

## ·工艺研究·

## 离子交换树脂纯化黄连生物碱的工艺研究

魏金津, 姚 曦, 何 伟(广东药学院药物研究所广东省药物新剂型重点实验室, 广东 广州 510006)

**摘要:** 目的 优选离子交换树脂纯化黄连生物碱的工艺条件。方法 以表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱含量为指标, 考察 D113 型、D001 型、D151 型、110 型、732 型阳离子交换树脂纯化黄连生物碱的效果及优选最佳树脂纯化工艺条件。结果 D151 型离子交换树脂比其他树脂具有较优的吸附及洗脱参数; 最佳纯化条件为: 样品溶液浓度(以生药计)为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $\text{pH}=9$ , 流速为  $3 \text{ BV/h}$ , 洗脱剂为 40% 乙醇酸性溶液(含 10% 醋酸), 用量  $7 \text{ BV}$ , 洗脱温度  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。结论 黄连提取液过 D151 型离子交换树脂柱前后各成分转移率均在 95% 以上, 纯化效果好, 适用于黄连生物碱的精制纯化。

**关键词:** 黄连; 离子交换树脂; 总生物碱; 精制工艺

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)06-0625-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.026

**Purification of Total Alkaloid from Rhizoma Coptidis by Ion Exchange Resin**

WEI Jinjin, YAO Xi, HE Wei (Medicine Institute of Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of New Medication Preparation, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To investigate the purification technology for total alkaloid from Rhizoma Coptidis by ion exchange resin. **Methods** With the contents of epiberberine, coptisine, palmatine, and berberine as the indicators, the effect of D113, D001, D151, 110 and 732 ion exchange resins in purifying the total alkaloids from Rhizoma Coptidis was evaluated, and the ion exchange resin purification condition was optimized. **Results** It has been found that D151 resin had the best adsorption and elution capacity for total alkaloids. The optimal process was as follows: the concentration of the sample solution was  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and pH value was 9 with flow rate at  $3 \text{ BV/h}$ , eluting at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  with 40% ethyl alcohol acid solution (with 10% acetic acid) 7 times as much as the resin volume. **Conclusion** Under the optimized conditions, the proportion of total alkaloid is over 95%, showing excellent purification of total alkaloid from Rhizoma Coptidis.

**Keywords:** Rhizoma Coptidis; Ion exchange resin; Total alkaloid; Refining process

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎, 具有泻火、解毒、清热、燥湿等功效。黄连生物碱主要含有小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱和药根碱等, 具有抗菌、降血糖、降血脂、抗血小板凝集等药理作用<sup>[1]</sup>。大多数生物碱因在其化学结构中含有一个或者一个以上带

电荷的氮原子, 故呈现碱性。离子交换树脂为高分子聚合物, 含有可电离活化的基团, 可与离子性药物靠静电作用相互吸附, 达到精制纯化的目的。本实验以表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱为指标, 考察阳离子交换树脂对黄连生物碱的吸附洗脱能力及优选树脂精制工艺参数, 为黄连生物碱精制工艺提供依据。

收稿日期: 2013-06-21

作者简介: 魏金津, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药剂学。Email: miyatane@126.com。通讯作者: 何伟, 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药新药与质量标准的研究。Email: weih8201@163.com。

基金项目: 十一五国家科技重大专项(2009ZX09103-407)。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Dionex ultimate 3000 高效液相色谱仪 (Thermo Fisher Scientific); BS224S 型电子分析天平 (Sartorius); CP 225D 型电子分析天平 (Sartorius); PHS-25C 型 pH 计 (上海理达仪器厂); RE52-05 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); UPH-I 型超纯水机 (成都超纯科技有限公司); SHZ-D(III) 型循环水式真空泵 (巩义市英峪予华仪器厂); DLSB 低温冷却循环泵 (郑州长城科工贸有限公司)。

**1.2 试剂** 黄连药材购自广州致信药业有限公司, 经广东药学院中药鉴定学教研室刘基柱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: 110731-200911, 购自中国药品生物制品检定所; 乙醇, 天津市富宇精细化工厂; D113 型、D001 型、D151 型、110 型和 732 型离子交换树脂, 均购自山东鲁抗立科药物化学有限公司; 液相用乙腈为色谱纯, 美国 LABSCIENCE; 液相用水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 黄连生物碱含量的测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Akasil C<sub>18</sub> (250×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (47:53); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 345 nm; 进样量: 10 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含小檗碱 0.1032 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

**2.1.3 标准曲线的绘制** 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 μL, 注入液相色谱仪中, 按照 2.1.1 项下色谱条件测定盐酸小檗碱色谱峰面积, 以小檗碱质量 (μg) 为横坐标 (X), 峰面积积分为纵坐标 (Y), 绘制盐酸小檗碱标准曲线, 得回归方程:  $Y=61.1873X+0.0078$ ,  $r=0.9999$ , 表明盐酸小檗碱在 0.1032~3.0960 μg 范围内线性关系良好。以盐酸小檗碱对照品的峰面积为对照, 分别计算表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的含量, 用待测成分色谱峰与盐酸小檗碱色谱峰的相对保留时间确定。

### 2.2 离子交换树脂型号的选择

**2.2.1 样品溶液的制备** 称取黄连药材 1 kg, 加入 70% 乙醇, 回流提取 2 次 (10 倍、8 倍), 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇并浓缩, 5000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 预处理药液, 加水定容至 5000 mL (以黄连药材计为 0.2 g·mL<sup>-1</sup>, 作为样品溶液 I)。

分别精密吸取 50 mL 样品溶液 I, 通过 D113 型、D001 型、D151 型、110 型和 732 型树脂柱 (内径为 1.5 cm, 柱高为 12 cm, 树脂量为 10 mL), 收集流出液, 用水洗至流出液近无色, 收集水洗液, 与流出液合并, 定容至 100 mL, 作为样品溶液 II。继用 50% 乙醇酸性溶液 (含醋酸 10%) 恒温 45 °C 洗脱至流出液近无色, 收集洗脱液, 定容至 100 mL, 作为样品溶液 III。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密吸取各样品溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 作为供试品溶液, 分别注入液相色谱仪中, 按照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积积分值, 计算其含量及各型号树脂的比吸附量和洗脱率, 结果见表 1。

表 1 不同类型树脂考察结果

Table 1 Adsorption and desorption rates of alkaloid by different type of ion exchange resin

树脂类型	比吸附量/mg·mL <sup>-1</sup>				洗脱率/%			
	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
D113	8.64	15.39	13.62	54.98	12.62	26.80	24.25	67.28
D001	6.97	11.72	11.20	45.40	38.06	30.91	61.67	52.62
D151	7.19	13.95	10.86	49.29	99.92	99.62	98.37	100.01
110	2.43	5.25	5.15	23.50	93.17	97.30	99.14	99.08
732	9.35	16.14	14.87	59.06	0.00	0.00	1.15	0.88

结果显示, D151 型离子交换树脂对表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的比吸附量和洗脱率均较高, 故选择 D151 型离子交换树脂, 并进一步优选其工艺条件。

### 2.3 优选动态吸附条件

**2.3.1 正交试验** 以表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱含量为指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验考察样品溶液浓度、pH 值、流速等因素对黄连生物碱精制效果的影响, 试验设计见表 2。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Orthogonal factor-level table

水平	因素			
	pH 值	浓度/g·mL <sup>-1</sup>	交互影响列	流速/BV·h <sup>-1</sup>
	A	B	A×B	D
1	7	0.1		1
2	8	0.2		2
3	9	0.3		3

按表 2 中各条件, 分别精密量取生药量为 20 g 的样品溶液 I, 平行 2 份, 通过已处理好的 D151 型

离子交换树脂柱(内径为 1.5 cm, 柱高为 12 cm, 树脂量为 10 mL), 水洗至流出液近无色, 收集流出液, 定容至 250 mL, 精密吸取各溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 作为供试品溶液。吸取各

供试品溶液, 分别注入液相色谱仪中, 按照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积积分值, 计算其含量及比吸附量。结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 3 正交试验设计表

Table 3 Orthogonal arrangement and results

试验号	列号				试验结果				
	1	2	3	4	表小檗碱比吸附量 /mg·mL <sup>-1</sup>	黄连碱比吸附量 /mg·mL <sup>-1</sup>	巴马汀比吸附量 /mg·mL <sup>-1</sup>	小檗碱比吸附量 /mg·mL <sup>-1</sup>	综合得分
	因素								
	A	B	A×B	D					
1	1	1	1	1	16.56	28.81	27.50	110.75	90.94
2	1	2	2	2	13.43	25.49	21.79	95.85	76.31
3	1	3	3	3	11.18	22.93	17.42	84.20	65.26
4	2	1	2	3	16.98	29.23	28.37	112.88	92.99
5	2	2	3	1	15.84	27.95	26.31	107.34	87.61
6	2	3	1	2	13.64	25.77	22.26	97.19	77.48
7	3	1	3	2	18.37	30.86	31.07	120.66	100.00
8	3	2	1	1	17.27	29.62	28.97	114.74	94.57
9	3	3	2	3	16.60	28.87	27.61	111.05	91.20
Ij	77.50	94.64	87.66	89.92					
IIj	86.03	86.16	86.83	84.60					
IIIj	95.26	77.98	84.29	84.27					
Rj	17.75	16.66	3.37	5.64					
							$\sum_{i=1}^9 y_i = 258.79$		
							CT=7441.36		

注: 综合得分=(表小檗碱比吸附量/表小檗碱最大比吸附量×0.25+黄连碱比吸附量/黄连碱最大比吸附量×0.25+巴马汀比吸附量/巴马汀最大比吸附量×0.25+小檗碱比吸附量/小檗碱最大比吸附量×0.25)×100

表 4 方差分析表

Table 4 The analysis results of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	473.021	2	25.518	19.000	$P < 0.05$
B	416.544	2	22.471	19.000	$P < 0.05$
C	18.537	2	1.000	19.000	
D	60.254	2	3.250	19.000	
误差	18.537	2			

由极差和方差分析结果可知, 影响黄连生物碱吸附效果的因素由大到小依次排列为 A>B>D, 结果显示样品溶液浓度、pH 值有显著性差异。综合分析, 较优的工艺方案为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>D<sub>1</sub>; 优选吸附工艺可初步定为: 样品溶液浓度(以黄连药材计)为 0.1 g·mL<sup>-1</sup>、pH 值=9、流速为 1 BV/h。分别进行比较验证试验。

**2.3.2 比较验证试验** 以表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱为指标, 分别比较样品浓度为 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 和 0.05 g·mL<sup>-1</sup>; pH=9 和 pH=10; 以 1 Bv/h、2 Bv/h、3 Bv/h 和 4 Bv/h 流速通过树脂柱时各成分的比吸附量。结果显示, 样品溶液浓度为 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 和 0.05 g·mL<sup>-1</sup> 时的比吸附量相差不大; 溶液 pH=10 时比吸附量仅

为 pH=9 时的 78%; 流速 1 Bv/h、2 Bv/h、3 Bv/h 比吸附量相差不大。综合考虑最终确定最佳吸附条件为样品溶液浓度为 0.1 g·mL<sup>-1</sup>、pH=9, 流速为 3 Bv/h。

**2.3.3 泄漏曲线考察** 取样品溶液 I, 加水稀释至浓度为 0.1 g·mL<sup>-1</sup>, 加浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液调整溶液 pH=9, 作为样品溶液 IV。

精密量取样品溶液 IV 360 mL, 通过树脂柱(内径为 1.5 cm, 柱高为 12 cm, 树脂量为 10 mL), 分段收集流出液, 每份 20 mL, 精密吸取 1 mL 定容至 10 mL 量瓶中, 作为供试品溶液。分别注入液相色谱仪中, 按照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积积分值, 计算其含量, 结果见图 1。

结果显示, 当通过树脂柱的样品溶液达 200 mL 时, 树脂对表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的吸附基本达到饱和, 树脂对总生物碱的最大吸附量为 201.92 mg·mL<sup>-1</sup>。

**2.4 洗脱条件考察**

**2.4.1 洗脱剂考察** 参考生物碱的精制方法<sup>[3]</sup>, 选用交换树脂的常用洗脱剂氨水进行洗脱考察; 而醋酸能

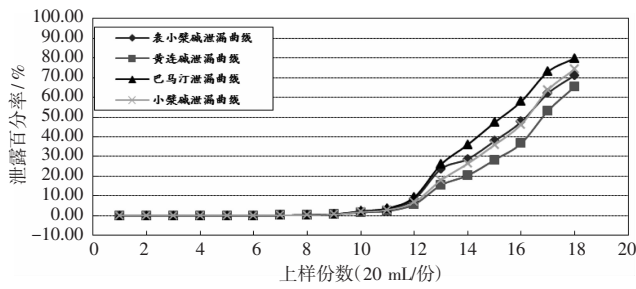


图1 泄漏曲线

Figure 1 The leakage curve

使生物碱与酸结合形成盐酸盐类，在乙醇中溶解度增大而被洗脱，故选用此两种溶剂进行洗脱率比较。

精密量取样品溶液Ⅳ 200 mL，通过树脂柱(内径为 1.5 cm，柱高为 12 cm，树脂量为 10 mL)，水洗至无色，分别以 50 %乙醇酸性溶液(含 10 %醋酸)、50 %乙醇碱性溶液(含 10 %氨水)作为洗脱液，恒温 45 ℃洗脱至无色，收集洗脱液，定容至 250 mL，作为供试品溶液。分别注入液相色谱仪中，按照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积积分值，计算其洗脱率，结果见表 5。

表 5 洗脱剂考察结果

Table 5 Effect of different eluent on desorption rate

洗脱剂	洗脱率/%			
	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
乙醇酸性溶液	95.48	93.94	95.84	96.12
乙醇碱性溶液	61.03	51.32	64.85	62.12

结果显示，乙醇酸性溶液为洗脱溶剂时，各指标成分的洗脱率均高于乙醇碱性溶液，故选择乙醇酸性溶液作为洗脱溶剂，并进一步优化洗脱条件。

**2.4.2 乙醇浓度考察** 精密量取样品溶液Ⅳ 200 mL，通过树脂柱(内径为 1.5 cm，柱高为 12 cm，树脂量为 10 mL)，水洗至近无色，固定各洗脱剂中醋酸浓度为 10 %，分别以水、20 %乙醇溶液、40 %乙醇溶液、60 %乙醇溶液和 80 %乙醇溶液作为洗脱液，恒温 45 ℃洗脱至近无色，收集洗脱液，定容至 250 mL，作为供试品溶液。注入液相色谱仪中，按照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积积分值，计算其含量及洗脱率。

结果显示，浓度为 40 %乙醇酸性溶液和 60 %乙醇溶液(含 10 %醋酸)的洗脱效果较为理想，对所测各成分洗脱率均能达到 97 %以上，且洗脱剂的用量基本一样，从成本考虑，选择洗脱液的乙醇浓度为 40 %。

**2.4.3 醋酸浓度考察** 精密量取样品溶液Ⅳ 200 mL，

通过树脂柱(内径为 1.5 cm，柱高为 12 cm，树脂量为 10 mL)，水洗至无色，固定洗脱剂乙醇浓度为 40 %，分别加 1 %醋酸、5 %醋酸、10 %醋酸、15 %醋酸、20 %醋酸作为洗脱液，恒温 45 ℃洗脱至近无色，收集洗脱液，定容至 250 mL，作为供试品溶液。注入液相色谱仪中，按照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积积分值，计算其含量及洗脱率。

结果显示，含有 10 %醋酸的洗脱剂对所测各成分的洗脱率已达到 97 %以上，故选择洗脱液的醋酸浓度为 10 %。

**2.4.4 洗脱温度考察** 试验中发现洗脱到无色时所用洗脱剂用量较大，从而对洗脱温度进行考察。精密量取样品溶液Ⅳ 200 mL，通过树脂柱(内径为 1.5 cm，柱高为 12 cm，树脂量为 10 mL)，平行两份，水洗至无色，以 40 %乙醇酸性溶液(含 10 %醋酸)作为洗脱液，分别在 25 ℃、30 ℃、35 ℃和 45 ℃恒温下洗脱至无色，收集洗脱液，定容至 250 mL，作为供试品溶液。注入液相色谱仪中，照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积积分值，计算其含量及洗脱率。结果显示，各温度下对所测各成分洗脱率达到 95 %以上，但随着洗脱温度的升高，洗脱剂的用量分别为 19BV、16BV、14BV、14BV，温度控制在 35 ℃时，洗脱率和洗脱剂的用量最理想，故选择洗脱温度为 35 ℃。

**2.4.5 洗脱溶剂用量考察** 按照上述确定的条件，精密量取样品溶液Ⅳ 200 mL，通过树脂柱，平行两份，水洗至无色，用 40 %乙醇酸性溶液(含醋酸 10 %)洗脱，洗脱液以 10 mL 为单位收集，定容，精密吸取 1 mL 置 50 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，作为供试品溶液。分别注入液相色谱仪中，按照 2.1.1 项下色谱条件测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱色谱峰面积，计算累计洗脱量、洗脱率。

结果显示，7 倍量洗脱剂各指标成分的累积洗脱量均达到 95 %以上，故选择洗脱剂用量为 7 倍量树脂体积。

黄连生物碱精制工艺确定为样品溶液浓度为 0.1 g·mL<sup>-1</sup>、pH=9，流速为 3 BV/h，洗脱剂为 40 %乙醇酸性溶液(含 10 %醋酸)，用量 7 BV，洗脱温度 35 ℃。经验证试验，黄连提取液中表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱过柱前后各成分的转移率均在 95 %以上，表明黄连生物碱纯化效果好。

(下转第 638 页)