

离子交换树脂对钩藤总生物碱的纯化工艺

窦月¹, 周洪雷^{1*}, 齐冬梅¹, 李运伦², 陈凯¹

(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: 建立阳离子交换树脂纯化钩藤总生物碱的工艺。方法: 以钩藤总生物碱为研究指标, 考察离子交换树脂分离钩藤总生物碱的工艺条件。结果: 选择732型阳离子交换树脂, 以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速上样, 分别用10 BV水, 6 BV 80%乙醇洗脱除杂, 最后选用1%氨性80%乙醇洗脱得到钩藤总生物碱, 含量达到50%。结论: 该方法工艺较简单, 总碱含量较高, 适合工业化生产。

[关键词] 离子交换树脂; 钩藤; 总生物碱; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0008-03

Purification Technology of Total Alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* by Ion-Exchange Resin

DOU Yue¹, ZHOU Hong-lei^{1*}, QI Dong-mei¹, LI Yun-lun², CHEN Kai¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To establish purification technology of total alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* with cation-exchange resin. **Method:** Total alkaloids from *U. rhynchophylla* was selected as indicator, and investigated separation technology conditions of total alkaloids from *U. rhynchophylla* by ion-exchange resin. **Result:** Seven hundred and thirty-two cation-exchange resin was chosen, flow rate of sample was $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ of flow rate, then eluted with 10 BV water and 6 BV 80% ethanol, finally eluted with 1% aqueous ammonia 80% ethanol, the content of total alkaloids from *U. rhynchophylla* was up to 50%. **Conclusion:** This technology was simply, the content of total alkali was high, suitable for industrial production.

[收稿日期] 20110514(007)

[基金项目] 山东省科技发展计划项目(2008GG2NS02011); 国家科技重大专项(2009ZX09301-013); 山东省自然科学基金项目(ZR2010HM017); 山东省教育厅科技计划项目(J105LL05)

[第一作者] 窦月, 硕士生, 从事中药化学成分及质量控制研究, Tel: 13276416287, E-mail: liaochengdy@163.com

[通讯作者] *周洪雷, 教授, 博士生导师, 从事中药及天然药物有效成分及质量控制研究, Tel: 13964017341, E-mail: hongleizhou@yahoo.com.cn

[2] 姜一平, 冯锋, 谢宁, 等. 毛冬青的化学成分[J]. 药学与临床研究, 2008, 6(3): 163.

[3] 侯世祥, 田恒康. 大孔吸附树脂在中药复方分离纯化工艺中的应用[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(3): 131.

[4] 曾永长, 梁少瑜, 邢学峰, 等. 白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 26.

[5] 刘中秋, 蔡雄, 赖小平, 等. 大孔吸附树脂富集纯化毛冬青总皂苷工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,

2001, 12(1): 51.

[6] 李鹏, 张宇燕, 李金辉, 等. 补阳还五汤方中红花黄芪配伍总黄酮的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 10.

[7] 徐艳华, 苗明三, 徐鹏, 等. 毛冬青有效部位中总黄酮含量测定[J]. 中医学报, 2011, 26(7): 826.

[8] 徐艳华, 苗明三, 高聪聪, 等. 毛冬青有效部位中总皂苷的含量测定[J]. 中国中医药现代远程教育杂志, 2011, 9(6): 144.

[责任编辑 仝燕]

[**Key words**] ion-exchange resin; *Uncaria rhynchophylla*; total alkaloids; purification

钩藤性味甘、凉,归肝、心包经,具有清热平肝、息风定惊之功效,入肝经,以凉血祛风,治昏止眩,主肝风相火之病,主要用于头痛眩晕、惊痫抽搐、高血压^[1-3]等症。现代药理实验证明^[4]钩藤具有显著的降压功效,其主要有效成分为钩藤总生物碱。钩藤总生物碱可以用乙醇提取,浓缩得浸膏,浸膏碱化后,三氯甲烷萃取的方法制得,但工艺繁琐,钩藤总生物碱含量较低。本试验以钩藤总生物碱为指标,考察阳离子交换树脂纯化钩藤总生物碱的工艺条件。

1 材料

钩藤购于建联大药店,经本校中药鉴定教研室李峰教授鉴定为钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Mig.) Mig. ex Havil.。732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂(天津大茂化学试剂厂),HD-8 型大孔强酸型离子交换树脂,HZ-008 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂,D155 型大孔弱酸型离子交换树脂均购于上海华震科技有限公司。盐酸、氨水、乙醇、三氯甲烷等均为国产分析纯。LD4-2A 型低速离心机(北京医用离心机厂)。

2 方法与结果

2.1 钩藤提取液的制备^[5] 钩藤药材 1 kg,加 10 倍量 75% 的乙醇溶液回流提取 3 次,每次 3 h,合并滤液,减压回收乙醇至 2 L,即得钩藤浓缩液(药材质量浓度约 0.5 g·mL⁻¹)。加入 1% 盐酸 20% 乙醇溶液 10 L。

2.2 钩藤总生物碱的含量测定

表 1 钩藤总生物碱加样回收率试验

No.	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	8.341	8.335	16.680	100.048		
2	8.336	8.335	16.450	97.349		
3	8.338	8.335	16.451	97.337	97.395	1.448
4	8.335	8.335	16.411	96.881		
5	8.340	8.335	16.417	96.905		
6	8.332	8.335	16.321	95.849		

2.3 阳离子交换树脂纯化钩藤总生物碱的工艺优化

2.3.1 树脂的预处理 树脂用去离子水浸泡过夜,水洗至近无色。装入色谱柱,3 倍量 5% 氢氧化钠冲洗树脂柱,水洗至流出液近中性,3 倍量 5% 盐酸冲洗,用水洗至流出液近中性,备用。

2.3.2 树脂型号的选择 分别取 732 型强酸性苯

2.2.1 酸碱滴定法 洗脱液回收至无醇味,加氨水调 pH 10 左右,转入分液漏斗中,三氯甲烷萃取(50 mL×6),合并三氯甲烷液,20 mL 蒸馏水水洗,得三氯甲烷液,回收三氯甲烷至干,残渣加 4 mL 三氯甲烷溶解,精密加 0.010 mol·L⁻¹ 硫酸液 30 mL,置水浴上加热除去三氯甲烷,放冷至室温,加 3 滴甲基红-亚甲蓝指示剂,用 0.020 mol·L⁻¹ 氢氧化钠液滴定至溶液由橙红色转变为浅黄绿色。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取经阳离子交换树脂纯化的钩藤洗脱液 400 mL,按 2.2.1 项下方法制备,即得供试品溶液。

2.2.3 精密度试验 取同 1 份经阳离子交换树脂纯化的钩藤洗脱液,按 2.2.2 项下方法制备,并按 2.2.1 项下方法测定,连续测定 6 次,结果钩藤总生物碱 RSD 1.53%,表明精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取同 1 份供试品溶液,按 2.2.1 项下方法连续测定 6 次,结果钩藤总生物碱 RSD 1.16%,表明精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 对同 1 份供试品溶液,在 0,1,2,4,6,12 h 分别测定。计算钩藤总生物碱 RSD 2.25%,表明样品至少在 12 h 内较稳定。

2.2.6 加样回收试验 精密量取已知钩藤总生物碱含量的钩藤洗脱液 100 mL 6 份,精密加入钩藤碱对照品适量,依 2.2.2 项下方法制备,并按 2.2.1 项下方法测定,计算钩藤总生物碱含量,结果平均回收率为 97.395%,RSD 1.448%,见表 1。

乙烯系阳离子交换树脂,HD-8 型大孔强酸型离子交换树脂,HZ-008 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂,D155 型大孔弱酸型离子交换树脂各 40 mL,装入同型号玻璃色谱柱(2 cm×20 cm),取 2.1 项下制备的钩藤药液上样,8 BV 水洗脱,10 BV 1% 氨水 80% 乙醇洗脱,洗脱流速 1 mL·min⁻¹,以钩藤总生物碱为指标,测定 1% 氨水 80% 乙醇洗脱液中总生

物碱质量分数,计算吸附量分别为 74.0, 65.8, 70.7, 65.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;洗脱量分别为 46.5, 38.3, 41.7, 31.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明 732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂的吸附量和洗脱量均最高,故选择 732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂。

2.3.3 上样流速的选择 取 732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂 20 mL 装于玻璃色谱柱中,分别量取钩藤上样药液 400 mL,以不同流速通过树脂柱,流出液以硅钨酸和碘化铋钾试液检测,当出现生物碱反应时停止上样。结果表明流速为 0.5, 1, 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,上样体积分别为 50, 225, 195 mL,随着上样流速的增加,上样体积逐渐减小,总生物碱的泄露逐渐加快,但流速过慢,则会延长生产周期,提高成本,综合考虑选择吸附流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 为宜。

2.3.4 洗脱剂的选择

2.3.4.1 氨浓度对洗脱效果的影响 取 732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂 40 mL 各 4 份,装入色谱柱(2 cm \times 20 cm),以 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的吸附流速上样 400 mL,上样后水洗至流出液成中性,分别用 80% 乙醇,0.5% 氨水 80% 乙醇,1% 氨水 80% 乙醇,2% 氨水 80% 乙醇,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速洗脱 8 BV,测定各洗脱液中钩藤总生物碱含量分别为 10.1, 30.3, 32.8, 31.4 mg。精密量取一定体积的洗脱液测定干膏重,分别为 130, 154, 193, 195 $\text{mg}^{[6]}$,结果表明 1% 氨水 80% 乙醇洗脱效果最高。

2.3.4.2 乙醇体积分数对洗脱效果的影响 量取 732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂 40 mL 各 4 份,装入色谱柱(2 cm \times 20 cm),以 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的吸附流速上样 400 mL 后,水洗至流出液成中性,再用 80% 乙醇初步除杂^[7]后,分别用 1% 氨水 60% 乙醇,1% 氨水 80% 乙醇,1% 氨水 95% 乙醇 8 BV 洗脱,计算各碱性乙醇洗脱液中钩藤总生物碱含量分别为 33.9, 33.3, 6.6 mg,洗脱固形物质量分别为 81, 65.5, 13 mg,纯度分别为 41.85%, 50.89%, 51.06%。由结果知 1% 氨水 60% 乙醇的洗脱率最高,但是纯度不高;1% 氨水 95% 乙醇的纯度虽高,但洗脱率低,故选择 1% 氨水 80% 乙醇作为洗脱剂。

2.3.5 工艺验证性试验 称取钩藤药材 1 kg,加

10 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 3 h,合并滤液,减压回收乙醇至 2 L,加入 1% 盐酸 20% 乙醇溶液 10 L,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过 732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂柱,8 BV 水洗至中性,80% 乙醇 6 BV 除杂,10 BV 1% 氨水 80% 乙醇洗脱,该洗脱剂回收溶剂,干燥,得钩藤总生物碱 2.17 g,纯度为 50.80%。

3 讨论

钩藤总生物碱是其降压有效部位,包括钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛因碱等多种生物碱,但含量均较低,仅以 1 种或几种含量来评价钩藤总生物碱不够全面。故本试验采用滴定法测定总生物碱的含量,能够有效地评价钩藤提取物。

钩藤所含生物碱为吲哚类生物碱,极性较小,在酸性条件下钩藤生物碱成盐,电离出生物碱阳离子,能够和阳离子交换树脂发生离子交换,吸附到树脂上,未被吸附的成分就被洗脱下来,用水冲去未被吸附的成分,再用 80% 乙醇初步除杂,碱性乙醇溶液作为洗脱剂洗脱从而达到纯化生物碱的目的,该方法大幅度提高了钩藤有效部位的纯度,为钩藤制剂的进一步研发提供依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:240.
- [2] 张丽心,孙涛,曹永孝. 钩藤碱的降压及舒血管作用[J]. 中药药理与临床,2010,26(5):39.
- [3] 宋纯清,樊懿,王伟晖,等. 钩藤中不同成分降压作用的差异[J]. 中草药,2000,31(10):762.
- [4] 霍青,赵婧,李运伦. 钩藤临床应用研究概况[J]. 山东中医杂志,2010,29(6):426.
- [5] 迟玉明,赵晔瑛,吉泽丰吉,等. 离子交换树脂用于角蒿总生物碱的纯化研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(5):617.
- [6] 梁勇,温碧珍. 钩藤中总生物碱提取分离研究[J]. 中国热带医学,2006,6(1):135.
- [7] 李义平,杨广德,贺浪冲. 红毛七总生物碱提取工艺研究[J]. 中药材,2007,30(2):220.

[责任编辑 全燕]