

荷叶中生物碱提取及纯化工艺研究

朱晓月, 刘虹*, 郝彧, 王萌, 张德芹

(天津中医药大学中医药研究中心 方剂学教育部重点实验室, 天津 300193)

[摘要] 目的: 优选荷叶总生物碱的提取纯化工艺。方法: 荷叶药材经过冷浸、浓缩、索氏提取、萃取、碱析, 分离荷叶总生物碱, 并以酸性染料比色法测定荷叶总生物碱含量。结果: 荷叶用含 0.1% 盐酸的 70% 乙醇浸泡提取 36 h, 提取 3 次后中和、浓缩, 再以乙酸乙酯为溶媒索氏提取 3 h, 再以 pH 1 的酸水及乙酸乙酯先后进行萃取, 所得乙酸乙酯萃取液用 40% 氢氧化钠溶液碱析, 所制荷叶总生物碱质量分数达到 90% 以上。结论: 此提取纯化工艺操作简便, 方法可行, 重复性好, 为荷叶总生物碱的开发利用提供了实验依据。

[关键词] 荷叶; 总生物碱; 工艺研究

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0022-03

Technology Study on Extraction and Purification of Total Alkaloids from Folium Nelumbinis

ZHU Xiao-yue, LIU Hong*, HAO Yu, WANG Meng, ZHANG De-qin

(Research Institute of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the extraction and purification technology of total alkaloids in Folium Nelumbinis. **Method:** The total alkaloids were obtained by impregnation, concentration, Soxhlet extraction and alkaline separation. Acid dye colorimetry was used to determine total alkaloids in Folium Nelumbinis. **Result:** Folium Nelumbinis was soaked in 1% HCl/70% ethanol for 36 h 3 times. After neutralization and concentration, Soxhlet extraction was carried out for 3 hours with ethyl acetate. Then the concentrate was extracted successively by acidic water at pH 1 and ethyl acetate. 40% NaOH was used for alkaline separation. The content of total alkaloids was above 90%. **Conclusion:** This extraction and purification technology was convenient, feasible, and reproducible, that would provide basic for the research and development of Folium Nelumbinis.

[Key words] Folium Nelumbinis; total alkaloids; technology study

荷叶是睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn 的干燥叶片, 主产于湖南、湖北、浙江、江苏等地, 具有

清热解暑、减肥降脂、升发清阳、凉血止血等多种功效^[1-2]。现代药理学研究表明, 荷叶中的生物碱具有降血脂, 抑制胆固醇、抑菌和止痉挛、抗氧化等药理活性, 是荷叶的主要有效成分^[3]。荷叶生物碱多属于阿扑啡类生物碱, 具有弱碱性, 其游离态在有机溶剂中溶解度较大, 但成盐后在水中的溶解度大大增加。本实验利用以上荷叶生物碱的特性设计了工艺路线, 通过冷浸、浓缩、索氏提取、萃取、碱析的方法, 对荷叶总生物碱进行提取和纯化。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: Agilent1100 色谱系统 (VWD

[收稿日期] 20100304(004)

[基金项目] 国家重大科技专项“重大新药创制”(2009ZX09102-128), 治疗糖尿病组分中药的联合开发(2009DFA31070)

[第一作者] 朱晓月, 在读硕士生, 研究方向: 中药新药开发, Tel: 022-23051114, E-mail: m_jude0828@hotmail.com

[通讯作者] * 刘虹, Tel: 022-23051114, E-mail: tjzy1h@yahoo.com.cn

检测器);紫外分光光度计(VARIAN Carry50);电子天平(METTLER TOLEDO AX-205);超声波清洗器(KQ250E, 昆山市超声仪器有限公司);数显恒温水浴锅(HH-2, 国华电器有限公司);旋转蒸发器(RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂);真空干燥箱(EYELA VOS-3014SD, TOKYORIKAKIKAI CO. LTD)。

荷叶碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110736-200525);荷叶药材(购于安国市长安中药材有限公司, 经天津中医药大学实验教学部标本馆李天祥副研究员鉴定);三氯甲烷、溴甲酚绿、邻苯二甲酸氢钾、氢氧化钠, 硅藻土(均为分析纯)。

2 含量测定方法

2.1 荷叶总生物碱的测定^[4]

2.1.1 对照品溶液的制备 取荷叶碱对照品适量, 精密称定, 用三氯甲烷配制成浓度为 $0.0154 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的荷叶碱对照品溶液。

2.1.2 溴甲酚绿缓冲液的制备 精密称取溴甲酚绿 125 mg, 用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 12.5 mL 溶解, 加入适量邻苯二甲酸氢钾, 加少量水溶解, 调 pH 4.0。

2.1.3 标准曲线的绘制 分别精密吸取 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 对照品溶液于 5 mL 量瓶中, 加三氯甲烷至刻度, 振摇, 移至分液漏斗中, 精密加入溴甲酚绿缓冲液和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 各 0.5 mL, 摇匀, 静置, 取澄清的三氯甲烷层在 415 nm 波长下测定紫外吸光度, 以荷叶碱浓度为纵坐标, 吸光度为横坐标, 得回归方程 $Y = 71.5109X - 0.01476$, $r = 0.9986$ 。

2.1.4 药材中总生物碱的测定 取荷叶药材, 粉碎成粗粉(24 目筛), 精密称取 4 g 于索氏提取器中, 用 80 mL 三氯甲烷提取 4 h, 冷却后将提取液转移到 100 mL 量瓶中, 补加三氯甲烷至刻度, 摇匀后, 精密吸取 1 mL 于 25 mL 量瓶中, 加三氯甲烷至刻度, 摇匀, 得供试品溶液。取 1 mL 供试品溶液置于加入 5 mL 三氯甲烷的分液漏斗中, 再加入溴甲酚绿缓冲液 3 mL 和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 溶液 1 mL, 振摇 1 min, 静置 30 min, 取澄清的三氯甲烷溶液层于 415 nm 处测定吸光度, 代入回归方程计算, 得到荷叶药材中总生物碱的含量为 0.52%。

2.2 荷叶碱的含量测定 荷叶药材及工艺考察中荷叶碱的含量测定方法参照 2005 年版《中国药典》^[11]。

3 荷叶总生物碱的提取工艺研究

3.1 提取溶剂盐酸浓度的确定 分别考察了含

0.1%, 0.5%, 1% 盐酸的 70% 乙醇溶液对荷叶碱的提取效果, 冷浸液中荷叶碱的浓度分别为 2.39, 2.40, 2.70 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此可知, 不同盐酸浓度的醇溶液提取效果相仿, 考虑到生产操作安全及降低设备腐蚀的需要, 故选择 0.1% 酸醇作为提取溶剂。

3.2 正交实验优化荷叶总生物碱的酸醇冷浸提取工艺 称取荷叶药材粗粉(24 目筛) 100 g, 根据单因素初筛试验结果, 分别以 0.1% 酸醇的乙醇含量(A)、提取次数(B)、提取时间(C)、提取倍量(D)为因素, 每个因素 3 个水平, 进行正交实验, 以荷叶碱转移率为指标, 确定总生物碱冷浸提取最佳条件。因素水平见表 1, 正交试验结果见表 2。

表 1 因素水平

水平	A 乙醇含量/%	B 提取次数/次	C 提取时间/h	D 提取倍量/倍
1	30	1	12	10
2	50	2	24	14
3	70	3	36	18

表 2 乙醇冷浸提取正交实验直观分析

No.	A	B	C	D	荷叶碱转移率/%
1	1	1	1	1	22.67
2	1	2	2	2	50.02
3	1	3	3	3	68.60
4	2	1	2	3	51.90
5	2	2	3	1	65.38
6	2	3	1	2	72.97
7	3	1	3	2	63.38
8	3	2	1	3	73.16
9	3	3	2	1	71.50
K_1	0.471	0.460	0.563	0.532	
K_2	0.634	0.629	0.578	0.621	
K_3	0.693	0.710	0.658	0.646	
R	0.222	0.250	0.095	0.114	

由表 2 可见, 荷叶碱提取率的影响程度依次为: $B > A > D > C$ (提取次数 > 乙醇含量 > 提取倍量 > 提取时间), 最佳条件为 $A_3 B_3 C_3 D_3$, 即 0.1% HCl-70% 乙醇 18 倍量, 浸泡提取 3 次, 每次 36 h。

4 荷叶总生物碱纯化工艺的研究

4.1 索氏提取溶剂的考察 将酸醇冷浸所得总生物碱提取溶液中和至 pH 9~10, 浓缩, 将浓缩液用硅藻土拌样, 干燥后, 取 3 份各 3 g, 分别用 80 mL 乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷 3 种不同溶剂进行索氏

提取, 经测定提取液中荷叶碱量分别为 0.920 5, 0.048 2, 0.054 6 mg, 乙酸乙酯的提取效率最高且毒性较小, 因此选择乙酸乙酯作为索氏提取溶剂。

4.2 索氏提取时间的考察 取 15 g 拌样后的硅藻土沙, 用 150 mL 乙酸乙酯索氏提取, 分别考察了索氏提取前 3 h, 第 4 h, 第 5 h, 乙酸乙酯提取液中荷叶碱含量, 结果见表 3。

表 3 索氏提取时间的考察

提取时间/h	荷叶碱提取量/mg	总量/mg	提取率/%
3	16.17		99.26
4	0.04	16.29	0.25
5	0.08		0.50

故确定索氏提取时间为 3 h。

4.3 酸水萃取次数的考察 将索氏提取液浓缩后用浓缩液 2 倍体积的 pH 1 的酸水进行萃取, 对酸水萃取次数进行了考察, 结果见表 4。

表 4 酸水萃取次数的考察

萃取次数	荷叶碱萃取量/mg	萃取总量/mg	萃取率/%
前 2 次	12.47		83.03
第 3 次	0.76	15.01	8.41
第 4 次	1.26		5.07

由表 4 可知酸水萃取 2 次即可将荷叶碱基本萃出。

4.4 乙酸乙酯萃取次数的考察 将萃取所得酸水溶液调节 pH 11, 再用相同体积的乙酸乙酯萃取, 对乙酸乙酯萃取次数进行了考察, 结果见表 5。

表 5 乙酸乙酯萃取次数的考察

萃取次数	荷叶碱萃取量/mg	萃取总量/mg	萃取率/%
1	3.37		84.25
2	0.63		15.75
3	0	4.00	0
4	0		0

由表 5 可知乙酸乙酯萃取 2 次即可。

4.5 氢氧化钠溶液碱析 将上述所得乙酸乙酯萃取液浓缩, 加入 40% 氢氧化钠溶液进行碱析, 出现絮状白色沉淀, 过滤, 真空干燥, 所得白色粉末即为荷叶总生物碱。用酸性染料比色法进行测定, 所得提取物中总生物碱含量均为 90% 以上。

5 讨论

在荷叶总生物碱的提取方法考察中, 曾比较了

酸醇回流及冷浸方法, 结果显示两种方法的提取效率相近, 但热提法提取出的溶液颜色较深, 杂质较多, 给下一步的纯化工艺造成困难, 因此选取冷浸提取方法; 而且冷浸提取简单易行, 无需加热, 避免热不稳定成分在提取过程中的损失。

曾参考文献, 荷叶提取液经过大孔树脂、聚酰胺树脂及 732 阳离子树脂进行纯化, 但是荷叶碱的转移率较低; 另外荷叶黄酮在大孔树脂及 732 阳离子树脂上均可吸附, 故所制得的荷叶总碱中总黄酮含量较高。因此选择了索氏提取和液液萃取对荷叶总生物碱进行富集, 既能保证荷叶碱的转移率又能有效去除黄酮。另外, 采用大孔树脂纯化时为了避免柱子堵塞, 通常需要将上样液过滤, 但是荷叶生物碱在水中溶解度很小, 浓缩后荷叶生物碱主要存在于沉淀当中而被过滤掉, 因此不合适采用大孔树脂进行纯化。

在索氏提取工艺的考察中, 曾分别考察了将过滤后的沉淀直接索氏提取、与硅胶拌样后索氏提取、与硅藻土拌样后索氏提取, 其中后者所得荷叶总生物碱出膏率及荷叶碱含量均最高。硅藻土与硅胶相比对生物碱类物质的吸附力较弱, 且可以有效的分散沉淀物, 使索氏提取溶剂更充分地与沉淀接触, 故提取效率更高, 因此选择硅藻土拌样后索式提取。

本工艺进行了 30 批放大验证, 每批荷叶药材投量 1.6 kg 荷叶总碱平均得量 3.6 g 平均荷叶总碱含量为 93%, 结果表明此提取纯化工艺操作简便、工艺稳定重复性好, 可为荷叶生物碱组分中药的研究以及荷叶降脂功能食品、药品的开发提供可靠的应用基础。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 231.
- [2] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 3583.
- [3] 龚康敏, 厉兰娜, 姚雪梅, 等. 荷叶合剂对小鼠及高脂血症大鼠血脂体重及血液流变学的影响[J]. 中国中医药科技, 1998, 5(5): 294.
- [4] 王伟, 谭晓梅. 荷叶总生物碱含量测定方法的研究[J]. 中药材, 2004, 27(1): 50.

[责任编辑 仝燕]