

# 大孔吸附树脂纯化石蒜鳞茎中的加兰他敏

李霞<sup>1</sup>, 熊海蓉<sup>2</sup>, 黄忠良<sup>3</sup>, 蒋利华<sup>3</sup>, 文祝友<sup>4</sup>, 熊远福<sup>1,\*</sup>

(1.湖南农业大学理学院, 湖南长沙 410128; 2.湖南农业大学分析测试中心, 湖南长沙 410128;

3.长沙环境保护职业技术学院, 湖南长沙 410004; 4.湖南农业大学动物科技学院, 湖南长沙 410128)

**摘要:**目的: 筛选出分离纯化石蒜中加兰他敏的最佳大孔树脂型号及工艺条件。方法: 通过静态、动态相结合的方法, 以加兰他敏吸附率、解吸率为指标, 确定最佳工艺。结果: HPD300 型树脂具有最佳的吸附和洗脱参数, 其最佳工艺为粗提物上样液中加兰他敏 1.74g/L、吸附流速 2BV/h、最大上样量 9BV; 吸附后先以 4BV 水洗去杂质, 再用 8BV 70% 乙醇溶液以 2BV/h 的速率进行洗脱, 加兰他敏纯度可由原来的 10.89% 提高到 45.52%。结论: HPD300 可较好地吸附分离石蒜中加兰他敏, 操作简单、安全、成本低廉, 有较高的应用价值。

**关键词:** 石蒜; 加兰他敏; 大孔吸附树脂; 纯化

## Purification of Galanthamine from *Lycoris radiate* Bulbs by Macroporous Resin Adsorption

LI Xia<sup>1</sup>, XIONG Hai-rong<sup>2</sup>, HUANG Zhong-liang<sup>3</sup>, JIANG Li-hua<sup>3</sup>, WEN Zhu-you<sup>4</sup>, XIONG Yuan-fu<sup>1,\*</sup>

(1. College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Center of Analysis and Testing, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. Changsha Environmental Protection College, Changsha 410004, China;

4. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The best type of macroporous resin and the best process conditions were screened for the purification of galanthamine from *Lycoris radiate* bulbs. Static and dynamic adsorption and desorption experiments were conducted to find out the effects of various process conditions on the adsorption and desorption rates of galanthamine. Macroporous resin type HPD 300 was found to be the best of 9 types investigated. The optimal purification process was obtained as follows: 9 BV of crude extract containing 1.74 g/L galanthamine was loaded at a flow rate of 2 BV/h and then the HPD 300 column was washed with 4 BV of purified water for the removal of unwanted impurities before elution with 8 BV of 70% ethanol at a flow rate of 2 BV/h. By using the optimal purification process, the purity of galanthamine was increased from 10.89% to 45.52%. From these results, we came to the conclusion that HPD 300 allows better adsorption of galanthamine, which is easy to operate, safe and inexpensive, and therefore has a promising application potential.

**Key words:** *Lycoris radiate* bulbs; galanthamine; macroporous adsorption resin; purification

中图分类号: O629.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)06-0033-04

加兰他敏(galanthamine)是一种异喹啉类生物碱<sup>[1]</sup>, 可用于重症肌无力、闭角型青光眼、术后肠肌麻痹的治疗<sup>[2]</sup>, 尤其是在治疗轻、中度阿尔茨海默病(AD, 老年痴呆症的最主要表现形式)方面毒副作用小, 具有较好的疗效<sup>[3-6]</sup>。近年来, 国内外已将其氢溴酸盐用于轻、中度 AD 的治疗, 临床有效率达 50%~60%, 且没有肝毒性<sup>[7]</sup>, 由于 AD 的治疗正朝着预防疾病的方向发展, 因此加兰他敏的优势受到特别关注。目前, 加兰他敏

的传统提取纯化一般采用低碳醇类溶剂抽提, 经减压浓缩后得含加兰他敏的石蒜浸膏, 然后用酸、碱处理及溶剂萃取并结合重结晶的方法<sup>[8]</sup>。高纯加兰他敏则采用氧化铝<sup>[8]</sup>、阳离子交换树脂等柱层法分离制备<sup>[9-10]</sup>。这些方法因使用大量有机溶剂, 存在收率低、生产成本低、易造成环境污染等缺点。大孔吸附树脂是 20 世纪 60 年代发展起来的有机高聚物吸附剂, 它具有选择性强、解吸条件温和、使用周期长、再生简便等诸多优

收稿日期: 2011-03-10

基金项目: 湖南省科技厅计划项目(2011SK3082)

作者简介: 李霞(1979—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: yayapark@hotmail.com

\* 通信作者: 熊远福(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物功能性成分提取与应用。

E-mail: yuanfuxiong888@163.com

点, 已广泛用于生物物质的纯化<sup>[11-14]</sup>, 目前尚未见大孔树脂分离加兰他敏的研究。本研究旨在寻找一种适合纯化加兰他敏的大孔吸附树脂, 研究其吸附和解吸的最佳工艺参数, 建立加兰他敏的纯化工艺, 为石蒜资源的开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

石蒜原料采于湖南九嶷山; AB-8、NKA-9、D101 大孔吸附树脂 天津海光化工有限公司; HPD300、HPD400、HPD600 大孔吸附树脂 沧州宝恩化工; ADS-5、ADS-7、ADS-9 大孔吸附树脂 天津南开和成科技发展有限公司。

加兰他敏标样(纯度 $\geq 94\%$ ) 美国 Sigma 公司; 乙醇、氯仿、甲醇、NaOH 均为分析纯; 乙腈(色谱纯)。

2690 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; UV-2201 型紫外分光光度计 日本岛津公司; AL204 型电子天平 瑞士 Mettler Toledo 公司; SHY-2AS 双功能水浴恒温振荡器 江苏金坛市环保仪器厂; KQ-160TDE 型超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司; RE-52 旋转蒸发器 上海亚荣仪器厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品溶液的制备

准确称取一定质量的干石蒜粉, 按料液比 1:6(g/mL) 加入 75% 乙醇溶液, 控制温度在 65℃, 加热 4h, 共提取 3 次。离心后取上清液, 回收溶剂浓缩提取液, 用氨水调节溶液 pH11, 再用氯仿萃取至无生物碱反应, 合并氯仿液并回收溶剂, 得加兰他敏粗提物, 以水为溶剂, 配制不同浓度的加兰他敏粗提物上样液, 备用<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.2 加兰他敏含量测定

加兰他敏在紫外光区 289nm 处有最大吸收。以甲醇作参比, 采用紫外分光光度计测定溶液中加兰他敏的吸收度, 计算其含量。采用高效液相色谱分析产品中加兰他敏的含量, 色谱条件为: 以乙腈-水(体积比 20:80, 含体积分数 0.1% TFA)为流动相, 流速 1.0mL/min, 检测波长 289nm, 进样量 20  $\mu$ L。

#### 1.2.3 大孔吸附树脂预处理

大孔吸附树脂用 95% 乙醇浸泡 24h 后湿法装柱, 用 95% 乙醇流动清洗, 清洗至流出的乙醇液与水以体积比 1:5 混合不呈白色混浊, 然后以大量蒸馏水冲洗至水洗液无醇味为止。

#### 1.2.4 静态吸附与解吸

准确称取 1g 经预处理的干大孔吸附树脂, 加入 50mL 一定浓度加兰他敏粗提物上样液, 室温振荡 24h, 每隔一段时间吸取一定体积上清液, 紫外分光光度法测

定上清液中加兰他敏浓度, 计算不同时间大孔吸附树脂的吸附量。吸附达饱和后的树脂滤去上清液, 用蒸馏水洗涤后, 加入 50mL 不同浓度的解吸剂, 室温下振荡解吸 24h, 紫外分光光度法测定溶液中加兰他敏的浓度, 计算不同浓度解吸剂的解吸率。

#### 1.2.5 动态吸附与解吸

准确称取一定量树脂湿法装柱(径高比为 1:10), 将不同浓度的加兰他敏粗提物上样液以不同流速过柱, 吸附饱和后用蒸馏水洗至流出液在 289nm 处无紫外吸收, 再用 1.2.4 节方法筛选出的解吸剂进行洗脱, 分段收集洗脱液并用紫外分光光度法测定加兰他敏含量, 考察加兰他敏粗提物上样液的浓度、流速、水洗及解吸剂用量等参数。

#### 1.2.6 最佳工艺验证实验

准确称取一定量树脂湿法装柱, 按 1.2.4、1.2.5 节的优化条件进行上样吸附与洗脱, 收集洗脱液, 并用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定洗脱液中加兰他敏的含量, 平行纯化 5 次, 考察重现性。

## 2 结果与分析

### 2.1 大孔吸附树脂的选择

根据极性不同选择 9 种大孔吸附树脂进行比较, 从中筛选一种吸附和解吸综合性能较好的树脂来纯化加兰他敏。

表 1 9 种大孔吸附树脂的性能参数及静态吸附与解吸数据

Table 1 Performance parameters and static and dynamic adsorption and desorption data of 9 types of macroporous resins

树脂 型号	极性	比表面积/ (m <sup>2</sup> /g)	平均孔 径/nm	平衡吸附 量/(mg/g)	解吸量/ (mg/g)	洗脱 率/%
AB-8	弱极性	480~520	130~140	46.9917	44.2369	94.14
NKA-9	极性	250~290	155~165	33.1384	27.6421	83.41
D101	非极性	650~700	90~100	42.1845	39.0928	92.67
HPD300	非极性	800~870	50~55	58.0169	49.4826	85.29
HPD400	弱极性	500~550	75~80	41.7701	39.4713	94.50
HPD600	极性	550~600	8.0	36.1669	32.8309	90.78
ADS-5	非极性	520~600	25~30	52.9407	47.6512	90.01
ADS-7	强极性	$\geq 100$	25~30	22.0576	18.6183	84.41
ADS-9	弱极性	520~600	25~30	53.8141	45.2158	84.02

注: 吸附量和解吸量计算以干树脂质量为基础。下同。

由表 1 可见, 本实验所选用的大孔吸附树脂包括非极性、弱极性、极性、强极性 4 种。由于加兰他敏分子结构中带有 1~2 个羟基, 具有形成氢键的能力而有一定极性, 但因为羟基数目少, 所以易被非极性和弱极性大孔吸附树脂吸附。此外, 大孔吸附树脂的吸附量与比表面积成正比, 而 HPD300 树脂在 9 种大孔吸附树脂中有最大比表面积, 这可能是其吸附量大的原因之一。综合考虑平衡吸附量和解吸率的影响, 选择 HPD300 型大孔吸附树脂作为对石蒜中加兰他敏进行纯化

的吸附树脂。

## 2.2 静态吸附与解吸特性

### 2.2.1 静态吸附动力学实验

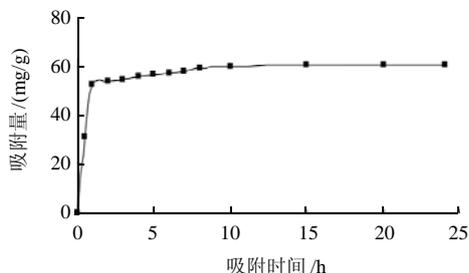


图1 HPD300树脂对加兰他敏的吸附动力学曲线

Fig.1 Adsorption kinetics curve of HPD 300 resin towards galanthamine

由图1可以看出,在吸附的起始阶段HPD300树脂对加兰他敏吸附速度快,且单位时间内对加兰他敏的吸附量大,1h后吸附速率逐渐减慢,曲线斜率逐渐减小,8h后曲线开始趋于平缓,这说明当单位质量树脂吸附量达到一定程度时,随着时间的延长,吸附速率和吸附量增量迅速减少。工业生产中可以选择1~8h为吸附时间,但1h后树脂吸附量增加不明显,因此从生产周期和吸附量方面考虑,本试验选择1h作为上柱液静态吸附时间。

### 2.2.2 解吸剂的筛选

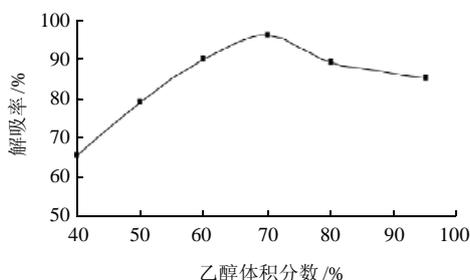


图2 不同体积分数乙醇对加兰他敏解吸率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the desorption rate of galanthamine

在饱和吸附后的树脂中分别加入50mL体积分数为40%、50%、60%、70%、80%、95%的乙醇溶液,测定解吸液中加兰他敏含量。由图2可知,随着乙醇体积分数的升高,树脂解吸率逐渐增大,当乙醇体积分数增大到70%时,树脂的解吸率达到最大值,此后再增大乙醇体积分数大孔吸附树脂的解吸率反而有所降低,这可能是因为加兰他敏是弱极性物质,与体积分数约70%的乙醇溶液极性相当,易被70%乙醇溶液从树脂中洗脱,因此洗脱剂的体积分数以70%为宜。

## 2.3 动态吸附与解吸特性考察

### 2.3.1 上样质量浓度对加兰他敏吸附量的影响

将质量浓度分别为0.96、1.08、1.26、1.74、2.21g/L的加兰他敏粗提物上样液以相同流速过柱,考察大孔吸附树脂在不同上样质量浓度条件下的最大吸附量。

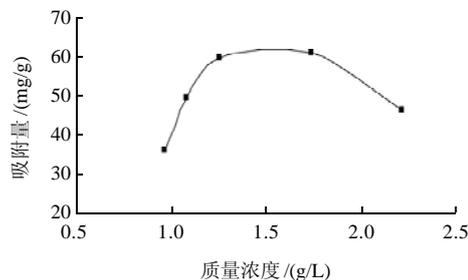


图3 上样质量浓度对吸附量的影响

Fig.3 Effect of sample concentration on the adsorption rate of galanthamine

由图3可知,树脂的吸附量随上样液质量浓度的增高而增加,但质量浓度太高时,会发生多层吸附并将微孔堵塞降低内孔的利用率,吸附率反而下降,因此确定最佳上样质量浓度为1.74g/L。

### 2.3.2 不同流速动态吸附曲线

在动态吸附实验中,吸附流速的大小是影响泄漏点出现早晚的关键因素。将质量浓度为1.74g/L的加兰他敏粗提物上样液分别以1.5、2、2.5、3BV/h的流速过柱,考察大孔吸附树脂在不同上样流速下的最大吸附量。

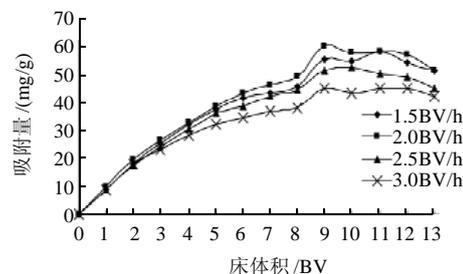


图4 不同流速的动态吸附曲线

Fig.4 Adsorption kinetics curves HPD 300 resin towards galanthamine at different flow rates

由图4所示,吸附流速为3BV/h时,泄漏点出现最早,随流速降低,泄漏点出现延迟,当吸附流速为1、2BV/h时,HPD300型大孔吸附树脂对加兰他敏的饱和吸附量都比较大,但流速为2BV/h时树脂能较快吸附饱和,因此考虑时间和吸附量的影响,确定最佳吸附流速为2BV/h,此时,树脂可以处理9BV的上样液。

### 2.3.3 蒸馏水动态洗脱曲线

吸附后柱树脂床用蒸馏水洗脱可除去未被大孔树脂吸附的加兰他敏和水溶性杂质,随着2BV/h洗涤用水的增加,洗涤水中加兰他敏含量迅速减少,当洗涤蒸馏水用量达到4BV时,洗涤蒸馏水中加兰他敏质量浓度降至0.0003g/L,树脂床上未被吸附的加兰他敏已被冲洗

干净。因此,蒸馏水洗涤用量为4BV。

### 2.3.4 乙醇动态解吸曲线

用70%乙醇溶液对已吸附饱和并水洗过的大孔吸附树脂进行解吸,由图5可以看出,洗脱峰集中对称,无明显拖尾现象,当乙醇用量在8BV时基本上可以将加兰他敏洗脱完全。

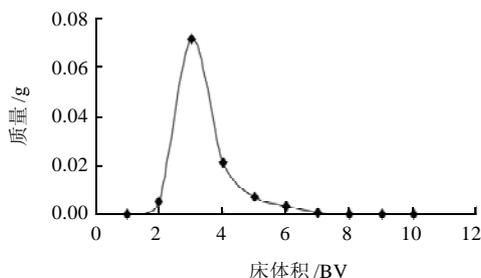


图5 70%乙醇溶液动态解吸曲线  
Fig.5 Desorption kinetics curve with 70% ethanol

## 2.4 最佳工艺验证实验

表2 验证性考察实验结果

Table 2 Results of repeated experiments under optimal adsorption and desorption conditions

实验号	上样量/g	解吸量/g	解吸率/%
1	0.125	0.1043	83.44
2	0.125	0.1046	83.68
3	0.125	0.1042	83.36
4	0.125	0.1043	83.44
5	0.125	0.1045	83.60
相对标准偏差/%		0.15	

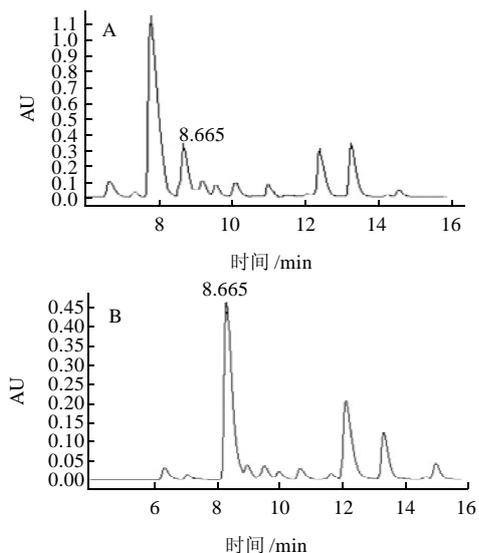


图6 大孔吸附树脂纯化前(A)、后(B)的石蒜提取物中加兰他敏的HPLC图

Fig.6 HPLC profiles of galanthamine in crude extract and purified sample

由表2可知,按照上述优化条件进行吸附解吸操作,方法稳定可行。从图6可知,加兰他敏为保留时间为8.66min的色谱峰,纯化前的主要杂质峰经大孔吸附树脂纯化后得以去除。经计算,纯化后固形物中加兰他敏的含量由纯化前10.89%提升至45.52%。

## 3 结论

3.1 静态吸附实验结果表明,在9种大孔吸附树脂中,以HPD300树脂对加兰他敏的吸附量最大、解吸率高,适用于从石蒜中分离、富集加兰他敏。

3.2 动态吸附与解吸实验结果表明,将9BV、质量浓度为1.74g/L的加兰他敏粗提物上样液,以2BV/h的吸附流速通过已处理好的装有HPD300型大孔吸附树脂的吸附柱(径高比为1:10),进行动态吸附后,依次用4BV蒸馏水和8BV体积分数70%的乙醇溶液以2BV/h的流速进行洗脱,即可将加兰他敏从树脂上解吸下来。经测定,纯化后固形物中加兰他敏含量由纯化前的10.89%提升至45.52%。表明该工艺有吸附快、解吸较易、稳定可行的优点,适宜于石蒜中加兰他敏的富集与纯化。

## 参考文献:

- [1] 潘正安. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 446.
- [2] 李霞, 熊远福, 蒋利华, 等. 荧光法测定石蒜中加兰他敏含量[J]. 作物研究, 2006(2): 149-150.
- [3] 马广恩. 加兰他敏治疗老年性痴呆症的研究概况[J]. 药学进展, 1998, 22(3): 153-155.
- [4] GUILLOU C, MARY A, RENKO D Z, et al. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2000, 10(7): 637-639.
- [5] MARCO L, CARREIRAS M C. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease[J]. Recent Patents on CNS Drug Discovery, 2006, 1(1): 105-111.
- [6] GUILLOU C, BEUNARD J L, GRAS E, et al. An efficient total synthesis of (±)-galanthamine[J]. Angew Chem Int Ed, 2001, 40(24): 4745-4746.
- [7] 李霞, 熊远福, 蒋利华, 等. 石蒜属植物中加兰他敏的化学研究进展[J]. 湖南农业大学学报, 2006, 32(6): 665-667.
- [8] 洪山海, 马广恩. 石蒜科生物碱的研究. III: 紫花石蒜和其他两种石蒜中的生物碱及新生物碱紫花石蒜碱[J]. 药化学报, 1964, 11(1): 1-11.
- [9] SADIKOV T, SHAKIROV T T. Isolation of lycorine from *Ungernia tadshicorum*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 1978, 14(6): 703-704.
- [10] 傅和亮, 匡卫文, 王晓岩, 等. 从天然植物中提取石蒜科生物碱的工艺: 中国, 1583749A[P]. 2005-02-23.
- [11] 樊海燕, 杨坤, 张晨晓, 等. 地黄中梓醇的超声提取-树脂分离纯化工艺[J]. 化工学报, 2008, 59(9): 2283-2288.
- [12] 杨桦, 邓晓静, 易红. 大孔吸附树脂用于川草乌中总生物碱的分离提取[J]. 中成药, 2000, 22(8): 535-538.
- [13] 张琳, 杨磊, 牛卉颖, 等. 大孔树脂吸附分离长春花中的文多灵、长春质碱和长春碱[J]. 化工学报, 2008, 59(3): 608-614.
- [14] 吕群金, 衣杰荣, 丁勇. 大孔吸附树脂对杨桃渣多酚吸附分离的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 39-42.
- [15] 李霞, 熊远福, 蒋利华, 等. 一步法提取石蒜中加兰他敏和石蒜碱的研究[J]. 化工进展, 2008, 27(6): 904-907; 912.