

沸石分子筛吸附分离忽地笑中石蒜碱

赵艺楠, 宋科*, 彭胜, 肖卓炳

吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 张家界 427000

摘要: 文章初步探索沸石分子筛应用于生物碱富集纯化的可行性, 以忽地笑中石蒜碱为吸附对象, 以吸附率、洗脱率为指标, 考察几种沸石分子筛的使用效果, 并与阳离子树脂进行对比, 探索沸石分子筛最佳的吸附、洗脱条件。结果表明: ZSM-5 沸石分子筛的吸附与洗脱效果相对较好, 优于 MCM-22、13X 分子筛和 D001、HD-8 阳离子树脂。上样液 pH 值为 4 时, ZSM-5 沸石分子筛的吸附效果相对较好; 以含 2.0 mol/L 氨水的 70% 的乙醇作为石蒜碱的洗脱剂效果相对较好。

关键词: 沸石分子筛; 石蒜碱; 吸附纯化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.022

Purification of Lycorine From *Lycoris aurea* Using Zeolite Molecular Sieve

ZHAO Yi-nan, SONG Ke*, PENG Sheng, XIAO Zhuo-bing

Hunan Province Key Laboratory of Forest Products and Chemical Industry
Engineering, Jishou University, Hunan Zhangjiajie 427000, China

Abstract: This article made preliminary study on the feasibility of the application of zeolite molecular sieves on enrichment and purification of alkaloid. The effects of different zeolite molecular sieves were examined based on indicators of adsorption rate and elution rate when lycorine in short-tube *Lycoris aurea* was taken as absorption object. Moreover, a comparison of effect was made with cationic resin to explore the optimal adsorption and elution conditions of zeolite molecular sieve. According to the result, ZSM-5 zeolite molecular sieve had better adsorption and elution effect, which were better than those of MCM-22 or 13X molecular sieve and D001 or HD-8 cationic resin. When pH value of upper sample liquid was 4, the adsorption effect of ZSM-5 zeolite molecular sieve was comparatively better; when 70% ethyl alcohol containing 2.0 mol/L ammonium hydroxide was taken as the eluent of lycorine, the elution effect was comparatively better.

Key words: zeolite molecular sieve; lycorine; absorption and purification

忽地笑 (*Lycoris aurea* Herb.) 属于被子植物门单子叶植物纲石蒜科 (*Amaryllidaceae*) 石蒜属 (*Lycoris*) 多年草本植物。我国石蒜科植物种类丰富, 约占全世界的 75% 以上, 其中我国华东地区为多样性分布中心^[1]。据《本草纲目》记载, 石蒜属植物具有解毒祛痰、利尿、催吐等功效, 主治痈疮、咽喉肿痛及水肿等^[2]。石蒜属植物的鳞茎部位含有多种具有药理活性的生物碱类次生产物^[3], 其中石蒜碱应用较为广泛。Hammoda HM 等人^[4]在石蒜科植物中选择用于治疗老年痴呆的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 其中石蒜碱和前多水花仙碱均有效; Lamoral-Theys D

等人^[5]在通过对 22 个石蒜碱系列化合物体外抗肿瘤活性研究中发现, 石蒜碱在微摩尔水平表现活性最强, 其对癌细胞的选择性至少是正常细胞的 15 倍, 并且其抗肿瘤活性是通过抑制细胞增殖而不是细胞毒作用。除此之外, 石蒜碱还是传统的临床用于小儿麻痹后遗症的药物, 且在抗病毒、抗炎以及抗寄生虫抗疟疾等方面都有很好的效果^[6]。

目前对于生物碱的富集纯化多用阳离子树脂, 如卢凌春等^[7]利用 Ls006 阳离子树脂对两面针总生物碱进行富集纯化, 每 g 树脂对两面针总生物碱的最大吸附量为 32.90 mg, 解吸附率为 94.78%, 生物碱结晶得率大于 50%; 王信等^[8]利用 001 × 7 氢型阳离子树脂分离纯化钩藤碱及钩藤总生物碱, 洗脱率可达到 88.2% 和 89.9%; 高鹏^[9]利用 732 型阳离子树脂探索苦参生物碱的纯化工艺, 提高了纯化效

率,工艺安全环保。

沸石分子筛^[10]是一类天然存在或者人工合成的具有均匀孔径和规则孔道的硅铝酸盐材料,化学组成为: $M_{2/n} \cdot Al_2O_{3x} \cdot xSiO_2 \cdot yH_2O$ (M代表金属阳离子,n为金属阳离子价态,x为硅铝比,y为饱和水分子数)。硅铝分子筛是以硅氧四面体和铝氧四面体为基本结构,其内部主要结构是基本结构通过氧桥相互连接形成的多元环和多个多元环连接形成笼之间的各种孔道,且有孔道规模可控、孔径稳定且单一、比表面积大的特点。沸石分子筛在日常生活及工业领域中应用广泛,如在医药领域中^[11],沸石分子筛可以作为离子吸附剂及抗菌助剂、缓/控释药物载体、抗癌药物助剂、模拟酶及生物传感器等。在石化领域中^[12],沸石分子筛可以用作石油产品的脱硫、脱氮以及石脑油的分离等。王剑^[13]等,利用4A和13X沸石分子筛设计天然气脱硫、脱水、脱醇工艺,净化效果显著。

在天然产物富集纯化工艺中,还未见利用沸石分子筛作为吸附剂的先例。常作为生物碱吸附剂的阳离子树脂,其吸附原理是阳离子树脂中的氢离子可以与水中以盐形式存在的生物碱结合,使碱与其他非离子型成分分离,达到生物碱吸附的目的^[14]。沸石分子筛孔径均一、高比表面积,且表面可修饰的特点,同样可以实现其与生物碱的结合,达到生物碱分离纯化的目的。本研究利用沸石分子筛作为吸附分离载体,针对忽地笑中的石蒜碱进行吸附分离效果的初步探索。

1 仪器与材料

1.1 材料

实验中石蒜原料采自湖南省张家界市永定区石蒜栽培基地,经吉首大学廖博儒研究员鉴定为石蒜科石蒜属植物忽地笑;ZSM-5分子筛、MCM-22分子筛、13X分子筛皆购自上海申县环保材料公司;HD-8型大孔强酸性离子交换树脂、D001磺酸型大孔阳离子树脂均为国产。

1.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪,检测器:G1315D(美国安捷伦公司);SB-3200D 超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海耀特仪器设备有限公司),RE-5205 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),AEG-220 型万分之一天平(日本岛津公司)。

1.3 试剂

磷酸二氢钾、浓硫酸(分析纯)、盐酸(分析纯)均是国产分析纯;甲醇、乙腈、三乙胺(均为色谱纯)为进口美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

石蒜碱标准品(批号:Z03D5B2)购自上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$ (液相检测)。

2 实验方法

2.1 石蒜碱含量测定

2.1.1 色谱条件

Fisher Synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈—磷酸二氢钾水溶液(体积比为10:90),其中磷酸二氢钾水溶液配制为:称取2.72 g 磷酸二氢钾溶于100 mL 去离子水中,加入1.4 mL 三乙胺,磷酸调节pH值至3,定容至1 L。检测波长:290 nm;柱温30 °C;流速1 mL/min。

2.1.2 供试液制备方法

称取25 g 忽地笑鳞茎粉末,倒入体积分数为0.5%的硫酸水溶液,料液比1:10(g:mL),70 °C水浴浸提2.5 h,后超声波处理30 min,重复提取2次,4000 rpm 离心20 min,取上清液。取一定量上清液,NaOH 调节pH值至10,等体积氯仿萃取4次,合并萃取液浓缩,HCl 调节pH值为2,取少量浓缩液过0.45 μm 微孔滤膜作样品待测。

2.1.3 石蒜碱标准品溶液配制

精确称取石蒜碱标准品10.30 mg,定溶于10 mL 容量瓶中,配置成1.030 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.4 线性范围考察

取上述石蒜碱标准品溶液,配置成浓度分别为0.005、0.010、0.020、0.040、0.060、0.080、0.100 mg/mL 的石蒜碱标准品溶液,将标准品各浓度溶液过0.45 μm 微孔滤膜,取20 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图,测定峰面积。以峰面积(Y)对浓度(X)进行回归,得到标准品的回归方程。

2.2 实验对象预处理

2.2.1 分子筛预处理

将一定量的Na型分子筛置于1 mol/L 的NH₄NO₃ 溶液中,80 °C水浴交换3次,每次5 h,交换后的样品置于马弗炉,空气中500 °C焙烧6 h,即得到H型分子筛。

2.2.2 树脂预处理

阳离子树脂用去离子水浸泡过夜,反复用去离子水冲洗至洗出液澄清。加入5倍体积的5% HCl

溶液随时搅拌,浸泡 12 h 左右,将 HCl 溶液倾倒,用去离子水洗至 pH 6~7 为止。加入 5 倍体积的 5% NaOH 溶液并随时搅拌,浸泡 12 h 左右后将 NaOH 溶液倾倒,再用去离子水冲洗至 pH 6~7。最后加入 5 倍量 5% HCl 溶液浸泡 12 h 左右,倾去酸液,用去离子水洗至 pH 6~7,得 H 型阳离子交换树脂。

2.3 静态实验

2.3.1 静态吸附率测定

分别精取处理好的 H 型沸石分子筛(按 2.2.1 制备得)及 D-001、HD-8 阳离子树脂(按 2.2.2 制备得)各 2.00 g,分别置于 40 mL 供试液中(按 2.1.2 中制备得),室温下静态震荡吸附 24 h,吸附完全后,高效液相测定吸附后溶液中生物碱浓度,按式 1-1 计算各个吸附剂对生物碱的吸附率(%):

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{C_0 - C}{C} \times 100\% \quad (1-1)$$

式中: C_0 -起始浓度(mg/mL), C -吸附后浓度(mg/mL)。

2.3.2 静态洗脱率测定

取按 2.3.1 项下吸附饱和的分子筛及树脂,抽滤滤去吸附余液,再将分子筛及树脂分别置于 40 mL 洗脱剂中,其中洗脱剂为含有 1.5 mol/L 氨水的 70% 的乙醇^[15],摇床震荡解吸 24 h,洗脱完全后高效液相测定解吸液中生物碱浓度,按式 1-2 计算生物碱的洗脱率(%):

$$\text{洗脱率}(\%) = \frac{C_2 \times V_2}{(C_0 - C_1) \times V_1} \times 100\% \quad (1-2)$$

式中: C_0 -起始浓度(mg/mL), C_1 -吸附后浓度(mg/mL), C_2 -洗脱液浓度(mg/mL), V_1 -初始体积(mL), V_2 -洗脱液体积(mL)。

2.4 上样液条件选择

试验分别选择 pH 值为 2、4、6 的上样液条件,称取 5.00 g H 型分子筛(按 2.2.1 制备得)室温下静态震荡吸附 24 h,按吸附时间在高效液相色谱仪上检测上样液中石蒜碱浓度。

2.5 洗脱剂的选择

在 2.0 g 吸附饱和的分子筛中,分别加入 50 mL 含各个浓度的氨水的 60% 乙醇以及含 1.5 mol/L 氨水的各个体积分数乙醇的洗脱剂,震荡洗脱 24 h,高效液相色谱仪检测石蒜碱浓度,计算洗脱率。

2.6 工艺重复性实验

取一定量的最优条件的上样液加到有 10.00 g H 型分子筛的锥形瓶中,室温下摇床振荡吸附 24

h,抽滤,往吸附饱和的 H 型分子筛中加入 2 倍于上样液的洗脱剂,室温下摇床震荡洗脱 24 h,高效液相色谱测定石蒜碱浓度,计算其含量。

3 结果与讨论

3.1 检测方法线性范围考察

石蒜碱标准品在浓度范围为:0.005~0.100 mg/mL,高效液相色谱仪检测不同浓度标准品的峰面积,以峰面积(Y)对浓度(X)进行回归,其回归方程为: $Y = 14416X - 4.7821$, $R^2 = 0.9997$,该方程在石蒜碱浓度为 0.005~0.100 mg/mL 内与其峰面积有良好的线性关系。

3.2 静态试验结果

由图 1 图 2 可知,在各分子筛与阳离子树脂吸附性能的对比试验中,ZSM-5 分子筛相对于其它分子筛,吸附及洗脱效果较好,且优于阳离子树脂 D001、HD-8,故选择 ZSM-5 作为主要实验对象。

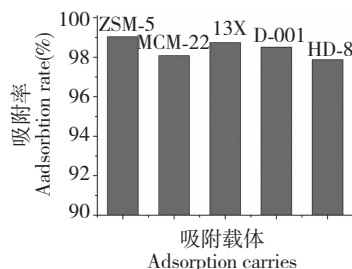


图 1 分子筛及阳离子树脂对石蒜碱的吸附率

Fig. 1 The absorption rate of zeolite molecular sieve and cation resin for lycorine

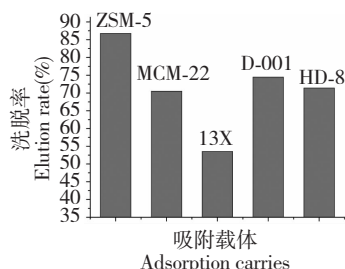


图 2 分子筛及阳离子树脂对石蒜碱的洗脱率

Fig. 2 The elution rate of zeolite molecular sieve and cation resin for lycorine

3.3 上样液条件选择

H 型分子筛与阳离子交换树脂在对生物碱的吸附原理有相似之处,其中决定阳离子交换树脂吸附平衡的重要因素之一是上样液的 pH 值。上样液的 pH 值决定了溶液中游离生物碱与生物碱盐浓度的

大小,从而直接影响阳离子树脂和分子筛的交换效果。由如图3可知,在上样液 pH 值的条件探索试验中,pH 值为 2 和 pH 值为 4 时,分子筛对上样液当中的石蒜碱都能到达较好的吸附效果,且优于 pH 值为 6 的溶液环境。相对于 pH 值为 2 的溶液环境,pH 值为 4 时,ZSM-5 分子筛对石蒜碱的吸附速度较快,故选择上样液 pH 值为 4 作为 ZSM-5 分子筛的吸附条件。

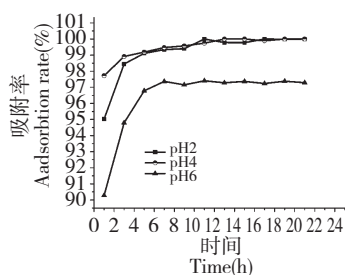


图3 上样液 pH 值对石蒜碱吸附率的影响

Fig. 3 Effects of different pH values of feed solution on adsorption rate of lycorine

3.4 洗脱条件选择

针对分子筛中石蒜碱的洗脱,主要考察了氨水-乙醇体系洗脱剂的洗脱效果,对洗脱剂中氨水的浓度以及乙醇的体积分数进行对比研究,比较不同浓度的氨水及不同体积分数的乙醇的洗脱效果。由图

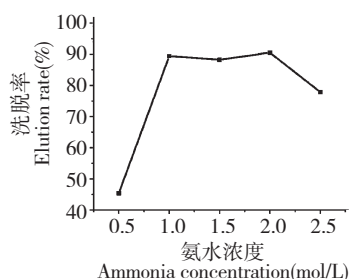


图4 洗脱剂氨水浓度的选择

Fig. 4 The selection of ammonia concentration for elution

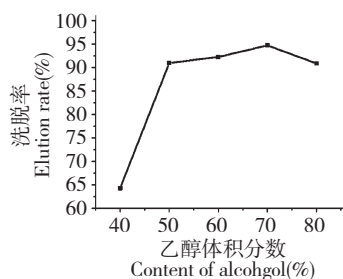


图5 洗脱剂乙醇体积分数的选择

Fig. 5 The selection of ethanol concentration for elution

4、图5可知,在洗脱条件的探索试验中,当氨水浓度为 2.0 mol/L 时,洗脱液对石蒜碱的洗脱效果最好;当乙醇的体积分数为 70% 时,洗脱液对石蒜碱的洗脱效果最好。故选择的石蒜碱洗脱剂的体系为:含有 2.0 mol/L 氨水的 70% 的乙醇。

3.5 工艺重复性试验

在工艺重复性试验中,结果平均每 g ZSM-5 H 型分子筛吸附石蒜碱 1.601 mg,用 250 mL 含 2.0 mol/L 氨水的 70% 的乙醇进行洗脱,其中石蒜碱洗脱率达到 90.35%。旋蒸洗脱液,高效液相测定并计算洗脱液中物质石蒜碱含量,洗脱液干燥物中石蒜碱含量为 40.09%。

4 结论

以 ZSM-5 H 型沸石分子筛作为石蒜碱的吸附载体,上样液最佳 pH 值为 4;洗脱剂的最佳条件为含有 2.0 mol/L 氨水的 70% 的乙醇溶液;重复性试验中,结果平均每 g ZSM-5 H 型分子筛吸附石蒜碱 1.601 mg,洗脱率达到 90.53%,石蒜碱含量为 40.09%,初步说明,沸石分子筛应用于生物碱的富集纯化是可行的。

石蒜碱具有很高的药用价值,但在石蒜中的含量较低,获得困难。本研究首次以沸石分子筛为载体,从石蒜属植物忽地笑提取液中吸附分离石蒜碱,取得了较好的效果,相对于目前研究较多的树脂法,显示了明显的优异性。本研究只说明了沸石分子筛的静态吸附、洗脱的研究,其动态吸附和洗脱能力还需进一步探索。

参考文献

- 1 Yuan JH(袁菊红), Hu MH(胡绵好). A review on germplasm resources of lycoris and its exploitation and utilization. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), 2009, 38(2): 79-84.
- 2 Wu ZP(吴志平), Chen Y(陈雨), Feng X(冯煦), et al. The pharmacological study of alkaloids from *Lycoris radiata* medicinal plant. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2008, 27(5): 26-31.
- 3 Wang H(王欢), Wang YH(王跃虎), Chen LJ(陈丽娟), et al. Research process of alkaloids from *Lycoris*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发). 2012, 24: 691-697.
- 4 Qin KM(秦昆明), Li X(李笑), XU Z(徐昭), et al. A survey of the studies on pharmacological effects of lycorine and its derivatives. *J Beijing Union Univ, Nat Sci* (北京联合大学学报, 自科版), 2009, 23(1): 6-10.