

阳离子交换树脂提取拐枣七中总生物碱的工艺研究

韩燕霞, 郭增军*, 张卉, 韩玲, 许文明, 李因(西安交通大学医学院, 西安 710061)

摘要: 目的 研究用阳离子交换树脂提取拐枣七中总生物碱的工艺条件。方法 以总生物碱的吸附量、解吸率和其中盐酸小檗碱的含量为考察指标, 对 5 种不同型号的阳离子交换树脂进行评价, 并考察最佳工艺参数。结果 最佳提取工艺是: 拐枣七药材粉碎成粗粉, 加入 10 倍量的 70%乙醇, 浸泡 2 h, 加热回流提取 3 次, 每次 1 h。C008 型阳离子交换树脂为最佳吸附树脂, 其最大吸附量为 $0.65 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, 4% 氨水乙醇为洗脱溶剂, 洗脱率为 13.81%。结论 C008 型阳离子交换树脂可用于提取拐枣七中总生物碱, 该方法简便可行。

关键词: 拐枣七; 总生物碱; 阳离子交换树脂; 工艺研究

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0624-04

作者简介: 韩燕霞, 女, 硕士生 Tel: 18709273726
(029)82655133 E-mail: guozj@mail.xjtu.edu.cn

E-mail: hanxia132546@163.com

*通信作者: 郭增军, 男, 博士, 教授 Tel:

Study on Extraction Technology of Alkaloids from *Hylomecon Japonica* by Cation Exchange Resins

HAN Yanxia, GUO Zengjun*, ZHANG Hui, HAN Ling, XU Wenming, LI Nan(School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To obtain the optimal conditions for separating the alkaloids from the extract of *Hylomecon japonica* by selecting appropriate cation exchange resins. **METHODS** Five types of cation exchange resins were evaluated in separating efficiency with measuring the adsorption ratio and eluting ratio of total alkaloids as indices, and the content of berberine hydrochloride from *Hylomecon japonica* was determined as an index by HPLC to choose the optimal technological parameters. **RESULTS** The optimal result of extraction was obtained as *Hylomecon japonica* shattered into thick powder, extracted with ten times 70% alcohol at room temperature for 2 hours and refluxing and extracting for 1 h (totally extracting for 3 times). C008 cation exchange resin had the good ability of absorbing the total alkaloid from *Hylomecon japonica*, and each gram of C008 cation exchange resin could absorb 0.65 g of the total alkaloids, and the desorption ratio was 13.81%. **CONCLUSION** The C008 cation exchange resin can be used for extracting total alkaloids from *Hylomecon japonica* and the established procedure is simple and feasible.

KEY WORDS: *Hylomecon japonica*; total Alkaloids; cation exchange resin; technological study

拐枣七为罂粟科(Papaveraceae)荷青花属荷青花 *Hylomecon japonica* (Thunb.) Prantl et Kundig 的多年生草本植物的地下部分^[1], 别名为荷青花根、刀豆三七、水菖三七、大叶老鼠七、乌筋七等^[2]; 根内含有隐品碱, 别隐品碱、原阿片碱、黄连碱、盐酸小檗碱、血根碱、白屈菜红碱、白屈菜玉红碱、白屈菜黄碱、白屈菜碱、人血草碱、四氢小檗碱等^[3]; 味苦, 平; 以根入药, 具有祛风湿, 舒筋活络, 散瘀消肿、止血、止痛的功效; 主治风湿性关节炎、跌打损伤等, 在临床上有一定的应用价值^[4]。拐枣七中所含的生物碱具有一定的活性^[5], 鉴于这些活性成分的药用价值, 对拐枣七药材进行了提取精制, 在充分保留原药材中所含生物碱成分的基础上, 尽可能的除去其他非生物碱成分。本课题以盐酸小檗碱为参考指标, 考察醇提后, 阳离子交换树脂法富集纯化拐枣七中总生物碱的工艺条件。

1 仪器与试剂

Spectra System P2000 高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司); 色谱柱为 Kromsil C₁₈ 键合硅胶柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); KQ 3200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); N-1100 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)。

乙腈(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙醇(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司); 磷酸(分析纯, 天津市化学试剂六厂); 水为超纯水; 001×7、C004、C008、LS-12、LSD001 型阳离子交换树脂(西安蓝晓科技有限公司)均为

市售; 对照品: 盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所, 批号: 0713-0609, 供含量测定用); 拐枣七药材采自太白山, 经西安交通大学药理学系生药教研室郭增军教授鉴定为罂粟科荷青花属荷青花 *Hylomecon japonica* (Thunb.) Prantl et Kundig 的地下部分。

2 方法和结果

2.1 盐酸小檗碱的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Kromsil C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-1%的磷酸溶液(25:75); 流速 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长 265 nm; 柱温 25 °C。

2.1.2 盐酸小檗碱的含量测定 以盐酸小檗碱为对照品, 采用 HPLC 测定拐枣七中盐酸小檗碱的含量。

2.2 拐枣七醇提的正交试验

根据预试验结果, 固定提取溶剂为 10 倍量, 以乙醇浓度、浸泡时间、提取时间、提取次数为考察因素, 设计 4 因素 3 水平^[6]的正交设计方案, 考察拐枣七提取工艺条件。根据表 1 的因素水平对该药材进行提取, 并按“2.1”项下方法分别测定拐枣七提取物中盐酸小檗碱的含量, 结果见表 2。

2.3 正交试验结果分析

正交试验结果的分析见表 2。由结果得知最佳工艺为 A₃B₂C₃D₃, 即 50%乙醇, 浸泡 2 h, 提取 3 次, 每次 3 h, 溶剂用量为 10 倍量。与其它因素相比, 提取时间因素的影响不大, 所以综合考虑各因素, 选择的最佳工艺为 70%乙醇、浸泡 2 h、提取 3 次、每次 1 h、溶剂用量为 10 倍量。

2.4 上样液的制备

根据“2.3”项下的最佳提取工艺制备提取液，滤过，滤液减压回收至干浸膏，加入 10 倍量的 2% 盐酸溶液使干浸膏溶解，酸水液离心，取上清液作为上样液。

表 1 因素水平表

Tab 1 Level of factors

因素水平	乙醇浓度 A/%	浸泡时间 B/h	提取时间 C/h	提取次数 D/次
1	95	0	1	1
2	70	1	2	2
3	50	2	3	3

表 2 正交试验设计及结果

Tab 2 Orthogonal experiment design and results

试验号	A/%	B/h	C/h	D/次	盐酸小檗碱含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	0.001 2
2	1	2	2	2	0.001 9
3	1	3	3	3	0.002 1
4	2	1	2	3	0.004 5
5	2	2	3	1	0.004 3
6	2	3	1	2	0.003 1
7	3	1	3	2	0.006 4
8	3	2	1	3	0.006 5
9	3	3	2	1	0.004 8
I	0.005 2	0.012 1	0.010 8	0.010 3	
II	0.011 9	0.012 7	0.011 2	0.011 4	
III	0.017 7	0.010 0	0.012 8	0.013 1	
R	0.012 5	0.002 7	0.002 0	0.002 8	

2.5 树脂动态吸附量的测定

取已经处理好的不同型号的阳离子交换树脂各 10 mL，装入层析柱中，以 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样，至流出液碘化铋钾反应呈阳性，停止上样。再用去离子水洗去多糖，至 Molish 反应呈阴性，停止洗脱。采用烘干法测定 10 mL 湿树脂的干重，即可得到每克干树脂的最大吸附量。结果见表 3。由结果可知：C008 型阳离子交换树脂吸附性能最佳，故选择该型号树脂做进一步考察。

2.6 解吸附剂的选择

将动态吸附后的 C008 型阳离子交换树脂进行动态洗脱，测定动态洗脱量以选择洗脱溶剂。本文比较了不同比例的乙醇-氨水解吸体系，考察氨水浓度为 2%，4%，6%，8%，10%，流速为 $1.5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 时洗脱剂的洗脱率，结果洗脱率分别为 11.34%，13.81%，11.74%，15.69%，12.05%。由结果可知，8%氨水乙醇的洗脱率最高，但和 4%的氨水乙醇的洗脱率接近，所以综合考虑试剂消耗等因素，选择 4%氨水乙醇作为洗脱溶剂。

表 3 1 g 干树脂的最大吸附量

Tab 3 The maximum adsorption capacity of 1 g dry resin

树脂型号	10 mL 树脂的干重/g	10 mL 树脂的最大吸附量/g	1 g 干树脂最大吸附量/g
001×7	5.45	2.58	0.47
C004	6.38	3.46	0.54
C008	6.67	4.33	0.65
LS-12	10.00	1.89	0.19
LSD001	7.89	1.58	0.20

2.7 不同型号树脂吸附量中盐酸小檗碱的含量

取“2.5”项下已经吸附好的 5 种阳离子交换树脂，按“2.6”项下所选择的洗脱剂进行洗脱，洗脱液减压回收得浸膏。按“2.1”项下进行盐酸小檗碱含量的测定，测定结果见表 4。结果表明：C008 型阳离子交换树脂中吸附的盐酸小檗碱的含量最高，进一步证明了 C008 型阳离子交换树脂为最佳树脂。

表 4 1 g 不同型号干树脂吸附盐酸小檗碱的含量

Tab 4 The berberine hydrochloride adsorption in 1 g different types dry resin

树脂型号	进样浓度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	进样体积/ μL	盐酸小檗碱的含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	1 g 树脂吸附的盐酸小檗碱含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
001×7	0.133 3	10	0.032 13	0.015 10
C004	0.028 9	10	0.052 84	0.028 53
C008	0.025 1	10	0.077 63	0.050 45
LS-12	0.045 7	10	双峰	-
LSD001	0.152 3	10	无	-

2.8 盐酸小檗碱含量测定的方法学考察

方法学考察结果为：盐酸小檗碱的线性回归方程为 $Y=660\ 986X-572.24$ ， $r=0.999\ 6$ ，线性范围为 $10\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；精密度试验 $\text{RSD}=1.70\%(n=6)$ ；重现性试验 $\text{RSD}=1.41\%(n=6)$ ；稳定性试验 $\text{RSD}=1.17\%(n=6)$ ；加样回收率试验得平均回收率为 123.74%， $\text{RSD}=2.27\%(n=6)$ 。方法学考察结果显示，建立的 RP-HPLC 测定盐酸小檗碱含量的方法准确、灵敏、可靠。

2.9 提取纯化工艺的重复性试验

精密称取拐枣七药材粗粉 100 g，按“2.4”项下方法制备上样液。取 C008 型阳离子交换树脂装入层析柱中，以 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样，至流出液碘化铋钾反应呈阳性，停止上样。再用去离子水洗去多糖，至 Molish 反应呈阴性，停止洗脱。用 4%氨水乙醇的洗脱剂洗脱，至碘化铋钾反应呈阳性时开始收集流出液，碘化铋钾反应呈阴性时停止收集，回收溶剂，干燥后得总生物碱浸膏为 4.17 g，得率为 4.17%，按“2.1”项测定总生物碱

中盐酸小檗碱的含量为 0.084%。

3 结论

通过对 5 种阳离子交换树脂吸附率、解吸附率的比较, 确定了吸附拐枣七中总生物碱较好的树脂为 C008 型阳离子交换树脂, 并以盐酸小檗碱的含量为参考指标, 进一步确定了最合适的树脂为 C008 型阳离子交换树脂。

目前没有对拐枣七药材中生物碱成分的研究报道。本实验采用盐酸小檗碱为参考指标, 但是通过实验, 表明了盐酸小檗碱在拐枣七总生物碱中的含量很低, 仅占到总量 0.084%, 其它生物碱含量有待于进一步研究。

近年来, 国内研究者已广泛将阳离子交换树脂用于生物碱的提取, 取得了显著的效果^[7-10], 本实验采用阳离子交换树脂提取拐枣七中的总生物碱, 工艺较简单, 成本低, 将为拐枣七药材的进一步开发研究提供了依据。

REFERENCES

- [1] Chinese Academy of Sciences, Flora of China Editorial Committee. Flora of China(中国植物志) [M]. Vol 32. Beijing: Science and Technology Press, 1999: 72-73
- [2] Northwest Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences.

- Qinling Flora(秦岭植物志) [M]. Beijing: Science and Technology Press, 1974: 361-362
- [3] State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Herbal Medicine(中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1998: 2269-2270
- [4] GUO Z J, WANG J X, SU Y F, et al. Shanxi Qiyao(陕西七药) [M]. Shanxi: Shaanxi Science and Technology Press, 2003: 189
- [5] ZHONG M. Separation, purification and bioactivities of principal alkaloids from *macleaya cordata*(Willd) R.BR. [C]. Changsha: Central South University, 2011
- [6] YUAN J L, PU Y Q, ZHANG T, et al. Technology study on extraction and purification of alkaloid from *Stemona japonica* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2011, 34(1): 126-129
- [7] HUO W Z, LI Y X, JIANG H Y, et al. Process optimization on purification of alkaloids by cation exchange resin from *Chuanping* Chinese medicine compound [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2005, 16(6): 446-449.
- [8] CHI Y M. Purification of total alkaloids from *in carvillea sinensis* with ion-exchange resin [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物的研究与开发), 2005, 17(5): 617-621.
- [9] WANG G L, FANG J Q, ZHAO X M, et al. Study on extraction and purification of the total alkaloids from *Scutellaria barbata* D.Don [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(5): 399-403.
- [10] LI Y P, YANG G D, HE L C, et al. Study on the extraction of the total alkaloids from *Caulophyllum robustum* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2007, 30(2): 220-223.

收稿日期: 2011-11-20