

制备高效液相色谱分离纯化荷叶碱

刘婧婧, 罗旭彪, 陈 波*, 姚守拙*

(湖南师范大学 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘 要:目的 研究制备型高效液相色谱 Pep-HPLC 分离纯化荷叶碱的方法。方法 荷叶提取物经 1% 盐酸水溶液提取后, 用氯仿萃取, 萃取液蒸干, 以流动相溶解, 用 Prep-HPLC 分离制备。收集液浓缩到一定体积析出针状晶体, 即得荷叶碱。结果 该方法所得产品经 MS、IR、UV、¹H-NMR 和 HPLC 图谱鉴定, 与文献对照品比较, 确定为荷叶碱, 质量分数大于 98%, 制备收得率大于 49%。结论 本法生产周期短, 产品质量高, 方法简便, 生产费用低, 荷叶碱产品可以用作分析方法的对照品。

关键词: 荷叶; 荷叶碱; 制备高效液相色谱

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0055-03

Isolation and purification of nuciferine by preparative HPLC

L U Jing-jing, LUO Xu-biao, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo

(Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research of Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: **Objective** To establish an isolation and purification method of nuciferine by preparative HPLC. **Methods** *Nelumbo nucifera* leaves were extracted by 1% HCl solution, then the supernatant was extracted by chloroform and the residue was obtained after chloroform evaporation. The residue was dissolved in mobile phases. The solution was isolated and purified by preparative HPLC. Fraction collected in suitable eluent time was concentrated to a certain volume. Nuciferine could be precipitated as needle crystals. **Results** Compared with the literature and reference substance, nuciferine was identified by MS, IR, UV ¹H-NMR, and HPLC. The purity of the product was higher than 98% and nuciferine yield from extracts by this method was over 49%. **Conclusion** The developed method is simple, rapid, and at low production cost. The nuciferine product owns the quality of reference substance.

Key words: the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn.; nuciferine; preparative HPLC

荷叶为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的叶, 具有清热解暑、升发清阳、凉血止血之功^[1]。《本草纲目》载“荷叶服之, 令人瘦劣”。现代临床广泛应用于肥胖症及高血脂症^[2]。荷叶碱是荷叶中的一种阿朴啡型生物碱。药理研究表明荷叶碱为荷叶中的主要降脂活性成分^[3,4]。荷叶碱的需求量不断增加, 但是目前缺少方便有效的制备荷叶碱的方法限制了对荷叶资源进一步的开发和利用。本实验采用制备高效液相色谱技术, 对荷叶提取物中的荷叶碱进行制备、分离和纯化。

1 制备与分离

1.1 仪器与试剂: Waters Prepare LC4000 高效液相制备色谱仪, LC—10 UV 检测器(大连江申分离科学技术公司), 10 mL 定量环, JS—3030 色谱工作站(大连江申分离科学技术公司)。JCX—250W 超声

波清洗器(山东济宁电子仪器厂), LD4—2A 高速离心机(上海安亭科学仪器厂), NOVA—400 核磁共振仪, Waters Micromass ZQ 2000 质谱仪, General TU—1221 型紫外分光光度计, 二次蒸馏水, 试剂均为分析纯。荷叶提取物由本实验室制备, 酸提碱沉, HPLC 测定荷叶碱的质量分数为 2.4%。

1.2 制备条件

1.2.1 上样溶液的制备: 称取 10 g 荷叶提取物于 500 mL 烧杯中, 用 1% 盐酸水溶液 500 mL 浸泡 12 h, 超声 30 min, 调节 pH 值为 3, 4 000 r/min 离心, 上清液用 250 mL 氯仿萃取 2 次, 有机相置于水浴锅上蒸干, 用流动相溶至 30 mL, 所得溶液备用。

1.2.2 色谱条件: 色谱柱: 反相 Waters Prep Nova-pak HR C₁₈ 柱(300 mm × 19 mm, 6 μm); 柱温: 室温, 检测波长: 280 nm; 流动相: 乙腈-0.2% 三乙胺水

* 收稿日期: 2005-03-03

基金项目: 国家“十五”重大专项“创新药物及中药现代化”“食品安全关键技术”; 湖南省杰出青年基金资助项目(03JJY1002, 2001BA 746C, 2001BA 804A 21, 2003AA 2Z3515)

* 通讯作者 陈 波 Tel: (0731) 8865515 E-mail: drchenpo@vip.sina.com

溶液(3-7); 体积流量: 36 mL/min。制备色谱见图 1。

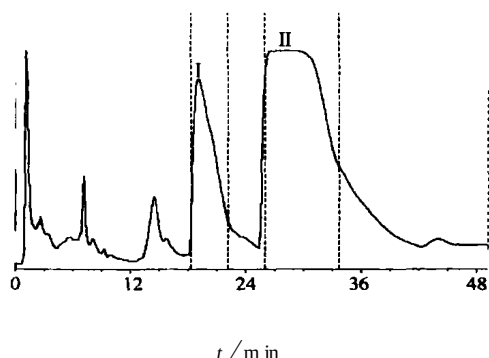


Fig. 1 Preparative HPLC chromatogram of nuciferine
I - 降荷叶碱 II - 荷叶碱
I - nornuciferine II - nuciferine

1.3 Prep-HPLC 收集液的处理: 将荷叶碱收集液在水浴锅加热浓缩到一定体积, 有针状晶体析出, 即得荷叶碱。

2 产品质量分析

2.1 仪器与试剂: 岛津高效液相色谱 (SCL-10A_{vp} 系统控制器, SPD-10A_{vp} UV-VIS 检测器, LC-10AD_{vp} 液相色谱, SIL-10A_{vp} 自动进样器, Shimadzu Class_{vp} 色谱管理系统), 乙腈为分析纯, 三乙胺为分析纯, 水为二次蒸馏水。荷叶碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 111566-200201)。

2.2 色谱分析条件: Spherigel C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 检测波长: 280 nm; 流动相 (A) 0.1% 三乙胺水溶液, (B) 乙腈; 线性梯度洗脱: 0~15 min, 60% A ~ 20% A; 15~20 min, 20% A ~ 0% A。经氯仿提取纯化后样品溶液和荷叶碱产品的色谱图见图 2 和 3。

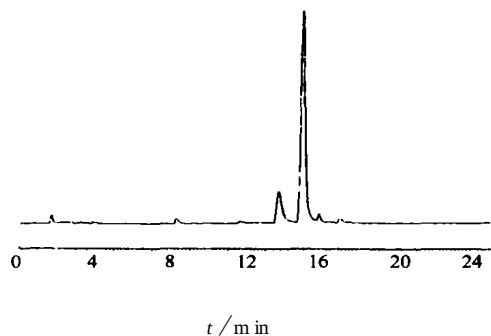


图 2 制备液的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC Chromatogram of sample solution

2.3 产品纯度分析及收得率: 10 g 荷叶提取物约可制备 120 mg 荷叶碱, 面积归一化定量确定产品质量分数大于 98%, 外标法定量确定产品质量分数为 98.2%。按照质量分数为 98.2% 计算原料中荷叶碱收得率为 49.1%。

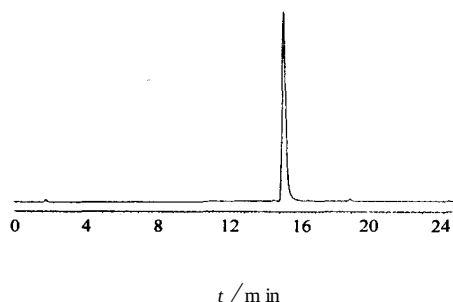


图 3 荷叶碱产品的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC Chromatogram of nuciferine product

2.4 产品鉴定: 纯化后得到的物质为白色针状晶体, 分子式为 C₁₉H₂₁O₂N, 熔点为 161~164 °C。UV λ_{max}^{CH₃OH} nm: 271, 230。ESI-MS m/z: 296 [M + H]⁺, 265 [M - CH₃O]⁺。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.593 (3H, -N-CH₃), 3.654 (3H, 单峰-O-CH₃), 3.888 (3H, 单峰-O-CH₃), 8.362 (1H, 多重峰), 6.637 (1H, 单峰), 芳-H。IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3002, 1593, 1566, 1496, 1450, 1370, 1313, 1245, 1109, 1032, 764。以上数据与荷叶碱的相关文献报道数据^[5,6]相符, 并与对照品比较, 推断该化合物为荷叶碱。

3 讨论

3.1 预处理条件的优化: 制备用原料中荷叶碱和杂质将影响上样量和产品得率。比较了氨水浸泡、氯仿提取、再 1% 盐酸反萃和用 1% 盐酸提取后, 调 pH 值为 3, 再氯仿萃取两种方式对进一步纯化提取物中荷叶碱的影响。后者所得荷叶碱的量是前者的 4.69 倍, 且在色谱图中杂质峰明显减少。所以, 本实验选择后者作为进一步纯化荷叶碱的预处理方式。

3.2 流动相的选择

3.2.1 乙腈对荷叶碱制备分离的影响: 考察了流动相中乙腈与 0.1% 三乙胺水溶液体积比为 30:70、32:68、35:65、40:60 时对制备荷叶碱的影响。当乙腈高于 35% 时, 荷叶碱与原荷叶碱 (图 1 中 I 部分经质谱初步鉴定为原荷叶碱) 有部分重叠, 难以得到纯度高的荷叶碱。乙腈为 32% 时, 荷叶碱与原荷叶碱基本达到了基线分离, 而 30% 乙腈能使荷叶碱与原荷叶碱完全分离, 有利于进行上样量的优化。

3.2.2 三乙胺对荷叶碱制备分离的影响: 当流动相中乙腈与 0.1% 三乙胺水溶液体积比为 30:70 时, 虽然能完全分离, 但是峰形拖尾较严重, 分离时间长。增加峰形抑制剂的体积比例至 0.2% 时能有效地改善峰形, 缩短制备分离时间。然而, 继续增加三乙胺的量, 使得流动相碱性过高, 将严重损害柱的使用寿命。

3.3 上样量的选择: 首先利用 Water Prep Novapak HR C₁₈ 柱(300 mm × 7.8 mm, 6 μm) 色谱柱来优化上样量, 体积流量为 6 mL/min, 每次进样 0.5 mL, 分离效果好, 但是制备量偏小, 上样量约 4 mg, 当进样 1.5 mL, 则突破了检测极限, 不能准确收集产品, 而当进样量为 1 mL 时, 上样量为 8 mg 左右, 不影响分离度, 且质量分数符合质量要求(98%, HPLC)。使用反相 Waters Prep Novapak HR C₁₈ 柱(300 mm × 19 mm, 6 μm) 进行制备, 按体积比扩大进样量, 将流动相体积流量增为 36 mL/min, 进样体积扩大为 6 mL, 则上样量可达到约 48 mg, 且分离度、质量分数均符合上述要求。根据分析色谱仪对相应收集液进行检测, 可知 II 部分为荷叶碱收集液。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [2] Tao B, Chen M Y, Li X N, et al. Review in studies on pharmacological effect of *Nelumbo nuciferine* leaves [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中国中药信息导报), 2001, 18 (2): 14.
- [3] Tu C C, Li X Y, Yang J P, et al. Experiment research of the total alkaloids from *Nelumbo nuciferine* leaves effect on lowering hyperlipemia in fatty mice [J]. *J Jiangxi Coll Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 2001, 13 (3): 120-121.
- [4] Xu L Y, Liu Y G, Ye Z X, et al. Development and research of effect on lowering hyperlipemia of *Nelumbo nuciferine* leaves [J]. *Hubei J Tradit Chin Med* (湖北中医杂志), 1996, 18 (1): 42-43.
- [5] Li Z C, Zhuo C X, Yang S J, et al. Study on chemical compound of *Nelumbo nuciferine* leaves [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27 (Suppl): 50-52.
- [6] Wang J L, Hu X M, Ying W H, et al. Research of the alkaloids from seeds of *Nelumbo nuciferine* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1991, 14 (6): 36-38.

大孔吸附树脂纯化栀子中总环烯醚萜苷和栀子苷的研究

姚 干¹, 何宗玉¹, 方积年^{2*}

(1. 重庆邮电学院生物信息学院, 重庆 400065; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 目的 建立栀子中总环烯醚萜苷测定方法, 研究 HPD 450 大孔吸附树脂纯化栀子总环烯醚萜苷、栀子苷的工艺条件。方法 采用紫外分光光度法和高效液相色谱法测定目标成分, 考察 HPD 450 大孔吸附树脂对栀子总环烯醚萜苷、栀子苷的吸附和洗脱条件。结果 栀子总环烯醚萜苷最大吸收波长为 238 nm, 与栀子苷一致, 栀子苷在 9.36~21.84 μg/mL 与吸光度呈良好线性关系, 平均回收率为 98.37%; HPD 450 大孔吸附树脂可以将提取物中总环烯醚萜苷由 45.45% 提高到 83.72%, 栀子苷由 24.46% 提高到 62.28%。结论 HPD 450 大孔吸附树脂能有效富集并纯化栀子总环烯醚萜苷、栀子苷; 紫外分光光度法测定栀子总环烯醚萜苷具有快速、准确的特点。

关键词: 栀子; 总环烯醚萜苷; 栀子苷; HPD 450 大孔吸附树脂; 紫外分光光度法

中图分类号: R 284.2; R 286.02 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2670(2006)01-0057-05

Purification of total iridoid glycosides and geniposide in *Gardenia jasminoides* with HPD 450 macroporous resin

YAO Gan¹, HE Zong-yu¹, FANG Ji-nian²

(1. College of Bioinformation, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; total iridoid glycosides; geniposide; HPD 450 macroporous resin; UV spectrophotometry

栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 是常用清热泻火中药, 其抗菌、解热有效成分是以栀子苷为代表的环烯醚萜苷类化合物^[1]。HPD 450 大孔吸附树脂是一种苯乙烯型共聚体, 在苷类成分分离、纯化中具有较多优点。本实验对其纯化栀子总环烯醚萜苷和栀子苷的影响因素、使用次数及再生条件进行了系列

研究, 并建立了栀子总环烯醚萜苷测定方法。研究成果已在中药天然药物五类新药——芩栀胶囊(SF-DA 药物临床试验批件号: 2005L 02273) 研制中得到了成功运用。

1 仪器与材料

UV—2401PC 紫外分光光度计(日本); Agilent

* 收稿日期: 2005-03-24

作者简介: 姚 干(1970—), 男, 四川省阆中市人, 副研究员, 中药学博士, 博士后, 主要从事中药药效物质基础、作用机制及中药新药研究, 发表相关论文 10 篇, 先后参与及承担国家“九五”重点科技攻关、国家“973”计划及省部级科研项目 7 项。
Tel: (023) 62471381 E-mail: cdyaoan@etang.com