

阳离子交换树脂氯化钠溶液洗脱纯化益母草总碱的研究

★ 代龙 (山东中医药大学 济南 250355)

摘要:目的:优选阳离子交换树脂以氯化钠作为洗脱剂纯化益母草总碱的最佳工艺条件。方法:采用732型阳离子树脂,以益母草总碱和盐酸水苏碱洗脱率为指标,优选最佳纯化工艺参数。结果:以3.0mol/L氯化钠溶液洗脱时益母草总碱的洗脱率为87.35%,盐酸水苏碱的洗脱率为86.04%,经纯化所得提取物的益母草总碱含量>75%。结论:采用732型阳离子树脂以氯化钠溶液作洗脱剂纯化益母草总碱,不仅洗脱率高,成本低,而且易于推广至工业化生产。

关键词:阳离子交换树脂;益母草总碱;盐酸水苏碱;氯化钠溶液;纯化工艺

中图分类号:R 284.2 文献标识码:A

The Research on the Technology of Purificating Total Alkaloids in Herba Leonuri with Sodium Chloride and Acidic Exchange Ion Resins

DAI Long

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355

Abstract: Objective: Selecting the optimum purificating process of total alkaloids in herba leonuri with sodium chloride and acidic exchange ion resin. Method: Selecting Stachydrine Hydrochloride and total alkaloids in leonuri as index, and researching the optimum purificating process by acidic exchange ion resin of 732 type. Result: 3mol/L salt water was tested to be the best; the purification ratio of Stachydrine Hydrochloride is 86.04%, total alkaloid is 87.35%; the purification ratio of total alkaloid of the extract is more than 75%. Conclusion: The technology of salt water eluting alkaloids in herba leonuri by acidic exchange ion resin of 732 type can overcome the defects such as low elution ratio, high cost, and unsuitable for industrial production.

Key words: Acidic Exchange ion Resins; Total alkaloids in Herba Leonuri; Stachydrine Hydrochloride; Sodium chloride; Purificating process

益母草总生物碱有效部位疗效确切,临床需求量大,结合生物碱可离子化的性质,采用732型阳离子交换树脂进行分离纯化效果较好,该法一般采用氨水碱化树脂后氯仿回流提取^[1]、阳离子树脂柱直接氨水洗脱^[2]或以氨性乙醇洗脱^[3]的方法,也有采用酸水^[4]作为洗脱剂的报道,我们通过研究发现,采用碱性溶剂纯化不仅洗脱效率低,生产成本低,而且使用大量有机溶剂,无法推广至大生产;而采用酸性溶剂纯化虽然洗脱率较高,但是高浓度的酸液具有较大的腐蚀性,还需要进行中和除盐,提高了生产成本,给操作带来极大不便,两者均未能显示出阳离子交换树脂纯化中药生物碱的优势。为了改进上述方法的不足,借鉴氨基苷类抗生素工业生产中离子交换树脂纯化盐水洗脱的成功经验,本研究采用氯化钠溶液作为洗脱剂,拟筛选出适合益母草总碱纯化的最佳工艺。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津 SPD -

10AVP 检测器,Class - VP 工作站);MV1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);AB135 - S 型十万分之一天平(瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司);KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BT02 型蠕动泵(重庆杰恒蠕动泵有限公司)。

1.2 试药

益母草药材购自济南建联中药店,经我校药学院中药鉴定教研室周凤琴教授鉴定为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥地上部分;盐酸水苏碱对照品(批号 120116 - 200305,购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用);三乙胺和磷酸(美国 TEDIA 公司)为色谱纯;液相用水为二次重蒸水;其余试剂均为分析纯。

2 试验方法与结果

2.1 药材提取及精制

取益母草饮片,加水煎煮2次,溶剂用量分别为12.9倍量水,提取时间各为1.5h,提取液滤过,合并,浓缩至相对密度约1.16~1.20(60℃),加入乙

醇使含醇量达 80%,静置冷藏 24 h,减压回收乙醇,再加水调整至每 1 ml 相当于 2 g 生药,作为供试样品液,即得。

2.2 总生物碱和盐酸水苏碱的含量测定

2.2.1 总生物碱的含量测定^[5] 采用《中国药典》2005 年版一部“益母草口服液”项下雷氏铵盐比色法测定,测得供试品液中益母草总碱含量为 0.70% (按药材折算)。

2.2.2 盐酸水苏碱含量测定^[6] 采用 Waters Spherisorb 5 μm SCX 阳离子交换树脂柱(4.6 $\times$ 250 mm),以 15 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(含有 0.04% 三乙胺和 0.15% 磷酸)为流动相,流速:1.0 ml/min,检测波长 192 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,经测定供试品液中盐酸水苏碱的含量为 0.52% (按药材折算)。

2.3 树脂的预处理^[7]

树脂以去离子水浸泡过夜,并洗至去离子水近无色;先加入 5 倍量 7% HCl 溶液浸泡 1 h 左右,随时搅拌,用去离子水洗至洗出水近中性;后加入 5 倍量 8% NaOH 溶液浸泡 1 h 左右,随时搅拌,再用去离子水洗至洗出水近中性;最后加入 5 倍量 7% HCl 溶液浸泡 2 h 左右,使阳离子交换树脂转为 H 型,并用去离子水洗至近中性,即可装柱应用。

2.4 益母草总碱过柱精制工艺优选

2.4.1 上样、洗脱终点判断方法 实验考察了几种常用的生物碱沉淀剂与益母草提取液的反应,结果以 10% 硅钨酸试剂反应最为明显,出现白色沉淀,易于观察。

2.4.2 上样药液的前处理方法考察

(1)上柱前药液浓度的选择 将不同浓度已处理好的药液(原液, pH 4.32)正向通过已处理好的阳离子交换柱(玻璃柱, $\varnothing$ 2.7 cm $\times$ 30 cm,下同),观察上样情况,结果见表 1。

表 1 不同药液浓度对上柱吸附影响的比较

药液浓度 (1ml:g 生药)	上柱吸附情况
1:1	药液稀,吸附顺利,上样速度可较快,但耗时较多
1:2	药液稀,吸附顺利,上样速度可较快,省时
1:3	药液稍粘,上样速度不能过快,且易泄漏
1:4	药液粘稠,上柱较困难,上样速度不能过快,易泄漏

结果表明,药液经醇沉去杂后已较澄清,可采用较高浓度上柱吸附,并能保证充分交换。最后确定上柱药液浓度以 1:2 为佳,既可保证生物碱吸附充分且不泄漏,又能提高上柱的效率,节省时间。

(2)上柱前药液 pH 的选择 将 2.1 项下所得药液以盐酸调节不同 pH 值,正向通过已处理好的阳离子交换柱,观察上样情况,结果见表 2。

表 2 药液不同 pH 值对上柱吸附影响的比较

药液 pH	上柱吸附情况	最大吸附量 /g $\cdot$ ml $^{-1}$
4.32(原液)	可吸附,上样速度不宜过快,易泄露	3.4
3.39	可吸附,上样速度不宜过快,易泄露	3.6
2.18	可吸附,上样速度可稍快,不易泄露	3.9
1.47	可吸附,上样速度可稍快,不易泄露	4.2

结果表明,以 pH 4~5 的原液上样时,益母草总生物碱离子化强度稍弱,上样速度较慢,但吸附效果与将药液酸化至 pH 3 以下时相差不大。但实验发现,在调节原液 pH 时溶液中会出现少量杂质沉淀,过滤后再上柱,则树脂的重复利用率明显提高,并可通过酸化过滤进一步除杂,提高生物碱的纯度,最后确定药液调节 pH 1~2 后过滤上样。

2.4.3 药液上柱流速的选择 将 50 ml 湿树脂以水搅匀,湿法装于玻璃柱中,取经处理的药液以不同的流速正向通过树脂柱,考察树脂的最大吸附量,结果见表 3。

表 3 不同的上柱流速对最大吸附量影响的比较

上柱速度 /BV $\cdot$ h $^{-1}$	最大吸附量 /g $\cdot$ ml $^{-1}$
3	4.03
4	4.15
5	4.01
6	3.87

结果表明,当上样速度为 4B V/h 时,不仅吸附效果好,而且不易泄露,因此确定上柱流速为 4B V/h。

2.4.4 树脂吸附量的确定 将 50 ml 湿树脂以水搅匀,湿法装于离子交换树脂柱中,取上样药液分别通过树脂柱,流出液以 10% 硅钨酸试剂随时检查,至生物碱反应呈阳性为止。多次的试验结果表明:1 ml 湿树脂可吸附 2~3 ml(4~6 g 生药)的药液。

2.4.5 水洗除杂条件的优选 药液交换完毕后,需先用去离子水洗去未发生交换的黄酮、多糖等杂质,以进一步除杂,提高总生物碱的纯度。实验比较了不同水洗流速的对除杂效果的影响以及所需去离子水的体积。结果见表 4。

表 4 不同的水洗速度对除杂效果影响的比较

水洗速度 /BV $\cdot$ h $^{-1}$	水洗结果
4	12BV 的水才能洗至近中性,流出液近中性
6	10BV 的水才能洗至近中性,流出液近中性
8	14BV 的水才能洗至近中性,流出液近中性

结果表明,以 6 BV/h 速度水洗,只需 10 倍柱体积左右的水即可除杂充分。

2.4.6 洗脱条件的优选 (1)洗脱剂浓度的选择 取经过处理的供试品液 5 份,每份 100 ml,分别通过装有 50 ml 湿树脂的树脂柱,先用去离子水洗至近中性,再分别用不同浓度的氯化钠溶液洗脱,至与

10% 硅钨酸试剂反应呈阴性为止。收集各洗脱液, 分别测定其中的总生物碱和盐酸水苏碱含量, 计算洗脱率, 结果见表 5。

表 5 氯化钠溶液浓度对益母草生物碱洗脱效果的影响 ($n=5$)

氯化钠浓度 /mol·L ⁻¹	总碱洗脱率 (%)	盐酸水苏碱洗脱率 (%)
1.0	80.29	83.56
1.5	83.56	84.72
2.0	86.07	87.12
2.5	89.41	91.23
3.0	92.42	93.15

结果表明, 随着氯化钠浓度的提高, 益母草总碱和盐酸水苏碱的洗脱率随之提高, 以 3.0 mol/L 氯化钠溶液作为洗脱剂时, 总碱和盐酸水苏碱洗脱率均在 90% 以上。

(2) 离子树脂洗脱速度的优选 取经过处理的供试品液 5 份, 每份 100 ml, 分别通过装有 50 ml 湿树脂的离子树脂柱, 先用去离子水洗至近中性, 再以 3.0 mol/L 氯化钠溶液作为洗脱剂, 分别以不同的洗脱速度洗脱, 至生物碱反应呈阴性为止, 比较洗脱剂用量以及总生物碱、盐酸水苏碱的洗脱率。结果见表 6。

表 6 洗脱速度对洗脱剂用量及生物碱洗脱效果的影响 ($n=5$)

洗脱速度 /BV·h ⁻¹	洗脱体积 /ml	总生物碱的 洗脱率 (%)	盐酸水苏碱 的洗脱率 (%)
4	342	83.28	84.39
5	305	86.66	87.10
6	256	92.17	91.96
7	348	89.29	90.02
8	378	90.59	90.35

结果表明, 以 6BV/h 流速洗脱时, 不仅洗脱剂的用量少, 而且洗脱率也高, 因此确定洗脱速度为 6 BV/h。

2.5 洗脱液脱盐精制工艺

益母草总生物碱经氯化钠溶液洗脱后, 洗脱液中含有大量的氯化钠盐及少量从树脂上替换下来的 H⁺, 呈酸性, 我们采用了中和 H⁺, 提取液浓缩、干燥后以乙醇提取生物碱的方法, 可以较好的除去其中的盐。

2.6 阳离子交换树脂纯化益母草总碱最优工艺的确定

将益母草进行提取、精制得提取液 (浓度 1:2, pH 1~2), 通过强酸性阳离子交换树脂柱, 至与 10% 硅钨酸试剂呈阳性反应为止。先以去离子水洗至近中性, 再以 3.0 mol/L 氯化钠溶液作为洗脱剂, 以 6 BV/h 洗脱至生物碱反应呈阴性为止, 收集洗脱液, 加饱和氢氧化钠溶液调节 pH 6~7, 滤液浓缩至析出大量氯化钠固体后干燥。取干燥固体加适量乙醇超声提取生物碱至完全, 滤过, 滤液减压回收乙醇, 并继续减压浓缩至稠膏, 重复提取 3 次, 最后将

稠膏干燥, 即得益母草总碱提取物。中试方法实验结果见表 7。

表 7 阳离子交换树脂纯化益母草总碱的工艺考察 ($n=3$)

实验	浸膏得量 (g)	总碱纯度 (%)	总碱洗脱率 (%)	盐酸水苏碱 纯度 (%)	盐酸水苏碱 洗脱率 (%)
1	132.87	74.03	86.28	48.04	85.11
2	128.92	76.94	87.01	50.47	86.75
3	129.90	77.89	88.75	49.80	86.26

结果表明, 采用优选工艺对益母草总碱进行纯化, 总生物碱的洗脱率可达 87.35%, 纯度可达 76.29%, 盐酸水苏碱的洗脱率可达 86.04%, 纯度可达 49.44%。

3 讨论

(1) 传统的阳离子树脂纯化生物碱工艺大多采用氨水碱化树脂后氯仿提取法, 洗脱率低、有机溶剂用量大、引入毒性树脂杂质且不适合大生产, 仅适用于实验室小量样品的精制。本文采用环保安全的氯化钠溶液洗脱纯化益母草总碱, 不仅大大提高了益母草总碱的纯化效率, 而且该工艺安全环保, 能实现管道化、流程化, 更易推广至大生产。

(2) 上柱前药液的浓度越高, 越能提高上柱吸附的效率, 但随着浓度的提高, 提取液的粘度也越高, 而所含杂质的浓度也相应提高, 不仅会使上柱吸附困难, 且容易毒化树脂, 因此需要优选合适的药液浓度。

(3) 氯化钠溶液洗脱纯化生物碱洗脱率高的原因可能为 Na⁺ 的交换洗脱能力较强, 可以将生物碱离子交换下来, 且生物碱呈离子态, 能够消除生物碱与树脂之间的静电吸引力, 使洗脱率大大提高。但盐水作为洗脱剂也有局限性, 只有像益母草生物碱这样具有很好的水溶性, 被交换下来的生物碱离子在盐溶液中有较好的溶解度时才可行, 否则生物碱不易被洗脱下来。

参考文献

- [1] 梁勇, 温碧珍. 钩藤中总生物碱的提取分离研究[J]. 中国热带医学, 2006, 6(1): 135-136.
- [2] 王洪新, 王健. 苦豆子种子生物碱离子交换分离的因素研究[J]. 中草药, 2002, 3(12): 1080-1083.
- [3] 迟玉明. 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): 617-621.
- [4] 徐贤武, 陈科力. 阳离子交换树脂富集纯化益母草中总生物碱的工艺研究[J]. 医药导报, 2007, 26(9): 1067-1069.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [Z]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 237.
- [6] 姜舜尧. 益母草药材中水苏碱成分的高效液相色谱法分析[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(4): 243-247.
- [7] 何炳林, 黄文强. 离子交换与吸附树脂 [M]. 上海科学教育出版社, 1995: 35.

(收稿日期: 2008-09-03)