

D101型大孔树脂纯化山豆根总生物碱的工艺优选

陈晓斌¹, 周琴妹¹, 刘顺¹, 管敏¹, 程革^{2*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210036; 2. 南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 目的: 优选 D101 型大孔树脂纯化山豆根总生物碱的工艺条件。方法: 选择苦参碱为指标成分, 采用 UV 测定总生物碱含量, 检测波长 415 nm。以总生物碱含量为指标, 通过单因素试验考察上样量质量浓度、洗脱剂用量及种类、洗脱流速等因素对山豆根总生物碱大孔树脂纯化工艺的影响。结果: 最佳工艺条件为上样液用盐酸调 pH 3~4, 用 20% 氨水调 pH 10, 上样液质量浓度 0.8 g·mL⁻¹, 上样流速 2 BV·h⁻¹, 上样量为山豆根药材与树脂体积比例 1:2.5, 加水 2 BV 除杂, 用 70% 乙醇 4 BV 于 4 BV·h⁻¹ 流速洗脱; 总生物碱纯度 66.83%。结论: D101 型大孔树脂对山豆根生物碱类物质具有较好的纯化效果, 优选的工艺简单可行, 为山豆根的资源利用提供参考

[关键词] 山豆根; 生物碱; D101 型大孔树脂; 苦参碱

[中图分类号] RR283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0021-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030021

Optimization of Purification Technology of Total Alkaloids from Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma by D101 Macroporous Resin

CHEN Xiao-bin¹, ZHOU Qin-mei¹, LIU Shun¹, GUAN Min¹, GHENG Ge^{2*}
(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210036, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology conditions of total alkaloids from Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma by D101 macroporous resin. **Method:** Taking matrine as index component, UV was employed to determine the content of total alkaloids with detection wavelength of 415 nm. With the content of total alkaloids as index, effects of the concentration of sample solution, amount and type of eluent, elution velocity on purification process were investigated by single factor tests. **Result:** Optimum technology conditions were as follows: adjusted pH of sample solution to 3-4 with hydrochloric acid, adjusted pH to 10 with 20% ammonia water, the concentration of sample solution 0.8 g·mL⁻¹, sample flow rate of 2 BV·h⁻¹, sample volume (equivalent as crude drug)-resin volume ratio of 1:2.5, washed impurity with 2 BV of water, with 4 BV of 70% ethanol as eluant, elution flow rate of 4 BV·h⁻¹. Purity of total alkaloids was 66.83%. **Conclusion:** D101 macroporous resin has good purification effect for total alkaloids from Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma, optimized process is simple and feasible, this study provides a reference for resource utilization of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma.

[Key words] Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma; total alkaloids; D101 macroporous resin; matrine

山豆根具有解热、镇痛、抗炎等作用, 含有丰富的生物碱、黄酮和多糖类等化学成分^[1]。研究报道山豆根含有的苦参碱和氧化苦参碱对多种肿瘤具有防治作用, 如神经母细胞瘤、脑胶质瘤、肝癌、卵巢癌、白血病等^[2]。目前采用吸附柱色谱法、离子交换色谱法分离纯化苦参碱和氧化苦参碱的研究已有报道^[3,4], 但

未见大孔树脂分离纯化山豆根生物碱类成分的研究。本实验以总生物碱含量为评价指标, 通过单因素试验优选山豆根生物碱类成分的大孔吸附树脂纯化工艺条件, 为山豆根的资源开发提供参考。

1 材料

Cary 50 型紫外-可见分光光度计(美国瓦里安

[收稿日期] 20140516(005)

[基金项目] 江苏省中医药管理局基金项目(LZ13029)

[第一作者] 陈晓斌, 主任中药师, 从事中药制剂研究, Tel: 025-86529291, E-mail: chxb67@163.com

[通讯作者] *程革, 博士, 副教授, 从事中医经方治疗肿瘤的研究, Tel: 025-85811033, E-mail: nanjingbox@163.com

公司),BP-211D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯公司),AR2140 型 1/1 万分析天平(奥豪斯仪器上海有限公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

山豆根购自安徽省万生中药饮片有限公司,批号 130801,经南京中医药大学附属医院药学部袁加才主任中药师鉴定为豆科植物越南魁 *Sophora tonkinensis* 的干燥根和根茎。苦参碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-200904),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 山豆根提取液的制备^[5] 称取山豆根粗粉 200 g,加 10 倍量 40% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,过滤,减压回收至无醇味,加水稀释至 200 mL,用盐酸调 pH 3~4,滤过,取溶液加 20% 氨试液调 pH 10,滤过,取上清液,即得。

2.2 供试品溶液的制备^[6] 精密称取山豆根醇提取液干燥后的浸膏适量,置具塞锥形瓶中,精密加入三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(40:10:1)混合液 25 mL,密塞,称定质量,放置 30 min,超声处理(250 W,40 kHz)30 min,加混合液补足减失的质量,摇匀,过滤。精密量取续滤液 10 mL,于 40 °C 减压回收溶剂至干,残渣加甲醇适量使溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 总生物碱的含量测定^[7] 精密称取干燥至恒重的苦参碱对照品约 4 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得 175.2 mg·L⁻¹ 对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,分别置于具塞锥形瓶中,挥干溶剂,加入溴百里香酚蓝溶液 4 mL 和三氯甲烷溶液 6 mL,震荡 2 min 后置于分液漏斗中静置 2 h,分取三氯甲烷层溶液,以相应试剂为空白,于 415 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 1.2795C + 0.0111$ ($r = 0.9995$),表明总生物碱在 17.52~87.6 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。取供试品溶液 0.1 mL,按上述条件测定 A,计算总生物碱含量。

2.4 大孔树脂纯化工艺优选 将处理好的大孔树脂加入玻璃柱(1.8 cm×29 cm,柱高 12 cm,体积约 30 mL,质量约 14.5 g),加入适量供试品溶液,收集流出液,按 2.3 项下方法测定总生物碱含量,分别按吸附率 = $(C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%$,洗脱率 = $C_2V_2/(C_0 - C_1)V_1 \times 100\%$ 和吸附-洗脱率 = 洗脱液中总

生物碱含量/吸附量 × 100% 计算。式中 C_0 为吸附液初始质量浓度, C_1 为吸附后样液质量浓度, C_2 为洗脱液质量浓度, V_1 为吸附液体积, V_2 为洗脱液体积。

2.4.1 树脂的预处理 称取适量 D101 型大孔吸附树脂,加 95% 乙醇浸泡 24 h,湿法装柱,加 95% 乙醇 8 BV 动态清洗树脂,水洗至无醇味,加 5% 盐酸 3 BV 浸泡 6 h,水洗至中性,加 5% 氢氧化钠溶液 3 BV 浸泡 6 h,水洗至中性,重复酸和碱洗 2 次,用 95% 乙醇动态清洗至乙醇洗脱液-水(1:3)混合不呈白色混浊为止,水洗至无醇味,备用。

2.4.2 上样液质量浓度考察 取 2.1 项下样品溶液 30 mL,分别加水配成 0.2,0.4,0.5,0.6,0.8,1.0 g·mL⁻¹,共 6 份,分别加水稀释至 0.2,0.4,0.5,0.6,0.8,1.0 g·mL⁻¹,依次加至已处理好的 D101 型大孔吸附树脂柱上,以流速 2 BV·h⁻¹ 进行动态吸附,利用稀碘化铋钾反应指示吸附终点,静置 2 h,使样品溶液得以充分吸附,加水 2 BV 洗脱,继用 70% 乙醇洗脱至碘化铋钾反应呈阴性,收集洗脱液,减压浓缩成干粉。计算洗脱物中总生物碱的吸附-洗脱率分别为 59.2%,72.2%,78.9%,85.6%,88.2%,82.1%,说明吸附-洗脱率随上样液质量浓度的增大先增加后减小,故选择上样液质量浓度 0.8 g·mL⁻¹。

2.4.3 泄露曲线 取 D101 型大孔吸附树脂 30 mL,湿法装柱,取 0.8 g·mL⁻¹ 样品液上样以流速 2 BV·h⁻¹ 进行动态吸附,收集流出液,每 5 mL (1 BV=30 mL) 收集为 1 份,共收集 5 份。按 2.3 项下方法测定总生物碱含量,结果发现上样 15 mL 后总生物碱开始明显泄露,故确定最大上样量 12 g,即最佳上样量与树脂体积比 1:2.5。

2.4.4 上样流速考察 取 0.8 g·mL⁻¹ 山豆根提取液 15 mL 进行动态吸附,调节上样流速分别为 0.5,1,2,2.5,3,3.5 BV·h⁻¹,收集流出液,结果总生物碱吸附率分别为 95.2%,94.6%,94.1%,87.5%,84.5%,80.3%,说明上样流速越小越有利于吸附的进行,但当流速 < 2 BV·h⁻¹ 时,吸附率随流速的减小而增加缓慢,变化不显著,且上样流速越小,耗时越长,故选择上样流速 2 BV·h⁻¹。

2.4.5 水洗用量考察 量取 0.8 g·mL⁻¹ 样品液 15 mL,分别通过 4 根 D101 型大孔吸附树脂柱(湿树脂体积 30 mL),按上样量与树脂体积比 1:2.5 进行动态吸附 2 h,分别加水 1,2,3,4 BV 除杂,加 70% 乙醇洗脱至稀碘化铋钾反应呈阴性,收集 70%

乙醇洗脱液,减压浓缩成干粉,称重,测得总生物碱质量分数分别为61.2%,66.1%,58.5%,55.0%,计算吸附-洗脱率分别为84.5%,91.6%,87.2%,85.1%。说明加水2 BV 除杂时,既有利于去除杂质,又能较好地保留山豆根总生物碱。

2.4.6 洗脱剂选择 量取 $0.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品液15 mL,分别通过5根D101型大孔吸附树脂柱(湿树脂体积30 mL),按上样量与树脂体积比1:2.5进行动态吸附,吸附完成后,加水2 BV 除杂,分别用40%,50%,60%,70%,80%的乙醇溶液洗脱至稀碘化铋钾反应呈阴性,收集乙醇洗脱液分别蒸干,称定质量,测得总生物碱质量分数分别为35.1%,38.9%,44.3%,66.1%,59.0%,计算吸附-洗脱率分别为79.6%,75.0%,83.5%,94.2%,79.4%。说明70%乙醇的洗脱物中总生物碱含量较高。

2.4.7 洗脱流速考察 取D101型大孔树脂30 mL,共3份,按优选的工艺条件装柱及上样,上样后加水2 BV 洗脱,弃去洗脱液,分别加70%乙醇以2,3,4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱,收集洗脱液,测定总生物碱含量,结果总生物碱质量分数分别为65.1%,65.2%,66.1%,计算吸附-洗脱率分别为95.1%,94.6%,94.5%,故确定洗脱流速4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.4.8 洗脱剂用量考察 量取适量 $0.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液上柱(湿树脂体积30 mL),按上样量与树脂体积比1:2.5进行动态吸附2 h,加水2 BV 除杂,加70%乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,前2份每10 mL收集为1份,之后每5 mL收集1份,测定总生物碱含量。结果每份洗脱液中生物碱质量分别为0.01,0.02,0.055,0.065,0.04,0.02,0.01,0.008,0.005,0.002 mg,说明当洗脱溶剂为4 BV 时,可将总生物碱洗脱完全,即洗脱剂用量4 BV。

2.4.9 验证试验 分别取3份上样液,每份150 mL,按优选的纯化工艺制备3批样品,收集乙醇洗脱液,测得总生物碱平均质量分数分别为66.2%,67.5%,66.8% ($n=2$),说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

山豆根中抗肿瘤活性物质基础为苦参碱和氧化苦参碱,二者的纯化多采用有机溶剂萃取,或结合氧化铝柱层析分离,再经三氯甲烷等有机溶剂洗脱及离子交换树脂分离等纯化处理方法,不仅步骤繁杂成本高,而且有机溶剂的大量使用对环境和操作者均造成危害。亦有文献报道选择氨水溶液为溶剂洗脱,虽避免了有机溶剂危害,但其刺激性挥发气味对环境和人体均有较大影响^[8-10]。而使用大孔吸附树

脂进行苦参总碱的吸附和分离具有操作简单、再生容易、收率高、对环境污染小等优点^[11-14]。本文采用D101型大孔树脂法对山豆根总生物碱进行富集纯化,上样前样品溶液先加盐酸调pH 3~4,滤过,加20%氨水调pH 10.0,滤过,溶液上样后加水洗脱以除去多糖、黄酮、三萜类等杂质,大大提高了总生物碱的得率,总生物碱纯度由上柱前的9.47%提高至约60%,工艺环保,成本低廉。该工艺分离纯化山豆根总生物碱纯化效果理想,工艺稳定、操作简便,保证了成品中山豆根总生物碱纯度>50%,符合中药新药口服制剂对有效部位含量的要求。

[参考文献]

- [1] 刘雪花. 苦参生物碱的药理研究进展[J]. 中国实用医药, 2009, 14(4): 232-234.
- [2] 王君明, 崔瑛. 山豆根化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 229-232.
- [3] 胡艳丽, 郭丽, 贾晓红. 苦参总碱分离纯化方法的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 32-36.
- [4] 李克, 王曙东, 吴龙琴. 离子交换树脂分离纯化山豆根中苦参碱和氧化苦参碱的实验研究[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(4): 45-48.
- [5] 陆娟, 杨帆, 刘春明, 等. 乙醇回流法提取山豆根总生物碱的工艺研究[J]. 长春师范学院学报, 2011, 30(5): 48-52.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 25-26.
- [7] 孟美, 王化宇, 任钰, 等. 正交试验优选山豆根有效部位的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 46-49.
- [8] 全燕, 王锦玉, 张镔, 等. 苦参总生物碱提取纯化工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(1): 19-22.
- [9] 郭安. 氧化苦参碱提取纯化工艺研究[J]. 云南中医学院学报, 2006, 29(3): 9-11.
- [10] 代龙. 阳离子交换树脂酸水洗脱法纯化苦参总碱的工艺优选[J]. 齐鲁药事, 2008, 27(10): 621-623.
- [11] 李成帅, 杜爱玲, 李霞, 等. H103 大孔吸附树脂分离纯化苦参碱与氧化苦参碱[J]. 精细化工, 2013, 30(3): 294-298.
- [12] 霍清, 林强. SP825 大孔吸附树脂分离提取苦参碱的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 134-138.
- [13] 秦学功, 陈景超. 以 X-5 型大孔树脂吸附分离苦参生物碱的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 29-31.
- [14] 彭程, 胡晋红, 朱全刚, 等. 醇提-大孔树脂纯化法提取苦参有效部位工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(7): 989-993.

[责任编辑 刘德文]