

莲子心生物碱树脂法分离纯化工艺研究

吴梅青, 陈丹

湘潭职业技术学院, 湖南 湘潭 411102

摘要: 目的 筛选适用于分离纯化莲子心生物碱的大孔吸附树脂。方法 考察吸附性能较好的 D101、AB-8、DA201 3 种大孔吸附树脂对莲心碱的吸附能力及洗脱参数, 并用 HPLC 定量分析了莲心碱的量。结果 D101 树脂对莲子心中生物碱有较好的吸附分离效果。先用水洗除杂, 再用 6 倍树脂体积、乙醇体积分数为 80%、pH 3 的洗脱剂洗脱, 浓缩干燥, 产品中莲心碱的质量分数为 10.2%、产品收率为 24.6%。结论 该工艺简单可行, 分离效果好, 适合莲子心生物碱的分离纯化。

关键词: 莲子心; 生物碱; 莲心碱; 分离; 纯化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)03-0199-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.03.011

Separation and purification of alkaloids in *Nelumbinis Plumula* by resins

WU Mei-qing, CHEN Dan

Xiangtan Vocational and Technical College, Xiangtan 411102, China

Abstract: Objective To screen the macroporous resin for the separation and purification of alkaloids from *Nelumbinis Plumula*. **Methods** The resins such as D101, AB-8, and DA201 were studied for their adsorption capability and elution parameters. The contents of liensinine were determined by HPLC. **Results** D101 resin had a preferable adsorptive and separative effect for the alkaloids in *Nelumbinis Plumula*. The preferable desorption ratio could be obtained by using 80% ethanol (pH 3) as eluting solvent and 6 BV. Under these conditions, the content of alkaloids in *Nelumbinis Plumula* was 10.8% and the yield was 2.6%. **Conclusion** The method is easy and possesses the popularization potential and good efficacy. It could be used for the separation and purification of alkaloids in *Nelumbinis Plumula*.

Key words: *Nelumbinis Plumula*; alkaloids; liensinine; separation; purification

莲子心为睡莲科植物 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的成熟种子中的干燥幼叶及胚根。主产于湖南、湖北、福建、江苏、浙江等地, 具有清心安神、交通心肾、涩精止血的功效。用于热入心包, 神昏谵语, 心肾不交, 失眠遗精, 血热吐血, 收载于 2010 年版《中国药典》^[1]。现代研究表明, 莲子心含有生物碱、黄酮、谷甾醇、挥发油和微量元素等化学成分。莲子心中生物碱包括莲心碱、甲基莲心碱、异莲心碱和莲心季铵碱等, 是莲子心的主要药效成分, 具有降血压、抗心律失常、抗血小板聚集、抗脂质过氧化及清除自由基、抗癌等药理作用。为了进一步研究和开发, 本文选择相关文献报道吸附性较好的大孔吸附树脂^[2-4], 以莲心碱含量为考察指标, 对莲子心生物碱进行了分离纯化工艺研究。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (岛津 LC-10ATVP); 岛津 SPD210Avp 紫外可见检测器; 赛多利斯 BP211D 分析天平 (十万分之一); 莲子心购自超市, 产地为湖南湘潭, 经中南大学刘佳佳教授鉴定为于莲科植物 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 种子的幼叶及胚根; 莲心碱高氯酸盐对照品 (批号 111686-200501, 购于中国食品药品检定研究院); 大孔树脂 D101 (浙江美迪康贸易公司); 大孔树脂 AB-8 (南开大学化工厂); 大孔树脂 DA201 (杭州德佳科学仪器有限公司); 水为超纯水; 乙醇为 95% 医用酒精; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 对莲心碱的 HPLC 测定^[5-6]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.015 mol/L 十二烷基

收稿日期: 2013-02-01

基金项目: 湖南省教育厅基金研究项目 (11C1256)

作者简介: 吴梅青, 女, 湘潭职业技术学院教师, 副教授, 主要从事药学专业课程教学及科研工作。Tel: 15173213086 E-mail: wmq0519@sina.com

磺酸钠-冰醋酸(56:43:1);体积流量为1 mL/min;检测波长为282 nm;温度为室温;进样量为10 μ L。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取莲心碱高氯酸盐对照品11.0 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成0.22 mg/mL对照品贮备溶液。精密吸取贮备溶液5 mL置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成质量浓度为0.11 mg/mL的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取莲子心粉末(过四号筛)适量,精密称定,精密加入2%盐酸甲醇溶液25 mL,称定质量,加热回流30 min,放冷,再称定质量,用2%盐酸甲醇溶液补足缺失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5 mL,置10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用0.22 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取2.1.2项下对照品溶液1、3、5、7、9、11 μ L进样,按上述色

谱条件进行测定,以峰面积积分值为纵坐标,对照品质量浓度(mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程得 $Y=231\ 679X-412.87$, $r=0.999\ 6$ 。结果表明莲心碱质量浓度在0.011~0.121 mg/mL与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 莲子心中莲心碱的测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,测定,得莲心碱含量为0.25%,RSD为1.08%,符合2010版《中国药典》规定的要求,可用于本实验。

2.1.6 莲子心提取液的制备 将莲子心研末,称取500 g,加10倍量90%乙醇回流提取两次,第一次提取90 min,第二次提取60 min,滤过,合并两次提取液,浓缩蒸至无醇味,加水定容到550 mL,得莲子心提取液,备用。用HPLC测定其中莲心碱的含量。莲心碱对照品及提取液的HPLC色谱图见图1,提取液中含莲心碱1.82 mg/mL。

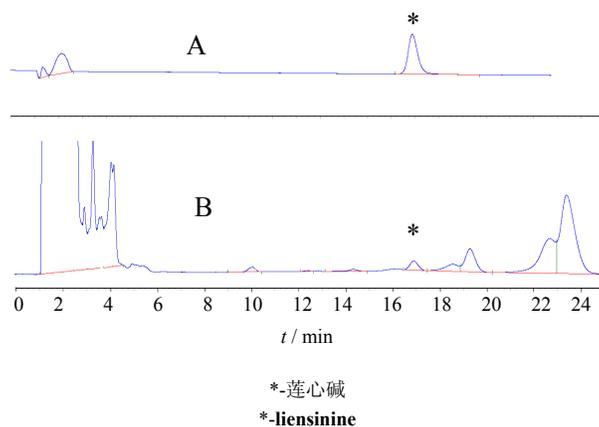


图1 莲心碱对照品(A)和莲子心提取液(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of liensinine (A) and extract of *Nelumbinis Plumula* (B)

2.2 树脂的预处理

将3种大孔树脂用95%的乙醇浸泡24 h,使其充分膨胀,湿法装柱,然后用95%的乙醇液洗至流出液加适量纯水无白色浑浊现象,再用去离子水洗净乙醇,直至流出液无醇味无浑浊为止。

2.3 大孔树脂型号的筛选

称取预处理后的大孔树脂D101、DA201、AB-8各30 g,湿法装柱,将莲子心提取液分别通过色谱柱,进行动态吸附,然后依次用纯水和90%乙醇进行洗脱,用HPLC测定其中莲心碱的量,计算莲心碱的动态解吸率,结果见表1。D101大孔树脂分离纯化莲子心生物碱动态解吸率较高,故确定选用D101型大孔树脂。

表1 不同型号大孔树脂的筛选结果(n=3)

Table 1 Screening of various macroporous resins (n=3)

树脂类型	莲心碱动态解吸率/%
D101	85.8
DA201	78.2
AB-8	80.7

2.4 不同浓度洗脱剂的影响

称取D101大孔吸附树脂9份(已处理),每份20 g,分别装柱,量取30 mL质量浓度为2.54 mg/mL的莲子心提取液,上样,分别用体积分数为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的乙醇洗脱,体积流量为2 mL/min,至流出液无色,收集洗脱液,

浓缩, 定容, 用 HPLC 测定莲心碱的含量。计算得到洗脱率, 见图 2。结果表明, 体积分数为 80%乙醇对莲心碱洗脱率最高。

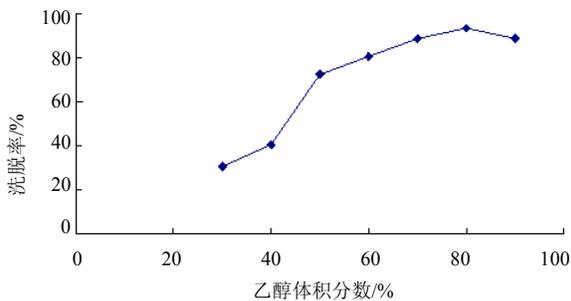


图 2 不同乙醇浓度的洗脱能力

Fig. 2 Elution capacities of ethanol at different concentration

2.5 pH 值的影响

2.5.1 pH 值对吸附的影响 称取 D101 大孔吸附树脂 5 份 (已处理), 每份 5 g, 于具塞三角瓶中, 各加入 30 mL 含莲心碱 1.82 mg/mL 的莲子心提取液, 用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 溶液将各提取液分别调至设定的 pH 值, 震荡 20 h, 振荡频率为 240 次/min, 滤过, 用 HPLC 测定滤液中莲心碱的浓度, 计算吸附量 (mg/g), 见图 3。结果表明, D101 大孔吸附树脂在碱性环境下对莲心碱的吸附量优于酸性环境, pH 为 11 时效果最好。

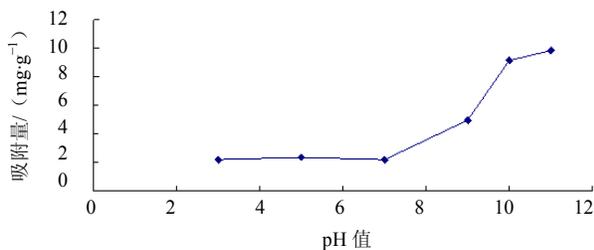


图 3 pH 值对吸附的影响

Fig. 3 Effect of pH values on adsorption

2.5.2 洗脱剂 pH 值对洗脱效果的影响 精密称取经预处理的 D101 干树脂 20 g, 湿法装柱。上样液以质量浓度为 1.82 mg/mL、体积为 8 倍柱体积缓慢加入色谱柱, 以 80%乙醇洗脱, 体积流量为 2 mL/min 从树脂上方流过, 收集流出液, 测定莲心碱的含量, 计算得到 D101 吸附树脂对莲心碱的吸附量。然后用酸碱液调节洗脱剂为不同 pH 值的乙醇溶液, 在洗脱剂相同浓度和体积下, 以相同体积流量对树脂进行洗脱, 收集洗脱液, 并用 HPLC 测定莲心碱的量后, 计算得到洗脱率, 见图 4。

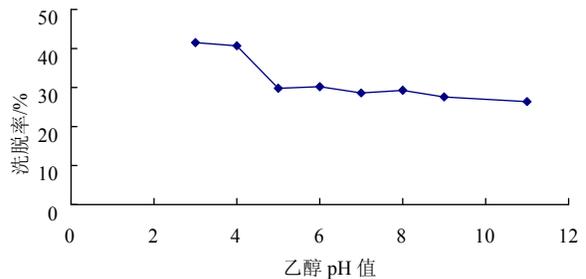


图 4 乙醇 pH 值对洗脱效果的影响

Fig. 4 Effect of pH values of ethanol on elution efficacy

结果表明, 当莲心生物碱在酸性条件下, 易从吸附树脂上被乙醇洗脱。这也与莲心生物碱分子在碱性条件下更易被吸附的结论相辅相成。因此选择 pH 值为 3 进行后续实验。

2.6 洗脱剂用量的影响

称取 D101 大孔吸附树脂 (已处理) 20 g, 装柱, 量取 20 mL 质量浓度为 1.82 mg/mL 的莲子心提取液, 上样, 用 pH=3 的 80%乙醇洗脱, 体积流量为 2 mL/min, 收集洗脱液, 浓缩, 用 HPLC 测定莲心碱的量。结果表明, 6 倍树脂体积洗脱剂用量时, 洗脱率已达到 94.4%, 继续增加洗脱剂用量, 洗脱率没有显著增加 (图 5)。

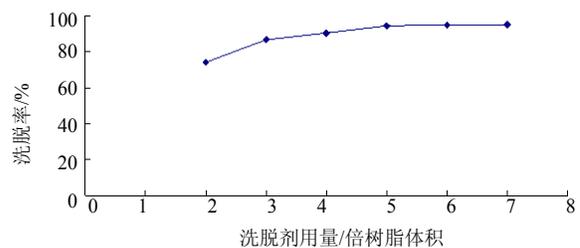


图 5 不同洗脱剂用量的洗脱能力

Fig. 5 Effect of eluant volume on elution capacity

2.7 洗脱速度的影响

称取 D101 大孔吸附树脂 5 份 (已处理), 每份 20 g, 分别装柱, 量取 20 mL 含莲心碱 1.82 mg/mL 的莲子心提取液, 上样, 用 pH=3 的 80%乙醇分别以不同洗脱速度洗脱, 至流出液无色, 收集洗脱液, 浓缩, 用 HPLC 测定莲心碱的量。见图 6。结果表明, 洗脱率最高时, 洗脱速度为 2 mL/min。

2.8 分离纯化后的产品

量取 20 mL 含莲心碱 1.82 mg/mL 的莲子心提取液, 上 D101 大孔吸附树脂柱, 依次用水、pH=3 的 80%乙醇洗脱, 洗脱剂用量为 6 倍树脂体积, 体

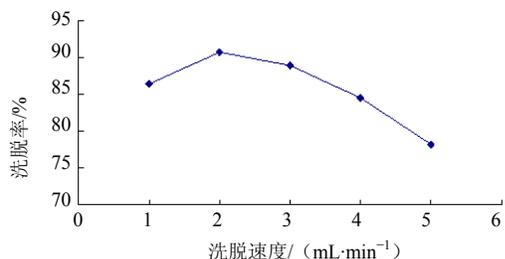


图6 不同洗脱速度的洗脱能力

Fig. 6 Effect of eluting velocity on elution efficacy

积流量 2 mL/min, 浓缩洗脱液至干, 得产品, 用 HPLC 测定其中莲心碱的量。结果得产品 0.1226 g, 其中莲心碱质量分数为 10.8%, 产品收率为 24.6%。

3 结论

大孔树脂广泛应用于中药的分离纯化, 在使用时, 应根据药物的有效成分的理化性质进行树脂型号、吸附容量、洗脱分离等具体工艺条件考察。实

验结果表明, D101 大孔吸附树脂作为分离纯化莲子心生物碱的树脂, 先水洗除杂, 再用 6 倍树脂体积、乙醇体积分数 80%、pH=3 的洗脱剂洗脱, 浓缩洗脱液至干, 得产品, 以 HPLC 分析得到莲心碱含量为 10.8%、产品收率为 24.6%。此法工艺简单, 成本低、产率高, 适用于中试及工业生产, 为大规模开发莲子心奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 席国萍, 宋国斌. 大孔吸附树脂分离纯化黄连小檗碱研究 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(5): 44-46.
- [3] 郁建生, 郁建平. 大孔吸附树脂分离纯化博落回总生物碱的研究 [J]. 江苏农业科学, 2007, (3): 200-203.
- [4] 陈昌国. 大孔吸附树脂分离纯化莲心中莲心总碱的研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 981-983.