

博落回提取物中血根碱的离子交换树脂分离纯化工艺研究^Δ

邓霖芳^{1*},袁 帅^{2,3},刘江云^{2#}(1.浙江中医药大学附属第三医院药剂科,杭州 310005;2.苏州大学药学院,江苏苏州 215123;3.无锡市中医医院药剂科,江苏无锡 214071)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2226-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.13

摘要 目的:建立博落回提取物中血根碱的离子交换树脂分离纯化工艺。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)测定博落回提取物中血根碱含量,色谱柱为Cosmosil C₁₈-R-Ⅱ(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.2%醋酸溶液(25:75,V/V),流速为1 mL/min,检测波长为270 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μL。通过静态吸附与解吸附试验,对比8种离子交换树脂对血根碱的吸附和解吸附性能;采用优选离子交换树脂,考察最佳上样液浓度、上样pH值以及上样体积;采用APPS 10D液相制备系统,考察动态洗脱条件,获得博落回精提物溶液;采用反相C₁₈色谱柱对博落回精提物溶液脱盐、洗脱并干燥,获得精制纯化物。采用HPLC法测定所得精制纯化物的纯度,并采用HPLC法、紫外分光光度法、质谱法、核磁共振法分别对其进行结构确证。结果:筛选获得CM-FF型树脂用于博落回提取物中血根碱的分离纯化,以含20%甲醇、0.25 mol/L氯化钠的20 mmol/L醋酸铵溶液100 mL进行洗脱。优化的动态吸附条件为上样浓度6.0 mg/mL、上样pH值5.5、上样体积25 mL;洗脱精提物经脱盐和精制后,最终获得纯度为97%的精制纯化产物(纯化收率为71%),并经结构确证其为血根碱。结论:优选的离子交换树脂分离纯化工艺绿色环保、安全高效、易于操作,可用于博落回提取物中血根碱单体的分离纯化,适合工业化生产。

关键词 博落回;血根碱;离子交换树脂;分离;纯化

Study on Separation and Purification Technology of Sanguinarine from the Extract of *Macleaya cordata* by Ion Exchange Resin

DENG Linfang¹, YUAN Shuai^{2,3}, LIU Jiangyun²(1. Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China; 2. School of Pharmacy, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China; 3. Dept. of Pharmacy, Wuxi Hospital of TCM, Jiangsu Wuxi 214071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the separation and purification technology of sanguinarine from the extract of *Macleaya cordata* with ion exchange resin. METHODS: The content of sanguinarine from the extract of *M. cordata* was determined by HPLC, with Cosmosil C₁₈-R-Ⅱ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-0.2% acetic acid solution (25:75, V/V), the flow rate of 1 mL/min, detection wavelength of 270 nm, column temperature of 30 ℃, and sample size of 20 μL. Static adsorption and desorption tests were carried out to compare the adsorption and desorption properties of 8 ion exchange resins for sanguinarine. The optimum concentration of sample solution, pH value and volume of sample were investigated by optimum ion exchange resin. APPS 10D liquid phase preparation system was used to investigate the dynamic elution conditions and obtain *M. cordata* refined extract solution. The refined purified product of *M. cordata* was obtained by desalination, elution on a reversed-phase (RP) C₁₈ column and drying. The purity of the purified product was analyzed by HPLC. The structure of the purified product was confirmed by HPLC, UV spectrophotometry, MS and NMR. RESULTS: CM-FF resin was screened for the separation and purification of sanguinarine from *M. cordata* extract. It was eluted with 20 mmol/L ammonium acetate solution 100 mL containing 20% methanol and 0.25 mol/L sodium chloride. The optimal dynamic absorption condition included that the concentration of sample was 6.0 mg/mL at pH 5.0, and the loading amount was 25 mL; after desalination and refinement, for the eluted refined extract, the purified product with 97% purity (purified yield of 71%) was obtained, and its structure was confirmed to be sanguinarine. CONCLUSIONS: The optimal separation and purification technology by ion exchange resin is green,

^Δ 基金项目:江苏省重点研发专项资金项目(No.BE2018322);江苏省第十四批“六大人才高峰”高层次人才资助项目(No.SWYY-167);浙江中医药大学附属第三医院院级医药卫生科技计划项目(No.ZS17YA01)

* 药师,硕士。研究方向:天然药物化学。电话:0571-88393553。E-mail:850588794@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然药物化学。电话:0512-65884301。E-mail:liujiangyun@suda.edu.cn

safe, efficient and easy to operate, which can be used for the separation and purification of sanguinarine from *M. cordata* extract and is suitable for industrial production.

KEYWORDS *Macleaya cordata*; Sanguinarine; Ion exchange resin; Separation; Purification

博落回[*Macleaya cordata* (Willd) R.Br.]是罂粟科博落回属多年生草本植物,全草入药,在我国主要集中于江苏、浙江、云南、贵州、湖南、湖北、广西、广东及台湾等地区^[1]。博落回富含生物碱,至今已被分离并鉴定的单体生物碱达74个,其中含量最高且生物活性较强的为苯并异喹啉类生物碱,主要包括血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱和别隐品碱等^[2-6]。其中,血根碱具有明显的抗菌、抗肿瘤以及保肝护肝等药理活性^[7-12]。在欧美和日本等发达国家,血根碱常作为抗菌药物的替代品被广泛用于畜牧业及鱼类养殖^[13-14]。目前,我国对于高纯度的血根碱尚无便捷、高效的规模化分离纯化方法。尽管大孔吸附树脂法用于提取纯化黄酮类及内酯酮类天然产物有着优异的表现^[15-16],但由于血根碱及其类似物独特的苯并杂原子共轭体系结构导致其化学性质特殊^[13],使用大孔吸附树脂对其进行纯化时需使用大量的甲醇、乙醇等有机溶剂,造成纯化成本高、难于规模化生产。生物碱成分在中性或酸性条件下以正离子形式存在,可采用阳离子交换树脂进行富集分离。离子交换树脂商品化已数十年,其质量可靠、成本较低、环境污染小,近些年越来越多的应用于黄酮类、生物碱类等天然产物的分离纯化^[17]。因本研究目标产物血根碱为季铵型生物碱^[13],采用离子交换树脂柱进行纯化分离具有一定优势。因此,本研究旨在开发一种高效的离子交换工艺,用于制备高纯度的血根碱,为后续该生物碱的进一步研究开发奠定工艺基础。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司);APPS10D型制备液相色谱仪、 $\Phi 15$ mm型GCC可压缩玻璃柱(苏州利德科技有限公司);ME215S型电子天平、PB-10型pH计(德国Sartorius公司);MP2002型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);N-1001型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);SHZ-82型恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司);DZF型电热恒温真空干燥箱(上海迈捷实验设备有限公司);Simplicity UV型超纯水机(德国Millipore公司);KQ-250E型医用超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

血根碱对照品[本实验室自制,批号:20170501,纯度:97.1%(按HPLC测定、归一化法计算)];CM-FF型弱阳离子交换树脂、SP-HP型强阳离子交换树脂[博格隆(上海)生物技术有限公司];CGC100 \times 4型弱阳离子交换树脂、PCG600F型反相树脂、PCG900F型反相树脂[漂莱特(中国)有限公司];S40型强阳离子交换树脂(苏州赛分科技有限公司);PIPO-02型大孔吸附树脂(广州牌牌

生物科技有限公司);SP50型强阳离子交换树脂(苏州知益微球科技有限公司);C₁₈制备级填料(75 μ m,日本Cosmosil公司);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 药材

博落回药材购自湖南,经苏州大学药学院陆叶副教授鉴定为罂粟科植物博落回(*Macleaya cordata*)的果荚。

2 方法与结果

2.1 血根碱的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Cosmosil C₁₈-R-II(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.2%醋酸溶液(25:75, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:270 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。在该色谱条件下,血根碱与相邻峰的分度均大于1.5,理论板数大于5 000(图略)。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定血根碱对照品12.86 mg,置于50 mL量瓶中,加入甲醇适量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)使其完全溶解后定容,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取“2.2”项下制备的博落回提取物样品25.48 mg,置于50 mL量瓶中,加入甲醇适量,超声使其完全溶解后定容,即得。

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下对照品溶液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,以甲醇稀释定容至刻度,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜过滤,制得系列质量浓度的线性对照品溶液。取上述稀释溶液与原未经稀释的对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别进样测定。以血根碱质量浓度(x , μ g/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为: $y=101.07x-398.04$ ($r=0.999 2, n=3$)。结果表明,血根碱质量浓度在25.72~257.2 μ g/mL范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.4”项下质量浓度为154.3 μ g/mL的线性对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,血根碱峰面积的RSD为1.07%($n=6$),表明仪器精密度良好。

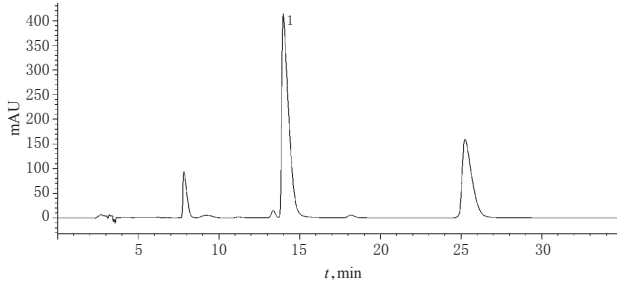
2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,血根碱峰面积的RSD为1.53%($n=5$),表明供试品溶液于室温下放置8 h内基本稳定。

2.1.7 加样回收率试验 取已知含量的博落回提取物样品12 mg,共6份,精密称定,分别加入质量浓度为1.528 mg/mL对照品溶液(按“2.1.2”项下方法制备)2 mL,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按标准曲线法计算含量并计算加样回收率。结果,平均加样回收率为

98.2% (RSD=1.06%, n=6), 表明方法准确度良好。

2.2 博落回提取物的制备及含量测定

按照文献[18]方法, 取博落回药材 10 kg, 粉碎, 用 pH 2~3 的稀硫酸溶液提取, 过滤, 滤液以 100 mmol/L NaOH 溶液调节 pH 至 10~12, 静置, 过滤, 真空低温干燥, 得博落回提取物 120 g。按“2.1”项下方法, 取该提取物样品制备供试品溶液并测定, 结果所得提取物中血根碱的含量为 24.49%, 色谱图见图 1。



注: 1. 血根碱

Note: 1. sanguinarine

图 1 博落回提取物高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of *M. cordata* extract

2.3 博落回提取物中血根碱的离子交换树脂纯化工艺考察

2.3.1 上样溶液的制备 称取“2.2”项下制备的博落回提取物样品 500 mg, 置于 250 mL 量瓶中, 加入甲醇 50 mL, 超声使其溶解后, 以 20 mmol/L 醋酸铵溶液定容至刻度, 即得。

2.3.2 解吸附液的制备 量取甲醇 50 mL, 置于 250 mL 量瓶中, 加入氯化钠 7.32 g, 20 mmol/L 醋酸铵溶液适量, 超声使氯化钠溶解后, 以 20 mmol/L 醋酸铵溶液定容至刻度, 即得。

2.3.3 离子交换树脂种类筛选 采用静态吸附与解吸附试验进行筛选。(1) 静态吸附试验。称取经预处理的不同种类树脂 (CM-FF、SP-HP、CGC100×4、PCG600F、PCG900F、S40、PIPO-02、SP50) 各 2 g, 分别置于 50 mL 锥形瓶中, 均精密加入“2.3.1”项的上样溶液 20 mL, 室温下以 120 r/min 振荡吸附 3 h; 精密吸取上层清液 1 mL, 转移至 25 mL 量瓶中, 以含有 20% 甲醇的 20 mmol/L 醋酸铵溶液定容至刻度。取该溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 计算树脂吸附前后上样液中血根碱的质量浓度, 并按公式计算树脂的静态饱和吸附量: 静态饱和吸附量 (mg/g) = (吸附前血根碱的初始质量浓度 - 吸附饱和后血根碱的质量浓度) × 吸附液体积 / 树脂称样量。(2) 解吸附试验。将吸附饱和的各树脂分别转移至 50 mL 锥形瓶中, 以水洗涤 3 次, 加入“2.3.2”项的解吸附液 20 mL, 室温下以 120 r/min 振荡吸附 5 h; 精密吸取上层清液 1 mL, 转移至 25 mL 量瓶中, 以含有 20% 甲醇的 20

mmol/L 醋酸铵溶液定容至刻度。取该溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 计算解吸附液中血根碱的质量浓度, 并按公式计算解吸附量及解吸附率: 解吸附量 = 解吸附液中血根碱质量浓度 × 解吸附液体积, 解吸附率 (%) = 解吸附液中血根碱质量浓度 × 解吸附液体积 / 静态饱和吸附量 × 100%, 结果见表 1 (注: 表中“-”表示未在解吸附液中测得血根碱, 提示该成分在此解吸附液条件下未能从树脂上洗脱)。

表 1 不同种类树脂的静态吸附和解吸附性能比较

Tab 1 Comparison of adsorption and desorption capacity of different types of resin

树脂类型	粒径, μm	静态饱和吸附量, mg/g	解吸附量, mg/g	解吸附率, %
CM-FF	90	6.7	5.0	75
SP-HP	30	7.6	5.6	74
CGC100×4	125	8.2	2.2	28
PCG600F	35	8.0	2.3	29
PCG900F	35	7.9	3.5	45
S40	40	7.8	4.0	51
PIPO-02	60	8.0	-	-
SP50	50	7.5	2.9	39

由表 1 可见, CM-FF、SP-HP 型号的树脂对血根碱的解吸附量及解吸附率明显高于其他类型的树脂; 其他类型的树脂虽然静态饱和吸附量更高, 但解吸附性能较差, 尤其是 PIPO-02 型号的大孔树脂, 在试验洗脱条件下无法解吸附血根碱, 这一结果与以往文献报道^[19]一致。而综合考虑静态吸附和解吸附参数后认为, CM-FF 型树脂较 SP-HP 型树脂对血根碱的吸附与洗脱性能更优, 因此本研究选取 CM-FF 型树脂作进一步工艺参数考察。

2.3.4 CM-FF 型树脂的动态吸附条件考察 (1) 博落回提取物上样液质量浓度考察。精密称取 5 份等质量的 CM-FF 型树脂适量, 湿法装填, 制得柱床体积 (BV) 为 20 mL 的离子交换制备柱。取 5 份“2.2”项下制备的博落回提取物各适量, 以含 20% 甲醇的 20 mmol/L 醋酸铵溶液制成质量浓度分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 的溶液。分别取上述溶液 30 mL, 以 5 mL/min 的流速上样, 收集流出液, 按“2.1”项下方法测定血根碱质量浓度, 根据公式计算 CM-FF 型树脂的动态吸附量 [动态吸附量 (mg) = (吸附前血根碱的质量浓度 × 吸附前药液体积) - (吸附后血根碱的质量浓度 × 吸附后药液体积)]。结果, 当博落回提取物的上样液质量浓度为 6.0 mg/mL 时, 动态吸附量达峰值 36.46 mg; 而随着博落回提取物质量浓度的进一步增加, 动态吸附量反而下降 (见图 2A)。因此, 本研究确定博落回提取物上样液质量浓度为 6.0 mg/mL。

(2) 上样 pH 值考察。精密称取 8 份等质量的 CM-FF 型树脂适量, 按“(1)”项下方法装填离子交换制备柱。配制含 20% 甲醇的 20 mmol/L 醋酸铵溶液 8 份, 分

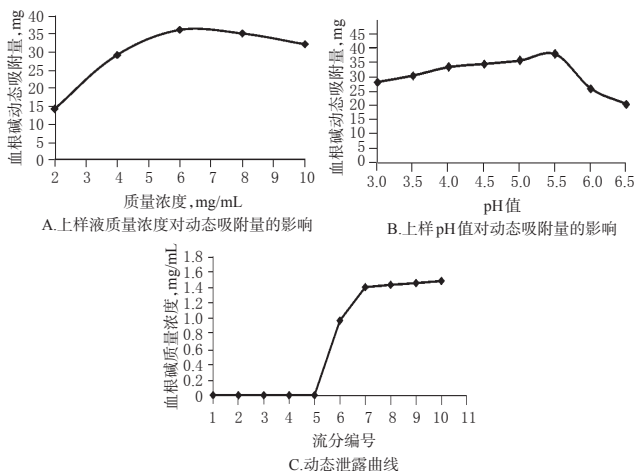


图2 不同条件对血根碱在CM-FF型树脂上吸附效果的影响

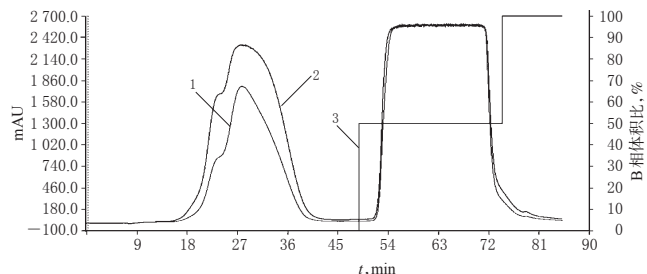
Fig 2 Effects of different conditions on the adsorption effect of CM-FF resin to sanguinarine

别用醋酸调整pH至3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5,并以上述溶液分别对柱床进行平衡。另取8份“2.2”项下制备的博落回提取物适量,以含20%甲醇的20 mmol/L醋酸铵溶液制成质量浓度均为6.0 mg/mL的溶液。分别取上述溶液30 mL,以醋酸调整至相应pH值后,以5 mL/min流速上样,收集流出液,按“2.1”项下方法测定血根碱质量浓度,并按“(1)”项下方法计算CM-FF型树脂的动态吸附量。结果,当上样pH为5.5时,动态吸附量达峰值37.04 mg;当上样pH过低或过高时,树脂动态吸附量均有所下降(见图2B)。因此,本研究确定博落回提取物溶液上样pH值为5.5。

(3)上样体积考察。精密称取CM-FF树脂适量,按“(1)”项下方法装填离子交换制备柱,并采用2 BV含20%甲醇的20 mmol/L醋酸铵溶液(pH调至5.5)对柱床进行平衡。取“2.2”项下制备的博落回提取物适量,以含20%甲醇的20 mmol/L醋酸铵溶液制成质量浓度为6.0 mg/mL的溶液。取该溶液50 mL,以5 mL/min流速上样,每5 mL收集1次流分,按“2.1”项下方法测定血根碱质量浓度。以流分编号为横坐标、流分中血根碱质量浓度为纵坐标绘制动态泄露曲线(见图2C)。结果表明,从6号流分开始出现明显泄露现象(即可检出血根碱成分),因此确定6.0 mg/mL的博落回提取物溶液的上样体积为25 mL。

2.3.5 博落回提取物的动态洗脱条件考察 采用APPS 10D型液相制备系统实时在线监测进行动态洗脱条件考察。根据“2.3.3”项下方法及考察结果,称取CM-FF树脂适量,装填BV为20 mL的离子交换制备柱。配制含20%甲醇的20 mmol/L醋酸铵溶液(pH调至5.5)作为洗脱液A相,配制含20%甲醇、0.5 mol/L氯化钠的20 mmol/L醋酸铵溶液(pH调至5.5)作为洗脱液B相。采用2BV的A相对柱床进行平衡;将质量浓度为6.0 mg/mL

的博落回提取物溶液(以A相为溶剂配制),以5 mL/min流速上样5 min。先以A-B混合相(B相体积比为2%)、流速为5 mL/min进行洗脱,得制备液相色谱图(见图3)。结果显示,从17 min开始,洗脱液色谱图中出现明显紫外吸收,表明有成分被洗脱出来;以17 min为起点,每10 mL收集1个流分,至40 min时,流出液色谱图中已无紫外吸收,停止收集。对已收集的各流分采用“2.1.1”项下色谱条件进样测定,通过与血根碱对照品溶液的保留时间比对可知,所有已收集流分中所含成分均为杂质。然后将混合相中的B相体积比提高至50%[此时混合洗脱液组成为含20%甲醇、0.25 mol/L氯化钠的20 mmol/L醋酸铵溶液(pH 5.5)]继续进行洗脱,至52 min时,洗脱液色谱图中有明显紫外吸收;此时起,保持上述洗脱条件,每10 mL收集1个流分,直至洗脱液无紫外吸收(见图3)。对上述流分按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,结果第54~74 min期间洗脱物中成分为血根碱。合并这一时间段的洗脱液流分(即精提物溶液),用于进一步脱盐和精制纯化。



注:1.洗脱液紫外吸收-时间曲线图(365 nm);2.洗脱液紫外吸收-时间曲线图(270 nm);3.混合相中B相体积比-时间曲线

Note: 1. UV absorption-time curves of eluent (365 nm); 2. UV absorption-time curves of eluent (270 nm); 3. phase B volumn proportion in mixed phase-time curve

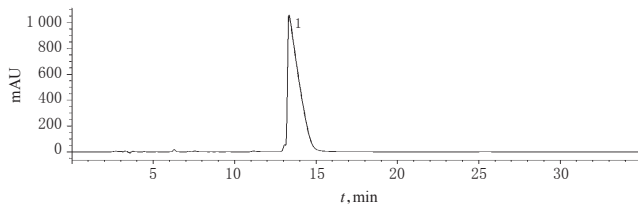
图3 博落回提取物离子交换制备液相色谱图

Fig 3 Ion exchange preparation LC chromatogram of *M. cordata* extract

2.3.6 博落回精提物溶液的精制纯化 为除去精提物溶液中的醋酸铵、氯化钠等无机盐,将“2.3.4”项下得到的精提物溶液直接上样至反相C₁₈制备级色谱柱中,用2 BV的20%甲醇溶液以15 mL/min流速进行脱盐;然后以2 BV的甲醇同流速洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,得到橙红色精制纯化干燥粉末,纯化收率为71%。经HPLC法检测,该精制纯化物的纯度为97%,并通过与血根碱对照品溶液的保留时间比对可初步判断为血根碱。所得精制纯化物的HPLC检测结果见图4。

2.4 博落回提取物精制纯化物的结构确证

取“2.3”项下制备的博落回精制纯化物,经HPLC法、紫外分光光度法、质谱法(MS)和核磁共振氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)分别检测。结果,该化合物与血根碱对照品保留时间一致,紫外特征吸收波长分别



注:1.血根碱

Note:1. sanguinarine

图4 精制纯化物的HPLC图

Fig 4 HPLC chromatogram of refined purified product

为270、328、335(肩峰)、400、475 nm;电喷雾(ESI)-MS谱显示,质荷比(m/z)为332.5,与血根碱分子 $[C_{20}H_{14}NO_4]^+$ 一致; 1H -NMR谱(600 MHz, CD_3OD)显示, δ 为9.90(1H, s, H-6)、8.57(1H, d, $J=8.9$ Hz, H-9)、8.48(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-11)、8.17(1H, d, $J=8.9$ Hz, H-10)、8.11(1H, s, H-4)、7.93(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-12)、7.52(1H, s, H-1)、6.53(2H, s, 2, 3- OCH_2)、6.27(2H, s, 7, 8- OCH_2)、4.93(3H, s, N- CH_3); ^{13}C -NMR谱(150 MHz, CD_3OD)显示, δ 为150.68、150.60、150.50、149.27、147.97、133.91、132.65、128.81、127.30、121.66、121.00、119.38、118.07 $\times 2$ 、111.00、106.79、106.35、104.79、104.14、52.64。经与文献数据^[18]比对,最终确认博落回提取物的精制纯化物为血根碱,相关谱图详见图5。

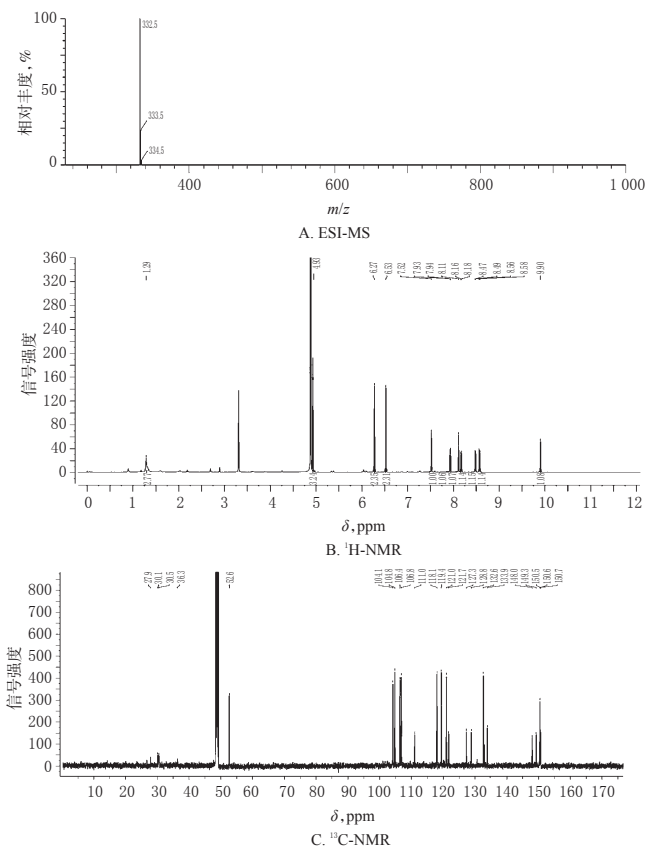


图5 精制纯化物的MS和NMR谱图

Fig 5 MS and NMR spectrum of refined purified product

3 讨论

在已往相关研究中,对博落回生物碱的分离提取多针对的是生物总碱混合物^[2-6],而对于其单体生物碱的分离纯化则鲜见报道。离子交换树脂具有成本低、性能稳定、分离速度快、环境污染少、可再生和反复使用的优势,广泛应用于化工生产、食品工业、制药工业和环保等领域^[17-18]。本研究首次采用以琼脂糖为基质的软胶CM-FF型弱阳离子交换树脂对博落回提取物进行分离纯化,并以反相 C_{18} 制备柱进行脱盐及进一步纯化,最终得到纯度为97%的血根碱产物,纯化收率为71%。该工艺稳定高效,为血根碱的开发和应用研究奠定了基础。

阳离子交换树脂法利用生物碱阳离子可被树脂所吸附、中性或阴离子成分不被吸附的原理,常用来纯化生物碱类成分^[19]。本研究首先通过静态吸附与解吸附试验,对比了8种不同类型离子交换树脂及大孔树脂对博落回提取物中血根碱的吸附和解吸附性能,结果发现CM-FF、SP-HP型这两种琼脂糖基质的软胶阳离子交换树脂的吸附和解吸附性能较佳。其原因可能为博落回提取物中所含有的血根碱及其类似物(原阿片碱、别隐品碱、白屈菜红碱等)均为苯并异喹啉类衍生物且都具有很强的疏水性,在与另外6种基质为聚苯乙烯的树脂发生相互作用时,既有较强的 π - π 相互作用,又有电荷相互作用,从而使血根碱难以被解吸附并洗脱;而CM-FF、SP-HP型树脂不会与血根碱及其类似物发生疏水相互作用,而仅通过离子键相互作用,因此具备较好的解吸附性能^[20-21]。同时,这类树脂基质与博落回提取物间相互作用力弱,有利于树脂的再生和循环利用,可有效延长树脂的使用寿命,从而降低工艺成本。而与SP-HP型强阳离子树脂比较,CM-FF型树脂为弱阳离子交换树脂,易于平衡,树脂粒径更大,反压低,易于装填,更利于工业化生产。

在筛选出CM-FF型弱阳离子树脂后,需要进一步考察其工作参数。考虑到弱阳离子交换树脂一般在pH4.5~6.5范围内性能较好,通过本研究考察,最终筛选出最佳上样pH值为5.5。此外,本课题组前期通过对动态流速和反压进行比较后发现,流速过低,则洗脱工艺时间将会延长,不利于放大生产;流速过高,在反压较高的情况下,多批次使用后会造树脂床层的塌陷,从而导致柱效降低,无法完成分离纯化。经多次预试验考察,优选出工作流速为5 mL/min,在此流速下,体系的反压为1.5 bar(1 bar=100 kPa),在软胶树脂的最大耐压3 bar范围之内。在溶剂选择方面,由于博落回提取物疏水性较强,为保证样品始终处于溶解状态,本课题组在预试验中筛选了溶剂中甲醇的比例,结果显示20%的甲醇比例为保持样品完全溶解的最低甲醇用量。另外,在

缓冲液体系的筛选中,考虑到20 mmol/L的醋酸铵体系具有良好的缓冲效果,最终优选出含20%甲醇的20 mmol/L醋酸铵溶液为最佳离子交换洗脱体系。后期使用APPS 10D液相制备系统实时在线监测进行流分收集,再通过HPLC法监测洗脱结果,最终确定了动态洗脱工艺及流分收集体积。对于离子交换洗脱得到的精提物盐溶液,再使用反相C₁₈制备柱进行脱盐和精制纯化,由图3可见,精制纯化物中的主要杂质相对保留时间为1.79,表明其杂质在反相体系中较易去除。

综上所述,本研究采用离子交换工艺完成了博落回提取物中血根碱的分离纯化,洗脱体系中有有机溶剂的用量非常少,优选工艺绿色环保、安全高效、易于操作,适合工业化生产。本研究所获血根碱的纯度为97%,今后有待进一步优化工艺提高精制产品的纯度;此外,由于软胶树脂耐压性较差,工作流速相对较低,造成工艺耗时较长,在今后的研究中将尝试采用同类型高交联度且耐压性更强的离子交换树脂进行分离纯化。

参考文献

[1] 王朝元,童胜兰,胡鑫.博落回生物碱成分及其抗菌活性的研究[J].中南民族大学报(自然科学版),2015,34(1):39-42.

[2] 余坤,彭懿,卿志星,等.博落回根的化学成分研究[J].中药材,2016,39(8):1767-1770.

[3] 邹惠亮,李红玉,周光熊.博落回的生物碱成分及细胞毒活性研究[J].中国中药杂志,2015,40(3):458-462.

[4] 杨鹏,卿志星,向峰.基于质谱示踪研究博落回根的化学成分[J].中药材,2017,40(1):84-86.

[5] OCH A, SZEWCZYK K, ŁUKASZ PECIO, et al. UPLC-MS/MS profile of alkaloids with cytotoxic properties of selected medicinal plants of the Berberidaceae and Papaveraceae Families[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. DOI: 10.1155/2017/9369872.

[6] 叶冯芝,冯锋,柳文媛.博落回的生物碱成分[J].中国中药杂志,2009,34(13):1683-1686.

[7] 汪学军,闵长莉,韩彭垒.博落回不同部位提取物对大肠菌群的抑菌作用研究[J].天然产物研究与开发,2016,28:247-250,288.

[8] 高红梅,付小草,马林.博落回生物碱对12种植物病原菌的生物活性研究[J].安徽农业科学,2014,42(18):

5810-5812.

[9] 杨舒,刘岩,杨千帆,等.博落回抗肿瘤作用及诱导人体端粒DNA形成G-四链体分子机制研究[J].中草药,2011,42(4):738-742.

[10] 田晶,郁建平,葛永辉.博落回中生物碱对五种皮肤真菌抑制作用的初步研究[J].中成药,2010,32(7):1108-1110.

[11] 张素仙,王妍妍,张琴,等.血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌A2780/Taxol细胞生长及TGF-β1/Smad通路抑制的影响[J].中国中西医结合杂志,2018,38(6):717-720.

[12] 张梦雅,王春丽,杜先华,等.血根碱通过STAT3通路对LPS致RAW264.7细胞炎症的保护作用[J].中药新药与临床药理,2017,28(6):714-718.

[13] HUANG P, XIA L, LIU W, et al. Hairy root induction and benzylisoquinoline alkaloid production in *Macleaya cordata*[J]. *Sci Rep*, 2018,8(1):11986.

[14] ESTRADA-ANGULO A, AGUILAR-HERNÁNDEZ A, OSUNA-PÉREZ M, et al. Influence of quaternary benzophenanthridine and protopine alkaloids on growth performance, dietary energy, carcass traits, visceral mass, and rumen health in finishing ewes under conditions of severe temperature-humidity index[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016,29(5):652-658.

[15] 郑淑霞,易骏,吴岩斌,等.大孔树脂纯化莲房总黄酮的工艺研究[J].中国药房,2015,26(31):4405-4408.

[16] 王忠震,林兵,宋洪涛,等.大孔吸附树脂纯化雷公藤4种有效成分的工艺研究[J].中国药房,2016,27(16):2261-2264.

[17] 于国庆.离子交换树脂在天然产物分离纯化中的应用[J].天津化工,2012,26(5):38-40.

[18] 袁帅,刘江云,周胜.博落回血根碱的制备工艺研究[D].苏州:苏州大学,2018.

[19] 张小艳,黄红梅,汪尚坤,等.博落回的进展研究[J].现代农业科技,2014(23):157-162.

[20] 林晓彤,郭娜,周翎,等.草乌花总生物碱的纯化工艺研究[J].中国药房,2015,26(31):4396-4398.

[21] 邱峰,吕华冲,马骏驰.天然药物化学[M].北京:清华大学出版社,2013:375-381.

(收稿日期:2019-03-15 修回日期:2019-07-04)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅