

吴茱萸碱的大孔树脂分离纯化工艺优选

李姝影¹, 李晓菲¹, 陈飞¹, 孙洪胜^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂分离纯化吴茱萸醇提液中吴茱萸碱的工艺条件。方法: 以吴茱萸碱的吸附量和洗脱率为考察指标, 通过静态吸附-洗脱试验考察5种不同类型大孔吸附树脂(AB-8, S-8, NKA-9, HPD-100, D-101)对吴茱萸碱纯化效果的影响, 通过单因素试验优选上样液质量浓度、上样量、上样流速、洗脱剂种类及用量等工艺参数。结果: D-101型大孔树脂对吴茱萸碱具有良好的吸附分离性能, 最佳富集工艺条件为上样液质量浓度 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 上样量4 BV, 上样流速 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 加水5 BV去除水溶性杂质, 加80%乙醇5 BV以 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 洗脱。吴茱萸碱洗脱率达92.81%, 吴茱萸碱的纯度由提取物的1.29%提高至26.77%。结论: D-101型大孔树脂适用于吴茱萸碱的纯化, 优选的纯化工艺稳定可行, 为该成分的开发利用提供参考。

[关键词] 吴茱萸; 吴茱萸碱; 大孔树脂; 极性; 洗脱率; 吸附量

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0027-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040027

Optimization of Purification Technology for Evodiamine from Euodiae Fructus by Macroporous Resin

LI Shu-ying¹, LI Xiao-fei¹, CHEN Fei¹, SUN Hong-sheng^{2*} (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology conditions of evodiamine from ethanol extract of Euodiae Fructus by macroporous resin. **Method:** With adsorption volume and elution rate of evodiamine as indexes, five kinds (AB-8, S-8, NKA-9, HPD-100, D-101) of macroporous resins were selected by static adsorption and desorption test. Sample solution concentration, sample volume, sample flow rate, eluent type, eluent amount and other parameters were investigated by single factor tests. **Result:** D-101 macroporous resin had the best separation and purification capacity for evodiamine in following technology conditions: sample concentration of $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sample volume of 4 BV, sample flow rate of $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, removed water-soluble impurities with 5 BV of water, eluted with 5 BV of 80% ethanol, eluting velocity of $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$. Elution rate of evodiamine was 92.81%, its purity increased from 1.29% to 26.77%. **Conclusion:** D-101 macroporous resin is suitable for purifying evodiamine from Euodiae Fructus. This optimized method is stable and feasible, it can provide a reference for development and utilization of evodiamine.

[Key words] Euodiae Fructus; evodiamine; macroporous resin; polar; elution rate; adsorption quantity

吴茱萸中的主要活性成分为吴茱萸碱, 药理研究表明吴茱萸碱除了具有抗动脉粥样硬化、血管舒张、强心等作用外, 还具有明显的抗肿瘤作用, 在 $10\sim 50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可不同程度地杀死各种肿瘤细胞, 但对人正常细胞无杀伤作用^[2], 与其他化疗药物相比具有明显的优势, 是一种开发前景较好的天然抗癌新药^[3-4]。许海玉等^[5]采用氧化铝柱纯化了纯化

吴茱萸提取液中总生物碱和柠檬苦素, 总质量分数能达到56.1%, 但并未单独考察对吴茱萸碱的纯化工艺。邱时祎^[6]采用制备液相分离纯化了吴茱萸碱, 纯度较高, 但该方法成本非常高。本实验采用价廉且使用广泛的大孔树脂^[7-8]分离纯化吴茱萸碱, 通过静态吸附-洗脱试验筛选吴茱萸碱的最佳纯化树脂型号, 利用单因素试验优选纯化工艺条件, 为吴

[收稿日期] 20140526(012)

[第一作者] 李姝影, 在读硕士, 从事中药新剂型新技术研究, Tel: 18615303989, E-mail: 1151327113@qq.com

[通讯作者] * 孙洪胜, 硕士, 主任药师, 从事中药质量控制与中药新剂型新技术研究, Tel: 13793188158, E-mail: 13793188158@163.com

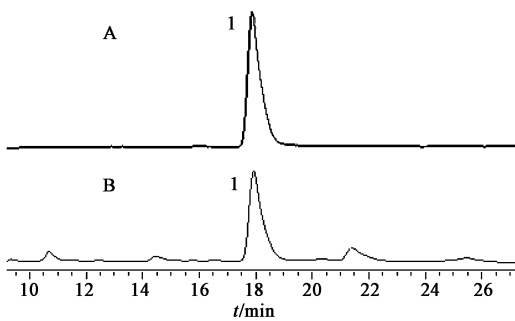
茛菪碱的新药研制提供参考。

1 材料

600-2996型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), JM-B型电子天平(诸暨市超泽平衡仪器设备有限公司), AL204型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。吴茛菪购自天马中药饮片科技有限公司, 由山东中医药大学附属医院张学顺主任药师鉴定为芸香科植物吴茛菪 *Euodia rutaecarpa* 的干燥近成熟果实; AB-8, S-8, NKA-9, HPD-100, D101型大孔吸附树脂(天津市光夏精细化工研究所), 吴茛菪碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110802-200908), 甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 吴茛菪碱的含量测定 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水-四氢呋喃-冰乙酸(45: 55: 0.9: 0.3), 检测波长 225 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL。理论塔板数按吴茛菪碱计算不低于 1 000。吴茛菪碱回归方程 $Y = 8.5 \times 10^6 X - 1.2 \times 10^5$ ($r = 0.9998$), 线性范围 0.122 8 ~ 0.532 μg, 方法的平均回收率 99.27% (RSD 1.1%), 精密度 RSD 1.3%, 重复性试验 RSD 1.8%, 24 h 内稳定性试验 RSD 1.2%, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 吴茛菪碱

图1 吴茛菪提取液 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Euodiae Fructus* extract

2.2 吴茛菪提取液的制备^[9] 取吴茛菪粗粉 2 kg, 加 20 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.2 h, 合并滤液, 减压浓缩, 过滤, 得吴茛菪提取液, 作为上样液。经测定, 提取液中吴茛菪碱质量浓度 0.593 7 g · L⁻¹。

2.3 树脂预处理 将 AB-8, D101, S-8, HPD-100, NKA-9 型大孔树脂依次用 95% 乙醇 4 BV 浸泡 24 h, 充分溶胀, 湿法装柱, 用 95% 乙醇洗至流出液加 4 倍量水后不出现浑浊, 水洗至流出液无醇味, 用

5% 盐酸浸泡 2 h, 水洗至中性, 用 5% 氢氧化钠溶液浸泡 2 h, 水洗至中性, 备用。

2.4 大孔树脂筛选^[10]

2.4.1 静态吸附-洗脱试验 精密称取经预处理好的 AB-8, D-101, S-8, HPD-100, NKA-9 型大孔树脂各 2.0 g, 精密加入吴茛菪提取液 150 mL, 室温下适当振摇至充分吸附, 浸泡 24 h, 滤过, 取滤液, 按 2.1 项下方法测定吴茛菪碱含量, 计算吸附量分别为 13.32, 18.24, 10.78, 17.49, 9.54 mg · g⁻¹。用 70% 乙醇 80 mL 对上述吸附饱和的树脂进行洗脱, 操作条件同吸附试验, 测定洗脱液中吴茛菪碱含量, 计算洗脱率分别为 65.31%, 81.36%, 42.69%, 59.33%, 57.12%。说明非极性大孔树脂 D-101 和 HPD-100 对吴茛菪碱的饱和吸附量和洗脱率较好。

2.4.2 树脂吸附动力学考察 精密称取经预处理好的 AB-8, D101, HPD-100, S-8, NKA-9 型树脂各 2.0 g, 分别置于具塞锥形瓶中, 各精密加入吴茛菪提取液 150 mL, 室温下水平振摇, 分别于 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24 h 按 2.1 项下方法测定吸附液中吴茛菪碱含量, 计算吸附量, 结果 D-101 型大孔吸附树脂较其余类型树脂具有更快的吸附速率, 2 h 时吸附量即达最终平衡的 94.63%, 故选择 D-101 型树脂对吴茛菪碱进行纯化。

2.5 上样条件考察^[11]

2.5.1 上样液质量浓度 将预处理好的 D-101 型大孔树脂 10 g (15 mL), 湿法装柱, 取吴茛菪提取液 100 mL, 分别浓缩成含吴茛菪碱 2, 3, 4, 5 g · L⁻¹ 的上样液, 以 1 BV · h⁻¹ 的流速上样, 收集流出液, 按 2.1 项下方法测定吴茛菪碱含量, 计算吴茛菪碱吸附率依次为 99.87%, 99.69%, 98.73%, 97.52%。综合考虑, 确定上样液中吴茛菪碱质量浓度 3 g · L⁻¹。

2.5.2 上样量 将经预处理好的 D-101 型大孔树脂 30 g (45 mL), 湿法装柱, 取 3 g · L⁻¹ 上样液以 1 BV · h⁻¹ 的流速上样, 收集流出液, 每份为 1 BV, 按 2.1 项下方法测定吴茛菪碱含量, 结果表明第 4, 5, 6 份流出液吸附率分别为 99.10%, 92.31%, 72.05%, 上样量达 5 BV 时开始泄漏, 综合考虑, 选择上样量 4 BV, 即树脂 1 g 吸附吴茛菪碱 18 mg。

2.5.3 上样流速 将经预处理好的 D-101 型大孔树脂 30 g (45 mL), 共 4 份, 湿法装柱, 取 3 g · L⁻¹ 上样液 4 BV 分别以 1, 2, 3, 4 BV · h⁻¹ 的流速过柱, 收集流出液, 按 2.1 项下方法测定, 计算吴茛菪碱吸附率分别为 99.93%, 95.32%, 89.71%, 81.20%, 故上样流速选择 1 BV · h⁻¹。

2.6 洗脱条件考察

2.6.1 洗脱剂浓度 将经预处理好的 D-101 型大孔树脂 10 g (15 mL), 湿法装柱, 取 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液 4 BV 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 待吴茱萸提取液充分吸附后, 加 5 BV 水以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 进行洗脱, 除去上样液中多糖类、色素等杂质, 依次用 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 的乙醇溶液各 5 BV 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 进行洗脱, 洗脱液按 2.1 项下方法测定, 计算回收率, 结果发现 30% 乙醇, 50% 乙醇, 60% 乙醇的洗脱液中未检测到吴茱萸碱, 80% 乙醇洗脱液回收率达 85.37%, 故选择 80% 乙醇为洗脱剂。

2.6.2 洗脱剂用量 将经预处理好的 D-101 型大孔树脂 30 g (45 mL), 湿法装柱, 取 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液 4 BV 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 待吴茱萸碱充分吸附后, 加 5 BV 水以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 进行洗脱, 加 80% 乙醇 8 BV 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度进行洗脱, 收集洗脱液, 每 1 BV 为 1 份, 按 2.1 项下方法测定, 结果发现用 80% 乙醇 5 BV 即可充分洗脱。

2.6.3 洗脱流速 将经预处理好的型大孔树脂 30 g (45 mL), 湿法装柱, 按上述确定的工艺条件吸附、水洗除杂, 加 80% 乙醇 5 BV 分别以 1, 2, 3, 4, $5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行洗脱, 按 2.1 项下方法测定, 计算吴茱萸碱回收率分别为 89.22%, 91.16%, 82.37%, 79.92%, 72.33%。说明流速越快, 洗脱效果越差, 综合考虑, 选择洗脱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.7 验证试验 称取 D-101 型大孔吸附树脂 30 g (45 mL), 湿法上柱, 取 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液 4 BV 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 按优选的工艺条件进行吸附和洗脱, 收集 80% 乙醇洗脱液, 按 2.1 项下方法测定纯化物中吴茱萸碱含量。结果 80% 乙醇洗脱液中吴茱萸碱回收率达 92.37%, 浸膏得量 129.7 mg, 浸膏中吴茱萸碱纯度达 26.52%。

2.8 中试试验 称取 D-101 型大孔吸附树脂 200 g, 湿法上柱, 按优选的工艺条件进行纯化, 收集乙醇洗脱液, 结果 80% 乙醇洗脱液中吴茱萸碱回收率达 92.81%, 浸膏得量 26.43 g, 浸膏中吴茱萸碱质量分数达 26.77%。说明优选的工艺稳定可行, 可推广于吴茱萸碱工业化生产中应用。经 D-101 型大孔树脂富集后, 吴茱萸碱的纯度由提取物的 1.29% 提高至 26.77%, 提高了近 21 倍。

3 讨论

在前期试验中, 流动相考察了 [乙腈-四氢呋喃 (25:15)]-0.05% 磷酸水溶液 (30:70), 乙腈-水 (51:49), 乙腈-水-四氢呋喃-冰乙酸 (41:59:1:

0.2), 结果发现后者的分析效果最好, 故选择乙腈-水-四氢呋喃-冰乙酸 (45:55:0.9:0.3) 为流动相。通过比较 5 种不同极性大孔树脂 (D-101 和 HPD-100 为非极性, AB-8 为弱极性, S-8 为中等极性, NKA-9 为极性), 发现非极性的大孔吸附树脂对吴茱萸碱的吸附量较大。吴茱萸碱难溶于水, 提取液一次性回收乙醇会出现大量沉淀, 容易堵柱, 为了克服该缺点, 在上样液质量浓度考察时, 选择 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醇提液进行上样, 结果并未影响纯化效果。吴茱萸碱的抗肿瘤作用被越来越多的研究所证实, 为纯化吴茱萸碱以便于制剂成型, 可根据吴茱萸碱的化学性质, 将大孔树脂纯化和醇提水沉、甲醇重结晶等方法相结合, 效果更佳。生物碱纯化采用大孔吸附树脂可避免传统阴离子交换树脂中酸或碱洗脱带来的不便, 且具有收率高、成本低、耐污染性强等优点, 研究中吴茱萸碱纯化工艺未用到乙醇以外的有机溶剂, 更易于推广于工业化生产, 为吴茱萸碱的研究开发提供参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:160.
- [2] 张莹. 吴茱萸碱抗肿瘤机制研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [3] 张醇, 梁华平. 吴茱萸碱抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(17):1558-1560.
- [4] 张鑫, 高世勇, 季宇彬. 吴茱萸碱体外抗肿瘤作用的研究[J]. 中国药理学通讯, 2010, 27(2):37-38.
- [5] 许海玉, 刘莹, 张铁军. 氧化铝柱纯化吴茱萸提取液中总生物碱和柠檬苦素的研究[J]. 中草药, 2010, 41(5):741-744.
- [6] 邱时祎. 吴茱萸中生物碱的分离纯化和质谱表征[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [7] 张旭, 王锦玉, 仝燕, 等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):286-290.
- [8] 王俐, 付文焕, 施孝金. 大孔吸附树脂分离技术在现代中药中的适宜性[J]. 中国医药指南, 2012, 10(6):34-35.
- [9] 陈洪宝, 周毅生, 宋华, 等. 均匀设计优选吴茱萸提取工艺的研究[J]. 中成药, 2005, 27(11):1338-1340.
- [10] 尚作华, 霍金海, 王伟明. 核桃楸叶总鞣质的大孔树脂纯化工艺考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16):36-38.
- [11] 金文淑, 张炜煜. 益髓通经方中马钱子生物碱纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2):10-13.

[责任编辑 刘德文]