

夏天无生物碱的高速逆流色谱分离纯化

王岱杰 刘建华 耿岩玲 王晓* 段文娟 傅茂润

(山东省科学院山东省分析测试中心, 济南 250014)

摘要 采用 pH 区带精制逆流色谱与常规高速逆流色谱相结合的方法快速分离纯化夏天无总生物碱。利用 pH 区带精制逆流色谱对夏天无总生物碱进行分离, 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:2:8, V/V, 上相加 5 mmol/L 三乙胺, 下相加 5 mmol/L HCl) 为溶剂系统, 上样量 3.0 g, 分离得到 1 个混合物和 3 个高纯度的生物碱单体: 原阿片碱 (375 mg)、苏元胡碱甲 (362 mg) 和比枯枯灵 (246 mg), 其纯度分别为 97.5%, 95.6% 和 97.1%。所得混合物 850 mg 经常规高速逆流色谱二次分离, 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (1:0.8:1:1.1, V/V) 为溶剂系统, 得到比枯枯灵 (105 mg) 和四氢巴马亭 (470 mg) 单体, 纯度分别为 99.1% 和 99.7%。从该药材分得苏元胡碱甲, 两种制备分离模式相结合, 提高了夏天无生物碱的分离效率。

关键词 夏天无; pH 区带精制逆流色谱; 高速逆流色谱; 生物碱

1 引言

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 (*Corydalis decum bens* (Thunb.) Pers.) 的干燥块茎, 具有活血通络, 行气止痛的功效, 主要用于治疗中风偏瘫、跌扑损伤、风湿性关节炎、坐骨神经痛等^[1]。夏天无的主要活性成分为生物碱类化合物, 如原阿片碱、比枯枯灵和四氢巴马亭等^[2,3]。建立主要活性成分的分离制备方法, 对夏天无药材及其产品的质量控制十分必要。传统的柱层析方法存在耗时长、容易造成样品的不可逆吸附、变性及样品回收率低等缺点。高速逆流色谱 (HSCCC) 是一种不用固态载体的液液分配色谱, 它根据样品在两相溶剂中分配系数的不同实现样品的分离, 可有效避免因不可逆吸附引起的样品损失、失活、变性等, 已广泛应用于天然产物的分离和提纯^[4~8]。pH 区带精制逆流色谱 (pH-ZRCCC) 是在 HSCCC 基础上发展起来的特殊分离制备技术, 依据化合物的解离常数 (K_a) 和疏水性的不同而实现分离, 适合于有机酸、有机碱制备性分离, 具有制备量大和分离馏分高度浓缩纯化的特点^[9]。本研究采用 pH 区带精制逆流色谱结合常规高速逆流色谱对夏天无总生物碱进行分离纯化, 快速分离制备出 4 个高纯度的生物碱单体: 原阿片碱、苏元胡碱甲、比枯枯灵和四氢巴马亭 (结构见图 1)。

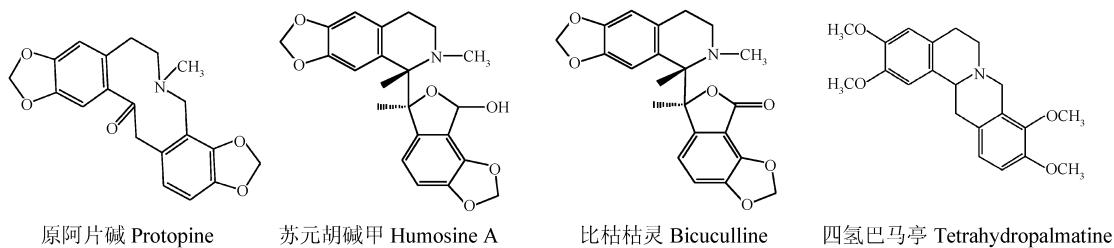


图 1 夏天无中分离出的化合物结构式

Fig 1 Chemical structure of compounds separated from *Corydalis decum bens* (Thunb.) Pers

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

GS10A 高速逆流色谱仪 (北京新技术研究所); S 系列柱塞式泵 (北京圣益通技术开发有限公司);

2009-10-30 收稿; 2010-01-26 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20872083) 和山东省科技攻关 (No. 2008GG2NS2024, BS2009SW047) 资助

* E-mail: wangx@keylab.net

8823B型紫外检测仪(北京宾达英创科技有限公司);Waters600高速液相色谱仪(美国Waters公司);Varian NOVA-600核磁共振波谱仪(美国Varian公司);1100 Series 6320 ion-trap电喷雾离子阱质谱仪(美国Agilent公司)。质谱分析条件:正离子模式,样品通过流动注射泵进样,流速0.2 mL/min,干燥气温度350℃;干燥器流量9.0 L/min,雾化气压强241.33 kPa;毛细管电压4 kV。质量范围m/z 50~1200,实验前质量数经过校正。

夏天无药材购于山东中医药大学中鲁医院,经山东省中医药大学李佳博士鉴定为罂粟科植物伏生紫堇(*Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.)的正品药材;粗提取的制备及分离用溶剂均为分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司);HPLC分析用乙腈为色谱纯(美国天地公司);实验用水为过滤蒸馏水。

2.2 样品制备

取夏天无药材3.0 kg粉碎过20目筛(0.9 mm孔径),加85%乙醇10 L,回流提取3次,每次3 h,过滤,合并滤液,减压回收乙醇得浸膏。用800 mL 1% HCl超声溶解,过滤,以适量石油醚萃取脱脂。脱脂水溶液加稀氨水不断搅拌调节至pH 9.5,沉淀,过滤,得夏天无总生物碱21.3 g,冷藏保存备用。

2.3 两相溶剂系统及样品溶液的制备

pH区带精制逆流色谱溶剂系统为正己烷 乙酸乙酯 甲醇 水(5:5:2:8, V/V),按比例置于分液漏斗中,充分振荡后静止分层,分取上下相。上相加5 mmol/L三乙胺作固定相,下相加5 mmol/L HCl作流动相。3.0 g夏天无总生物碱,用10 mL加碱的上相和10 mL未加酸下相,超声振荡溶解。

常规HSCCC二次分离溶剂系统为正己烷 乙酸乙酯 甲醇 水(1:0.8:1.1:1, V/V),按比例置于分液漏斗中,充分振荡,静止分层,分取上下相。样品用上相和下相各5 mL溶解。

2.4 分离及鉴定

2.4.1 HSCCC分离过程 固定相以9 mL/min流速注满高速逆流色谱仪的螺旋管,转速为800 r/min,样品注入进样圈(常规HSCCC二次分离过程需溶剂系统平衡后进样),同时流动相以2 mL/min流速泵入。开启检测器和记录仪,检测波长为254 nm,根据色谱图收集各色谱峰组分。

2.4.2 HPLC分析及结构鉴定 夏天无生物总碱和高速逆流色谱分离各组分用HPLC分析。Waters C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长为280 nm;流动相为乙腈 乙酸 /乙酸钠缓冲溶液(70:30, V/V, pH 5.0),流速1.0 mL/min,进样量10 μL。

HSCCC各峰组分的结构根据ESI-MS-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR的数据进行鉴定。

3 结果与讨论

3.1 HPLC条件的优化

考察了甲醇水、甲醇乙腈水、乙腈-1%三乙胺和乙腈-0.2 mmol/L乙酸/乙酸钠缓冲溶液(pH 5.0)等作为HPLC流动相时,夏天无粗提物中各组分的分离效果。结果表明:当采用乙腈 乙酸 /乙酸钠缓冲溶液(70:30, V/V, pH 5.0)进行洗脱,流动相的流速为1 mL/min时,可以得到良好分离效果。

3.2 HSCCC分离条件的优化

3.2.1 pH-ZRCCC分离条件的优化 典型的pH区带精制逆流色谱峰为矩形的平台峰,平台区内的产物高度浓缩而杂质峰被浓缩在平台峰的两端^[10]。本实验基本溶剂系统为正己烷 乙酸乙酯 甲醇 水体系,均出现pH区带精制逆流色谱平台,保留率和样品溶解性远大于叔丁基甲醚 正丁醇 乙腈 水体系^[10]。采用正己烷 乙酸乙酯 甲醇 水(5:5:1:9, V/V, 上相加10 mmol/L三乙胺, 下相加10 mmol/L浓HCl)为溶剂系统,虽然出现平台峰,但样品的分离效果不佳(图2A);采用正己烷 乙酸乙酯 甲醇 水(5:5:2:8, V/V, 上相加10 mmol/L三乙胺, 下相加10 mmol/L浓HCl)为溶剂系统,分离效果明显改善。但通过HPLC分析,分离效果仍不理想(图2B);采用降低保留酸碱浓度的方法,提高分离效果,取得了较为满意的分离效果(图2C)。取夏天无生物碱3.0 g,采用溶剂系统正己烷 乙酸乙酯 甲醇 水(5:5:2:8, V/V, 上相加5 mmol/L三乙胺, 下相加5 mmol/L浓HCl)进行分离,在130~246 min得到化合物1原阿片碱(图2C中)375 mg, 288~347 min得到化合物2苏元胡碱甲(图2C中)362 mg, 488~522 min得到化合物3比枯枯灵(图2C中)246 mg, 纯度分别为97.5%, 95.6%和97.1%。在358~484 min得到化合物3

比枯枯灵和化合物 4四氢巴马亭的组成的混合物 762 mg(图 2C中) , HPLC分析见图 3。

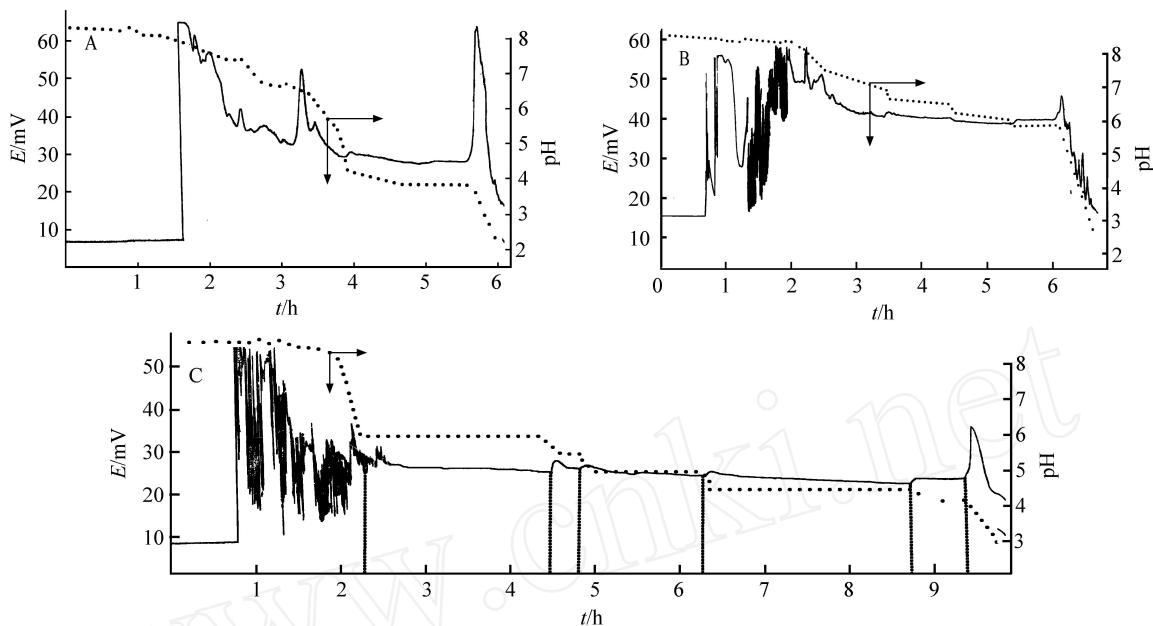


图 2 夏天无生物碱 pH区带精制逆流色谱图

Fig 2 pH-zone refining counter-current chromatography (ZRCCC) separation of extract from *Corydalis decumbens* 溶剂系统 (Solvent system): 正己烷-乙酸乙酯-甲醇水 (*n*-hexane-ethyl acetate-methanol-H₂O), A. 5 5 1 9, V/V, 上相加 10 mmol/L 三乙胺, 下相加 10 mmol/L HCl, 固定相保留率 43% (10 mmol/L TEA in upper organic stationary phase and 10 mmol/L HCl in lower aqueous phase; retention of stationary phase: 43%); B. 5 5 2 8, V/V, 上相加 10 mmol/L 三乙胺, 下相加 10 mmol/L HCl, 固定相保留率 48% (10 mmol/L TEA in upper organic stationary phase and 10 mmol/L HCl in lower aqueous phase; retention of stationary phase: 48%); C. 5 5 2 8, V/V, 上相加 5 mmol/L 三乙胺, 下相加 5 mmol/L HCl, 固定相保留率 41% (5 mmol/L TEA in upper organic stationary phase and 5 mmol/L HCl in lower aqueous phase; retention of stationary phase: 41%)。上样量 (sample size): 3.0 g。

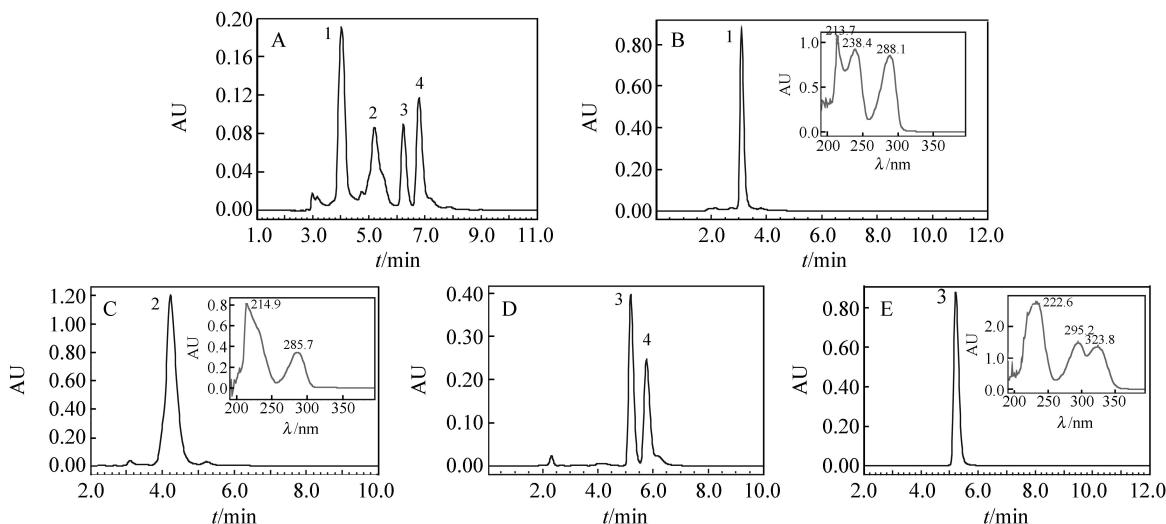


图 3 夏天无总生物碱和 pH区带逆流色谱分离组分 HPLC图 (A:总生物碱; B:图 2C中组分 ; C:图 2C中组分 ; D:图 2C中组分 ; E:图 2C中组分)

Fig 3 Results of HPLC analyses of crude alkaloids extracted from *C. decumbens* and purified by pH-ZRCCC fractions(A: Crude sample; B: peak in Fig 2C; C: peak in Fig 2C; D: peak in Fig 2C; E: peak in Fig 2C)。

3.2.2 常规 HSCCC 分离比枯枯灵和四氢巴马亭 应用常规 HSCCC, 对上述的混合物进行二次分离。

首先,应用HPLC测定了目标组分在不同溶剂系统中的分配系数(见表1)。从表1可见,正己烷-乙酸乙酯-甲醇水(6:3:2:5, V/V)中的分配系数过大,用该溶剂系统分离时需要很长时间才能将目标化合物洗脱出来。而在正己烷-乙酸乙酯-甲醇水(1:0.6:1.2:1, V/V)溶剂系统中分配系数太小,化合物很容易随溶剂前沿被洗脱出来,而难以被分开。溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇水(1:0.8:1.1:1, V/V)的分配系数大小适合分离。从850 mg混合物经常规HSCCC分离得到比枯枯灵105 mg和四氢巴马亭470 mg,其纯度分别达到99.1%和99.7%,HPLC分析见图4。由此可见,综合应用两种模式的HSCCC,可以实现夏天无生物碱的快速分离纯化。

表1 比枯枯灵和四氢巴马亭的分配系数和分离度

Table 1 Partition coefficients and resolution of bicuculline and tetrahydropalmatine

正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水 <i>n</i> -Hexan-ethylacetate-methanol-water (V/V)	分配系数 K		分离度 Resolution	正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水 <i>n</i> -Hexan-ethylacetate-methanol-water (V/V)	分配系数 K		分离度 Resolution
	峰3 Peak 3	峰4 Peak 4			峰3 Peak 3	峰4 Peak 4	
6:3:2:5	3.9	3.6	1.1	1:0.8:1.1:1	1.7	1.2	1.4
1:0.6:1.2:1	0.3	0.5	1.7	1:0.8:1.2:1	0.9	0.7	1.3

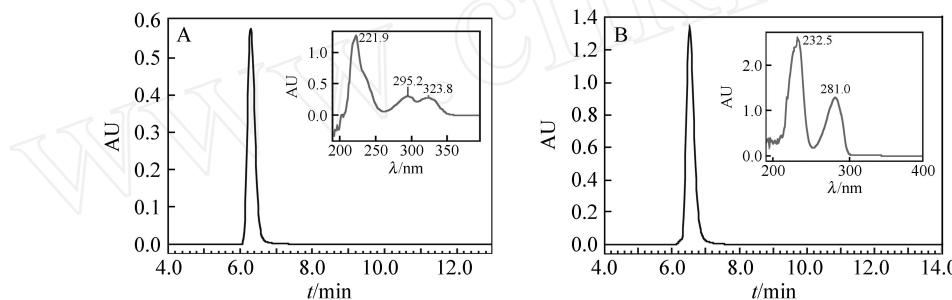


图4 比枯枯灵和四氢巴马亭的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of bicuculline and tetrahydropalmatine

A. 比枯枯灵(Bicuculline); B. 四氢巴马亭(Tetrahydropalmatine)。

3.3 HSCCC峰组分的鉴定

化合物 : UV max^{EOH} : 213.7, 238.4, 288.1, ESI-MS-MS: 353.3 [M + H]⁺, ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) : 6.90 (1H, s, H-1), 6.69 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-12), 6.66 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-11), 6.64 (1H, s, H-4), 5.95 (2H, s, O—CH₂—O), 5.92 (2H, s, O—CH₂—O), 3.80 (2H, br, H-13), 3.59 (2H, br, H-8), 2.91 (2H, br, H-5), 2.56 (2H, br, H-6), 1.93 (3H, s, NCH₃)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) : 194.7 (C-14), 148.0 (C-3), 146.3 (C-2), 146.0 (C-9), 145.9 (C-10), 136.0 (C-4a), 132.7 (C-14a), 128.9 (C-12a), 125.0 (C-12), 117.8 (C-8a), 110.5 (C-4), 108.1 (C-1), 106.8 (C-11), 101.2 (O—CH₂—O), 100.9 (O—CH₂—O), 57.8 (C-6), 50.9 (C-8), 46.4 (C-13), 41.5 (NCH₃), 31.7 (C-5)。与文献[11, 12]比较,鉴定为原阿片碱(Protopine)。

化合物 : UV max^{EOH} : 214.9, 285.7, ESI-MS-MS: 370.4 [M + H]⁺, ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) : 2.47 (3H, s, NCH₃), 2.39 (2H, m, H-5), 2.71 (2H, m, H-6), 3.86 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-8), 5.29 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-9), 5.94 (1H, s, O—CH₂—O), 5.97 (1H, s, O—CH₂—O), 5.99 (1H, s, O—CH₂—O), 6.01 (1H, s, O—CH₂—O), 6.34 (1H, s, HO—CH—), 6.58 (1H, s, H-4), 6.80 (1H, s, H-1), 6.54 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 6.59 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) : 22.2 (C-5), 44.0 (NCH₃), 45.8 (C-6), 64.8 (C-8), 87.0 (C-9), 97.9 (HO—CH—), 101.0 (O—CH₂—O), 101.8 (O—CH₂—O), 107.6 (C-4), 108.4 (C-1), 108.7 (C-3), 113.9 (C-2), 123.9 (C-4a), 124.0 (C-6), 128.5 (C-8a), 133.0 (C-1), 141.5 (C-5), 146.4 (C-2), 146.6 (C-3), 148.2 (C-4)。与文献[13, 14]比较,鉴定为苏元胡碱甲(Humosine A)。

化合物 : UV max^{EOH} : 221.9, 295.2, 323.8, ESI-MS-MS: 368.3 [M + H]⁺, ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) : 6.90 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 6.56 (1H, s, H-5), 6.43 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, d, J = 8.4 Hz,

H-2), 6.10(2H, s, O—CH₂—O), 5.87(2H, s, O—CH₂—O), 5.55(1H, d, *J*=3.6, H-9), 4.03(1H, d, *J*=3.6Hz, H-1), 2.51(3H, s, NCH₃)。与文献[15]比较, 鉴定为比枯枯灵(Bicuculline)。

化合物: UV_{max}^{EOH}: 232.5, 281.0, ESI-MS-MS: 356.4[M+H]⁺。¹H-NMR(600MHz, CDCl₃): 6.89(1H, d, *J*=8.4Hz, H-12), 6.80(1H, d, *J*=7.8Hz, H-11), 6.74(1H, s, H-1), 6.62(1H, s, H-4), 6.69(1H, d, *J*=7.8Hz, H-12), 6.69(1H, d, *J*=7.8Hz, H-12), 6.69(1H, d, *J*=7.8Hz, H-12), 6.69(1H, d, *J*=7.8Hz, H-12)。¹³C-NMR(150MHz, CDCl₃): 150.3(C-9), 147.5(C-2), 147.4(C-3), 145.0(C-10), 129.6(C-14a), 128.6(C-12a), 127.7(C-8a), 126.8(C-4a), 123.9(C-12), 111.3(C-4), 110.9(C-11), 108.5(C-1), 60.2(C-14), 59.3(O—CH₂—O), 56.1(O—CH₂—O), 55.9(O—CH₂—O), 55.8(O—CH₂—O), 54.0(C-8), 51.5(C-6), 36.3(C-13), 29.1(C-5)。与文献[16]比较, 鉴定为四氢巴马亭(Tetrahydropalmatine)。

References

- Editorial Committee of The Pharmacopoeia of People's Republic of China (国家药典委员会编). *The Pharmacopoeia of People's Republic of China (Part)* (中华人民共和国药典(一部)) Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2005: 197
- CHEN Rong (陈荣), YANG Shao-Hua (杨少华), TANG Xiao-Ling (唐晓玲). *Chinese Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(12): 948~949
- LIAO Jing (廖静), LIANG Wen-Zao (梁文藻), TU Guo-Shi (涂国士). *Chinese J. Pharm. Sci.* (中国药学(英文版)), 1995, 4(2): 57~61
- Chen L, Yang F Q, Zhang T Y. *J. Chromatogr A*, 2001, 912(1): 181~185
- ZHAO Shu-Jie (赵淑杰), HAN Mei (韩梅), HAN Zhong-Ming (韩忠明), LI Yan-Ying (李彦颖), YANG Li-Min (杨利民). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2009, 37(9): 1354~1358
- ZHANG T Y, in: Berthod A (Eds). *Countercurrent Chromatography-The Support-Free Liquid Stationary Phase*. Elsevier, Amsterdam, 2002: 201~260
- LIU Jian-Hua (刘建华), ZHAO Shan-Cang (赵善仓), WANG Xiao (王晓), GENG Ling (耿岩玲), LI Fu-Wei (李福伟). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2008, 36(7): 964~966
- PENG Jin-Yong (彭金咏), XU Li-Na (许丽娜), Han Xu (韩旭), Xu You-Wei (许有威), QI Yan (齐艳), XU Qi-Wei (徐奇伟). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2007, 35(10): 1444~1448
- CAO Xue-Li (曹学丽). *HSCCC Technology and Application* (高速逆流色谱分离技术及应用). Beijing: Chemical Industry Press (中国化工出版社), 2005: 3
- Ito Y. In: *High-Speed Countercurrent Chromatography*. Wiley, New York, 1996: 121~175
- Wang X, Geng Y L, Li F W, Shi X G, Liu J H. *J. Chromatogr A*, 2006, 1115(1-2): 267~270
- Wynne P M, Vine J H, Amiet R G. *J. Chromatogr B*, 2004, 811(1): 85~91
- WU Ai-Xue (吴爱学), YANG Wei-Xing (杨卫星), ZHOU Jin-Yun (周金云). *Chinese Tradit Herb Drugs* (中草药), 1988, 19(9): 5~7
- Kathleen S R, Robert E G. *J. Org. Chem.*, 1991, 56(4): 1564~1569
- LIU Chuan (刘川), ZHAO Shou-Xun (赵守训). *J. Shenyang Pharm. Uni* (沈阳药科大学学报), 1989, 20(5): 261~265
- XU Xiang-Hong (许翔鸿), WANG Zheng-Tao (王峥涛), YU Guo-Dian (余国奠), YUAN Bi-Fang (阮碧芳), LI Jun (李军). *Chinese Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 483~486

Separation of Alkaloids from *Corydalis Decumbens* (Thunb.) Pers by High Speed Counter-Current Chromatography

WANG Dai-Jie, LI Jian-Hua, GENG Yan-Ling, WANG Xiao*, DUAN Wen-Juan, FU Mao-Run

(Shandong Analysis and Test Center, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014)

Abstract A method was established for the separation and purification of alkaloids from the crude extract of *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers using high speed counter-current chromatography (HSCCC) with two modes. First, pH-zone-refining counter-current chromatography was successfully performed with a two-phase solvent system, *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water (5:5:2:8, V/V), in which 5 mmol/L triethylamine in the organic stationary phase and 5 mmol/L hydrochloric acid in the aqueous mobile phase. From 3.0 g of crude extract, a mixture and three compounds, with 375 mg protopine (1), 362 mg humosine A (2) and 246 mg bicuculline (3) were obtained with purities of 97.5%, 95.6% and 97.1%, respectively. And then, the mixture was separated by HSCCC with the two-phase solvent system composed of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water (1:0.8:1.1:1, V/V). Bicuculline (105 mg) and tetrahydropalmatine (470 mg) were obtained from 850 mg mixture. Among them, humosine A was isolated from *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers for the first time. pH-Zone refining counter-current chromatography combined with routine HSCCC improved the separation efficiency of alkaloids from crude *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.

Keywords *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers; pH-Zone refining counter-current chromatography; High speed counter-current chromatography; Alkaloids

(Received 30 October 2009; accepted 26 January 2010)

第十五届冶金及材料分析测试学术报告会征稿通知

作为国内外冶金及材料分析测试技术、冶金制造流程优化与产品优化的过程检测及质量控制等技术交流的盛会,第十五届冶金及材料分析测试学术报告会及展览会将于2010年9月12~15日在北京举行。会议由中国金属学会(CSM)与中国机械工程学会(CMES)主办,国际钢铁工业分析委员会(ICASI)支持。热忱欢迎冶金、材料、矿山、化工、机械、地质、环保、外贸、国防、商检等单位、部门或院校从事冶金及材料分析、无损检测、物理检测和力学性能测试等工作的技术人员及管理者踊跃投稿,积极参加。

时间/地点:2010年9月12~15日,北京·九华山庄

征稿范围:征稿范围包括:试样前处理及湿法分析、等离子光谱、等离子质谱、原子吸收光谱、原子荧光光谱、火花光谱、激光光谱、辉光光谱、辉光质谱、X荧光光谱、材料气体分析、状态分析、原位统计分布分析、材料表面/界面分析、冶金过程在线及环境分析、微束分析、材料微观解析、失效分析及动态断裂、力学试验、物性分析、无损检测、实验室管理与质量控制等。

论文截止日期:2010年6月30日。论文格式参考《冶金分析》投稿须知。请提供作者简介、工作单位(全称)、详细通讯、邮编、电话、E-mail。论文提交请登陆:<http://journal.yejinfenxi.cn> 注意标明稿件类型为“2010年会论文”

联系方式:中国金属学会分析测试分会秘书处

地址:北京海淀区学院南路76号14信箱,邮编:100081

电话:010-62182398;010-62188330传真:010-62181163

E-mail:csm@analysis.org.cn;yejinfenxi@163.com