

弱酸性离子交换树脂纯化黄连总生物碱

陈奇, 邓雁如*, 于静, 夏娜
(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 探寻大孔树脂纯化黄连总生物碱的工艺条件, 为规模化生产提供可行性方案。方法: 以盐酸小檗碱含量为指标对 D101, AB-8, D151 等大孔树脂纯化总黄连生物碱的效果进行考察。结果: D151 型弱酸性离子交换树脂对总生物碱的吸附能力明显强于其他树脂, 适宜的工艺条件为生药质量浓度 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样, 上样量 9 BV, 水洗体积 2 BV, 酸洗浓度为 $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 用量 5 BV。此条件下, 所得浸膏量减少 60% 以上, 总生物碱质量分数达 80% 以上, 样品回收率在 70% 以上。结论: D151 型弱酸性离子交换树脂对黄连总生物碱的纯化效果较好, 其载药量较大, 适合规模化生产。

[关键词] 总生物碱; 盐酸小檗碱; 纯化; 大孔树脂; D151

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0009-04

Purification of Total Alkaloid from Rhizoma Coptidis by Weakly Acidic Ion Exchange Resin

CHEN Qi, DENG Yan-ru*, YU Jing, XIA Na
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the purification technology of total alkaloids from Rhizoma Coptidis by macroporous resin, and to provide feasible program for large-scale manufacture. **Method:** Evaluated the effect of purification of total alkaloids from Rhizoma Coptidis by D101, AB-8 and D151 resins respectively with the indicator of the content of berberine. **Result:** It has been found that D151 resin's adsorption capacity of total alkaloids was the best in those three resins. The optimum process was as follows: the concentration of the sample solution was $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with 9 times the amount of resin volume, washed 2 times the amount of resin volume by distilled water and 5 times the amount of resin volume by $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of HCl solution. Under those conditions, more than 60% extract was reduced with the proportion of total alkaloid in excess of 80%, and 70% of sample recover. **Conclusion:** D151 resin is suitable for industrial production for excellent drug loading and purification.

[Key words] total alkaloid; berberine; purification; macroporous resin; D151

黄连为毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎, 为清热类药物, 味苦、性寒, 具有清热燥湿、泻火解毒等功效。黄连是治疗糖尿病的中药复方中常用的一味药, 经药效学研究证明, 其总生物碱

为有效部位, 所含的多种生物碱中主要成分是小檗碱、黄连碱、甲基黄连碱、巴马汀、药根碱、表小檗碱和木兰花碱等^[1], 其中最主要的是小檗碱。市售黄连类药品中主要生物碱成分多以盐酸盐形式存在, 为强酸弱碱盐。本研究利用生物碱的弱碱性及产品的盐酸盐形式的特点, 运用弱酸性阳离子交换树脂中含有的酸性反应基团, 如羧基, 能在水中离解出 H^+ 而呈酸性, 树脂离解后的带负电基团, 如 $\text{R}-\text{COO}^-$, 能与溶液中的其他阳离子(如季铵型氮离子)吸附结合, 从而产生阳离子交换作用的原理, 选择弱酸性阳离子交换树脂作为载体纯化生物碱类成

[收稿日期] 20110105(014)

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(2009CB523003); 国家自然科学基金项目(81073033)

[第一作者] 陈奇, 硕士, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 13821280193, E-mail: chenqi-qq@163.com

[通讯作者] * 邓雁如, 教授, 博士, 从事中药学研究, E-mail: dyanru@sina.com

分,与传统类型的树脂对比纯化的效果,筛选出纯化黄连总生物碱的工艺条件。

1 材料

UV2401-PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),D101,AB-8,D151 型树脂(南开和成公司),甲醇、乙醇(天津江天化工);黄连药材为市售品,经天津中医药大学中药学院李天祥教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎,盐酸小檗碱对照品(批号 110713-200911),盐酸巴马汀对照品(批号 110732-200907),盐酸药根碱(批号 110733-200806)均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 总生物碱含量的测定^[2]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的盐酸小檗碱对照品 10.31 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入盐酸-甲醇(1:100)溶液少量,超声溶解,标定至刻度,摇匀,即得盐酸小檗碱对照品溶液。盐酸巴马汀、盐酸药根碱对照品溶液的制备步骤同上。

2.1.2 供试品溶液的制备 取黄连粉末约 0.2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)溶液 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液 2 mL 于 10 mL 量瓶中,盐酸-甲醇(1:100)溶液定容至刻度,即得供试品溶液^[3]。

2.1.3 吸收波长的确定 取上述 4 种待测溶液于 200~500 nm 扫描,4 者在波长 349 nm 处有较大重叠吸收峰,故选取 349 nm 为检测波长。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密移取上述盐酸小檗碱对照品溶液 0,0.5,1.0,1.5,2.0,3.0 mL 分别至 25 mL 量瓶中,用盐酸-甲醇(1:100)溶液定容至刻度,摇匀,在 349 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,0~21.48 mg·L⁻¹的质量浓度与吸光度呈良好的线性关系,得回归方程 $Y = 0.0724X + 0.0074 (r = 0.9995)$ 。

2.2 大孔树脂的筛选^[4]

2.2.1 树脂的预处理 D101,AB-8 2 种大孔树脂均用 95% 乙醇浸泡 24 h,每隔一段时间充分搅拌 1 次,重复浸泡 3 次,之后湿法装柱,以 95% 乙醇冲洗至流出液与蒸馏水 1:3 的比例混合不产生浑浊为止,然后用蒸馏水冲洗至无醇味,备用;D151 树脂用蒸馏水清洗至无明显杂质,浸泡 24 h 后用 4% 氨水浸泡 2~4 h,以 1 BV·h⁻¹ 速度通过,再用 50 °C~90

°C 热水冲洗至无氨水味,蒸馏水冲洗至 pH 8~10,然后用 4 BV 的 5% 盐酸浸泡 2~4 h,以 1 BV·h⁻¹ 速度通过,再用蒸馏水洗至中性,备用。

2.2.2 上样液的制备 取黄连粗粉 1 kg,加 10 倍量 30% 乙醇,水浴回流提取 4 次,每次 30 min,趁热过滤,合并滤液,回收乙醇后用蒸馏水稀释至 5 L,即 1 mL 药液含生药 0.2 g(总生物碱 21.82 g·L⁻¹),备用。

2.2.3 各型号树脂的静态吸附 精确量取以上 3 种处理好的湿树脂各 5 mL,分别加入到 40 mL 上样液中,静态吸附 24 h,每隔一段时间摇晃 1 次,每次 3 min,依照 2.1 项下测定方法测定静态吸附前后溶液中总生物碱含量,两者的差值即为树脂的静态吸附量,即可得出 1 mL 树脂所吸附总生物碱的量,从而得出 3 种树脂对总生物碱的静态吸附能力大小,结果见表 1。

表 1 3 种树脂对黄连总生物碱的静态吸附率及解析率

树脂类型	静态吸附量 /g·L ⁻¹	吸附率 /%	静态解吸量 /g·L ⁻¹	解吸率 /%
D101	84.9	48.6	60.7	71.5
AB-8	92.2	52.8	67.8	73.5
D151	124.0	71.0	84.4	68.1

由表 1 可以得出,3 种树脂的静态吸附能力大小顺序 D151 > AB-8 > D101。

2.2.4 各型号树脂的静态解吸 D101 树脂为非极性大孔吸附树脂,AB-8 树脂为弱极性大孔吸附树脂,D151 树脂为大孔型聚丙烯酸树脂,是一种弱酸性阳离子交换树脂,根据 3 种树脂的理化性质,分别选用 95% 乙醇和 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液作为解吸溶剂。取 2.2.3 项下 3 种树脂,用 5 BV 蒸馏水洗净后,吸干表面液体,分别加 95% 乙醇、95% 乙醇和 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液各 25 mL,摇匀,放置 24 h,每隔一段时间摇晃 1 次,每次 3 min,依照 2.1 方法测定解吸液中总生物碱含量,即可得出每 mL 树脂所解吸的总生物碱量,从而得出 3 种树脂的静态解吸能力大小,结果见表 1,3 种树脂的静态解吸能力大小顺序为 AB-8 > D151 > D101。

2.2.5 泄漏曲线的考察 精确量取 3 种湿树脂各 25 mL,湿法装柱(规格 15 mm × 200 mm),缓慢加入 0.2 g·mL⁻¹ 的上样液,控制流速至 25 mL·h⁻¹ 流出液,即 1 BV·h⁻¹,每 0.5 BV 流出液收集 1 份,依照 2.1 项下测定方法测定流出液中总生物碱浓度,绘

制各型号树脂的泄漏曲线如图1所示,由图1可知,D101树脂从第7份流出液开始出现大规模泄漏;AB-8树脂从第8份开始出现大规模泄漏;D151树脂从第11份流出液开始出现大规模泄漏,3种树脂的动态吸附能力大小 D151 > AB-8 > D101。

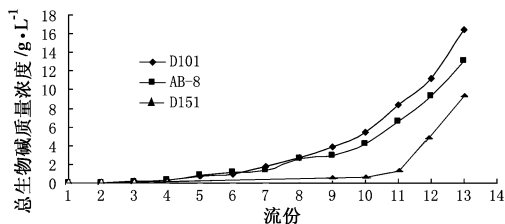


图1 3种树脂的泄漏曲线

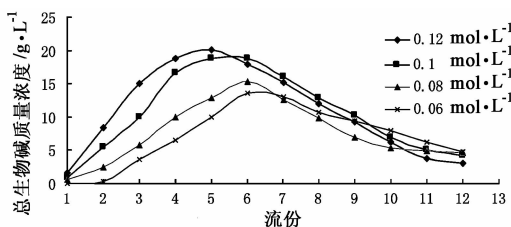


图2 不同浓度HCl洗脱剂的洗脱曲线

通过对3种树脂的静态吸附、解吸以及泄漏曲线的考察,可以得出D151树脂对总生物碱的吸附能力较其他2种树脂有明显优势,其静态解吸能力略低于其他2种树脂,此外D151树脂的预处理也较其两种树脂经济,综合考虑选用D151树脂进行进一步研究。

2.3 纯化工艺的考察

2.3.1 上样液浓度的考察 精确量取处理好的D151树脂4份,每份25 mL,湿法装柱,分别缓慢加入0.2,0.15,0.1,0.05 g·mL⁻¹的上样液,控制流速0.5 BV·h⁻¹,每0.5 BV流出液收集1份,依照2.1方法测定流出液中总生物碱含量,可以得出在生药质量浓度为0.2 g·mL⁻¹时,从第12个流份开始出现明显泄漏;在0.15 g·mL⁻¹时,从第18个流份开始明显泄漏;在0.1 g·mL⁻¹时,从第28个流份开始明显泄漏;在0.05 g·mL⁻¹时,从第55个流份开始明显泄漏。树脂吸附量分别为173.2,198.6,186.3,165.4 g·L⁻¹,即D151树脂对不同生药浓度的上样液吸附能力大小为0.15 > 0.1 > 0.2 > 0.05 g·mL⁻¹。

2.3.2 水洗体积的考察 取2.3.1下上样浓度为0.15 g·mL⁻¹的树脂,用蒸馏水冲洗,流速1 BV·h⁻¹,每0.5 BV收集1份,依照2.1方法测定流出液中总生物碱含量,可得出在水洗用量达到2 BV时,流出液基本无色,水洗用量2 BV即可。

2.3.3 洗脱剂的考察 D151树脂为弱酸性阳离子交换树脂,洗脱剂应选用稀酸溶液,本试验选用不同浓度的HCl溶液进行洗脱。精确量取处理好的D151树脂4份,每份25 mL,湿法装柱,缓慢加入0.15 g·mL⁻¹的上样液100 mL,以0.5 BV·h⁻¹的速度通过树脂柱后水洗2 BV,分别缓慢加入0.12,0.1,0.08,0.06 mol·L⁻¹的HCl溶液,控制流速1 BV·h⁻¹,每0.5 BV收集1份,依照2.1方法测定流出液中总生物碱含量结果见图2,酸洗时总生物碱含量先逐渐升高,然后逐步下降,4种浓度的酸液各6 BV的量对总生物碱的洗脱率分别为75.2%,72.2%,52.3%,49.3%,随着酸浓度的降低,洗脱效果逐渐下降,表明洗脱效果与酸浓度有较大关系,酸的用量在5 BV时,能将大部分的总生物碱洗脱下来。综合考虑,选用0.12 mol·L⁻¹的HCl溶液,用量5 BV。

2.4 最佳纯化工艺 精密移取0.15 g·mL⁻¹上样液5 mL,真空干燥24 h,得210 mg浸膏,总生物碱质量分数为38.8%;分别精密移取2.3.3中0.12 mol·L⁻¹的HCl洗脱液前10个流份各5 mL,合并,充分混匀,然后精密移取5 mL,真空干燥24 h,得75 mg浸膏,含总生物碱83.0%。2.3.3项中,总生物碱的上样量为2182 mg,5 BV的0.12 mol·L⁻¹的HCl洗脱液中总生物碱的量为1556.3 mg,产品回收率为71.3%。由此得出最佳工艺条件:以0.15 g·mL⁻¹的生药质量浓度上样,控制流速0.5 BV·h⁻¹,上样量9 BV;水洗体积2 BV,流速1 BV·h⁻¹;酸洗浓度0.12 mol·L⁻¹的HCl溶液,用量5 BV,流速1 BV·h⁻¹。

2.5 验证试验 精密量取25 mL处理好的D151树脂2份,每份25 mL,湿法装柱,缓慢加入0.15 g·mL⁻¹的上样液100 mL,控制流速0.5 BV·h⁻¹,水洗2 BV后,用0.12 mol·L⁻¹的HCl溶液5 BV洗脱,流速1 BV·h⁻¹,收集酸洗脱液,取5 mL洗脱液,依照2.4下处理方法,分别得79,78 mg浸膏,含总生物碱分别82.2%,82.8%,说明优选工艺稳定。

3 讨论

D151树脂对总生物碱的纯化能力明显强于其他树脂,且上样和水洗过程中生物碱损失量较少,D151为弱酸性离子交换大孔树脂具有酸性较弱的反应基如羧基,可与样品中的碱性成分进行离子交换,形成比较稳定的体系,且因其具有大孔型结构,

柴胡总皂苷提取物制剂前的评价

封传华¹, 张国松², 罗晓健^{1,2}, 胡鹏翼¹, 何秀菊², 王跃生^{1,3*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 对柴胡总皂苷提取物进行制剂前研究, 为设计合理的剂型提供依据。方法: 采用分光光度法和高效液相色谱法研究柴胡总皂苷提取物的表观溶解度、油水分配系数、稳定性及初步考察柴胡总皂苷提取物对胃黏膜的刺激性。结果: 柴胡总皂苷提取物在水中的表观溶解度为 $0.145 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 pH 5.0 的缓冲液中, 油水分配系数为 34.72; 在 pH 9.0 的缓冲液中, 油水分配系数为 60.36; 高湿度试验结果不符合规定; 刺激性较大。结论: 柴胡总皂苷提取物的表观溶解度小, 在碱性溶液中的油水分配系数大于酸性溶液中的分配系数, 稳定性较好, 但具有一定的吸湿性, 具有较大的胃黏膜刺激性。

[关键词] 柴胡; 总皂苷; 制剂前评价研究

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0012-04

Evaluation on Pre-Preparation of Total Saponins Extract from Bupleuri Radix

FENG Chuan-hua¹, ZHANG Guo-song², LUO Xiao-jian^{1,2}, HU Peng-yi¹, HE Xiu-ju², WANG Yue-sheng^{1,3*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study on pre-preparation of total saponins extract from Bupleuri Radix and provide a basis for rational design of dosage forms. **Method:** Using spectrophotometry and high performance liquid chromatography to investigate of the appraent aqueous solubility, oil-water partition coefficient, stability and preliminary gastric irritation of extracts of total saponins extract from Bupleuri Radix. **Result:** The appraent aqueous

[收稿日期] 20110401(007)

[基金项目] 重大新药创制专项(2009ZX09103)

[第一作者] 封传华, 在读硕士, 从事药物新剂型与新制剂研究, Tel: 0791-7119617, E-mail: fengch1986@126.com

[通讯作者] * 王跃生, 研究员, 博士生导师, Tel: 0791-7119617, E-mail: Wylw915@126.com

具有较大的接触面积, 所以在上样和水洗过程中对样品的吸附量较大而损失较小; 在洗脱过程中, 生物碱因与酸形成盐酸盐类成分不被吸附而被洗脱。在优选工艺条件下纯化的提取物总生物碱质量分数达到 80% 以上, 出膏率减少 60% 以上, 总生物碱回收率在 70% 以上, 能较好适应中药现代剂型的进一步开发要求。

[参考文献]

- [1] 杨云. 天然药物化学成分提取分离手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 676.
- [2] 赵庆国, 吴素体, 王颖. 不同品种和产地黄连的总生物碱含量测定[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(11): 974.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 285, 286.
- [4] 徐晓宏, 张铁军, 廖茂梁, 等. 大孔吸附树脂分离纯化黄连总生物碱的工艺研究[J]. 中草药, 2007, 38(8): 1167.

[责任编辑 全燕]