

正交试验法优选莲子心中甲基莲心碱提取工艺的研究

宋金春^{1*}, 李娟², 叶鹏¹

(1. 武汉大学人民医院, 武汉 430060; 2. 武汉大学药学院, 武汉 430060)

[摘要] 目的: 从莲子心中提取分离甲基莲心碱。方法: 采用正交试验法, 以甲基莲心碱含量、得率为指标, 多指标综合评分, 优选甲基莲心碱提取分离工艺条件。结果: 最佳分离方法为: 浓度为 2.5% 的氢氧化钠溶液以体积比 1:1 与三氯甲烷进行萃取, 由三氯甲烷层得到甲基莲心碱, 含量为 91.6%, 得率为 45.6%。结论: 该工艺能够有效、快速的从莲子心中提取分离甲基莲心碱。

[关键词] 莲子心; 提取分离; 甲基莲心碱

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0018-03

Separation of Neferine from Total Alkaloids of *Nelumbo Nucifera*

SONG Jin-chun^{1*}, LI Juan², YE Peng¹

(1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

[Abstract] Objective: To separate neferine from total alkaloids of *Nelumbo nucifera*. **Method:** An orthogonal test was adopted in the study. The neferine content and extraction ratio were adopted as index. Data processing was carried out with the multiple guidelines grading method for optimizing the extraction. **Result:** The optimum condition was as follows: chloroform and 2.5% sodium hydroxide solution were used as extraction solvent with volume ratio of 1:1; the neferine content and extraction ratio were 91.6% and 45.6% respectively. **Conclusion:** The separation of neferine by extraction with sodium hydroxide solution was effective and easy, which could provide the good information for further studies.

[Key words] *Nelumbo nucifera*; separation; neferine

甲基莲心碱是莲子心生物碱中含量较高的酚性生物碱之一, 研究表明它具有扩血管、降压、抗心律失常、抗血小板聚集、抗血栓形成、抗氧化^[1]等药理作用。从莲子心中提取分离甲基莲心碱多采用柱层析法^[2,3], 该法耗时长、对环境污染大。本文研究一种从莲子心中提取分离甲基莲心碱的制备方法, 该法具有工艺简单、成本低、得率高的特点。

1 材料

1.1 仪器 Agilent-1100 高效液相色谱仪, 配四元

梯度泵, DAD 检测器, G137PA 自动脱气机, 标准自动进样器, 柱温箱, 色谱工作站(美国安捷伦), AG245 型电子天平(METTLER TOLEDO)。

1.2 试药 莲子心(湖北康圣医药有限公司, 产地湖北洪湖, 批号 20100204), 经武汉大学药学院马俊玲教授鉴定符合《中国药典》2010 年版标准^[4]; 甲基莲心碱对照品为本院天然药物化学教研室提取、纯化, 理化常数及波谱测试(UV、IR、MS、NMR)均与文献报道一致^[5], 含量为 98.0%; 乙腈(色谱纯, TEDIA, U.S.A); 甲醇(色谱纯, TEDIA, U.S.A); 三乙胺(分析纯, 上海金山亭新化工试剂厂); 水为双蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甲基莲心碱含量测定方法的建立

[收稿日期] 20100723(001)

[基金项目] 湖北省科技攻关课题(2006AA301B04)

[通讯作者] * 宋金春, 男, 教授, 硕士, 专业研究方向为药物新剂型, Tel: 027-88047471, E-mail: songjc1234@126.com

2.1.1 色谱条件 色谱柱 ASM-Kromasil-C₁₈, 流动相乙腈-水-三乙胺(16:84:0.1, 用磷酸调 pH 3.0), 紫外检测波长 282 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温室温, 进样量 10 μL。在此条件下的色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液 精密称取减压干燥至恒重的甲基莲心碱对照品 5.0 mg 置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 作为储备液。精密吸取 1 mL 甲基莲心碱对照品储备液于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度。

2.1.3 供试品溶液 精密称取甲基莲心碱供试品 20.4 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 作为储备液。精密吸取 1 mL 甲基莲心碱供试品储备液于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度。

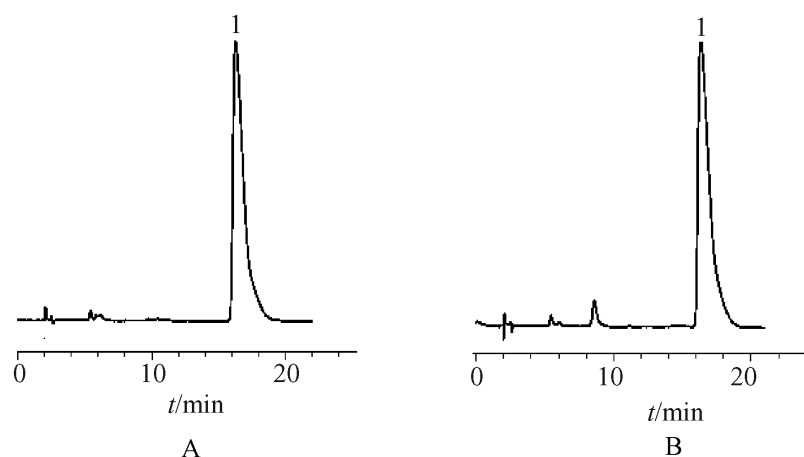


图 1 莲子心中甲基莲心碱含量测定 HPLC
A. 对照品; B. 供试品; 1. 甲基莲心碱

2.1.4 标准曲线的建立 依次精密吸取甲基莲心碱对照品储备液 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 得到质量浓度分别为 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg·mL⁻¹ 的稀释液, 以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。按上述色谱条件进样, 以各自的峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程: $A = 6960C - 9.643$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.01 ~ 0.4 g·L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 取同一甲基莲心碱对照品溶液, 在上述色谱条件下, 重复进样 5 次, 峰面积积分值 RSD 为 0.18%。

2.1.6 样品溶液稳定性试验 取同一甲基莲心碱供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定, 其相对保留时间稳定, 测定峰面积, 计算得 RSD 0.21%, 表明样品测定在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品 3 份, 按供试品溶液制法同法制备, 并进行含量测定, 其 RSD 0.18%, 表明此方法重复性好。

2.2 莲子心总生物碱的提取^[6] 取干燥择净之莲子心 500 g, 碾成粗粉, 过四号筛, 加 6 倍量甲醇于室

温下浸泡 2 d, 回收甲醇, 残渣加入到 3% 枸橼酸中, 并加适量活性炭过滤, 弃去不溶物, 滤液加适量乙醚提取, 分出乙醚层, 水层 (pH 约为 2.5) 用氨水调至浑浊 (pH 约为 8.5), 再用乙醚提取, 分出乙醚层, 提取至不显生物碱反应即可, 蒸去乙醚, 得淡黄色固体, 即为莲子心总生物碱。

用上述方法所得莲子心总生物碱得率 0.88%, 总生物碱中主要含莲心碱、异莲心碱、甲基莲心碱, 三者含量占总生物碱的 88%, 其中甲基莲心碱占总生物碱含量 54.9%。三者保留时间分别为 6.02, 8.53, 16.34 min。上述色谱条件下莲子心总生物碱的色谱图见图 2。

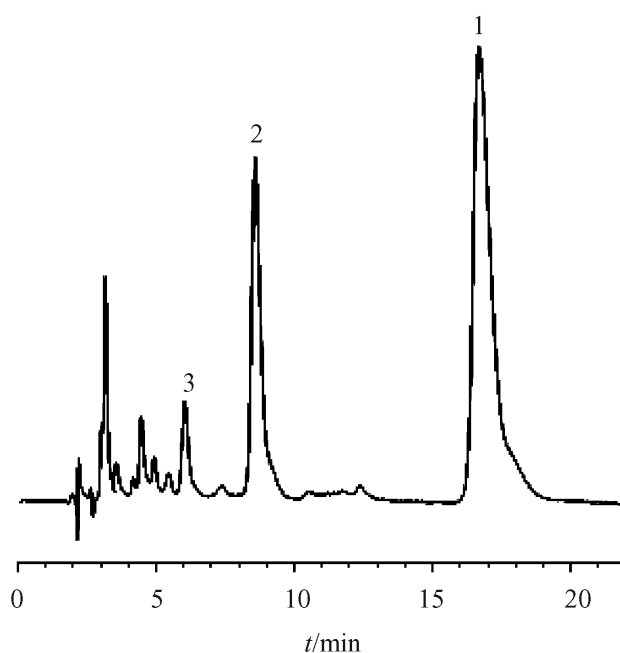


图 2 莲子心总生物碱的 HPLC
1. 甲基莲心碱; 2. 异莲心碱; 3. 莲心碱

2.3 从莲子心总碱中分离甲基莲心碱

2.3.1 甲基莲心碱的分离方法 取适量莲子心总碱溶于有机溶剂中, 用一定浓度的氢氧化钠溶液进行萃取, 静置分层, 取有机层回收有机溶剂, 得黄色固体物质, 即为甲基莲心碱。

2.3.2 分离工艺的优化 在预试验和单因素考察的基础上, 以甲基莲心碱含量、甲基莲心碱得率为指标, 采用 L₉(3⁴) 进行正交试验设计, 主要考察 3 因素: 溶剂种类 (A)、氢氧化钠溶液质量浓度 (B)、溶剂比例 (C), 因素水平见表 1。

表 1 甲基莲心碱分离工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C
	三氯甲烷	2%	1 2
	乙醚	2.5%	1 1
	乙酸乙酯	3%	2 1

称取莲子心总碱共 9 组, 每组 100 mg, 按 L₉(3⁴) 正交表的条件萃取, 回收有机层溶剂, 称重, 分别测定各组甲基莲心碱的含量并计算得率, 进行多

指标综合评分^[7]。在本试验中, 甲基莲心碱含量的权重系数设为 0.8, 甲基莲心碱得率的权重系数设为 0.2。以综合值进行统计分析, 结果见表 2。其中综合评分 $Y = 0.8X_1 \times 100 / 0.9900 + 0.2X_2 \times 100 / 0.9600$ 。

表 2 甲基莲心碱分离工艺正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	甲基莲心 碱 / %	得率 / %	综合 评分
1	1	1	1	1	80.4	66.30	78.78
2	1	2	2	2	92.3	45.4	84.04
3	1	3	3	3	98.5	20.3	83.83
4	2	1	2	3	89.8	19.40	76.61
5	2	2	3	1	94.7	13.50	79.34
6	2	3	1	2	99.0	11.50	82.39
7	3	1	3	2	60.1	96.00	68.57
8	3	2	1	3	69.2	74.60	71.46
9	3	3	2	1	76.3	68.00	75.82
K_1	246.651	223.959	232.629	233.940			
K_2	238.341	234.840	236.469	234.990			
K_3	215.85	242.040	231.741	231.907			
R	10.267	6.027	1.576	1.033			

表 3 甲基莲心碱分离工艺方差分析

方差来源	SS	df	F	P
A	169.277	2	102.282	<0.05
B	55.233	2	33.373	<0.05
C	4.212	2	2.545	
误差	1.66	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.000$

经直观比较分析, 以综合评分为指标, 在所选因素水平范围内, 各因素作用溶剂种类(A) > 氢氧化钠溶液浓度(B) > 溶剂比例(C)。方差分析表明, A、B 因素对试验结果的影响具有显著性, C 因素对试验结果无显著影响。确定最优工艺条件为 $A_1 B_2 C_2$, 即用三氯甲烷与 2.5% 的氢氧化钠溶液以体积比 1:1 进行萃取。

2.3.3 甲基莲心碱最佳分离工艺的验证 取莲子心总碱适量, 溶于适量三氯甲烷中, 与浓度为 2.5% 的氢氧化钠溶液以体积比 1:1 进行萃取, 取三氯甲烷层挥干三氯甲烷, 得黄色固体, 即为甲基莲心碱。取 3 批所得甲基莲心碱分别测定含量与得率, 所得结果如表 4:

表 4 甲基莲心碱最佳分离工艺验证结果 %

No.	质量分数	得率
1	91.5	45.8
2	92.2	44.7
3	90.7	46.1

3 讨论

据本试验前期研究, 莲子心总生物碱中主要含有莲心碱、异莲心碱、甲基莲心碱这 3 种酚性生物碱, 三者含量可达 88%。甲基莲心碱含量占 3 种生物碱的 54.9%, 为 3 种碱中含量最高。同莲心碱和异莲心碱相比, 甲基莲心碱的结构中少一个酚羟基, 这就决定了甲基莲心碱比其他 2 种碱的酸性要弱。根据这种酸性的差异, 可以选择适宜浓度的碱液实现成功分离。

按照对中药新药一类申报的要求: 国家药品标准中未收载的从植物、动物、矿物等物质中提取得到单一成份的含量应当占总提取物的 90% 以上。本文以此为标准, 综合考察甲基莲心碱纯度和得率 2 个评价指标, 并进行分离条件的正交试验优化, 所得产品符合中药新药一类申报的要求。

在预试验中, 发现随着甲基莲心碱得率的升高往往伴随着其纯度的降低。因此, 本文选择甲基莲心碱纯度和得率两个指标, 进行综合评分, 评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化, 再给出不同的权重。权重系数其大小视各指标的重要程度而定, 其符号视测定值越大越好或越小越好而取正或负。

通过正交试验发现有机溶剂的种类对试验结果影响显著, 进一步分析发现碱液只能从乙酸乙酯中萃取到少量的莲子心生物碱, 故以其为溶剂, 所得产品得率高, 但纯度低; 而碱液能从乙醚中萃取到绝大部分莲子心生物碱, 故以其为溶剂, 产品纯度高, 但得率极低; 而以三氯甲烷为溶剂, 能在保证纯度符合要求的同时, 得率也达到 50% 左右。

[参考文献]

- [1] 唐小卿, 曹建国. 甲基莲心碱的药理作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 8.
- [2] 郭毛娣, 陈兰贵. 中国大陆产莲子心中生物碱成分的研究[J]. 中草药, 1984, 15(7): 291.
- [3] 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, 29(4): 982.
- [4] 中国药典[S]. 一部. 2010: 256.
- [5] 王嘉陵, 胡学民, 尹武华等. 莲子心中生物碱成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(11): 673.
- [6] 张先洲, 胡学民, 王嘉陵等. 紫外分光光度法测定莲心碱的含量[J]. 药物分析杂志 1991, 11(3): 184.
- [7] 雷晓林, 束家有. 多指标综合评分法优选西洋参提取工艺[J]. 中药材 2005, 28(7): 600.

[责任编辑 仝燕]