

· 工艺与制剂 ·

大孔树脂纯化浙贝母中总生物碱工艺优选

董洁¹, 朱会敏¹, 胡凯文², 安超², 韩立炜^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂纯化浙贝母中总生物碱的工艺。方法: 通过静态、动态吸附和解吸动力学试验, 筛选最佳大孔树脂型号, 并优选其纯化工艺。结果: 最佳纯化工艺为采用 HPD100 型大孔树脂, 径高比 1:9, 上样液 pH 8.0, 上样液生药质量浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样体积 13 BV, 吸附流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 8 BV 水洗除杂, 用 10 BV 80% 乙醇洗脱, 洗脱流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集 80% 乙醇洗脱液。优选的纯化工艺可使浙贝母总生物碱含量 $> 65\%$ 。结论: HPD100 型大孔树脂对浙贝母总生物碱的富集综合性较好, 适用于其分离纯化。

[关键词] 浙贝母; 总生物碱; 大孔树脂; 纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)14-0018-05

Optimization of Purification Process for Total Alkaloids from *Fritillaria thunbergii* by Macroporous Resin

DONG Jie¹, ZHU Hui-min¹, HU Kai-wen², AN Chao², HAN Li-wei^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Oriental Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total alkaloids from *Fritillaria thunbergii* by macroporous resin. **Method:** Optimum macroporous resin and its purification process was selected by static and dynamic adsorption and desorption kinetics test. **Result:** Optimal purification process conditions were: optimal macroporous resin type HPD100, diameter-height ratio 1:9, the concentration of sample solution $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with pH as 8.0, maximum sample volume 13 BV, flow rate of adsorption and elution $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, washed by 8 BV water and 10 BV 80% ethanol, collected eluent of 80% ethanol. Under this optimized technology, the content of total alkaloids was more than 65% by UV. **Conclusion:** HPD100 type macroporous resin showed good comprehensive adsorption property for enrichment of total alkaloids from *F. thunbergii*, and suitable for separation and purification of it.

[Key words] *Fritillaria thunbergii*; total alkaloids; macroporous resin; purification

浙贝母味苦性寒, 归肺、心经, 具有化痰止咳、清热散结之功效。其开泄力大, 清火散结力强, 可用于

咳嗽、瘰疬、癭瘤、疮痍等症。现代研究发现浙贝母中总生物碱具有抗肿瘤作用^[1-3]。本试验为避免中药成分复杂给新药研发带来不稳定性, 拟在以往研究基础上^[4]以浙贝母提取物为研究对象, 采用大孔树脂吸附分离技术进行纯化, 通过静态和动态吸附解析动力学变化试验, 筛选最佳纯化树脂, 并优化其分离工艺。

1 材料

SP-752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司), PHS-25C 型数字酸度计(上海鹏顺科

[收稿日期] 20120229(008)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-346); 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队项目(2011-CXTD-13)

[第一作者] 董洁, 在读硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: djmk_paradise@163.com

[通讯作者] * 韩立炜, 教授, 从事中药新制剂与新技术研究, Tel: 010-84738616, E-mail: bjhlw@126.com

学仪器有限公司),浙贝母[北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,经本校杨瑶珺副教授鉴定为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎],实验所用树脂均购自沧州宝恩吸附材料有限公司,贝母甲素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110750-200609),所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总生物碱含量测定^[5-7]

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取贝母甲素对照品 4.03, 3.07 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加二氯甲烷溶解定容, 即得 0.161 2, 0.148 g·L⁻¹ 的对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定浙贝母粉末(过 60 目筛) 2 g, 用氨水 1 mL 润湿 15 min, 加乙醚-三氯甲烷-无水乙醇(25:8:2.5) 20 mL, 称重, 超声提取 40 min, 称重, 用溶剂补足质量, 离心(3 500 r·min⁻¹, 5 min)。精密吸取上清液 5 mL, 水浴挥干溶剂, 残渣加二氯甲烷溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.1.3 最大吸收波长的确定 精密吸取供试品溶液 2 mL, 对照品溶液 0.8 mL(0.161 2 g·L⁻¹), 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入显色剂溶液 10 mL[① pH 7.6 的磷酸二氢钠-氢氧化钠缓冲液(磷酸二氢钠 1.56 g 加水溶解并定容至 100 mL); ② 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液(氢氧化钠 0.8 g 加水溶解并定容至 100 mL), 将②缓慢加入①中, 调 pH 7.6, 将溴麝香草酚蓝 0.02 g 溶于 pH 7.6 的缓冲液 90 mL 中, 即得显色剂溶液], 用二氯甲烷定容, 充分摇匀后移入分液漏斗中, 静置 40 min, 分取二氯甲烷层, 置预先放有 0.20 g 无水硫酸钠(预先于 105 °C 加热 1 h) 的具塞锥形瓶中, 密闭摇匀, 取上清液。另取二氯甲烷, 以同样方法操作, 作为空白对照。于 200 ~ 600 nm 波长进行扫描。结果对照品溶液在 411 nm 处有最大吸收, 供试品溶液在 415 nm 处有最大吸收, 故最后选择 415 nm 为测定波长。

2.1.4 标准曲线的建立 精密吸取贝母素甲对照品溶液(0.161 2 g·L⁻¹) 0.5, 0.8, 1.4, 1.7, 2.0, 2.3 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 按 2.1.3 项下方法操作, 于 415 nm 处测定吸光度(A)。以 A 对贝母素甲质量进行线性回归, 得回归方程 $A = 3.036 7 m + 0.003 5$ ($r = 0.999 0$)。结果表明贝母素甲在 0.08 ~ 0.37 mg 与 A 呈良好线性关系。

2.1.5 重复性试验 取同一批浙贝母粉末(过 60 目筛) 6 份, 各 2 g, 按 2.1.2 及 2.1.3 项下方法操

作, 测定, 结果浙贝母总生物碱平均质量分数为 0.125%, RSD 2.14%, 表明该方法重复性良好。

2.1.6 精密度试验 精密量取浙贝母供试品溶液 3 mL, 按 2.1.3 项下方法操作, 重复测定其 A 6 次, RSD 0.21%, 表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 精密量取浙贝母供试品溶液 3 mL, 按 2.1.3 项下方法操作, 每隔 15 min 测定 1 次 A, 结果表明浙贝母生物碱与染料形成的离子对在 150 min 内稳定, RSD 0.84%。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取浙贝母供试品溶液 1 mL, 精密加入贝母素甲对照品溶液(质量浓度 0.148 g·L⁻¹) 0.45 mL, 按 2.1.3 项下方法操作, 测定并计算加样回收率。结果平均回收率为 101.49%, RSD 2.08%。结果见表 1。

表 1 浙贝母总生物碱回收率试验

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回 收率/%	平均回收 率/%	RSD /%
1	0.064 2	0.066 6	0.133 5	104.17	101.49	2.08
2	0.061 2	0.066 6	0.126 8	98.40		
3	0.061 7	0.066 6	0.129 1	101.27		
4	0.064 2	0.066 6	0.131 5	101.13		
5	0.063 3	0.066 6	0.131 5	102.47		
6	0.061 9	0.066 6	0.132 9	106.52		

2.2 浙贝母总生物碱提取物制备^[4] 6 倍量 2% 盐酸溶液提取 2 次, 每次 1 h, 浓缩, 离心, 收集上清液。上清液调 pH 9.0, 用等体积二氯甲烷提取 4 次, 收集二氯甲烷层, 回收溶剂, 蒸干。

2.3 大孔树脂类型优选 根据大孔树脂 HPD100, HPD722, X-5 型和阳离子交换树脂 001 × 7 型的静态吸附和解析动力学变化、动态吸附和解析动力学变化筛选树脂。

2.3.1 静态试验^[8-9]

2.3.1.1 静态吸附试验 将提取物用 2% HCl 溶解, 过滤, 滤液调 pH 8.0(经阳离子交换树脂富集者调 pH 5.0), 过滤。滤液用 pH 8.0 或 5.0 的水液将滤液稀释至一定浓度, 即为上样液。量取处理好的各型号树脂 18 mL, 抽干后分别置上样液中, 摇床于 25 °C 下振荡(160 r·min⁻¹) 6 h, 每隔 0.5 h 取样。用 2.1 项下酸性染料比色法测定各取样液中总生物碱含量, 计算静态饱和和比吸附量。以时间为横坐标, 比吸附量为纵坐标, 绘制静态吸附动力学变化曲线。结果见图 1。

2.3.1.2 静态解吸试验 过滤静态饱和和吸附的树

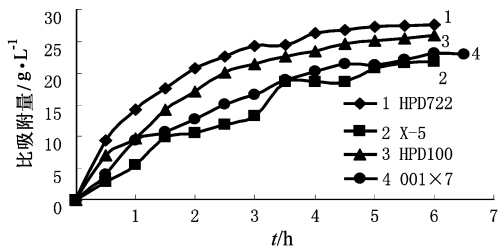


图 1 总生物碱于不同型号大孔树脂中静态吸附动力学变化曲线
脂,水洗至流出液无色,吸干树脂表面水分,加入 95% 乙醇(经离子交换树脂富集者为 90% 氨水-乙醇),摇床室温下振荡 5 h,每隔 0.5 h 取样。测定总生物碱含量,计算静态比解吸量和解吸率,绘制静态解吸动力学变化曲线。结果见图 2。静态试验结果见表 2。

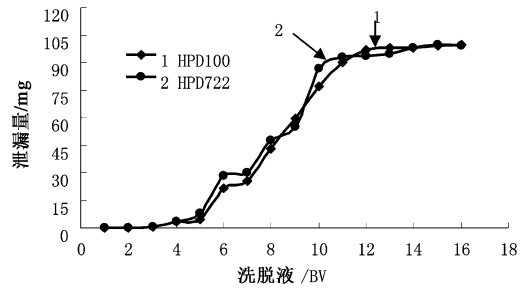


图 3 总生物碱泄漏曲线

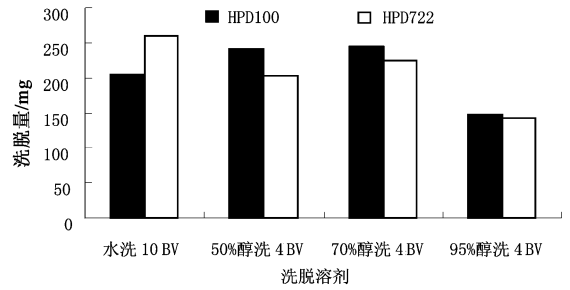


图 4 不同洗脱溶剂对总生物碱洗脱量对比

2.4.1 上样液 pH 考察 将 pH 分别为 7.0, 8.0, 9.0 的浙贝母总生物碱上样液(生药质量浓度 $10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)各 50 mL, 分别缓缓加于径高比 1:7 的 HPD100 树脂柱(直径 1.5 cm)上, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。上样完成后,用蒸馏水洗脱至流出液糖检识反应为阴性,收集上样流出液和水洗脱液;用 95% 乙醇洗脱至生物碱显色反应为阴性,收集醇洗脱液。测定各洗脱液中总生物碱质量分数分别为 66.77%, 70.20%, 63.78%; 吸附量分别为 196.06, 192.62, 119.47 mg。故确定最佳上样 pH 8.0。

2.4.2 上样液浓度考察 将 pH 8.0、生药质量浓度分别为 10, 5, 2.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浙贝母总生物碱上样液各 100, 200, 400 mL, 缓缓加于径高比 1:7 的 HPD100 型树脂柱(直径 1.5 cm)上, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。其余步骤同 2.4.1 项下操作。结果见表 3。

表 3 总生物碱上样液浓度考察

上样浓度/ 生药·mL ⁻¹	上样液中总碱 含量/mg	泄漏量 /mg	吸附量 /mg	吸附时间 /min
10	585.15	45.84	539.31	100
5	639.90	18.99	620.91	200
2.5	667.28	34.23	633.05	400

由表 3 可知,在上样量一定的前提下,质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 泄漏最少,吸附率最高,综合考虑吸附时间,故选择生药质量浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为最佳。

2.4.3 上样流速考察 将 pH 8.0, 质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3 份浙贝母总生物碱上样液 200 mL, 缓缓加

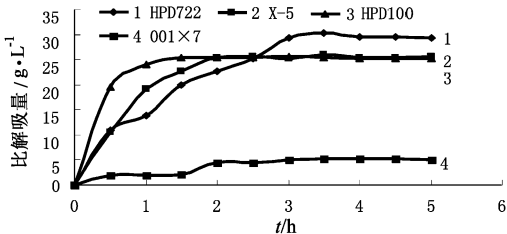


图 2 总生物碱于不同型号大孔树脂中静态解吸动力学变化曲线

表 2 总生物碱于不同大孔树脂中静态试验 (n=2)

树脂型号	比吸附量 /g·L ⁻¹	解吸率 /%	吸附饱和 时间/h	解析平衡 时间/h
HPD722	27.64	104.13	5.0	4.0
HPD100	25.94	97.28	5.5	1.5
X-5	21.84	117.31	5.5	3.0
001×7	22.95	22.47	6.0	3.5

由静态试验结果可知,确定较优吸附树脂型号为 HPD722, HPD100。采用动态试验进一步筛选。

2.3.2 动态试验^[10-11] 将上样液缓缓加于 HPD100 和 HPD722 型树脂柱(直径 1.5 cm, 径高比 1:7), 每 1 BV 为 1 个流份, 测定各流份中总生物碱含量, 绘制泄漏曲线(图 3)。将吸附饱和的树脂, 分别用 10 BV 水和 50% 乙醇, 70% 乙醇, 95% 乙醇各 4 BV 洗脱, 收集乙醇洗脱液, 测定各洗脱液中总生物碱含量, 绘制不同溶剂洗脱量对比图(图 4)。

由图 3 结果表明 HPD722 型树脂比 HPD100 型树脂泄漏略早; 由图 4 可知 HPD722 型树脂总洗脱量比 HPD100 型树脂低, 综合考虑动态和静态试验结果, 最终确定 HPD100 型大孔树脂为浙贝母总生物碱最佳纯化树脂。

2.4 HPD100 型大孔树脂纯化工艺参数考察^[12]

于径高比 1:7 的 HPD100 型树脂柱(直径 1.5 cm)上,流速分别为 0.5, 1, 2 mL·min⁻¹。上样完成后,用蒸馏水洗脱至流出液糖检识反应为阴性,收集上样流出液和水洗脱液。测定总生物碱含量,计算比吸附量分别为 26.60, 26.12, 24.09 g·L⁻¹;吸附率依次为 89.47%, 87.86%, 81.04%。说明上样量一定且吸附完全的前提下,随流速加快,比吸附量减少,0.5, 1 mL·min⁻¹比吸附量无明显差异,综合考虑时间因素,故选择 1 mL·min⁻¹为最佳上样流速。

2.4.4 径高比考察 将 pH 8.0、生药质量浓度为 5 g·mL⁻¹的浙贝母总生物碱上样液 140, 200, 260, 315, 365 mL, 分别缓缓加于径高比 1:5, 1:7, 1:9, 1:11, 1:13 的 HPD100 型树脂柱(直径 1.5 cm)上,流速 1 mL·min⁻¹。上样完成后,用水洗脱至流出液糖检识反应为阴性,收集上样流出液和水洗脱液;用 95% 乙醇洗脱至生物碱显色反应为阴性,收集醇洗脱液。测定各洗脱液中总生物碱含量,计算比吸附量、吸附率、比解析量、解吸率。综合各因素选出最佳径高比。结果见表 4。

表 4 总生物碱大孔树脂纯化工艺径高比考察($n=2$)

径高比	比吸附量 /g·L ⁻¹	吸附率 /%	比解析量 /g·L ⁻¹	解吸率 /%	总生物碱含量/%
1:5	23.05	73.80	21.92	95.08	62.55
1:7	23.56	75.15	18.95	80.43	63.51
1:9	24.84	79.06	23.51	94.61	68.09
1:11	26.07	82.20	20.11	77.15	60.76
1:13	25.19	82.75	20.41	81.02	62.88

由表 4 结果可知,比上样量一定且上样均泄漏的前提下,径高比为 1:11 时比吸附量最大。而径高比为 1:9 时,比解析量最大,含量最高。故选择 1:9 为最佳径高比。

2.4.5 泄漏曲线绘制 按上述所确定的吸附条件上样,每 1 BV 收集 1 次,收集 3 份后,每 2 BV 收集 1 次,再收集 9 份。用酸性染料比色法测定各流份中总生物碱含量。绘制泄漏曲线见图 5。

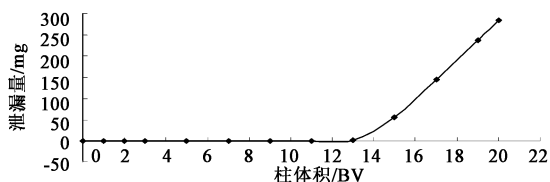


图 5 浙贝母总生物碱泄漏曲线

由图 5 知,上样量为 13~15 BV 时明显泄漏,故

确定生药质量浓度 5 g·mL⁻¹的上样液最大上样 13 BV。

2.4.6 水洗倍数考察 按上述所确定的吸附条件上样完成后,用 10 BV 蒸馏水洗脱,每 1 BV 收集 1 次,第 5, 6 BV 收集 1 次,第 7, 8 BV 收集 1 次,第 9, 10 BV 收集 1 次。同时用糖检识反应检测流出液。结果表明,8 BV 时糖检识反应呈阴性,故选择 8 BV 为最佳水洗倍数。

2.4.7 醇体积分数考察 将 2.4.6 项下已吸附树脂,分别用体积分数为 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95% 的乙醇洗脱,收集洗脱液。用酸性染料比色法测定各洗脱液中总生物碱含量。绘制洗脱量对比图见图 6。

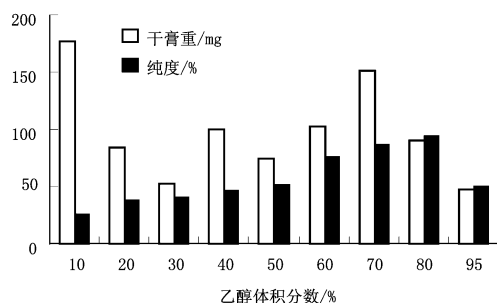


图 6 不同体积分数乙醇对总生物碱的洗脱量

由图 6 可知,70% 乙醇洗脱量比 80% 乙醇大,但 80% 乙醇洗脱时浙贝母总生物碱的含量较高,故确定选择 80% 乙醇洗脱。

2.4.8 醇洗脱流速的考察 按上述所确定的最优条件上样,先用水洗脱后,用 80% 乙醇 10 BV 洗脱,流速分别为 1, 2, 3 mL·min⁻¹,收集洗脱液。测定总生物碱含量分别为 67.61%, 65.67%, 64.26%;计算解吸率分别为 80.84%, 78.60%, 76.01%;出膏量分别为 111.65, 111.45, 110.15 mg。说明各流速出膏量无明显差异,随流速的加快,解吸率和含量均降低,故选择 1 mL·min⁻¹为最佳洗脱流速。

2.4.9 洗脱曲线绘制 按上述所确定的最优条件上样洗脱,每 1 BV 收集 1 次洗脱液。测定每个流份中总生物碱含量,计算解吸量和解吸率。纵坐标绘制洗脱曲线。结果见图 7。

由图 7 可知,10 BV 基本洗脱完全,故选择 10 BV 为最佳洗脱剂用量。

2.4.10 验证试验 按最佳工艺条件,即径高比 1:9 的 HPD100 型大孔树脂,上样液 pH 8.0,上样液生药质量浓度 5 g·mL⁻¹,上样体积 13 BV,吸附流速 1 mL·min⁻¹;用 8 BV 水洗除杂,用 10 BV 80% 乙醇洗

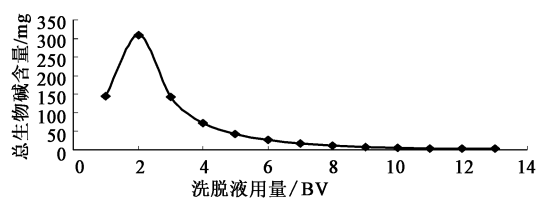


图 7 HPDI00 树脂 80% 乙醇洗脱曲线

脱,洗脱流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集 80% 乙醇洗脱部分,对浙贝母总生物碱提取物进行纯化,测定各洗脱液中总生物碱含量,计算比吸附量、解吸率、含量、保留率。结果见表 5。

表 5 总生物碱大孔树脂纯化工艺验证试验

树脂柱	比吸附量 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	解吸率 $/\%$	含量 $/\%$	保留率 $/\%$
1	32.05	96.05	66.98	86.93
2	31.95	92.89	67.14	83.81
3	32.03	97.68	68.83	88.36
平均值	32.01	95.54	67.66	86.37

注:上样量为 $36.98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

由结果可知,采用该优选工艺分离纯化浙贝母总生物碱稳定可行。

3 讨论

本试验选用的浙贝母药材中总生物碱含量为 0.125%,采用大孔树脂提取分离纯化后其纯度 >65%,提高了 520 倍,为浙贝母生物碱制剂的开发奠定了很好的基础。上样液的澄清度对大孔树脂吸附影响十分重要,因此在上样液制备的每个过程都需要保证上样液的澄清,否则易堵塞并污染树脂,降

低树脂的效能。

[参考文献]

- [1] 胡凯文,陈信义. 中药活性成分抗耐药肿瘤细胞体外筛选研究[J]. 中国医药学报, 1998,13(2):10.
- [2] 胡凯文,郑洪霞,齐静,等. 浙贝母碱逆转白血病细胞多药耐药的的研究[J]. 中华血液学杂志, 1999, 12(11):650.
- [3] 李冬云,陈信义,姜靖雯. 复方浙贝颗粒研究现状与应用前景分析[J]. 中国药物与临床, 2009,9(2):85.
- [4] 董洁,朱会敏,韩立炜,等. 浙贝母总生物碱提取富集工艺研究[C]. 昆明: 中药制剂创新与发展论坛, 2011:165.
- [5] 马卫成,盛振华,戎建辉. 不同产地浙贝母总生物碱的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7):1495.
- [6] 李建伟. 酸性染料比色法测定苦参药材中总生物碱的含量[J]. 长治医学院学报, 2007,21(5):331.
- [7] 辛海量,赵玉海,林峰,等. 苦豆草中总生物碱含量测定[J]. 解放军药学报, 2002,18(2):113.
- [8] 金莹,孙爱东. 大孔树脂纯化苹果多酚的研究[J]. 食品科学, 2007,28(4):160.
- [9] 赵大洲,戴胜军. 大孔树脂分离夏天无总生物碱的研究[J]. 中成药, 2006,28(2):182.
- [10] 张郁松. 大孔树脂法纯化辣椒碱的工艺[J]. 食品研究与开发, 2009,30(2):31.
- [11] 冯颖,武美玲,李天来,等. 大孔树脂纯化长白楸木嫩芽皂苷的特性研究[J]. 食品科学, 2010,31(4):73.
- [12] 段芳,孟江,周毅生,等. 黄连中生物碱有效部位纯化工艺研究[J]. 中国药师, 2009,12(4):429.

[责任编辑 全燕]