈菜提取物质量浓度为 2 mg/mL 的含药培养基。

2.2.3 CCK8 法检测药效

取 SW620 细胞，以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 96 孔板中，培养 24 h；待细胞贴壁后，给药组分别加入相同质量浓度、不同提取条件所得的白屈菜提取物。给药 24 h 后，每孔加入 CCK-8 溶液 100 μL，于 37 ℃孵育 2 h，用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (OD) 值，照式①计算各组抑制率 (inhibition rate，I)。

$$I=100\% - (OD_{给药组} - OD_{调零组})/(OD_{空白组} - OD_{调零组})\times100\% \quad ①$$

2.3 白屈菜提取工艺的优选

2.3.1 均匀设计法优化提取工艺

采用 $U_6(6^4)$ 均匀设计表，选取料液比 (X_1)、乙醇体积分数 (X_2)、提取时间 (X_3)、提取次数 (X_4) 为考察因素，得出不同条件下白屈菜提取物中的生物碱含量 (Y_1)、出膏率，以及对 SW620 细胞的抑制率。结果如表 1 所示。

表 1 提取工艺参数的均匀设计方案及结果

Tab.1 Uniform Design Scheme and Results of Extraction Process Parameters

试验号	X_1	X_2/%	X_3/h	X_4/ 次	生物碱含量/ ($mg\cdot g^{-1}$)	出膏率/%	抑制率/%
1	1 ∶ 5	70	1.5	3	20.10	13.50	21.88
2	1 ∶ 25	95	0.5	1	22.85	12.45	41.40
3	1 ∶ 10	30	1.0	2	5.87	17.90	12.04
4	1 ∶ 20	0	2.5	2	6.90	29.80	18.04
5	1 ∶ 15	100	3.0	3	30.34	17.05	57.49
6	1 ∶ 30	50	2.0	1	13.69	17.45	30.01

2.3.2 数据处理

以生物碱含量为指标，通过 DPS 数据处理系统软件（版本号 9.50）进行数据分析优化可得，白屈菜提取物的生物碱含量和各因素的回归方程为 $Y_1=-3.452\ 676+0.013\ 273X_1^2+0.001\ 819X_2^2-0.250\ 588X_3^2+1.652\ 321X_4^2$，相关系数 R=0.999 9，，调整后的相关系数为 R_a=1.000 0，总体显著性检验值 F=124 999.812 5，显著水平 P 值为 0.002 1<0.05，剩余标准差为 S=0.000 9，Durbin-Watson 统计量 d=2.739 726 20，模型恰当，方程拟合度好。通过回归方程系数可知，生物碱含量与 X_3^2 呈负相关，与 X_1^2、X_2^2 和 X_4^2 呈正相关。其中，X_2 因素的 P 值为 0.005 6<0.05，说明乙醇体积分数是影响生物碱含量的最显著因素。

以生物碱含量为指标，均匀设计结果得出的最佳提取条件为：料液比为 1 ∶ 30，乙醇体积分数为 99%，提取时间为 1.7 h，提取次数为 3 次。出于工业实际生产的考虑，采用单因素法考察了料液比为 1 ∶ 30、1 ∶ 35、1 ∶ 40、1 ∶ 45、1 ∶ 50，以及乙醇体积分数为 95%和 99%时，提取物中的生物碱含量，经 SPSS 软件（版本号 21.0）分析，上述试验结果均无显著性差异。因此，最终确定提取条件为：料液比为 1 ∶ 30，乙醇体积分数 95%，提取 3 次，每

次 1.7 h。

2.3.3 相关性分析

采用 SPSS 软件（版本号 21.0）中的双变量相关分析法，将总生物碱含量、出膏率和抑制率设为“变量”，进行 Pearson 相关性分析。三者的相关性分析结果显示：总生物碱含量与出膏率的

Pearson 相关性为 －0.592（P>0.05），说明总生物碱含量与出膏率不存在相关性；出膏率与细胞抑制率的

Pearson 相关性为 －0.369（P>0.05），说明出膏率与抑制率不存在相关性；总生物碱含量与细胞抑制率的

Pearson 相关性为 0.905，存在显著相关性（P<0.05）。上述说明白屈菜中生物碱类成分是其抗结肠癌的主要活性成分。

2.3.4 提取工艺验证

按上述优化提取工艺参数进行 3 次平行验证试验。结果显示，总生物碱含量均值（n=3）为 39.05 mg/g，RSD 为 1.83％；平均出膏率（n=3）为 15.57％，RSD 为 1.85％；以 2 mg/mL 的质量浓度与 SW620 细胞孵育 24 h，平均抑制率（n=3）为 91.67％，RSD 为 0.58％。上述结果表明，提取工艺准确、可靠。

2.4 白屈菜总生物碱的纯化工艺研究

2.4.1 上样液的制备

精密称取白屈菜粉末（过 3 号筛，孔径 355 μm）约 5.0 g，加入 30 倍量 95％乙醇，回流提取 3 次，每次 1.7 h，合并提取液，回收乙醇至无醇味，加水稀释成质量浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.30 g/mL 的上样液。

2.4.2 树脂预处理

将 6 种大孔吸附树脂（NKA-9、HPD400、HPD100、AB-8、X-5、D101 型）用 95％乙醇浸泡 24 h，湿法装柱后先用适量 95％乙醇冲洗，再用水洗净乙醇，直至流出液无浑浊为止，备用。

将 6 种阳离子交换树脂（D61、D001、D113、D152、732、D410 型）先用 10％氯化钠溶液浸泡 24 h，使其充分膨胀，再反复用水冲洗至洗出液澄明无色。湿法装柱，用 5 BV 5％氢氧化钠溶液冲洗树脂，用水洗至中性；再用 5 BV 5％盐酸冲洗，用水洗至中性，备用。

2.4.3 树脂型号的选择

根据白屈菜总生物碱的理化性质和树脂的吸附性能，筛选 12 种不同型号和类型树脂的纯化效果。精密称取已处理的大孔吸附树脂和阳离子交换树脂各 2 g，用滤纸吸干后，置 150 mL 锥形瓶中，分别加入质量浓度为 0.1 g/mL 的白屈菜上样液 20 mL，置 25 ℃摇床恒温振荡 24 h 进行吸附，过滤，取适量滤液测定吸光度。吸附饱和的树脂用滤纸吸干表面药液后置 150 mL 锥形瓶中。大孔吸附树脂加 95％乙醇 30 mL，置 25 ℃摇床恒温振荡 24 h 进行解吸，过滤，取滤液测定吸光度。阳离子交换树脂加入含 2％氨水的 95％乙醇 30 mL，置 25 ℃摇床恒温振荡 24 h 进行解吸，过滤，取适量滤液测定吸光度。计算并比较各种类型树脂的吸附率、解吸率，结果如表 2

表 2　总生物碱在不同树脂上的静态吸附能力（n=3）

Tab.2　Static Adsorption Capacity of Total Alkaloids on Different Resins（n=3）

树脂型号	粒径 /mm	比表面积 /($m^2 \cdot g^{-1}$)	平均孔径 /nm	极性	吸附率 /%	解吸率 /%
NKA-9	0.30 ～ 1.25	250 ～ 290	15.5 ～ 16.5	极性	90.80	52.15
HPD400	0.30 ～ 1.20	500 ～ 550	7.5 ～ 8.0	弱极性	93.25	58.04
HPD100	0.30 ～ 1.25	650 ～ 700	8.5 ～ 9.0	非极性	91.91	49.57
AB-8	0.30 ～ 1.25	480 ～ 520	13.0 ～ 14.0	弱极性	92.42	51.17
X-5	0.30 ～ 1.25	500 ～ 600	29.0 ～ 30.0	非极性	93.56	65.88
D101	0.20 ～ 0.60	400 ～ 600	10.0 ～ 12.0	弱极性	93.01	45.30
D61	0.40 ～ 0.60	100 ～ 500	5.0 ～ 30.0	强酸性	88.70	41.98
D001	0.4 ～ 0.9	100 ～ 800	10.0 ～ 50.0	强酸性	86.77	44.03
D113	0.69 ～ 1.25	100 ～ 500	5.0 ～ 30.0	弱酸性	86.48	26.11
D152	0.3 ～ 1.2	100 ～ 500	5.0 ～ 30.0	弱酸性	88.35	49.68
732	0.315 ～ 1.25	100 ～ 500	0 ～ 2.0	强酸性	89.31	24.89
D410	0.4 ～ 0.6	100 ～ 500	5.0 ～ 30.0	弱酸性	89.26	38.17

所示。可见，X-5 型树脂的静态吸附率和解吸率最高，故选用。

2.4.4 上样液质量浓度的考察

将 5 个质量浓度（0.05、0.10、0.15、0.20、0.30 g/mL）的上样液，加于径高比 1 ∶ 11 的 X-5 型树脂柱上（直径 1.5 cm），用 3 BV 水除去表面杂质；再用 10 BV 95%乙醇洗脱，收集醇洗脱液，计算总生物碱含量。根据不同质量浓度下生物碱的吸附量、吸附率选择合适的上样浓度。结果（图 1A）显示，在总生物碱量一致的情况下，质量浓度为 0.2 g/mL 时总生物碱吸附量及吸附率较高，故确定最佳上样浓度为 0.2 g/mL。

2.4.5 上样液 pH 值、上样流速、径高比的考察

采用 $U_6(6^4)$ 均匀设计表，选取质量浓度为 0.2 g/mL 的上样液 20 mL，以上样 pH 值（X_5）、上样流速（X_6）、柱的径高比（X_7）为考察因素，以 X-5 型大孔树脂对生物碱吸附量（Y_2）、吸附率为指标，对树脂动态吸附条件进行优选。结果如表 3 所示。

表 3 均匀设计法优化纯化工艺参数的方案和考察结果

Tab.3 Scheme and Investigation Results of Purification Parameters by Uniform Design

试验号	X_5	X_6/(BV·h^{-1})	X_7	吸附量/mg	吸附率/%
1	5	2	3	100.98	65.14
2	2	4	6	85.26	55.00
3	7	3	15	102.25	65.96
4	3	1	12	101.85	65.70
5	4	5	18	68.95	44.48
6	6	6	9	65.77	42.43

2.4.6 数据处理

通过 DPS 数据处理系统软件（版本号 9.50）进行数据分析优化可得，树脂对生物碱的吸附量和各因素的回归方程为：Y_2=113.516 531－6.009 347X_5+0.905 673X_5^2－1.115 388X_6^2－0.078 680X_6X_7，相关系数 R=1.000 0，调整后的相关系数为 R_a=0.999 8，总体显著性检验值 F=250 1.342 0，显著水平 P 值为 0.015 0<0.05，剩余标准差为 S=0.377 6，Durbin-Watson 统计量 d=1.579 545，模型恰当，方程拟合度好。最终确定优化纯化工艺为：上样液 pH 7，径高比 1 ∶ 11，上样流速 1 BV/h。

2.4.7 均匀设计的验证

按均匀设计得出的最佳条件，取质量浓度为 0.2 g/mL 的上样液 20 mL，调至 pH 7，以 1 BV/h 的流速上样，柱的径高比为 1 ∶ 11。3 次平行试验中，总生物碱的吸附量分别为 113.85、112.41、115.19 mg，平均吸附量（n=3）为 113.82 mg，RSD 为 1.22%；总生物碱的吸附率分别为 73.44%、72.51%、74.31%，平均吸附率（n=3）为 73.42%，RSD 为 1.22%。经验证，均匀设计法所得结果可信。

2.4.8 泄漏曲线绘制

将预处理后的 X-5 型大孔树脂湿法装柱，照“**2.4.7**”项下方法洗脱，分段收集流出液，每 10 mL 收集 1 份（共 15 份），测定其中总生物碱的含量。当洗脱液中总生物碱浓度达到上样液（初始）质量浓度的 10%时即可认为出现泄漏[8]，通过泄漏点确定上样量。本品的泄漏曲线如图 2A 所示。随着上样量增加，流出液中生物碱含量不断增加，在 40 mL 时出现明显泄漏，故确定最大上样量为 40 mL。

2.4.9 除杂用水量的考察

按上述确定的吸附条件完成上样后，用水除杂，每 1 BV 收集 1 份流出液，用 Molish 反应检测。结果表明，当采用 6 BV 水洗时，Molish 反应呈阴性，故最佳水洗脱用量为 6 BV。

2.4.10 乙醇体积分数的考察

按上述确定的吸附条件上样，用 6 BV 水除杂后，用 10 BV 体积分数分别为 30%、50%、70%、90%、95%、100%的乙醇洗脱，收集各洗脱液，测定吸光度值，计算总生物碱吸附量。结果（图 1B）显示，当乙醇体积分数为 95%时，总生物碱吸附量、吸附率均较高，故选择洗脱剂为 95%乙醇。

2.4.11 洗脱曲线绘制

按上述确定的吸附条件上样，用 6 BV 水除杂，用 95%乙醇洗脱，每 1 BV 收集 1 份洗脱液，测定其吸光度值，计算总生物碱吸附量。以累积洗脱体积为横坐标，总生物碱吸附量为纵坐标绘制洗脱曲线。结果（图 2B）显示，10 BV 时基本洗脱完全，故选 95%乙醇 10 BV 为最佳洗脱剂用量。

2.4.12 洗脱流速的考察

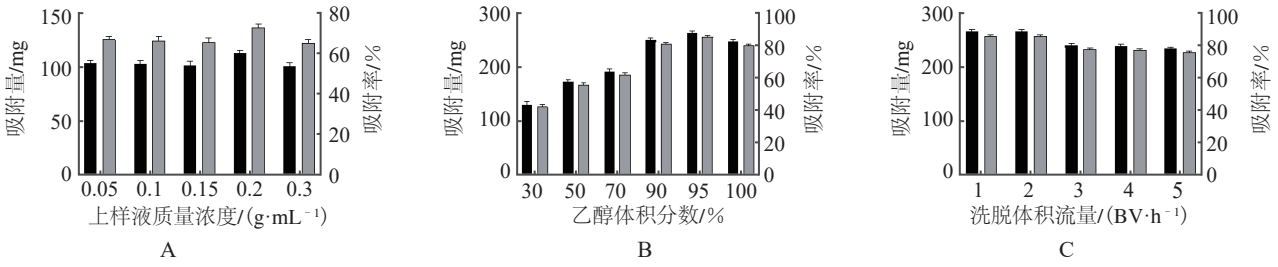
按上述确定的条件上样、除杂，用95%乙醇洗脱，调节流速分别为1、2、3、4、5 BV/h，收集洗脱液。测定各洗脱液的吸光度值，计算总生物碱吸附量。结果（图1C）显示，随着洗脱流速的增加，白屈菜总生物碱含量逐渐降低。当洗脱速度为1和2 BV/h时，白屈菜总生物碱吸附量无显著性差异，当洗脱流速为3 BV/h时，白屈菜总生物碱吸附量显著下降。考虑到实际效益，最佳洗脱流速选择为2BV/h。

2.4.13 纯化工艺验证

综上所述，优化纯化工艺为：采用X-5大孔吸附树脂，上样液质量浓度0.20 g/mL，径高比为1∶11，上样液pH 7，上样流速1 BV/h，用6 BV水除杂，再用10 BV 95%乙醇以2 BV/h的流速洗脱。按上述纯化工艺进行3次平行试验，测定样品中的总生物碱含量和收率（醇洗脱物固体质量/上样液中的生药质量×100%）。将纯化得到的富集物用纯水超声溶解，采用同等条件进行二次、三次纯化，即得一次、二次、三次纯化物。结果表明，一次、二次、三次纯化物中总生物碱平均含量分别为72.47%、88.76%和95.10%，收率分别为4.35%、3.12%和2.75%。

2.5 酸性染料比色法验证

为保证本试验测定白屈菜总生物碱含量的准确

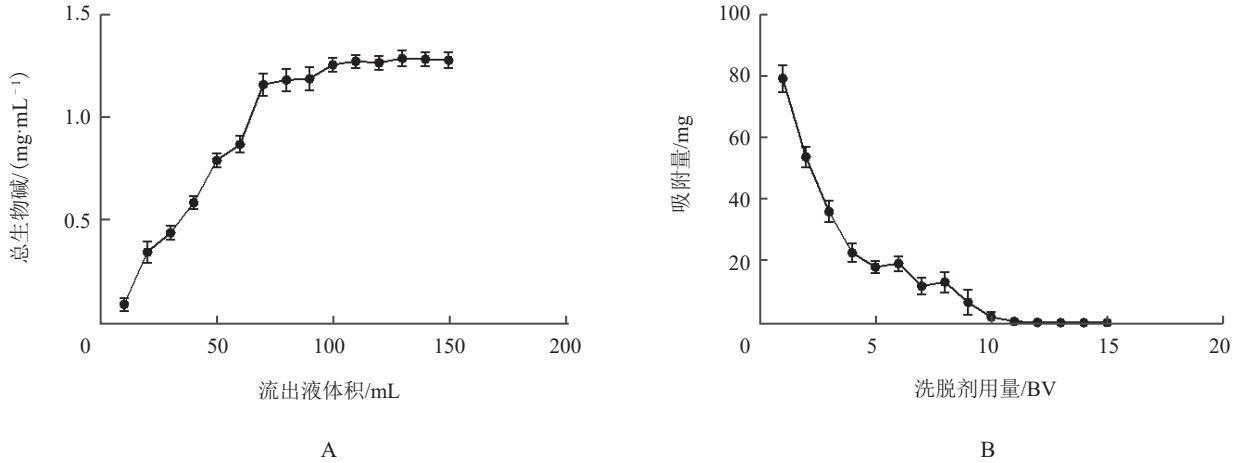


■—吸附量；▭—吸附率。

A—上样液质量浓度；B—乙醇体积分数；C—洗脱液流速。

图1　各因素对白屈菜总生物碱吸附量和吸附率的影响（*n*=3）

Fig.1　Influence of Various Factors on the Adsorption Capacity and Adsorption Rate of Total Alkaloids of Chelidonium (*n*=3)



A—泄露曲线；B—洗脱曲线。

图2　泄漏曲线及洗脱曲线（*n*=3）

Fig.2　Leakage Curve and Elution Curve (*n*=3)

性，选取文献[9]报道的酸性染料比色法进行含量的验证。精密吸取 0.30 mg/mL 的白屈菜红碱对照品溶液 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80 mL 置分液漏斗中，补水至 1 mL，加入枸橼酸 - 枸橼酸钠缓冲液（pH 4.8）5 mL，再加入溴酚蓝指示液 2 mL，摇匀，加入二氯甲烷至二氯甲烷层体积为 10 mL；充分振摇后静置分层，分取二氯甲烷层，经无水硫酸钠脱水后在 418 nm 波长下测定吸光度。以对照品质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标线性回归，结果表明，白屈菜总生物碱在 0 ～ 24.0 μg/mL 内线性关系良好（r=0.999 7）。经此方法检测，一次、二次、三次纯化物中白屈菜总生物碱的含量分别为 70.21%、84.89%、88.98%。

2.6 SW620 结肠癌细胞的体外验证试验

分别以质量浓度均为 0.10 mg/mL 的粗提物、一次纯化物、二次纯化物、三次纯化物，照“**2.2.3**”项下方法与 SW620 结肠癌细胞进行孵育，计算其对 SW620 细胞的抑制率，结果如表 4 所示。

表 4 白屈菜提取物纯度对 SW620 细胞抑制率的影响 /%（n=3）

Tab.4 Effect of Purity of *Chelidonium* Extract on Its Inhibition Rate against SW620 Cells /%

药物	抑制率	总生物碱含量
提取物	18.34±2.66	24.98±1.85
一次纯化	57.74±2.96	72.47±2.55
二次纯化	70.75±1.87	89.56±2.26
三次纯化	89.47±2.63	95.10±1.66

将粗提物、不同纯化后生物碱含量和细胞抑制率进行 Pearson 相关性分析。结果显示，总生物碱含量与细胞抑制率的 Pearson 相关性为 0.980，二者存在显著相关性（P<0.05），验证了生物碱是白屈菜抗结肠癌的药效物质，试验结果可靠。与一次纯化物相比，三次纯化物生物碱含量提高了 22.63%，总生物碱量降低了 17.04%，对结肠癌细胞的抑制率提高了 31.73%。

3 讨论

临床研究表明，白屈菜对人类多种恶性肿瘤都有显著的抑制作用[2—3]，其主要的化学成分和药理活性成分均为生物碱类成分，其中苯并菲啶型生物碱如白屈菜红碱、血根碱、原阿片碱等，对结肠癌、胃癌、胰腺癌、肝癌等多种恶性肿瘤均有抑制作用[10—13]。因此，本研究优化了白屈菜提取和纯化工艺，确定了白屈菜药效部位的主要成分是生物碱类成分，纯化后获得的白屈菜总生物碱含量为 95.10%，为白屈菜总生物碱类抗结肠癌新药的研发提供前期基础。

根据已有白屈菜总生物碱提取纯化工艺研究[5]，所得提取物中含量为 72.58%，与本试验一次纯化物中 72.47%含量相近。该文献[5]白屈菜总生物碱的得率为 1.43%，本试验为 3.91%，提高了约 1.73 倍；文献[5]中纯化工艺总生物碱回收率为 70.41%，本试验回收率为 80.73%，提高了 14.66%。本试验显示，经第二次、第三次纯化，总生物碱含量达到了 95.10%，且证明了总生物碱含量越高，抗结肠癌细胞的活性越强。

在白屈菜总生物碱提取工艺研究中，分别以生物碱含量和 SW620 细胞抑制率为指标时，二者的提取工艺在提取时间上有所差别。这可能是因为随着提取时间增加，白屈菜中的生物碱类成分在长时间的高温下结构会被破坏[7]。因此在提取过程中，要严格把控提取时间，以免造成生物碱被破坏。综合生物碱含量和出膏率可以得到生物碱总量，在大生产中需要同时考虑经济成本和获得的生物碱总量，出膏率的考察为工业生产提供了基础数据。

在白屈菜总生物碱纯化工艺研究中，X-5 型树脂是非极性树脂，乙醇洗脱后树脂的颜色为黑绿色，树脂重复利用时存在死吸附现象。为工业大生产考虑，本试验后续将选择合适的再生剂，如甲醇、丙酮等进行考察，解决 X-5 型树脂得不到充分回收利用的问题。

目前测定总生物碱的方法主要有 3 种：酸碱滴定法、对照品比较法、酸性染料比色法。酸碱滴定法操作简便、成本低廉、但灵敏度和准确性较低。对照品比较法和酸性染料比色法测定白屈菜总生物碱均有文献[5,7,9]报道。白屈菜中含有的生物碱主要为苯并菲啶类生物碱，此类生物碱是一类重要的异喹啉类

生物碱。如白屈菜碱、白屈菜红碱、血根碱、黄连碱、小檗碱等，因异喹啉母核的存在，该类生物碱在 290 nm 处均有异喹啉环的紫外强吸收峰存在[14]。酸性染料比色法测定总生物碱含量的应用范围较广，可应用于吲哚类生物碱、萜类生物碱、异喹啉类生物碱、甾类生物碱等[15]。

本试验首先采用操作简便的对照品比较法进行考察，然后采用酸性染料比色法进行含量验证。经此 2 种方法测定，均获得了高含量的白屈菜总生物碱，但含量相差 6%左右。影响酸性染料比色法测定结果的因素有很多，如酸性染料的种类和用量、缓冲液的 pH 值和用量、萃取过程中振摇的力度、过度振摇引起的乳化、静置分层的时间等[15]。2 种方法测定结果差异可能与上述因素有关，具体有待于进一步考察。2 种方法均可证明，纯化后白屈菜生物碱含量相较粗提物含量均提高了 64%以上。

本研究结果不仅可为今后白屈菜的提取和纯化工艺的改进提供理论参考，而且为白屈菜总生物碱治疗结肠癌的新药研发奠定试验基础。

参考文献：

[1] 洪　波, 孟　琦, 江健梅, 等. 白屈菜生物碱研究进展 [J]. 人参研究, 2022, **34**(2): 58-62.

[2] ZIELINSKA S, JEZIERSKA-DOMARADZKA A, WOJCIAK-KOSIOR M, *et al*. Greater Celandine's ups and downs-21 centuries of medicinal uses of *Chelidonium majus* from the viewpoint of today's pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2018, **9**: 299.

[3] DELJANIN M, NIKOLIC M, BASKIC D, *et al*. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines [J]. *Ethnopharmacol*, 2016, **190**: 362-371.

[4] 都姝麟, 李丽荣, 顾　硕, 等. 白屈菜药理作用综合研究进展 [J]. 吉林中医药, 2022, **42**(1): 84-87.

[5] 严　光. 白屈菜生物碱提取与应用的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2019.

[6] 肖忠华, 牟凤林, 邓晶荣, 等. 太白贝母提取物对人结肠癌 SW480 细胞增殖抑制作用及其机制的研究 [J]. 肿瘤药学, 2018, **8**(4): 505-511.

[7] 赵胜男, 李瑞海, 贾天柱. 响应面法优化白屈菜中总生物碱酸水提取的工艺 [J]. 中国药师, 2019, **22**(3): 541-545.

[8] 王　凯, 黄亚光, 陶　薇, 等. 蓝布正总鞣质提取纯化工艺的优化 [J]. 中成药, 2021，**43**(5): 1291-1295.

[9] 顾　悦. 白屈菜质量评价研究 [D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2010.

[10] 周　佳, 邱智东, 林　喆, 等. 白屈菜红碱对人卵巢癌 SKOV3 细胞迁移、侵袭和上皮－间质转化的影响 [J]. 吉林大学学报, 2024, **50**(1): 25-32.

[11] 叶汉林, 乔　淦, 王琳琳, 等. 原阿片碱通过线粒体凋亡途径抑制肝细胞癌生长 [J]. 药学学报, 2021, **56**(8): 2223-2229.

[12] 王　密, 翁春燕. 血根碱基于 PI3K/AKT 通路抑制结肠癌细胞增殖和迁移的机制研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2023, **33**(9): 803-807.

[13] LI C, DONG N, WU B, *et al*. Dihydroberberine，an isoquinoline alkaloid，exhibits protective effect against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. *Phytomedicine*, 2021, **90**: 153631.

[14] 邓　婕, 高雅英. 综述异喹啉类生物碱分离与分析研究进展 [J]. 化工时刊，2010, **24**(1): 45-50.

[15] 李　丽, 龚晓莹, 姜蔓菁, 等. 酸性染料比色法测定总生物碱含量的研究进展 [J]. 中南药学, 2019, **17**(8): 1242-1246.