

D-900型大孔树脂纯化巴戟天低聚糖的工艺优选

杨欣¹, 宋健平², 关业枝², 王琪², 林励^{1*}, 林伟栋¹, 顾善喜¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学 科技产业园, 广州 510445)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂纯化巴戟天低聚糖的工艺条件, 制备高纯度的低聚糖有效部位。方法: 以耐斯糖和水溶性低聚糖的吸附-洗脱率为指标, 采用单因素试验考察上样液质量浓度、径高比、洗脱剂用量等因素对巴戟天低聚糖大孔树脂纯化工艺的影响。结果: 最佳纯化工艺为上样液质量浓度 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 树脂柱径高比 1:6, 上样量与树脂体积比 1:25, 加水 12 BV 以流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱。水洗脱液中低聚糖平均质量分数、吸附-洗脱率、转移率分别为 55.70%, 94.45%, 91.82%。结论: 该纯化工艺简单、稳定、成本低, 可应用于中试生产。低聚糖有效部位纯度 >50%。

[关键词] 大孔吸附树脂; 纯化工艺; 耐斯糖; 巴戟天; 低聚糖

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0016-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030016

Optimization of Purification Technology for Oligosaccharides in *Morindae Officinalis Radix* by D-900 Macroporous Resin

YANG Xin¹, SONG Jian-ping², GUAN Ye-zhi², WANG Qi², LIN Li^{1*}, LIN Wei-dong¹, GU Shan-xi¹

(1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Science and Technology Industrial Park, Guangzhou University of

Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of oligosaccharides in *Morindae Officinalis Radix* by macroporous resin and prepare effective parts of oligosaccharides with high purity. **Method:** Taking adsorption-desorption rate of nystose and oligosaccharides as indexes, effects of the concentration of sample solution, diameter-height ratio, elution agent and other factors on purification technology of oligosaccharides were investigated by single factor tests. **Result:** Optimum purification technology was as following: the concentration of sample solution $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, diameter-height ratio of resin column 1:6, ratio of sample volume-resin 1:25, then eluted with 12 BV of water with flow rate of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, collected eluent. Average content, adsorption-elution rate and transfer rate of oligosaccharides in water eluent were 55.70%, 94.95%, 91.82%, respectively. **Conclusion:** This optimized purification technology is simple and stable with low cost, purity of oligosaccharides is more than 50%.

[Key words] macroporous absorption resin; purification process; nystose; *Morindae Officinalis Radix*; oligosaccharides

大孔吸附树脂分离技术是通过物理吸附从中药及其复方提取液中有选择性地吸附有效成分, 去除无效成分的一种纯化工艺, 近年已被广泛用

于天然药物化学成分分离和中药新药的研发^[1]。巴戟天^[2]中低聚糖部位具有抗痴呆、抗抑郁、增强记忆作用的神经药理学活性^[3-6], 已成为

[收稿日期] 20150609(003)

[基金项目] 广东省科技厅“扬帆计划”引进创新创业团队专项(2014YT02S008); 广东省省级科技计划项目(2015A020211021)

[第一作者] 杨欣, 在读博士, 从事中药资源开发与新药研究, Tel:020-39358270, E-mail:37739362@qq.com

[通讯作者] *林励, 研究员, 从事中药资源开发与新药研究, Tel:020-39358270, E-mail:ll76611@yahoo.com.cn

神经领域科研和新药研究热点。前期研究已确定选用 D-900 型大孔吸附树脂分离纯化巴戟天中低聚糖,但低聚糖纯度 < 50%,不符合中药有效部位原料药的要求。为充分保留巴戟天低聚糖有效成分,更好地发挥药效,本实验以耐斯糖、巴戟天低聚糖部位的吸附-洗脱率为考察指标,通过单因素试验优选大孔吸附树脂纯化巴戟天低聚糖有效部位的工艺条件,为开发高效、质优的现代创新性五类新药提供基础。

1 材料

8453E 型紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司),2695 型高效液相色谱系统(配备 2424 型蒸发光散射检测器,美国 Waters 公司),BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。巴戟天样品系 2014 年 7 月采于广东德庆市高梁镇按中药材生产质量管理规范(GAP)种植的巴戟天基地,经广州中医药大学中药学院林励研究员鉴定为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* 的干燥根。耐斯糖(日本和光纯药株式会社,批号 AWG0714,纯度 $\geq 99.0\%$),葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-200904,纯度 $\geq 99.5\%$),D-900 型离子交换大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司,批号 20141107),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 精密称取巴戟天药材粉末(过 3 号筛)100 g,加 23 倍量 40% 乙醇^[7]浸泡 24 h,于 93 °C 水浴回流提取 1.7 h,滤过,滤渣加 23 倍量 40% 乙醇提取 1.7 h,合并滤液,即得。

2.2 耐斯糖的含量测定

2.2.1 色谱条件 Waters XBridge™ Amide 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,3.5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min,87% ~ 65% A;11 ~ 20 min,65% ~ 75% A;21 ~ 45 min,75% ~ 80% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,漂移管温度 90 °C,喷雾器模式加热 100%,增益 2,柱温 40 °C。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取耐斯糖对照品适量,加流动相制成 1.0 g·L⁻¹对照品溶液。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密称取耐斯糖对照品适量,用流动相配成质量浓度分别为 0.20,0.49,0.98,14.7,17.6,19.6,29.4 g·L⁻¹的对照品溶液,精密量取 10 μL 按 2.2.1 项下条件测定,以峰面积对进样量的对数进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.001X + 10.394$ ($R^2 = 0.9993$),线性范围 2.00 ~

29.4 μg。

2.3 低聚糖部位的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取葡萄糖对照品适量,加水配成 0.25 g·L⁻¹对照品溶液。

2.3.2 标准曲线制备 采用药典苯酚-硫酸法^[1]。分别精密量取葡萄糖对照品溶液 1,2,3,4,6,8,10 mL 置 25 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。取上述溶液各 1 mL,置具塞试管中,加入 4% 苯酚溶液 0.5 mL,混匀,缓慢滴加浓硫酸 3 mL,摇匀,在沸水中放置 20 min,取出放冷。于 490 nm 处测定吸光度 A ,以质量浓度(C)为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0128C + 0.0086$ ($R^2 = 0.9997$),线性范围 0.01 ~ 0.1 g·L⁻¹。试验仪器精密度良好(RSD 0.3%),平均加样回收率 99.76%(RSD 0.5%)。

2.3.3 精制巴戟天低聚糖及换算因子计算^[8] 取 2.1 项下样品溶液过活性炭柱除杂,用 D-900 型大孔树脂进行纯化,循环上柱数 > 2 次,用水冲洗至洗脱液糖显色反应为阴性,合并无色水洗脱液,减压浓缩成稠膏,冷冻干燥成固体,加入 5 倍量水水浴回流溶解后,趁热过滤,待滤液冷却至常温后,加乙醇至体积分数 90%,搅拌均匀,常温静置 4 d,过滤,收集沉淀,减压干燥,得巴戟天低聚糖固体约 4.8 g。

精密称取巴戟天低聚糖 5.0 mg,加水溶解并定容至 50 mL 量瓶中,得供试品溶液。精密量取 1.0 mL,照 2.3.2 项下方法测定 A ,计算供试液中葡萄糖含量。以 $f = M_1/M_2$ 计算换算因子(M_1 为供试液中低聚糖实际质量 5.0 mg, M_2 为测定值),得 $f = 0.09$ 。

巴戟天低聚糖质量分数 = $C \cdot V \cdot f / m \times 100\%$

式中 C 为巴戟天低聚糖待测液中葡萄糖的质量浓度, f 为换算因子, m 为称取低聚糖的质量, V 表示低聚糖待测液总体积。

2.4 树脂预处理^[9] 称取适量 D-900 型大孔吸附树脂,加 85% 乙醇浸泡 24 h,湿法装柱,用 8 倍柱体积 (bed volume, BV) 水动态清洗树脂,水洗至无醇味,用 5% 盐酸 1 BV 浸泡 6 h,水洗至中性,用 5% 氢氧化钠 1 VB 浸泡 6 h,水洗至中性,用水浸泡,备用。

2.5 大孔树脂纯化工艺优选

2.5.1 上样液质量浓度考察 称取巴戟天药材粉末 100 g,共 4 份,按 2.1 项下方法制备样品溶液,减压回收乙醇至无醇味,加入 40% 乙醇稀释至质量浓度分别为 20,40,80,120 g·L⁻¹ 的样品溶液,依次加至已处理好的装有 200 mL D-900 型大孔吸附树脂

柱上,径高比 1:6,以相同流速进行动态吸附,用 40% 乙醇洗至蒽酮-浓硫酸溶液指示吸附终点确认样品溶液得以充分吸附,用水洗至蒽酮-浓硫酸反应呈阴性,分别水浴蒸干 40% 乙醇流出液、水洗脱液至呈固体。测得洗脱物中耐斯糖吸附-洗脱率分别为 64.6%,89.6%,83.3%,81.2%;巴戟天低聚糖吸附-洗脱率分别为 68.5%,90.2%,86.3%,79.0%,故选择上样液质量浓度 40 g·L⁻¹。

吸附量 = 上样液中成分含量 - 40% 乙醇流出液中成分含量

吸附-洗脱率 = 水洗脱液中成分含量/吸附量 × 100%

2.5.2 吸附流速考察 取 40 g·L⁻¹ 样品液 100 mL,共 4 份,分别以 1,2,3,4 BV·h⁻¹ 的流速通过 4 根已处理好的 D-900 型树脂柱(湿树脂体积 200 mL,下同),利用薄层色谱法检查流出液,待流出液中有与耐斯糖对照品呈相同斑点时,停止上样,水洗至蒽酮-浓硫酸反应呈阴性,分别收集 40% 乙醇流出液、水洗脱液,水浴浓缩呈固体,计算吸附-洗脱率,见表 1。结果表明不同流速对 D-900 型树脂的吸附能力影响较大,综合分析,确定吸附流速以 3 BV·h⁻¹ 为宜。

表 1 巴戟天低聚糖大孔树脂纯化工艺的吸附流速考察
Table 1 Inspection of adsorption velocity in purification process of oligosaccharides from Morindae Officinalis Radix

吸附流速 /BV·h ⁻¹	吸附量/g		水洗脱液中 质量/g		吸附-洗脱率 /%	
	耐斯糖	低聚糖	耐斯糖	低聚糖	耐斯糖	低聚糖
1	0.09	0.45	0.06	0.32	66.67	71.11
2	0.15	0.68	0.12	0.54	80.00	79.41
3	0.21	0.86	0.18	0.79	85.71	91.86
4	0.22	0.88	0.18	0.73	81.82	82.95

2.5.3 树脂径高比考察 取等量 40 g·L⁻¹ 样品液 3 份,每份 100 mL,上样至已处理好的径高比分别为 1:4,1:6,1:8 的 D-900 型大孔树脂柱,以流速 3 BV·h⁻¹ 进行吸附,吸附完成后用水洗脱,水洗至蒽酮-浓硫酸反应呈阴性,水浴蒸干浓缩洗脱液。结果耐斯糖吸附-洗脱率分别为 62.5%,89.6%,86.0%;巴戟天低聚糖吸附-洗脱率分别为 68.5%,92.1%,88.3%。故确定选用径高比 1:6。

2.5.4 泄露曲线 称取 D-900 型大孔吸附树脂适量,湿法装柱(径高比 1:6,湿树脂体积 200 mL),取 40 g·L⁻¹ 样品液上样,以流速 3 BV·h⁻¹ 动态吸附,按份收集流出液。每 10 mL 收集为 1 份,共收集 30

份。每份取流出液适量,按 2.2 项下方法测定耐斯糖含量,绘制泄露曲线,见图 1。结果显示上样 200 mL 后(第 20 份)耐斯糖开始明显泄露,故确定最大上样量 8 g,即最佳上样量与树脂体积比为 1:25。

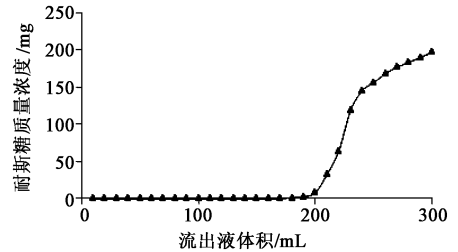


图 1 巴戟天低聚糖 D-900 型大孔树脂纯化工艺的泄露曲线
Fig.1 Leakage curve of purification process of oligosaccharides from Morindae Officinalis Radix

2.5.5 洗脱剂考察 量取适量 40 g·L⁻¹ 样品液,分别通过 4 根 D-900 型大孔吸附树脂柱(湿树脂体积 200 mL),按优选的上样量进行动态吸附,待吸附完成后,用水和体积分数分别为 5%,10%,15% 的乙醇洗脱至蒽酮-浓硫酸溶液反应呈阴性。收集洗脱液分别蒸干,称定质量,测得耐斯糖质量分数依次为 8.96%,8.02%,6.58%,2.96%,吸附-洗脱率分别为 85.71%,78.51%,76.92%,83.33%;巴戟天低聚糖质量分数分别为 39.30%,37.97%,34.21%,23.70%,吸附-洗脱率分别为 91.86%,88.75%,83.87%,76.19%。说明不同体积分数乙醇不能将耐斯糖、巴戟甲素等水溶性低聚糖分离彻底,洗脱效果比水差,故选用水为洗脱剂。

2.5.6 洗脱流速考察 D-900 型树脂按上述确定的吸附条件吸附饱和后,分别用水以 1,2,3,4 BV·h⁻¹ 的流速进行洗脱,考察不同流速对洗脱的影响,结果见表 2。故确定洗脱流速 2 BV·h⁻¹。

表 2 巴戟天低聚糖大孔树脂纯化工艺的洗脱流速考察
Table 2 Inspection of eluting velocity in purification process of oligosaccharides

洗脱流速 /BV·h ⁻¹	吸附量/g		水洗脱液中 质量/g		吸附-洗脱率 /%	
	耐斯糖	低聚糖	耐斯糖	低聚糖	耐斯糖	低聚糖
1	0.21	0.86	0.11	0.52	52.38	60.47
2	0.22	0.85	0.18	0.79	81.82	92.94
3	0.23	0.84	0.18	0.77	78.26	91.67
4	0.22	0.85	0.17	0.76	77.27	89.41

2.5.7 洗脱剂用量考察 精密量取适量 40 g·L⁻¹

样品溶液上柱,按上述确定的吸附条件吸附饱和后,用水洗脱,收集水洗脱液,每 200 mL 收集 1 份,共收集 20 份,测定,绘制洗脱曲线,见图 2。说明当收集洗脱溶剂 12 份(2.4 L)时,可同时 will 低聚糖和耐斯糖洗脱完全,故确定洗脱剂用量 12 BV。

2.6 验证试验 按优选的纯化工艺进行 3 批验证试验,收集水洗脱液,减压干燥,得巴戟天低聚糖纯化部位,按 2.2 和 2.3 项下方法测定^[10],见表 3。结果显示耐斯糖、巴戟天低聚糖含量、吸附-洗脱率较高,重复性好,说明优选的工艺稳定可行。

表 3 巴戟天低聚糖大孔树脂纯化工艺验证试验

Table 3 Verification test of purification process of oligosaccharides from *Morindae Officinalis Radix*

批号	吸附量/g		水洗脱液中质量/g		吸附-洗脱率/%		低聚糖转移率/%
	耐斯糖	低聚糖	耐斯糖	低聚糖	耐斯糖	低聚糖	
141101	1.30	5.36	1.16	5.05	90.77	94.22	91.82
141102	1.28	5.35	1.16	5.06	90.63	94.58	92.01
141103	1.29	5.33	1.17	5.04	90.70	94.56	91.64

注:药材投料量均为 50 g。

3 讨论

巴戟天中提取的低聚糖分为醇溶性糖和水溶性低聚糖,均能与显色剂蒽酮-浓硫酸溶液呈颜色反应。在吸附流速、泄露曲线考察过程中,显色剂无法判断水溶性低聚糖是否被树脂吸附或泄露。为了解决 D-900 型树脂分离醇溶性低聚糖的干扰,拟通过测定 40% 乙醇流出液中水溶性低聚糖主要成分耐斯糖的含量进行判断,也可采用点薄层板与耐斯糖对照品斑点位置一致进行定性分析,以确定水溶性低聚糖泄露或充分吸附。

本文通过考察水和不同体积分数乙醇洗脱剂的洗脱效果,确定水作为纯化水溶性低聚糖部位的洗脱剂^[11]。研究发现树脂使用数 > 4 次后,树脂颜色会变深,吸附能力随之降低,应进行再生处理。有效的再生处理方式不仅能节约成本,而且不影响分离纯化效果。预试验对树脂再生也进行了研究,建议树脂的再生处理方法为在树脂柱内加入高于树脂层 10 cm 的 2% ~ 3% 盐酸溶液浸泡 4 ~ 6 h,用同样浓度的盐酸溶液 2 BV 过柱冲洗,水冲洗至流出液接近中性;同上用 3% ~ 5% 氢氧化钠乙醇溶液浸泡 6 ~ 8 h,用 3% ~ 5% 氢氧化钠乙醇溶液 2 ~ 4 BV 冲洗,水洗至流出液 pH 为中性,即可再次投入使用。

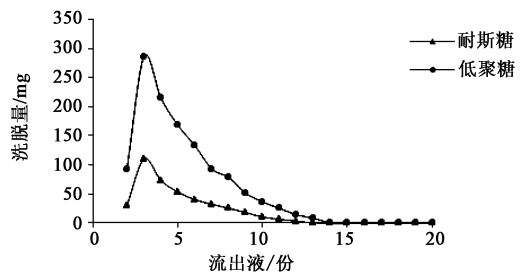


图 2 巴戟天低聚糖 D-900 型大孔树脂纯化工艺的洗脱剂用量考察
Fig. 2 Inspection of quantity of eluent in purification process of oligosaccharides

化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 286-290.

[2] 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: 75, 78.

[3] 陈地灵, 张鹏, 林励, 等. 巴戟天低聚糖对 $A\beta_{25-35}$ 致拟痴呆模型大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1306-1309.

[4] 张鹏, 陈地灵, 林励, 等. 巴戟天水提液对自然衰老小鼠脑组织中单胺类神经递质含量的影响[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(6): 79-81.

[5] 邹连勇, 马远林, 宓为峰, 等. 巴戟天寡糖对海马神经细胞再生及神经元生长的影响[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(22): 2623-2626.

[6] 刘建金. 巴戟天多糖对抑郁症大鼠氧化应激及认知行为的影响[J]. 中国现代医生, 2011, 49(16): 1-2.

[7] 邓少东, 肖凤霞, 林励, 等. 亲水作用色谱-蒸发光散射检测器联用法同时测定巴戟天中 5 种低聚糖的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3446-3450.

[8] 杨武德, 李聪. 大黄生品及炮制品中总糖及多糖的含量测定[J]. 中国药房, 2010, 21(19): 1759-1761.

[9] 徐莲英, 候世祥. 制药工艺技术解析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 77-91.

[10] 刘涛, 郭晓恒, 吴春梅, 等. 肺毒清颗粒中有效成分的含量测定及转移率考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 54-56.

[11] 陈强. 大孔吸附树脂在中药新药制备工艺中的应用[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(2): 67-70.

[参考文献]

[1] 张旭, 王锦玉, 全燕, 等. 大孔树脂技术在中药提取纯

[责任编辑 刘德文]