

大孔吸附树脂纯化莲子心总生物碱的工艺研究

柳 伟, 王宏洁, 边宝林*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100070)

[摘要] 目的: 研究大孔吸附树脂纯化莲子心总生物碱的工艺条件及参数。方法: 以洗脱率和吸附量为指标, 考察了大孔吸附树脂纯化莲子心总生物碱的吸附性能和洗脱参数。结果: 莲子心提取液经大孔吸附树脂吸附后, 依次用蒸馏水、15%乙醇、70%乙醇洗脱, 总生物碱富集在70%乙醇部分, 洗脱率在80%以上, 平均得率为1.82%。结论: 通过大孔吸附树脂纯化后, 莲子心总生物碱纯度为70.98%, 采用此法可以较好地纯化莲子心总生物碱。

[关键词] 大孔吸附树脂; 莲子心; 生物碱

[中图分类号] R284.2 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)03-0023-03

莲子心为睡莲科植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 的成熟种子中干燥的绿色胚芽, 具有清心安神、涩精止血之功效, 常用于心律失常、心肌缺血、高血压等心血管疾病的治疗。主要含有生物碱、黄酮、氨基酸和挥发油等成分^[1], 其中莲子心总生物碱为治疗心律失常等心血管疾病的有效部位。为了进一步研究和开发, 本实验对大孔吸附树脂纯化莲子心总生物碱的工艺条件进行了研究。

1 仪器与材料

T6新世纪紫外可见分光光度仪(北京普析通用有限公司), JB-2002-90-A型电动搅拌机(北京精华瑞科学仪器有限公司); 莲子心产自湖南, 经中国中医科学院中药所生药室何希荣主管药师鉴定, 甲基莲心碱对照品(本室自制, 经HPLC归一法确定纯度为98%); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的制备 精密称取甲基莲心碱对照品5 mg至5 mL量瓶中, 用0.1 N盐酸溶解并定容至刻度, 摇匀。分别吸取对照品溶液0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.50 mL于10 mL量瓶中, 以0.1 N盐酸定容至刻度。于280 nm波长处测定吸收度($n = 5$)。0.1 N盐酸作空白参比, 以吸收度为纵坐标(A), 甲基莲心碱的浓度为横坐标(C), 绘制标准曲线, 其经回归处理, 得回归方程为 $A = 0.01665C + 0.01564$, $r = 0.9999$ 。表明吸收度与甲基莲心碱浓

度在15.52 $\mu\text{g/mL}$ ~ 51.72 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.2 样品溶液的制备 取莲子心粗粉50 g, 精密称定, 加80%乙醇400 mL冷浸8 h后, 用电动搅拌机搅拌提取3次, 转速为400 r/min, 每次均使用80%乙醇400 mL, 提取2 h, 滤过, 合并乙醇液得莲子心总生物碱提取液。减压回收至无醇味, 过滤, 合并滤液并转移至250 mL量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。即得样品溶液(含生药0.2 g/mL)。

2.3 莲子心总生物碱的含量测定 收集各部分树脂洗脱液, 水浴挥干。精密称取一定量固体物, 以少量0.1 N盐酸溶解, 置分液漏斗中, 浓氨水调pH至9~10, 用氯仿萃取5次, 收集氯仿液蒸干, 残渣以0.1 N盐酸溶解至25 mL量瓶中并稀释至刻度, 混匀。按照标准曲线项下方法测定其吸收度, 并用回归方程计算总生物碱含量。

2.4 大孔吸附树脂预处理 大孔吸附树脂用95%乙醇浸泡24 h使充分溶胀, 湿法装柱, 用乙醇和蒸馏水交替洗脱, 洗至乙醇液与水混合(1:2)不呈白色混浊为止, 然后以去离子水洗至无醇味即可。

2.5 大孔吸附树脂类型的选择 本实验以比吸附量及洗脱率为指标, 对D101-A、AB-8、HP-2MG3种不同类型的大孔吸附树脂进行考察, 三种树脂的化学参数见表1。

精密吸取样品溶液3份(每份35 mL), 分别上样于经预处理的不同类型树脂柱内(10 mL), 预吸附2 h, 流速1 BV/h (BV为柱床沉降体积), 吸附完毕后用70%乙醇洗脱3 BV, 流速为1 BV/h。依次吸取样

[收稿日期] 2006-08-10

[通讯作者] * 边宝林, Tel: (010) 64021008

品溶液、过柱液、洗脱液按 2.3 项下方法测定总生物碱的量,并计算比吸附量及洗脱率,结果见表 2。

表 1 3 种大孔吸附树脂的化学参数

树脂型号	生产厂家	极性	树脂结构	比表面积 m ² /g	孔径 /mm
D101-A	天津南开大学化工厂	非极性	聚苯乙烯型	480~580	28~30
AB-8	天津南开大学化工厂	弱极性	聚苯乙烯型	480~520	130~140
HP-2MG	日本三菱化工	中等极性	聚丙烯酸酯型	470 左右	170 左右

表 2 不同树脂吸附容量与洗脱率比较

树脂型号	比吸附量(mg/mL)	洗脱率(%)
D101-A	15.11	81.80
AB-8	12.36	74.93
HP-2MG	11.27	82.10

注:(1)比吸附量(mg/mL)=[上柱液中总生物碱量(mg)-过柱液中总生物碱量(mg)]/树脂体积(mL);(2)洗脱率(%)=[洗脱液中总生物碱量(mg)/树脂吸附总生物碱量(mg)]×100%。

由以上结果可知:3 种大孔吸附树脂的比吸附量按大小依次为 D101-A > AB-8 > HP-2MG;洗脱率按大小依次为 HP-2MG > D101-A > AB-8。综合考虑 D101-A 大孔树脂吸附和解吸附能力均较理想,因此选择 D101-A 大孔吸附树脂纯化莲子心总生物碱。

2.6 洗脱溶媒的考察 精密吸取样品溶液 33.50 mL,加至预处理好的 D101-A 大孔树脂柱上(10 mL),依次用蒸馏水,15,30,50,70,80,90% 乙醇洗脱 3 BV,流速 1 BV/h,收集洗脱液。按 2.3 项下方法测定各流分中总生物碱的量,计算洗脱率,结果见下表 3。

表 3 洗脱溶媒的考察

洗脱溶媒	总生物碱的量(mg)	洗脱率(%)
蒸馏水	—	—
15% 乙醇洗脱	—	—
30% 乙醇洗脱	6.07	4.02
50% 乙醇洗脱	24.37	16.13
70% 乙醇洗脱	62.37	41.28
80% 乙醇洗脱	37.65	24.92
90% 乙醇洗脱	—	—

注:“—”表示未检出生物碱。

结果表明:总生物碱主要集中在 50%~80% 乙醇洗脱部分,70% 乙醇洗脱率高于 50% 及 80% 乙醇部分,因此选择 70% 乙醇作为洗脱溶媒。蒸馏水和 15% 乙醇部分未检测出生物碱成分,且洗脱液中均有一定量的固形物存在,说明蒸馏水及 15% 乙醇洗脱部分可用于除去水溶性杂质。

2.7 洗脱溶媒用量的确定 精密吸取样品溶液 33.50 mL,加至预处理好的 D101-A 大孔树脂柱上(10 mL),依次用蒸馏水,15,70,90% 乙醇洗脱 5 BV,流速 1 BV/h,每 1 BV 为 1 流份。吸取适量各洗脱液,蒸干溶剂,残渣加少量甲醇溶解,滤过。分别吸取滤液 2~3 mL,分别点于硅胶 G 薄层板上,以氯仿-乙酸乙酯-二乙胺(5:4:1)为展开剂,展开。取出晾干,喷以改良的碘化铋钾乙醇溶液显色。收集含生物碱各部分洗脱液,按 2.3 项下测定各流分中总生物碱的含量并称量固体物重,计算洗脱率。结果见表 4、表 5。

表 4 各洗脱溶媒中固体物重的试验数据

洗脱溶媒	固体物重(mg)				
	1 BV	2 BV	3 BV	4 BV	5 BV
蒸馏水	58.09	36.31	9.11	1.41	0
15% 乙醇	18.29	13.80	14.81	8.43	1.74
70% 乙醇	46.92	73.48	31.28	16.68	3.64
90% 乙醇	14.07	8.31	—	—	—

注:“—”表示未检出固体物。

表 5 洗脱溶媒用量的考察

70% 乙醇洗脱液	总生物碱的量(mg)	洗脱率(%)
1 BV	25.16	16.65
2 BV	60.74	40.20
3 BV	22.80	15.09
4 BV	13.53	8.96
5 BV	—	—

注:“—”表示未检出生物碱。

结果表明:蒸馏水、15% 乙醇及 90% 乙醇各流份 TLC 法检识未见有生物碱橙红色斑点。70% 乙醇洗脱部分前三流份洗脱率较大,洗至 4 BV 时树脂柱上吸附的生物碱洗脱基本完全。蒸馏水、15% 乙醇洗至 4BV 时,固体物已经很少,基本完成除去水溶性杂质的目的。故确定先以蒸馏水,15% 乙醇洗脱 4 倍树脂体积去除水溶性杂质后,用 70% 乙醇洗脱 4 倍树脂体积富集总生物碱。

2.8 验证试验 精密吸取样品溶液 33.50 mL(含生药 0.2 g/mL),平行做 3 份,加至预处理好的 D101-A 大孔树脂柱上(10 mL),依次用蒸馏水,15%,70% 乙醇洗脱 4 BV,收集 70% 乙醇部分洗脱液,按 2.3 项下方法测定总生物碱的量和总生物碱纯度,计算洗脱转移率及总碱固体物得率。结果见下表 6。

3 小结与讨论

莲子心总生物碱中主要成分为莲心碱、异莲心

表6 工艺参数验证性试验结果

样品	总生物碱量 (mg)	总生物碱纯度 (%)	洗脱转移率 (%)	得率 (%)
1	124.10	70.69	82.13	1.85
2	122.23	70.92	80.90	1.82
3	120.38	71.34	79.67	1.80
平均	122.24	70.98	80.90	1.82

碱、甲基莲心碱,3者均属异喹啉类生物碱。根据文献报道^[2,3]可采用紫外分光光度法测定总生物碱含量。本试验以3种成分中含量最高的甲基莲心碱为对照品,计算总生物碱含量,方法简单,操作方便。

莲子心药材乙醇提取液中含有黄酮、生物碱、氨基酸等多种化合物,成分较为复杂,总生物碱的富集、分离、纯化存在一定的困难。本实验尝试了大孔树脂吸附法,从3种不同类型的树脂中优选出D101-A型大孔吸附树脂对总生物碱进行纯化。文中表3各浓度乙醇洗脱率与其他试验数据差距较大,可能是本试验中每次树脂的取样量较小,易产生误差;其

次试验选用D101-A型大孔吸附树脂颗粒均匀性与同类型进口树脂相比存在一定差距,膨胀系数亦较大,在取样及试验过程中也容易造成误差。在进一步的试验研究中应加大树脂的使用量,同时注意大孔树脂均匀性及膨胀系数的考察。采用本文方法纯化后总固形物中莲子心总生物碱含量达到70.98%,且操作简单,只需使用乙醇和水两种溶媒,因而大孔树脂吸附法适宜于莲子心总生物碱的分离、纯化与富集,而且具有吸附快,解吸率高,吸附容量大,洗脱率高等优点,适于工业化生产。

[参考文献]

- [1] 吕武清,郑海华,葛新. 莲子心的研究概况[J]. 中草药. 1996, 27(7): 438-440.
- [2] 胡学民,杨淑清,张先洲. 紫外分光光度法测定莲心碱片的含量[J]. 华西药学杂志. 1998, 13(1): 51-52.
- [3] 刘产明,卢宇. 莲子心总碱缓释片体外释放度试验[J]. 江苏药学与临床研究. 2005, 13(2): 13-14.