

实验过程中选择了 3 种流动相系统甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水(0.05% TFA) 进行梯度洗脱, 对流动相的考察结果表明甲醇-水系统与乙腈-水系统差别不大, 从实验成本角度考虑, 选择了较为经济的甲醇-水系统。

实验选择了索氏提取法、回流提取法和超声提取法 3 种提取方法进行提取方式的考察。结果表明超声提取法优于其他两种提取方法。同时对超声时间的考察结果表明, 超声 30、45、60 min 的提取能力

无显著性差异, 故超声时间确定为 30 min。

参考文献:

- [1] 吴晓磊, 潘 勤. 甘遂化学成分的研究[J]. 中草药, 2010, 41(6): 877-881.
- [2] 刘道清. 中药别名大辞典[M]. 郑州: 中原农民出版社, 1999.
- [3] 权宜淑. 中药甘遂的本草调查[J]. 西北药学杂志, 1994, 12(9): 255-257.
- [4] 王立岩. 甘遂的化学成分及其生物活性的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [5] 郑维发. 甘遂提取物抗病毒活性成分及其毒性研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 1998.
- [6] 张 耀, 汪俊松, 孔令义. 甘遂烷型三萜的研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1733-1739.

黄柏生物碱大孔树脂纯化工艺研究

刘丽梅¹, 陈 琳¹, 王瑞海¹, 陈韩英², 杨立新³, 牛燕梅¹, 刘凤华⁴, 许剑琴⁵

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; 2. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 4. 北京农学院 动物科技系, 北京 102206; 5. 中国农业大学动物医学院, 北京 102206)

摘 要:目的 筛选黄柏总生物碱大孔树脂纯化工艺。方法 对黄柏总生物碱提取液纯化所用大孔树脂型号、洗脱剂体积分数、大孔树脂吸附容量、上柱药液 pH 值、上柱速度、洗脱剂用量、洗脱剂流速、洗脱液浓缩质量浓度、洗脱液浓缩后 pH 值进行考察。结果 黄柏总生物碱大孔树脂纯化最佳工艺: 大孔树脂载样量为 AB 8 大孔树脂: 黄柏药材= 1: 1.2(g/g), 上样速度为 2 BV/h, 50% 乙醇洗脱, 速度 1.5 BV/h, 收集 6BV 洗脱液, 回收乙醇, 浓缩至 1.5 g 生药/mL, 其相对密度为 1.015~1.017(70℃), 放置室温, 浓盐酸调节 pH 0.2~0.4, 冷藏放置 12 h, 离心, 沉淀低温减压干燥, 得黄柏总生物碱。提取物中盐酸小檗碱质量分数达到 57.38%, 黄柏总生物碱质量分数达到 59.04%。结论 该工艺稳定, 质量可控, 可用于柏总生物碱纯化的产业化生产。

关键词:黄柏; 总生物碱; 大孔树脂; 纯化

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)12-1990-04

黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 习称川黄柏, 具有清热燥湿、泻火除烦、解毒疗疮等功效^[1]。黄柏中含有多种生物碱, 主要为小檗碱, 还有巴马汀、药根碱、黄柏碱、蝙蝠葛碱、白瓜蒌碱、木兰花碱等生物碱^[2]。资料表明黄柏生物碱具有抗溃疡及抗腹泻作用, 对免疫功能具有调节作用^[2], 是本课题组提取的有效部位。前期研究确定了黄柏总生物碱提取工艺^[3], 本实验采用大孔树脂纯化, 使黄柏总生物碱大于提取物的 50%。

1 仪器和材料

SPS202 Ohaus 电子天平(梅特勒-托利多(常州)称重设备系统有限公司), Startorius CP 2250 天平(德国), T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司), WATERS-717-2487 高效

液相色谱仪。紫外灯(上海精科实业有限公司)。

AB-8、D4020、S-8 大孔树脂(天津南开大学化工厂), 860021、DM-130、CD-180、D001-SD 大孔树脂(山东鲁抗医药股份有限公司), 医用酒精(挚友酒精厂), 氯仿、甲醇、氨水均为分析纯。薄层色谱板(烟台市化学工业研究所)。

黄柏药材购自河北安国, 经中国中医科学院中药所冯学峰研究员鉴定为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 其盐酸小檗碱的质量分数为 3.65%。

2 方法与结果

2.1 盐酸小檗碱的 HPLC 测定方法的建立^[1]

2.1.1 色谱条件: 色谱柱 Waters C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(50:50)(每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.1 g); 检测波

收稿日期: 2010-02-27

基金项目: 北京市科技计划课题(Y0705003041631)

作者简介: 刘丽梅(1965—), 女, 黑龙江人, 副研究员, 从事中药研究及中医方证基础研究。

Tel: (010) 64014411-2592 E-mail: liulimeih@163.com

长: 265 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 35 ℃。

2.1.2 对照品溶液的制备: 精密称取盐酸小檗碱 1.5 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备: 取样品约 50 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加乙醇 80 mL, 超声处理 30 min, 加乙醇至刻度, 摇匀, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 标准曲线的制备: 取干燥至恒重的盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定, 加乙醇制成 0.14 mg/mL 的溶液。分别精密吸取 2、4、6、8、10 μL 注入液相色谱仪, 连续进样 3 次, 测定峰面积。以进样量为横坐标, 峰面积均值为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表明盐酸小檗碱在 0.28~1.40 μg 线性关系良好, 其回归方程为 $Y = 4574.647X - 156.623$, $r = 0.9998$ 。

2.1.5 测定: 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算供试品中盐酸小檗碱的质量浓度。

2.2 黄柏总生物碱紫外分光光度法的建立^[2]: 取一定量黄柏提取物, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加

95% 乙醇 30 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 用 95% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤纸滤过。取续滤液 2 mL, 注入 50 mL 量瓶中, 加入 0.05 mol/L 硫酸定容, 摇匀。取 95% 乙醇 2 mL 置 50 mL 量瓶中, 加入 0.05 mol/L 硫酸定容, 作空白对照溶液, 于 345 nm 波长进行紫外分光光度计测定。

2.3 大孔树脂型号的筛选: 采用动态吸附法对不同型号的大孔树脂进行筛选。取不同极性 7 个型号大孔树脂各 100 g, 按说明书要求进行处理备用。取黄柏细丝, 加药材 10 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 药液回收乙醇, 浓缩至相对密度为 0.998~1.005 (60 ℃), 加水至药液总体积相当于药材 24 倍^[2]。冷藏过夜, 离心, 上清液采用不同型号的大孔树脂进行动态纯化, 分别用水、10%、30%、50%、95% 乙醇或酸醇进行洗脱, 收集不同质量浓度洗脱样品, 采用 HPLC 法测定盐酸小檗碱, 采用紫外-可见分光光度法测定总生碱, 结果见表 1。结果表明, 采用 AB-8 大孔树脂纯化黄柏提取液纯化效果优于其他型号大孔树脂, 故采用 AB-8 大孔树脂进行黄柏提取液的纯化, 并对纯化参数进行优化。

表 1 各种型号树脂纯化黄柏的筛选结果

Table 1 Screening of *Phellodendri Cortex* purification with different types of resin

树脂型号	洗脱剂	出膏量/g	盐酸小檗碱/%	总生碱/(g·g ⁻¹)	总生碱解吸量/(g·g ⁻¹)	总生物碱得率/%
DM-130	水-10%乙醇	2.58	—	0.40	—	—
	30%乙醇	3.41	30.58	29.70	10.12	2.26
	50%乙醇	0.14	—	3.66	—	—
860021	10%乙醇	1.00	4.82	13.99	—	—
	30%乙醇	3.38	37.02	36.58	12.36	2.06
D4020	10%乙醇	1.13	4.31	15.38	—	—
	30%乙醇	3.28	34.74	34.25	11.23	1.87
S-8	水-10%乙醇	1.73	30.06	28.33	4.90	1.90
	30%乙醇	0.83	—	—	—	—
CD-180	95%乙醇	0.54	41.96	38.11	—	—
	0.1%酸醇	4.95	23.95	20.86	10.33	1.72
D001-SD	10%~95%乙醇	0.24	—	2.96	—	—
	0.5%~10%酸醇	10.05	8.69	13.6	13.67	2.72
AB-8	30%乙醇	3.91	41.17	45.59	17.82	2.97
	50%+95%乙醇	0.44	—	—	—	—

—: 未计算

—: not counted

2.4 洗脱剂体积分数的筛选及洗脱药液浓缩后 pH 值的确定: 预试验表明, 10% 乙醇冲洗可除去一部分杂质, 生物碱集中在 30%~50% 乙醇洗脱液。取黄柏 5 份, 提取纯化, 按表 2 工艺洗脱大孔树脂, 按色带收集药液, 并用薄层色谱检查至小檗碱痕量, 测定提取物中总生物碱, 结果见表 2。结果表明, 10% 乙醇除杂再用 30% 乙醇冲洗大孔树脂总生物碱量高, 但洗脱体积大, 周期长, 与之相比, 直接用

50% 乙醇洗脱大孔树脂总生物碱略低, 但洗脱体积小, 周期短。由于 30%、50% 乙醇洗脱黄柏总生物碱量均小于 50%, 需进一步纯化。将洗脱液浓缩后调节 pH 值, 生物碱析出, 为此对 30%、50% 乙醇洗脱液浓缩后的 pH 值进行筛选。

取 4 份等量 AB-8 大孔吸附树脂, 按要求进行预处理, 检验合格后备用。取 4 份黄柏, 按优选工艺提取并行上柱前纯化, 上清液上柱, 进行洗脱, 按色

带收集药液,回收乙醇,浓缩,用浓盐酸调节 pH 值至没有物质析出,放置 12 h,离心,沉淀减压干燥,测定提取物中盐酸小檗碱和总生物碱,结果见表 3。结果表明直接用 50% 乙醇洗脱,药液回收乙醇后用浓盐酸调节至 pH 0.2~0.4,生物碱基本析出,提取物中盐酸小檗碱转移率和总生物碱提取纯化得率最高,故确定洗脱剂为 50% 乙醇,洗脱液用盐酸调节至 pH 0.2~0.4。

表 2 乙醇洗脱树脂体积分数的筛选条件及结果

Table 2 Screening conditions and results of ethanol eluting concentration of resins

除杂体积 数/体积	洗脱体积 分数/%	洗脱体积 / BV	出膏率 /%	总生物碱 /%
10/4	30	24	5.58	42.35
—	30	10	8.81	10.50
—	50	6	1.05	12.06
—	50	4	7.79	24.45
10/4	50	4.5	6.29	39.99
10/4	40	7	5.77	37.64

表 3 30%、50%乙醇洗脱大孔树脂样品及 pH 值范围

Table 3 Samples and pH values of resin with 30% and 50% ethanol eluting

除杂体积 分数/体积	洗脱体积 分数/体积	洗脱液/ (g·mL ⁻¹)	pH 值	出膏率 /%	盐酸小檗碱 转移率/%	总生物碱 得率/%
10/4	30/24	2.0	0.40	5.78	78.64	3.58
—	30/24	1.0	0.23	4.18	73.16	2.97
10/4	50/6.5	1.5	0.31	6.00	81.93	3.61
—	50/6.5	1.5	0.23	5.87	90.24	3.62

2.5 大孔树脂吸附容量的考察: AB-8 大孔吸附树脂 100 g, 按要求处理装柱(40 cm×3 cm) 备用。取黄柏丝 270 g, 按优选工艺提取并进行上柱前纯化, 上清液上柱, 上柱速度控制在 2 BV/h, 分段收集流出液, HPLC 法检测流出液中盐酸小檗碱的质量浓度, 绘制吸附容量图, 见图 1。结果表明, 100 g 大孔吸附树脂吸附 130 g 黄柏药材提取的药液时开始渗漏, 考虑生产实际情况, 该复方工艺中大孔吸附树脂吸附黄柏量定为 1:1.2(g/g), 即 100 g 大孔树脂载 120 g 黄柏药材提取液。

2.6 药液上柱时 pH 值的考察: 取 3 份 AB-8 大孔吸附树脂各 100 g, 按要求处理装柱(40 cm×3 cm), 备用。取 3 份黄柏各 80 g, 按优选工艺提取并行上柱前纯化, 得上清液, 测得 pH 4.5。3 份药液 1 份为原洗脱药液(pH 4.5), 另外 2 份洗脱药液用 5% 氢氧化钠调节 pH 7.5、10.5, 使 3 份药液分别在酸性、中性、碱性时上样, 按色带收集 50% 乙醇洗脱液 6.5 BV, 回收乙醇, 浓缩, 浓盐酸调节 pH 0.2~0.4, 放置 12 h, 离心, 沉淀减压干燥, 测定提取物中

盐酸小檗碱和总生物碱, 结果见表 4。结果表明, 3 种不同 pH 值药液上柱洗脱样品中盐酸小檗碱转移率和总生物碱提取率以 pH 4.5 时药液上样最佳, 故按优选工艺提取并进行上柱前纯化的上清液可直接上样。

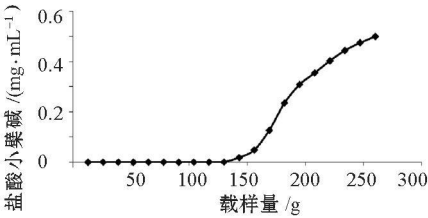


图 1 大孔树脂吸附黄柏药液容量
Fig 1 Adsorption of liquid capacity of Phellodendri Cortex by resin

表 4 上柱药液 pH 的考察结果

Table 4 pH Values of sample

药液 pH 值	出膏率 /%	盐酸小檗 碱/%	盐酸小檗碱 转移率/%	总生物 碱/%	总生物碱 得率/%
4.5	4.26	57.03	65.62	62.04	2.64
7.5	3.54	57.28	55.55	65.70	2.32
10.5	3.60	59.65	58.83	62.94	2.27

2.7 药液上柱速度的考察: 取 3 份 AB-8 大孔树脂各 100 g, 按要求处理装柱(40 cm×3 cm), 备用。取 3 份黄柏药材各 120 g, 按优选工艺提取并行上柱前纯化, 上清液上柱, 将上柱速度分别控制在 2、4、6 BV/h, 洗脱速度相同(2 BV/h), 按色带收集 50% 乙醇洗脱液 6.5 BV, 按照以上试验操作, 测定盐酸小檗碱和总生物碱, 结果见表 5。结果表明上柱速度为 2 BV/h 时, 样品中盐酸小檗碱转移率和总生物碱提取率为最高, 故上柱速度选择 2 BV/h。

表 5 药液上柱速度的筛选结果

Table 5 Screening of column speed of sample

上柱速度/ (BV·h ⁻¹)	出膏率 /%	盐酸小檗 碱/%	盐酸小檗碱 转移率/%	总生物 碱/%	总生物碱 得率/%
2	5.23	55.40	79.38	60.53	3.17
4	4.99	56.11	76.70	60.88	3.04
6	4.80	58.19	76.52	64.65	3.10

2.8 乙醇洗脱大孔树脂用量的考察: AB-8 大孔树脂 100 g, 按要求处理装柱(40 cm×3 cm), 备用。根据吸附容量试验结果, 取黄柏 120 g, 按优选工艺提取并进行上柱前纯化, 上清液上大孔树脂, 按柱体积收集 50% 乙醇洗脱液数份, 测定流出液中盐酸小檗碱, 根据解吸体积和质量浓度绘制盐酸小檗碱解吸曲线图, 见图 2。结果表明, 当 50% 乙醇洗脱 6 BV 以后, 盐酸小檗碱峰的量已很少, 因此用 50% 乙醇洗脱, 收集 6 BV 流出液。

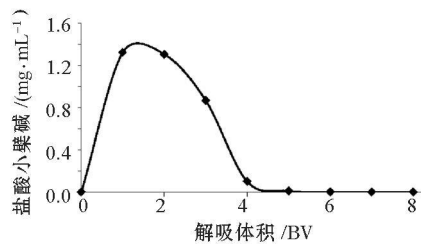


图 2 盐酸小檗碱解吸曲线

Fig 2 Desorption curve of berberine hydrochloride

2.9 洗脱剂体积流量的考察: 取 3 份 AB-8 大孔树脂各 100 g 按要求处理装柱(40 cm×3 cm), 备用。取 3 份黄柏药材各 120 g, 按优选工艺提取纯化, 上清液上柱, 上柱速度均为 2 BV/h, 洗脱速度分别为 0.5、1.0、1.5 BV/h, 收集 50% 乙醇洗脱液 6 BV, 其他同上, 测定样品中盐酸小檗碱和总生物碱, 结果见表 6。结果表明, 大孔树脂乙醇洗脱速度为 1.5 BV/h 时, 样品中盐酸小檗碱转移率和总生物碱提取率最高, 故选择洗脱速度为 1.5 BV/h 适宜。

表 6 大孔树脂下样洗脱速度的筛选结果

Table 6 Screening of eluting speed of sample with resin					
洗脱速度/ (BV·h ⁻¹)	出膏率 /%	盐酸小檗 碱/ %	盐酸小檗碱 转移率/ %	总生物 碱/ %	总生物碱 得率/ %
0.5	4.75	59.87	77.91	64.77	3.08
1.0	5.20	56.15	79.99	62.75	3.26
1.5	5.29	56.07	81.26	63.29	3.35

2.10 洗脱液浓缩质量浓度的考察: 取 AB-8 大孔树脂 300 g, 按要求处理装柱(80 cm×6 cm), 备用。取黄柏 360 g, 按优选工艺提取并进行上柱前纯化, 收集 50% 乙醇洗脱液 6 BV, 均分为 3 份, 每份洗脱液分别浓缩至不同质量浓度, 加浓盐酸调 pH 0.2~0.4, 冷藏放置 12 h, 离心, 取沉淀减压干燥, 测定样品中盐酸小檗碱和总生物碱, 结果见表 7。结果表明, 50% 乙醇洗脱液浓缩至含生药 1.5 g/mL 时, 样品中盐酸小檗碱转移率、总生物碱提取率最高, 故用 50% 乙醇洗脱大孔树脂, 药液浓缩至含生药 1.5 g/mL 时调节 pH 值最佳, 此时测定其相对密度为 1.015~1.017 (70℃)。

表 7 洗脱液浓缩浓度的筛选结果

Table 7 Screening of eluent concentration					
质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	出膏率 /%	盐酸小檗 碱/ %	盐酸小檗碱 转移率/ %	总生物 碱/ %	总生物碱 得率/ %
1.0	5.05	58.40	80.80	62.84	3.17
1.5	5.87	52.37	84.22	57.53	3.37
2.0	6.23	46.44	70.27	50.92	3.17

2.11 验证实验: 取 AB-8 大孔树脂 800 g, 装柱(80 cm×6 cm) 处理备用。取黄柏 960 g, 按优选工艺提取、上柱前纯化、上柱纯化, 测定样品中盐酸小檗碱及总生物碱, 结果见表 8。结果表明, 该工艺稳定, 质量可控。提取物中盐酸小檗碱质量分数达到 57.38%, 盐酸小檗碱转移率达到 71.77%, 黄柏总生物碱质量分数达到 59.04%。

表 8 验证试验

Table 8 Test of verification					
编号	出膏率 /%	盐酸小檗 碱/ %	盐酸小檗碱 转移率/ %	总生物 碱/ %	总生物碱 得率/ %
1	4.62	54.42	68.95	55.36	2.56
2	4.65	58.16	72.66	61.71	2.81
3	4.52	59.55	73.71	60.07	2.71
平均	4.57	57.38	71.77	59.04	2.69

3 讨论

黄柏总生物碱呈酸性, 考虑到生产中干燥设备的适应性以及配方酸碱度适宜性, 将浓盐酸调节 pH 值后得到的黄柏总生物碱沉淀加适量的去离子水(药材质量 1/4 的水量), 搅匀, 用 20% NaOH 溶液调节沉淀液的 pH 3.5~4, 将其浓缩至稠膏, 低温减压干燥, 得到黄柏总生物碱, 该半成品没有酸的气味。

二类中药要考察单一成分和总有效成分的量, 为此实验中给出了盐酸小檗碱和总生物碱量, 并通过考察盐酸小檗碱的转移率和总生物碱提取纯化得率来考核提取纯化的工艺。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005
[2] 邹节明, 陆浩, 何斌等. 苦玄参、黄芩与黄柏的大孔树脂提取研究[J]. 中草药, 2003, 34(3): 222-226
[3] 刘丽梅, 王瑞海, 陈琳等. 黄柏总生物碱提取方法及工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010(2): 3-5