

序列中所含的丙氨酸比例占 15%，预示着此蛋白二级序列结构为一个普通的 α 螺旋结构。

鹿茸蛋白 CNTP III 对于生长状态不良的细胞的促生长作用更明显，如处于复苏期的细胞等，但是平行实验研究表明鹿茸蛋白 CNTP I 对小鼠海马神经细胞有微弱增殖作用，蛋白 CNTP II 则无作用。

电泳实验表明，蛋白 CNTP I 反复冻融后会少量分解为蛋白 CNTP II 和 CNTP III。结合激光解析电离飞行时间质谱所测定的三者的相对分子质量可以看出，CNTP I 的相对分子质量 (6.7018×10^4) 为 CNTP II (4.3749×10^4) 与 CNTP III (2.3855×10^4) 之和，提示蛋白 CNTP II 和 CNTP III 可能为蛋白 CNTP I 的两个亚基。

References:

- [1] Yang L L, Chi C, Qin F, et al. The velvet chemical compositions and pharmacological action [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 1995, 18(4): 19-23.
- [2] Li H P. The velvet chemical compositions of velvet-deer breeds or strains in China [J]. *J Northeast Forest Univ* (东北林业大学学报), 2003, 31(4): 26-29.
- [3] Yang R M. Study on comparison of nutrients between three kinds of velvet antlers [J]. *Guangdong Micro Element Sci* (广东微量元素科学), 2000, 7(12): 47-51.
- [4] Huo Y S, Huo H. The differential expression of nerve growth factors from fresh Pilose antler [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1997, 8(2): 79-81.
- [5] Fan Y. Study on the extraction separation and anticancer activity [J]. *J Econom Anim* (经济动物学报), 1998, 2(1): 27-31.
- [6] Weng L, Zhou Q L, Wang B X, et al. A new polypeptide promoting epidermal cells and chondrocytes proliferation from *Cervus elaphus* Linnaeus [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(12): 913-916.
- [7] Wang F, Zhou Q L, Wang B X, et al. Research on the purification and characterization of polypeptide from velvet antler [J]. *J Jilin Univ: Sci Ed* (吉林大学学报:理学版), 2003, 41(1): 111-114.
- [8] Wang J H, Li Q, Lu Z Q, et al. The extraction and nature of collagen from deer skin [J]. *J Jilin Univ: Nat Sci* (吉林大学自然科学学报), 2001(1): 106-108.

大孔吸附树脂分离纯化黄连总生物碱的工艺研究

徐晓宏¹, 张铁军^{2*}, 廖茂梁², 刘可越³, 王文芳⁴, 吴延吉⁴

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津药物研究院 中药现代研究部, 天津 300193;
3. 九江学院, 江西 九江 332005; 4. 天津大学, 天津 300072)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂纯化黄连总生物碱的工艺。方法 采用 LD605、D101、DA201、NKA-9、AB-8 大孔吸附树脂对黄连总生物碱进行吸附纯化。以总生物碱的收率、质量分数为考察指标综合评价。结果 AB-8 大孔吸附树脂具有最佳的吸附洗脱参数, 其动态饱和和吸附-洗脱量达 1.23 mg/g, 2 倍体积蒸馏水、2 倍体积 40% 乙醇依次洗脱, 总生物碱收率为 85%, 质量分数为 80%。结论 AB-8 大孔吸附树脂对总生物碱综合性能较好, 适合于黄连总生物碱的分离纯化。

关键词: 黄连; 总生物碱; AB-8 树脂; 分离纯化

中图分类号: R286.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2007)08-1167-04

Separation and purification of total alkaloid from *Rhizoma Coptidis* by macrorreticular adsorbent resin

XU Xiao-hong¹, ZHANG Tie-jun², LIAO Mao-liang², LIU Ke-yue³, WANG Wen-fang⁴, WU Yan-ji⁴

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. Jiujiang University, Jiujiang 332005, China; 4. Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To study the technology for purification of total alkaloids from *Rhizoma Coptidis* by macrorreticular adsorbent resin. **Methods** LD605, D101, DA201, NKA-9, and AB-8 types of macrorreticular adsorbent resins were used to separate and purify the total alkaloid from *Rhizoma Coptidis*. The yields and purities of the products were compared as indexes. **Results** AB-8 Type macrorreticular adsorbent resin had optimum adsorption and elution parameters with its dynamic saturated adsorption ratio up to 1.23 mg/g. After eluted with 2 BV of distilled water and 2 BV 40% ethanol, the yields of total alka-

收稿日期: 2006-10-08

作者简介: 徐晓宏, 女, 在读硕士, 主要方向为中药研究与开发。

* 通讯作者 张铁军 Tel: (022)23006848

loid was 85%, and content was 80%. **Conclusion** The AB-8 type macroreticular resin shows a better comprehensive adsorption property and can be used to separate and purify the total alkaloids from *Rhizoma Coptidis*.

Key words: *Rhizoma Coptidis*; total alkaloids; AB-8 resin; separation and purification

黄连是毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎,性寒、味苦,具清热燥湿、泻火解毒、和胃止呕之效^[1]。黄连中主要含有小檗型生物碱。大孔吸附树脂是一类新型非离子型高分子化合物,主要通过表面吸附、表面电性或形成氢键等作用进行吸附,具有选择性好、解析容易、可反复利用等特点,目前主要用于工业脱色、医药工业的药物生物活性物质和中药化学成分提取分离纯化。罗集鹏等^[2]采用D-101树脂对黄连中小檗碱进行了富集和定量分析,发现大孔吸附树脂对黄连生物碱有较好的吸附作用。侯世祥等^[3]也以小檗碱为指标成分研究了影响LD605、NKA-Ⅱ型大孔吸附树脂吸附黄连提取液中有效成分的一些因素。本实验在以往的研究基础上以黄连水提取液为研究对象,采用大孔树脂吸附技术进行了纯化,同时对大孔吸附树脂进行了筛选实验,以找出对黄连总生物碱进行有效分离纯化的树脂并确定最佳工艺。

1 仪器与材料

UV—1601 紫外-可见分光光度计(日本岛津)。LD605 大孔吸附树脂(化工部成都有机硅研究中心),D-101、DA201 大孔吸附树脂(天津海光化工厂),NKA-9、AB-8 大孔吸附树脂(南开大学化工厂);黄连药材为市售品,经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定,为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎,符合《中国药典》2005 年版一部的有关规定。盐酸小檗碱(批号 110713-200208)、盐酸巴马亭(批号 732-8701)、盐酸药根碱对照品(批号 733-8701)由中国药品生物制品检定所提供,所用试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄连药材中总生物碱的测定

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 10.04 mg,置 50 mL 量瓶中,用 0.05 mol/L H_2SO_4 溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。同法制备盐酸巴马汀、盐酸药根盐对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备:取黄连粗粉约 0.1 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加入盐酸-甲醇(1:100)约 95 mL,60 ℃ 水浴中加热 15 min,取出,超声处理 30 min,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.1.3 检测波长的选择:分别取巴马亭、药根碱、小檗碱对照品溶液与药材供试品溶液,在 200~400 nm 波长扫描。结果表明,各对照品溶液与供试品溶液都在 345 nm 波长处有较大吸收,所以选择 345 nm 作为检测波长。

2.1.4 标准曲线的绘制:精密量取盐酸小檗碱对照品溶液 0.3、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置 50 mL 量瓶中,加 0.05 mol/L H_2SO_4 稀释至刻度,摇匀,在 345 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,进行线性回归。结果表明在 1.205~20.08 $\mu g/mL$ 与吸光度呈良好的线性关系,其回归方程为 $Y=0.0624X+0.0073$, $r=0.9999$ 。

2.1.5 测定^[4]:分别取对照品溶液和供试品溶液,采用柱色谱-分光光度法进行测定,得药材中总生物碱的质量分数为 16.28%。

2.2 大孔吸附树脂静态吸附和解吸试验考察

2.2.1 上样溶液的制备:称取黄连药材 1 kg,粉碎成粗粉,加入 12 倍体积水,回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液并浓缩至 8 L,采用柱色谱-分光光度法测定药液中总生物碱的质量浓度,备用。

2.2.2 树脂预处理:大孔树脂分别用 95% 药用乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,用乙醇洗至溶液加适量蒸馏水无白色浑浊现象时为止,最后用蒸馏水洗至无醇味,备用。

2.2.3 不同树脂对黄连总生物碱的静态吸附量试验:称取不同型号大孔吸附树脂 10 g,置 250 mL 烧杯中,加样品溶液 100 mL,每隔 5 min 振摇 10 s,持续 2 h,然后静置 24 h,充分吸附后,滤过,测定吸附前后溶液的吸光度值,计算静态吸附率。吸干经静态饱和吸附总生物碱后的各型号树脂表面水分,精密加入 95% 乙醇 200 mL,每隔 5 min 振摇 10 s,持续 2 h,同时采用柱色谱-分光光度法测定洗脱液中总生物碱的质量浓度,计算饱和吸附量和解吸率^[5]。结果见表 1。可以看出除 NKA-9、DA201 外,另外 3 种树脂的静态吸附量很高,同样这 3 种大孔吸附树脂的解吸率较高。考虑到吸附率和解吸率,故选择 AB-8、D-101、LD605 大孔吸附树脂进行进一步试验。

饱和吸附量=(原料液质量浓度×原料液体积-流出液质量浓度×流出液体积)/湿树脂的量

吸附率=饱和吸附量/原料液中总碱的量×100%

解吸率=洗脱液质量浓度×洗脱液体积/饱和吸附量×100%

表 1 大孔吸附树脂对黄连中总生物碱的静态吸附率和静态解吸率

Table 1 Static adsorption and desorption rates of total alkaloid in *Rhizoma Coptidis* by macroreticular adsorbent resins

树脂种类	极性	饱和吸附量/ (mg·g ⁻¹)	静态吸 附率/%	总解吸量 (mg·g ⁻¹)	静态解 吸率/%
LD605	非极性	49.34	51.03	37.08	75.15
D-101	非极性	51.58	56.01	40.30	78.13
NKA-9	极性	27.86	28.77	15.67	56.33
DA201	极性	39.10	40.44	25.15	64.31
AB-8	弱极性	53.70	55.53	41.40	77.11

2.3 大孔吸附树脂动态吸附和解吸试验考察

2.3.1 大孔吸附树脂动态吸附考察:将黄连提取液分别缓慢加入装有等量 AB-8、LD605、D-101 树脂柱(30 cm×1.2 cm)中,控制流量为 1 BV/h,每 0.5 BV 为 1 个流份,测定所各流份中的总生物碱的质量浓度,结果见图 1。可以看出,3 种大孔吸附树脂中,AB-8 从第 11 个流份开始,黄连总生物碱出现较大泄露;LD605 和 D-101 均从第 7 个流份开始出现泄露;随着流份数的增加,黄连总生物碱的质量浓度也不断上升,对于 AB-8 来说增至第 22 个流份以后,曲线趋于平缓,即此时 AB-8 树脂对黄连总生物碱的动态吸附趋于饱和,吸附量可达 40.66 mg/g。而 LD605 和 D-101 对总生物碱的吸附量分别是 35.54、32.05 mg/g。

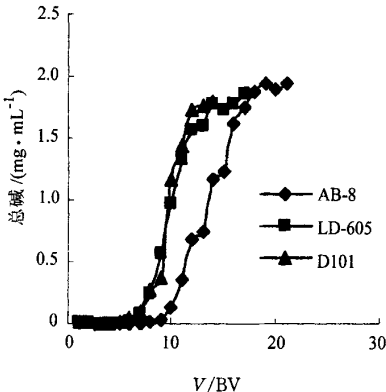


图 1 AB-8、LD605 和 D-101 大孔吸附树脂吸附量与时间曲线的关系

Fig. 1 Relationship between adsorbance and time of AB-8, LD605, and D-101 macroreticular adsorbent resins

2.3.2 乙醇不同体积分数和用量对大孔吸附树脂的动态洗脱考察:黄连水提液 20 mL(相当于 2.5 g 生药)上 AB-8、LD605、D-101 树脂柱后,分别以蒸馏水和 30%、50%、70% 乙醇各 80 mL(相当于 4 个树脂床体积)洗脱,每 20 mL 为一个树脂床体积,分别测定各洗脱液流份中黄连总生物碱的质量浓度,绘制洗脱曲线,见图 2。可以看出,30%、50%乙醇就可以把绝大部分总生物碱洗脱下来,并且因为 3 种大孔吸附树脂的极性相似,对黄连总生物碱的吸附能力相当,所以有几乎相同的洗脱行为。

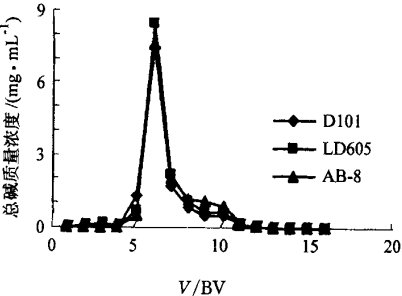


图 2 不同体积分数乙醇对黄连总生物碱的影响
Fig. 2 Effect of different concentrations of ethanol on total alkaloid in *Rhizoma Coptidis*

综合考虑 3 种树脂的吸附和洗脱能力,最终选用 AB-8 大孔吸附树脂进行黄连总生物碱的纯化。

2.4 AB-8 大孔吸附树脂吸附和解吸试验的考察

2.4.1 上样质量浓度对大孔吸附树脂吸附量的影响:取相同质量的 AB-8 型大孔吸附树脂,将黄连提取液浓缩后分别稀释为含生药 0.25、0.20、0.17、0.125、0.10、0.07、0.03 g/mL,进行不同上样质量浓度对树脂吸附量的研究,结果树脂对不同质量浓度的药液吸附量分别为 66.5、67.8、74.3、75.6、50.5、39.0、27.2 mg/g,结果见图 3。可见随着上样质量浓度的增加,树脂的吸附量也增加,当质量浓度达到含生药 0.125 g/mL 后,随着质量浓度的增加,树脂的吸附量反而有所下降,所以上样生药质量浓度应该控制在 0.125~0.20 g/mL。

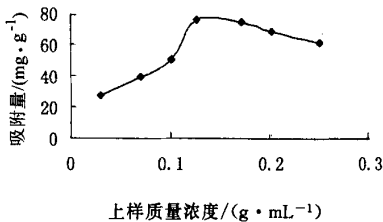


图 3 不同上样质量浓度对吸附量的影响
Fig. 3 Effect of different concentrations of samples on adsorbance

2.4.2 冲洗杂质用水体积的考察:将经预处理的 AB-8 大孔吸附树脂装入玻璃柱(30 cm × 1.5 cm)中,用 0.125 mg/mL 黄连水溶液上样(含总碱 456 mg),以 1 BV/h 上柱,吸附完全后,分别以 1、2、3、4、5、6、7 BV 水冲洗(流量为 0.5 mL/min),每 1 BV 为一个流份,测定吸光度,计算总生物碱的质量分数,同时测定每一流份的出膏量,计算总生物碱的损失率,见表 2。可以看出,前 2 个洗脱体积出膏量大于流出的总生物碱的量,第 3 个洗脱体积以后出膏量与总生物碱的量相差不大。考虑到树脂的除杂作用,为了减少洗脱用水,缩短洗脱时间,选择 2 BV 为洗脱杂质用水量。

表 2 不同体积水量对出膏量和总生物碱量的影响

Table 2 Effect of various water amounts on extract yield and total alkaloid

水洗体积	总生物碱量/mg	出膏量/mg	损失率/%
1	4.02	177.56	0.97
2	15.23	59.87	3.33
3	20.21	34.94	4.40
4	22.07	24.13	4.83
5	18.16	26.70	3.90
6	15.79	19.31	3.46

2.4.3 乙醇体积分数和用量的选择:分别取 AB-8 树脂 3 等份,用 95%乙醇充分溶胀,用蒸馏水洗净,装柱,供试品溶液 3 等份(含总碱 456 mg)分别上样(经计算上样液中所含总碱量小于树脂泄露量),用蒸馏水洗 3 BV 后,分别用 20%、30%、40% 乙醇洗脱,收集洗脱液,每 1 BV 一份,测定每份中总生物碱量,绘制洗脱曲线,见图 4。可以看出,随着乙醇体积分数的增加,洗脱能力增加,40%乙醇优于 20%、30%乙醇,并且 40%乙醇在 2 BV 内将总生物碱的 80%以上洗脱下来,故没有考察其他体积分数的乙醇。

2.4.4 吸附-洗脱性能稳定性试验:准确量取已处理好的 AB-8 干树脂约 80 g,湿法装入玻璃柱(100 cm × 3 cm)中,黄连提取物溶液 150 mL(0.125 g 生药/mL)以 1 BV/h 上柱,用蒸馏水洗 2 BV 后,用 2 BV 40%乙醇以 1 BV/h 洗脱,收集洗脱液。重复以上操作。重复上述操作 2 次,分别将各次洗脱液减压蒸发,浓缩,干燥,测定。结果总生物碱的量分别为 2.65、2.71、2.68 g,转移率分别为 91.44%、93.50%、92.31%,质量分数分别为 84.47%、

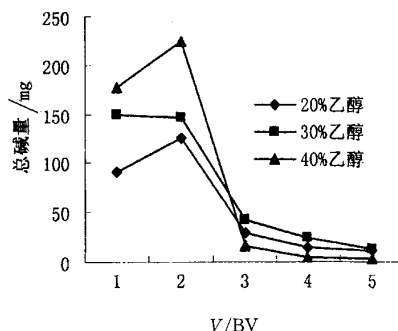


图 4 乙醇体积分数和用量对解吸率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration and amount on desorption rate

83.40%、85.12%。

3 结论

通过对 5 种大孔吸附树脂的静态吸附研究发现 AB-8 型大孔吸附树脂是一种比较理想的树脂,吸附量大,解吸率高,较适合黄连中总生物碱的分离纯化,具有操作简便、重现性好、消耗少等优点,具有较好的推广应用前景。

黄连中总生物碱的纯化工艺选用 AB-8 大孔吸附树脂,上柱药液质量浓度为 0.125 ~ 0.20 mg/mL,50 g 湿态树脂可以处理 15 g 生药,洗脱流量为 1 BV/h,以蒸馏水洗脱 2 BV 后,再用 40%乙醇洗脱收集 2 BV 即可。黄连提取液未纯化之前总生物碱的质量分数为 48%左右,出膏率为 26%,所得纯化物中总生物碱的质量分数在 80%以上,出膏率为 15%,可见经过大孔吸附树脂纯化后体积分数提高 30%以上,出膏率降低了 10%以上,从而为新药开发提供了选择。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Luo J P, Ma H W, Xu M Q. Enrichment and quantitative analysis of berberine by macroreticular resin [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2000, 23(7): 413-415.
- [3] Hou S X, Zhu H, Sun Y Y, et al. Effect on separation and purification of coptis extract of *Rhizoma Coptidis* through macroreticular resin [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(11): 666-668.
- [4] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 1990.
- [5] Shu X S, Gao Z H, Yang X L. Optimize separation conditions of bamboo-brier saponin by macroreticular resin [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药志), 2005, 30(1): 30-32.