

# 应用Amberlite XAD-2树脂从九连小檗细胞 培养液中回收药根碱

侯嵩生 卢大炎 李新明

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉)

应用植物细胞培养技术进行有用化学物质的生产在药物和食品工业方面,其前景是非常广阔的,尤其是植物细胞固相化技术对于延长植物细胞的生命周期,提高植物细胞的生长速率,促进生物转化,增加有用化合物的产量提供了一个很好的研究途径。并使得植物中有益成分的大规模工业化生产成为可能。然而,在植物细胞培养中,由于培养液的体积较大,释放到液体中的次生产物的浓度较低,应用溶剂萃取法或沉淀法收集产物因操作繁杂,回收率低和成本高而失去意义。

作者曾报道了从九连小檗细胞培养物中提取分离出药根碱<sup>[1]</sup>,为实现连续培养,降低生产成本,我们采用大孔吸附树脂对九连小檗细胞培养液中的药根碱进行了回收试验,并对这类吸附剂的吸附特性、吸附介质的pH值对吸附效果的影响,产物的回收率,树脂再生等因素作了较系统的试验。为实现九连小檗细胞连续培养和收集提供了一些有用参数。

## 材料与 方法

### (一)细胞培养

将经过34代继代培养的九连小檗悬浮培养细胞作为种子细胞(参见文献1),以MS为基本培养基,激素为NAA及6BA,每升培养液接种25-30g鲜细胞,于25℃±2℃下进行悬浮培养20天,取出抽滤,滤液存于冰箱内备用。

### (二)树脂处理

Amberlite XAD-2, XAD-4和 XAD-8 大孔吸附树脂,粒度为0.3-1.0mm(Fembiochemica, Heidelberg, SERVA)。树脂使用前经甲醇浸泡6h,水洗,3mol/L HCl清洗,再用蒸

馏水洗至中性,然后装柱,柱直径为1.2cm,长15cm,每根柱装1g树脂(干重)。

### (三)介质的pH值对树脂吸附容量的影响

1. 药根碱溶液的制备及吸附:精确称取盐酸药根碱2.19g(盐酸药根碱由本组制备)溶于蒸馏水中,定容至1L。分取5份,每份150ml,然后用少量盐酸或氨水分别调整溶液的pH值到4.5、6.5、8.5、9.5和10.0。再用50ml容量瓶将每份分成3等份,分别上柱于XAD-2、XAD-4和XAD-8树脂。溶液过柱流速为1ml/min。待溶液全部过柱后,以少量pH8的氨水洗脱柱3次。如有黄色药根碱液从柱尾流出,将流出液收集定容至50ml。

2. 洗脱:吸附平衡后的树脂柱,经甲醇、乙酸乙酯或酸化甲醇在常温下分别进行洗脱,其效果如图1所示。由图可见,在常温采用单一溶剂

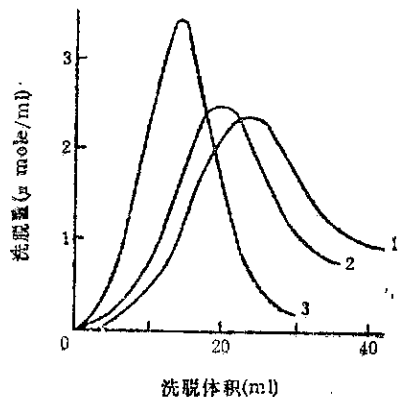


图1 药根碱的洗脱曲线

1. 甲醇洗脱 2. 1mol/L HCl洗脱  
3. 酸化甲醇:乙酸乙酯(3:1)

洗脱, 其洗脱曲线拖尾较长, 这种现象在XAD-8树脂柱上尤为明显。因此我们选用酸性甲醇(pH2): 乙酸乙酯(3:1)40ml, 以索氏抽提法在70℃水浴上提取至树脂无色为止。提取液仍定容至50ml。用HPLC分别测定过柱前后和解吸液中药根碱的含量, 按下式计算药根碱的洗脱回收率。

$$\text{药根碱的回收率} = \frac{C_3}{C_1 - C_2} \times 100\%$$

式中:  $C_1$ : 过柱前药根碱溶液的原始浓度

$C_2$ : 过柱后流出液中药根碱的浓度

$C_3$ : 被洗脱出的药根碱的浓度

结果如表1所示。

表1 药根碱的洗脱回收率

上柱pH	回收率 (%)		
	XAD-2	XAD-4	XAD-8
4.5	100	100	90
6.5	95	100	96
8.5	94	92	86
9.5	100	97	93
10	97	98	93

由表1可以看出: 除XAD-8的回收率略低以外, 用其余两种树脂吸附药根碱大都可达到95%以上的解吸回收率。

3. 吸附量: 药根碱在不同pH介质中上柱吸附, 待树脂饱和后(流出液出现黄色说明柱已超负荷), 经洗脱、测定并按下式计算不同树脂柱对药根碱的吸附量。

$$DC(\mu\text{mole/g}) = \frac{C_1 - C_2}{R_w}$$

式中:  $DC$ : 树脂对药根碱的吸附量

$R_w$ : 树脂重量

结果如图2所示。

图2说明: 在pH8—9的范围内, 药根碱均可在上述三种树脂上得到最大吸附, 其中, 以XAD-2的吸附效率最佳。

由于Amberlite XAD树脂所吸附的对象是化合物的游离成分<sup>[2,3]</sup>, 在液体介质中, 化合物的游离型成分的浓度主要取决于该化合物的解离常数(pKa)和介质的pH值。对于碱性化合物而言(如药根碱), 当溶液的pH值等于或高于该化合物的解离常数时, 此化合物就以游离型存在,

有利于被大孔树脂吸附。一般说来, 介质的pH值应尽量接近被吸附化合物的解离常数, 如药根碱在pH8.5的介质中被吸附到XAD-2树脂上的量比在pH6的介质中高6倍之多。

#### (四) 实验室提取试验

根据以上所选用的试验条件, 我们取悬浮培

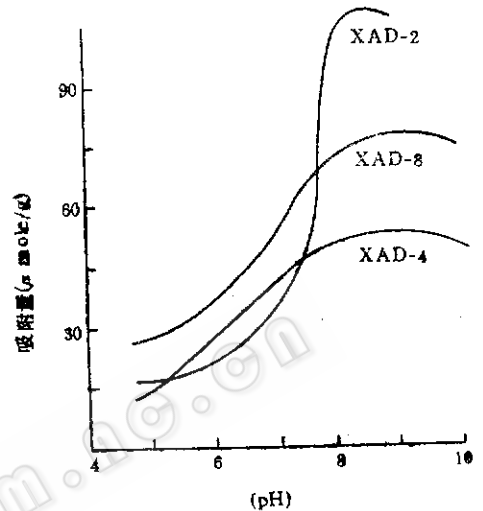


图2 药根碱在不同pH介质中的吸附曲线

养20天后的九连小檗细胞培养液, 将抽滤后所得滤液, 调整其pH值到8.2, 静置24h后, 再次过滤, 用HPLC测定药根碱的含量, 并据此计算出树脂用量。为确保药根碱完全被吸附, 取多于计算用量5—15%的XAD-2树脂装柱。树脂处理、过柱流速及洗脱如实验(二)、(三)所述。结果如表2。

表2 XAD-2树脂提取药根碱的试验结果

药根碱含量 (mg/3L)	树脂用量 (g)	回收药根碱量 (mg)	纯度 (%)
450	10	455	87
500	12	513	89
600	15	605	85

从表2药根碱的回收纯度可以看出杂质含量约占12%以上, 这是因为在培养液中存在微小的悬浮细胞和其他代谢产物所致。这些物质往往使树脂产生不可逆吸附, 导致树脂的使用寿命缩短。因此, 我们在相同提取实验条件下考察了树脂经多次使用的吸附效果, 见表3。

表 3 树脂的使用寿命与药根碱的吸附效果

树 脂	吸 附 量 (mg/g)			
	第一次	第二次	第三次	第四次
XAD-2	53.4	54.2	53.9	53.8
XAD-4	14.9	14.5	15.3	15.4
XAD-8	24.5	21.6	21.4	20.8

由表 3 可以看出,树脂经前几次吸附—解吸之后,由于清除了原树脂内部的细小微粒,使树脂的吸附容量稍有上升。此后,树脂的吸附效果就逐渐趋于稳定。在实验中尤其要注意的是培养液的预处理,如抽滤后调整培养液的 pH 值,加热静置过滤,再上柱吸附这些步骤对于树脂的吸附效率、减轻不可逆吸附、延长树脂的使用寿命都是十分重要的。

### 讨 论

采用 Amberlite XAD 系大孔吸附树脂从九

连小檗细胞培养液中回收药根碱,避免了常规的化学后处理可能造成的一系列不利因素,尤其是对生物反应体系干扰较少。

由于 XAD-4 的内孔径小于 XAD-2,对中等分子量以上的化合物的吸附效果较差。以烷基酯官能团代替芳香环共聚而成的 XAD-8,加之太大的内孔径和太低的比表面积,对药根碱的吸附能力也不能与 XAD-2 相比。而且由于 XAD-8 的偶极矩大于前者 6 倍之多,导致药根碱的解吸严重拖尾和不可逆吸附。因此,采用 XAD-2 树脂可以避免二者之不足。

如果在一个培养—收集—培养的循环体系中采用 XAD-2 树脂有选择性地吸附九连小檗细胞培养液中的药根碱,由于生物合成的产物被不断地除去,可缓解或消除细胞因产物的积累达到平衡后所产生的反馈抑制作用,有利于向形成产物方向的生化反应的进行,从而可刺激产物的合成,达到提高产量之目的。

### 参 考 文 献

- [1] 侯嵩生等:植物学报, 30(1):62—65, 1988.
- [2] 屠式改:医药工业, 18(4):177—179, 1987.
- [3] Voser, W. and Weiss, K.: J. Chromatography, 201:287—292, 1980.

## Application of Amberlite XAD-2 Resin in the Recovery of Jatrorrhizine from *Berberis julianae* Schneid Cell Culture Solution

Hou Songsheng Lu Dayan Li Xinmin  
(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan)

The properties and environmental factors of macroporous adsorbing resins in the products recovery from plant cell suspension culture solution were explored. The adsorption and desorption behaviour of the isoquinoline alkaloid-jatrorrhizine on Amberlite XAD resins were studied systematically. A method for the collection of jatrorrhizine from *Berberis julianae* Schneid cell culture solution was established. A foundation for carrying out continuous culture of immobilized plant cells and products recovery was supplied potentially

### Key words

*Berberis julianae* Schneid; jatrorrhizine; macroporous adsorbing resin;