

阳离子交换树脂分离纯化钩藤总生物碱的工艺研究

王 信¹, 代 龙¹, 孙志强¹, 高 鹏¹, 马志国^{2*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

摘要: 目的 研究阳离子交换树脂分离纯化钩藤总生物碱的工艺条件。方法 分别以钩藤碱、钩藤总生物碱的比吸附量、洗脱率、产物质量分数为指标, 优选钩藤总生物碱的最佳纯化工艺。结果 最佳工艺为钩藤药材提取液以 6 BV/h 的体积流量通过 001×7 氢型阳离子交换树脂柱(径高比为 1:8), 树脂饱和后, 水洗至中性, 再用含 5%氯化钠的 50%乙醇溶液以 8 BV/h 的体积流量洗脱, 洗脱 10 倍量树脂柱体积。钩藤碱及钩藤总生物碱洗脱率分别为 88.2%和 89.9%, 钩藤碱、钩藤总生物碱的质量分数分别为 13.9%、47.6%。结论 采用 001×7 氢型阳离子交换树脂纯化钩藤总生物碱效率高, 易实现管道化、连续化, 具有广阔的工业应用前景。

关键词: 钩藤; 钩藤碱; 总生物碱; 阳离子交换树脂; 分离纯化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-1973-04

Separation and purification technology for total alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis* with cation exchange resin

WANG Xin¹, DAI Long¹, SUN Zhi-qiang¹, GAO Peng¹, MA Zhi-guo²

1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To optimize the technology for separation and purification of total alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis* by cation exchange resin. **Methods** The elution and absorption rate and content of mitrinermine and total alkaloids were used as indexes through comparing different elution agents to optimize the purifying conditions of total alkaloids. **Results** The optimum condition was passing through the 001×7 hydrogen cation exchange resin column ($r:h = 1:8$) at the rate of 6 BV/h in reverse direction, then the resin column was flushed with water at the rate of 6 BV/h to neutral in forward direction. At last, the column was eluted at the rate of 8 BV/h to obtain alkaloids with 5% NaCl in 50% alcohol, the content of mitrinermine was 13.9% and the content of the total alkaloids was 47.6%; The elution ratio of mitrinermine was 88.2% and total alkaloids was 89.9%. **Conclusion** Separation and purification of the total alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis* with 001×7 hydrogen cation exchange resin could achieve satisfactory results, and it has wide application prospects in industry.

Key words: *Uncariae Ramulus cum Uncis*; mitrinermine; total alkaloids; cation exchange resin; separation and purification

钩藤系茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall.、毛钩藤 *U. hirsuta* Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil. 或无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 的干燥带钩茎枝, 是一种常用中草药, 具有清热平肝、息风定惊等功效, 临床主要用于治疗高血压^[1]。现代研究表明, 生物碱类成分是其有效成分,

包括钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱等吲哚类亲脂性生物碱^[2]。目前对钩藤总生物碱的分离纯化工艺研究的报道很少, 由于离子交换树脂对离子型化合物选择性高, 吸附量大, 价格低廉, 在生物碱类成分的分离纯化中应用最为广泛, 故本实验选用阳离子交换树脂对钩藤总生物碱进行分离纯化, 为钩藤总生物碱的工业化生产及同类生物碱

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: “十一五”国家科技重大专项/重大新药创制项目(2009ZX09103-403); 山东省中医药科技发展计划项目(2009-012)

作者简介: 王 信(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药制剂工艺及质量标准的研究。

Tel: (0531)82960689 13698604675 E-mail: wangxin470920844@126.com

*通讯作者 马志国 Tel: (020)85223784 E-mail: mzg79@hotmail.com

的纯化提供实验依据。

1 仪器与材料

LC—2010A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); BT02 型蠕动泵 (重庆杰恒蠕动泵有限公司); AB135—S 型十万分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); UV1100 型紫外可见分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司); PHS—3C 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂); PK—S24 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司)。

钩藤碱 (质量分数 > 98%, 批号 10172-080114, 购自南昌贝塔生物科技有限公司); 钩藤药材购自济南建联中药店, 经山东中医药大学药学院生药系周凤琴教授鉴定为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 的干燥带钩茎枝。001×2.5、001×7、001×15 型阳离子交换树脂 (购自山东鲁抗树脂厂), 甲醇、冰醋酸、三乙胺为色谱纯, 氯化钠、无水乙醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 上样液制备

取钩藤粗粉 2 kg, 依次加 6、5、4 倍量 0.3% 盐酸水溶液, 60 °C 提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并得滤液, 即为上样液。

2.2 钩藤碱和钩藤总生物碱的测定

2.2.1 钩藤碱的测定^[3] 采用 Merck ODS 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (55:45) (含三乙胺 10 mmol/L, 醋酸调 pH 7.5) 为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm; 柱温 25 °C。经测定上样液中钩藤碱为 86.1 μg/mL。

2.2.2 钩藤总生物碱的测定^[4] 采用酸碱滴定法测定钩藤总生物碱, 以甲基红-亚甲蓝为指示剂, 用 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液滴定, 由紫红色至蓝绿色为终点, 每毫升 0.01 mol/L 硫酸溶液相当于 7.68 mg 钩藤总生物碱。经测定药材提取液中钩藤总生物碱为 301.0 μg/mL。

2.3 树脂的预处理

树脂以去离子水浸泡过夜, 并洗至去离子水近无色; 先加入 6 倍量树脂体积的 7% 盐酸溶液浸泡 1 h 左右, 随时搅拌, 用去离子水洗至近中性; 后加入 6 倍量树脂体积的 8% 氢氧化钠溶液浸泡 1 h 左右, 随时搅拌, 再用去离子水洗至近中性; 最后加入 5 倍量树脂体积的 7% 盐酸或 8% 氢氧化钠溶液浸泡 2 h 左右, 使阳离子交换树脂转为氢型或钠型, 并用去离子水洗至近中性, 即可装柱使用。

2.4 树脂的筛选

本实验采用酸水温浸工艺提取钩藤总生物碱, 药液中钩藤生物碱以阳离子形式存在, 其可被阳离子交换树脂的氢离子或钠离子交换而被吸附在树脂上, 由于钩藤总生物碱主要为吲哚类生物碱, 碱性较弱, 故选用强酸性阳离子交换树脂进行研究。本实验以钩藤碱及钩藤总生物碱的比吸附量和洗脱率为指标, 对 001×2.5、001×7、001×15 氢型和钠型不同阳离子交换树脂的纯化能力进行了比较。取树脂 100 mL, 湿法装柱 (柱径与柱高比为 1:8), 以 4 BV/h 的体积流量逆向通过树脂柱至树脂饱和, 水洗至中性, 用含 3% 氯化钠的 50% 乙醇溶液进行洗脱, 收集 6 倍柱体积洗脱液, 计算钩藤碱及钩藤总生物碱的比吸附量、洗脱率, 结果见表 1。结果表明, 相同类型等体积的离子树脂随交联度的增大, 对钩藤碱及钩藤总生物碱的吸附量逐渐减少, 但洗脱率却逐渐增高。氢型离子树脂效果要优于钠型离子树脂, 考虑到生产实际和树脂机械强度等问题, 选择 001×7 氢型阳离子交换树脂进行后续研究。

比吸附量 = (上样液中生物碱量 - 过柱液中生物碱量) / 树脂体积

洗脱率 = 洗脱液中生物碱量 / 树脂吸附生物碱量

表 1 6 种不同类型阳离子交换树脂对钩藤生物碱的动态吸附能力

Table 1 Dynamic adsorption capability of total alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis* by six types of cation exchange resins

树脂型号	钩藤碱		总生物碱	
	比吸附量/ (mg·mL ⁻¹)	洗脱率/%	比吸附量/ (mg·mL ⁻¹)	洗脱率/%
001×2.5 氢型	15.2	34.2	53.2	31.7
001×7 氢型	11.1	48.2	32.9	51.4
001×15 氢型	5.6	56.5	18.8	55.8
001×2.5 钠型	12.2	32.1	45.9	32.0
001×7 钠型	9.3	49.4	28.1	50.9
001×15 钠型	4.1	54.9	16.4	55.1

2.5 树脂纯化工艺的研究

001×7 氢型阳离子交换树脂为强酸性阳离子交换树脂, 钩藤酸水提取液 pH 值约为 1.5, 且钩藤总生物碱的量较低, 因此提取液可不经特殊处理直接上样, 并结合生产实际 (柱径高比不宜太高) 及后续洗脱情况, 最终选定柱径高比为 1:8, 对药液

上样方式及上样体积流量进行筛选。

2.5.1 药液上样方式的选择 以钩藤碱、钩藤总生物碱的比吸附量为考察指标, 比较逆向和正向上样对树脂吸附能力的影响。

取 100 mg 树脂, 湿法装柱(径高比为 1:8), 钩藤提取液以 4 BV/h 的体积流量正向或逆向通过离子树脂柱, 计算钩藤碱、钩藤总生物碱的比吸附量。正向时钩藤碱、钩藤总生物碱的比吸附量分别为 5.3、18.9 mg/mL, 逆向时分别为 10.1、33.4 mg/mL。结果表明, 上样方式对树脂的总生物碱吸附能力影响较大, 逆向上样由于药液与树脂接触充分, 边缘效应小, 钩藤碱、总生物碱的吸附量较大, 所以选择逆向上样方式。

2.5.2 药液上样体积流量的选择 考察指标同“2.4”项下, 比较不同上样体积流量对树脂吸附能力的影响。

取 100 mL 树脂, 湿法装柱(柱径高比为 1:8), 钩藤药材提取液以不同体积流量逆向通过离子树脂柱, 计算总生物碱比吸附量, 见表 2。结果表明, 4、6 BV/h 上样体积流量对总生物碱的吸附量影响不大, 8 BV/h 上样体积流量偏快, 不利于钩藤碱、总生物碱的吸附, 吸附量相对减少, 在保证高吸附量和高效率的前提下, 优选 6 BV/h 作为药液上样体积流量。

表 2 不同上样体积流量对总生物碱吸附效果的影响
Table 2 Effects of flowing speed on adsorption rate of total alkaloids

上样体积流量/ (BV·h ⁻¹)	比吸附量/(mg·mL ⁻¹)	
	钩藤碱	总生物碱
4	12.0	37.9
6	11.3	36.5
8	5.7	20.5

2.5.3 洗脱溶剂的选择

(1) 不同质量分数氯化钠溶液洗脱效果的比较 树脂柱上样饱和后, 分别用不同质量浓度的氯化钠溶液进行洗脱, 洗脱体积流量为 4 BV/h, 收集 6 倍柱体积洗脱液, 测定钩藤碱及总生物碱洗脱率, 见表 3。结果表明, 不同质量分数的氯化钠溶液对钩藤生物碱无洗脱能力。

(2) 不同质量分数氯化钠-乙醇溶液洗脱效果比较 树脂柱上样饱和后, 分别用不同质量分数氯化钠-乙醇溶液进行洗脱, 洗脱体积流量为 4 BV/h, 收集 6 倍柱体积洗脱液, 测定钩藤碱和总生物碱的洗

脱率、质量分数, 见表 4。结果表明, 5%氯化钠的 50%乙醇洗脱液总生物碱洗脱率相对较高, 且钩藤碱和总生物碱质量分数也较高, 最终选择 5%氯化钠的 50%乙醇溶液为洗脱液。

表 3 不同质量浓度氯化钠溶液对钩藤生物碱洗脱效果的影响
Table 3 Effects of various sodium chloride concentrations on elution of alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis*

氯化钠/%	洗脱率/%	
	钩藤碱	总生物碱
5	0	0.4
10	0	0.2
15	0	0.2

表 4 不同质量分数氯化钠-乙醇溶液对钩藤生物碱洗脱效果的影响

Table 4 Effects of various sodium chloride and ethanol concentrations on elution of alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis*

洗脱溶剂	钩藤碱		总生物碱	
	洗脱率/ 质量分数/		洗脱率/ 质量分数/	
	%	%	%	%
1%氯化钠-30%乙醇	21.2	5.1	25.3	17.3
3%氯化钠-30%乙醇	32.6	6.4	34.7	21.6
5%氯化钠-30%乙醇	35.2	9.3	34.9	30.1
1%氯化钠-50%乙醇	31.5	7.8	24.2	28.8
3%氯化钠-50%乙醇	49.3	12.8	51.4	44.5
5%氯化钠-50%乙醇	52.1	13.9	52.8	47.6
1%氯化钠-70%乙醇	32.6	9.6	23.5	34.7
3%氯化钠-70%乙醇	55.3	12.6	56.4	46.8
5%氯化钠-70%乙醇	57.4	12.4	55.6	41.4

2.5.4 洗脱体积流量的选择 树脂柱上样饱和后, 用 5%氯化钠-50%乙醇溶液以不同洗脱体积流量进行洗脱, 收集 6 BV 洗脱液, 测定钩藤碱和钩藤总生物碱的洗脱率, 见表 5。结果表明, 洗脱体积流量越小, 生物碱洗脱率越高。4、8 BV/h 洗脱效果相当, 考虑实际生产的效率问题, 最终选择 8 BV/h 作为洗脱体积流量。

2.5.5 洗脱剂用量的选择 树脂柱上样饱和后, 用 5%氯化钠-50%乙醇溶液进行洗脱, 洗脱体积流量为 8 BV/h, 分段收集洗脱液, 测定钩藤碱和钩藤总生物碱的洗脱率、质量分数, 见表 6。结果表明, 用 5%氯化钠-50%乙醇溶液洗脱 10 倍柱体积后, 钩藤

表 5 不同洗脱体积流量对钩藤生物碱洗脱效果的影响

Table 5 Effects of different speeds on elution of alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis*

洗脱体积流量/ (BV·h ⁻¹)	洗脱率/%	
	钩藤碱	总生物碱
4	53.1	52.2
8	51.9	53.4
12	41.5	42.7

表 6 不同洗脱剂用量对钩藤生物碱洗脱效果的影响

Table 6 Effects of different volumes on elution of alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis*

洗脱剂 用量/BV	钩藤碱		总生物碱	
	洗脱率/ %	质量分数/ %	洗脱率/ %	质量分数/ %
6	53.5	12.8	56.1	46.7
8	73.1	13.9	74.6	47.4
10	87.5	14.2	88.9	48.2
12	88.2	13.8	90.9	47.8

碱及钩藤总生物碱的洗脱率、质量分数变化不大，最终选择洗脱 10 倍柱体积。

2.6 验证试验

通过对 001×7 氢型阳离子树脂纯化钩藤总生物碱的研究，得出最佳纯化工艺为：钩藤药材提取液以 6 BV/h 逆向通过 001×7 氢型阳离子交换树脂柱（柱径高比为 1：8），树脂饱和后，水洗至中性，再用 5%氯化钠-50%乙醇溶液以 8 BV/h 洗脱，洗脱 10 倍量树脂柱体积。在最佳吸附和洗脱条件下，重复试验 3 次，结果见表 7。从结果可以看出，在最佳实验条件下，钩藤碱和钩藤总生物碱在 001×7 氢型阳离子交换树脂上吸附和洗脱重现性好，说明此实验条件稳定，结果可靠。

表 7 最佳工艺验证试验

Table 7 Validation of optimum technology

序号	钩藤碱				总生物碱			
	比吸附量/ (mg·mL ⁻¹)	洗脱率/%	质量分数/%	收率/%	比吸附量/ (mg·mL ⁻¹)	洗脱率/%	质量分数/%	收率/%
1	10.4	89.1	13.6	86.6	33.9	90.2	48.3	90.5
2	11.5	87.7	14.2	85.7	31.2	89.3	47.3	89.2
3	10.7	87.9	13.9	86.2	32.7	90.1	47.1	91.3

2.7 洗脱液处理及除盐工艺

洗脱液中含有大量的 H⁺及氯化钠，需要进行中和及除盐处理。经考察，确定将洗脱液用 10%氢氧化钠溶液调至近中性，然后将药液减压浓缩至有大量氯化钠固体析出，移至烘箱中减压干燥，将干燥品用无水乙醇加热回流提取 4 次进行脱盐。经脱盐剩余的氯化钠可循环利用，不仅安全环保，而且降低了生产成本。最后将所得的乙醇提取液经减压回收乙醇后，浓缩，干燥，即得钩藤总生物碱提取物。

2.8 离子树脂的再生

树脂每次使用后，用去离子水逆向洗去乙醇及氯化钠，然后逆向加 7%盐酸浸泡过柱面，浸泡 4~5 h 后，正向加水冲洗至流出液 pH 值为 5~7 时，即可进行下一次上柱交换，树脂可多次循环使用，生产成本低，且不需反复装柱，应用简便。

3 讨论

本实验对不同交联度的离子交换树脂性能进行了比较研究，发现交联度越大，比吸附量越低，但洗脱率较高，相反，交联度越小，比吸附量越高，但洗脱率较低。可能原因是交联度大，机械强度高，网络结构致密，交换离子不宜进入树脂内部，只是表面位点的交换吸附，比吸附量就低，但表面吸附有利于洗脱过程，所以有较高的洗脱率，交联度小的正好相反。通过对不同质量分数的氯化钠溶液和氯化钠-乙醇溶液洗脱钩藤生物碱的比较，可以看出，即使有交换离子能把生物碱交换下来，但不能破坏生物碱与树脂之间的静电吸引力，同样不能把生物碱洗脱下来。

传统离子树脂的洗脱溶剂为酸醇、氨醇等，在预试验中发现这些洗脱剂洗脱率低，易引入毒性树脂杂质且不适合大规模生产，本实验采用盐醇溶液为洗脱剂，洗脱率高，总生物碱质量分数高，经济、安全，适合大规模生产，具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 宋纯清, 樊 懿, 黄伟晖, 等. 钩藤中不同成分降压作用的差异 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 762-764.
- [3] 王英锋, 魏璐雪, 王保中. 高效液相色谱法测定钩藤中钩藤碱、异钩藤碱含量 [J]. 药物分析杂志, 1999, 19(1): 56-57.
- [4] 韩正洲, 高崇凯, 李 宇, 等. 正天胶囊提取工艺研究 [J]. 中成药, 2003, 25(9): 696-699.