

# NKA-9 型大孔树脂纯化蟾皮总生物碱工艺

王元清<sup>1,2</sup>, 严建业<sup>2\*</sup>, 罗堃<sup>2</sup>, 王璐<sup>2</sup>, 师白梅<sup>2</sup>, 汪兰<sup>2</sup>

(1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004; 2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:建立 NKA-9 型大孔树脂纯化蟾皮总生物碱的工艺条件。方法:以蟾皮总生物碱含量(5-羟色胺计)作为考察指标,优化 NKA-9 型大孔树脂吸附与解析的工艺条件。结果:优选出的最佳纯化工艺为 NKA-9 型大孔树脂在 25 ℃ 进行吸附,样品溶液 pH 9,上样量为 4 BV,吸附时间为 8~10 h,先用 6 BV 水洗,然后用 3 BV70% 的乙醇洗脱。结论:该工艺可用于蟾皮总生物碱的纯化。

**[关键词]** NKA-9 型大孔树脂; 蟾皮总生物碱; 纯化工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0006-03

## Purification Technology of Total Alkaloids from Skin of *Bufo bufo gargarizans* by NKA-9 Macroporous Resin

WANG Yuan-qing<sup>1,2</sup>, YAN Jian-ye<sup>2\*</sup>, LUO Kun<sup>2</sup>, WANG Lu<sup>2</sup>, SHI Bai-mei<sup>2</sup>, WANG Lan<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish purification technology of total alkaloids from skin of *Bufo bufo gargarizans* by NKA-9 macroporous resin. **Method:** The content of total alkaloid (5-HT) from skin of *B. bufo gargarizans* was chosen as index, optimized condition of adsorption and desorption of NKA-9 macroporous resin and established purification technology condition of total alkaloids from skin of *B. bufo gargarizans*. **Result:** Optimum purification process conditions were: used NKA-9 macroporous resin, adsorption temperature was 25 ℃, loaded 4 times the amount of column volume with pH of sample solution was 9; adsorption time was 8-10 h, firstly eluted with 6 times water of column volume, then eluted with 3 times 70% ethanol of column volume. **Conclusion:** Optimum

**[收稿日期]** 20110712(008)

**[基金项目]** 中南林业科技大学青年科学研究基金项目(2009015B);湖南省教育厅科学研究项目(11C1321);湖南省高校科技创新团队项目(湘教通[2010]212号)

**[第一作者]** 王元清,在读博士,讲师,从事生物药物研究,Tel:0731-85623496,E-mail:wangyuanqing201@126.com

**[通讯作者]** \* 严建业,在读博士,讲师,从事药剂学研究,Tel:0731-88458231,E-mail:yanjianye201@126.com

实验方剂学杂志,2011,17(7):262.

[3] 何平均,倪淑欣,王文权,等. 抗肿瘤寡肽类药物研究进展[J]. 中国医药生物技术,2009,4(4):288.

[4] 陆融,王卓,姚智. 小分子多肽抗肿瘤作用的研究进展[J]. 天津医科大学学报,2005,11(3):499.

[5] 中国药典. 二部[S]. 2010:54.

[6] 张锐昌,徐志宏,刘邻渭. 胃蛋白酶水解小麦蛋白工艺的研究[J]. 食品与机械,2006,22(1):59.

[7] 苏玉永,徐楚鸿,吕永宁. 多酶微片中胃蛋白酶的活力测定[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(4):214.

[8] 李培骏,袁永俊,胡婷,等. 胰蛋白酶水解酪蛋白进程研究[J]. 食品与机械,2005,21(6):23.

[9] Sewald, N, Jakubke, H D. 肽:化学与生物学[M]. 刘克良,何军林,等译. 北京:科学出版社,2005,7:5.

[责任编辑 仝燕]

process could be used for purification of total alkaloids from skin of *B. bufo gargarizans*.

[Key words] NKA-9 macroporous resin; total alkaloids from skin of *Bufo bufo gargarizans*; purification process

蟾皮为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 的干燥表皮,其提取液具有强心、抗肿瘤、抗病毒、麻醉、止痛、促进骨髓增生等功效,并可调节肿瘤患者的细胞免疫和体液免疫功能<sup>[1-5]</sup>。本研究以蟾皮总生物碱含量(以5-羟色胺计)作为评价指标,选用NKA-9型大孔树脂对蟾皮提取液中总生物碱进行初步纯化,优化蟾皮总生物碱的纯化工艺。

## 1 仪器与试剂

722型可见分光光度计(上海奥谱勒仪器有限公司),TP-1200C型电子天平(厦门索迈电子科技有限公司)。蟾皮(湖南省医药销售有限公司提供),5-羟色胺(批号1130661-31205079,供含量测定用,Sigma公司提供),NKA-9型大孔树脂(安徽三星树脂科技有限公司),对二甲氨基苯甲醛、盐酸、氢氧化钠等均为分析纯,水为蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 蟾皮总生物碱的含量测定<sup>[6]</sup>

**2.1.1 标准曲线的制备** 精密称取5-羟色胺对照品0.0062 g置10 mL量瓶中,加甲醇超声溶解,定容至刻度,精密移取0.5 mL置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释定容至刻度。精密量取上述对照品溶液0.5,1.5,2.5,3.5,5.0 mL分别置10 mL量瓶中,加蒸馏水使成5.0 mL,加15%对二甲氨基苯甲醛盐酸溶液至刻度,摇匀,放置30 min,以蒸馏水做空白对照(5.0 mL蒸馏水加5.0 mL 15%对二甲氨基苯甲醛盐酸溶液),于555 nm处测定吸光值。其线性回归方程为 $Y = 0.0031X + 0.0855$  ( $r = 0.9996$ )。5-羟色胺在15.5~155  $\mu\text{g}$ 线性关系良好。

**2.1.2 样品中蟾皮总生物碱(以5-羟色胺计)的含量测定** 精密量取各样品溶液适量,置10 mL量瓶中,加水至5 mL,加15%对二甲氨基苯甲醛盐酸溶液至刻度,放置30 min,以水做空白对照,555 nm波长处测定吸光度,并计算含量。

**2.2 大孔吸附树脂预处理** 以95%乙醇浸泡树脂24 h,充分溶胀后湿法装柱,用95%乙醇通过树脂层,洗至流出液加水不呈白色浑浊,再用蒸馏水洗至没有醇味,备用。

### 2.3 NKA-9型大孔树脂吸附工艺

**2.3.1 上柱液的制备** 称取蟾皮药材50 g,加水浸泡15 min,加热提取3次,加水量为14,12,12倍,提取时间为105,90,90 min,合并提取液,浓缩定容至1 000 mL,得上柱液(含蟾皮总生物碱74.36  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**2.3.2 温度对NKA-9型大孔树脂吸附蟾皮总生物碱的吸附性能影响** 称取2.0 g抽滤至干的湿树脂置于烧杯中,共5份,各加入蟾皮样品溶液25 mL,将烧杯置于恒温水浴箱中,分别在20,25,30,35,40  $^{\circ}\text{C}$ 吸附,每隔2 h取样2 mL,测定含量。吸附量 =  $V(C_0 - C_1)/M$ ,式中 $C_0$ 为吸附前样液中总生物碱的质量浓度, $C_1$ 为吸附后上清液中总生物碱的浓度, $V$ 为样液的体积, $M$ 为湿树脂质量。结果见图1。

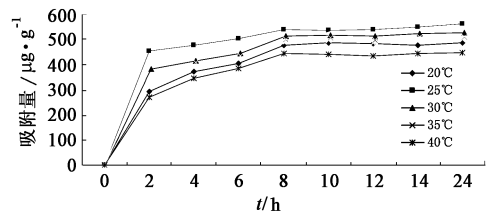


图1 NKA-9型大孔树脂对蟾皮总生物碱的吸附等温线

由图1可直观看出来吸附8~10 h后,NKA-9型大孔树脂对蟾皮总生物碱的吸附基本达到平衡,温度对大孔树脂的吸附性能有一定的影响,且在25  $^{\circ}\text{C}$ 条件下,吸附性能最好。

**2.3.3 pH对大孔树脂吸附性能的影响** 平行称取2.0 g已处理好的湿树脂6份,分别置于6个锥形瓶中,均加入蟾皮水提液25 mL,分别调节pH 5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,于25  $^{\circ}\text{C}$ 吸附24 h后,精密移取上清液1.0 mL测定吸光度,并计算其吸附量分别为149.25,443.50,508.00,600.75,669.25,670.12  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。样品溶液的pH对化合物的吸附有一定的影响,当样品溶液为弱碱性时,吸附的总生物碱量最大。

**2.3.4 NKA-9型大孔树脂的解析条件考察** 称取12.0 g NKA-9型大孔树脂于烧杯中,加入pH 9.0的蟾皮样品溶液150 mL,静态吸附24 h,滤出树脂,过滤后按质量平均分成6份,分别置于6个锥形瓶中,

各加入体积分数 10% ,30% ,50% ,60% ,70% ,80% 的乙醇溶液,静态解析 24 h。抽滤,并用各自的洗脱剂冲洗树脂,合并入滤液,得到洗脱液,测定各自的总生物碱含量,并计算解析量。计算公式如下:

$$\text{解析量} = C_2 \times V/M$$

$$\text{解析率} = [C_2 / (C_0 - C_1)] \times 100\%$$

式中  $C_0$  为吸附前样液中总生物碱的质量浓度,  $C_1$  为吸附后上清液中总生物碱的质量浓度,  $C_2$  为解析液中总生物碱的含量,  $V$  为样品溶液的体积,  $M$  为湿树脂质量。其解析率依次为 39.99% ,47.99% ,64.16% ,75.93% ,90.23% ,88.88%。结果可知不同体积分数的乙醇洗脱效果不同,其中 70% 乙醇的解析率最高,洗脱效果最好,因此选 70% 乙醇作为洗脱剂。

**2.3.5 样品上样量的考察** 取 NKA-9 型大孔树脂 10 g,湿法装柱,将 pH 9.0 的蟾皮水提液以  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速上柱,分段收集过柱流出液,测定总生物碱含量,按(流出液质量浓度/上柱液质量浓度)  $\times 100\%$  计算未吸附率(% )。结果分别为 0,0,0,0.53% , 6.28% , 19.21% , 20.29% , 21.72% , 23.16%。结果可知当上样量为 4 BV 时,未吸附率几乎为 0,即吸附率接近 100%。因此,为了更好地吸附以及不浪费样品,选择 3 BV 的样品溶液进行上样。

**2.3.6 水洗终点体积的确定** 取大孔树脂 10 g,湿法装柱,将 pH 9.0 的蟾皮水提液 4 BV 上样,吸附 8 ~ 10 h,流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  水洗,分段收集水洗液,与苯酚-硫酸显色反应,确定反应终点。结果发现当用 6 BV 水洗柱子时,通过苯酚-硫酸反应,有微量的颜色变化,结果表现为正反应。当用 7 BV 水洗柱子时,通过苯酚-硫酸反应,没有颜色变化,结果表现为不明显。因此选择用 6 BV 水洗。

**2.3.7 洗脱剂用量的考察** 取大孔树脂 10 g,湿法装柱,将 pH 9.0 的蟾皮水提液 4 BV 上样,吸附 8 ~ 10 h,  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  流速水洗,弃去 6 BV 洗液,用 70% 乙醇  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速洗脱,分段收集洗脱液,测定其吸收度分别为 0.308,0.335,0.016,0.004。结果发

现当用 3 BV 70% 乙醇洗脱剂洗脱时,洗脱液的吸收度较小,洗脱较完全,因而洗脱剂的用量定为 3 BV。

### 3 讨论

本研究进行了几种树脂吸附与解析附性能的预试验,发现 NKA-9 对蟾皮总生物碱的吸附与解析性能较好,并首次采用 NKA-9 型大孔树脂对蟾皮总生物碱进行初步分离纯化,初步获得了可行的纯化工艺。在纯化工艺考察过程中,发现温度对 NKA-9 型大孔树脂的吸附性能有较大的影响。根据实验结果,蟾皮总生物碱在 20 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$  时,随温度升高吸附量增加;在 25 ~ 40  $^{\circ}\text{C}$  时,随温度升高吸附量降低,因此可能 25  $^{\circ}\text{C}$  为 NKA-9 型大孔树脂对蟾皮总生物碱的吸附平衡温度。

随着 pH 增大,吸附性能增强,pH 9.0 时,吸附性能最好,这说明改变溶液 pH 可以影响有效成分在大孔树脂上的吸附。生物碱在碱性溶液中以游离态形式存在,而在酸性溶液中以离子形式存在。游离状态下,在水中的溶解性能较低,大孔树脂对其吸附性能增强,所以随着溶液的 pH 增加,生物碱的吸附量增加,当 pH 9.0 时,吸附性能最好,可能此 pH 条件下,蟾皮总生物碱较稳定。

### [参考文献]

- [1] 王元清,严建业,喻林华. 蟾皮的化学成分与临床应用研究进展[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):1213.
- [2] 张绍杰,刘诚进. 浅谈蟾蜍的药用价值[J]. 中华临床医学研究杂志,2007,13(10):1397.
- [3] 逮华,陈日新. 华蟾素抗恶性肿瘤的研究进展[J]. 右江民族医学报,2009(5):895.
- [4] 陈才法,缪进,李景辉,等. 蟾酥、蟾皮、蟾衣提取物对心肌细胞膜 ATP 酶的影响[J]. 四川动物,2008,27(3):393.
- [5] 王加真,闫家阁,张军,等. 华蟾素的镇痛作用及其机制研究[J]. 临沂医专学报,2000,22(2):81.
- [6] 王元清,严建业,喻林华,等. 华蟾素分散片溶出度的研究[J]. 中成药,2008,30(11):1667.

[责任编辑 全燕]