

pH 区带逆流色谱法分离三尖杉生物碱

姜华, 杜琪珍, 王奎武, 修丽丽

(浙江工商大学食品与生物工程研究所, 杭州 310035)

摘要 目的: 利用 pH 区带逆流色谱法 (pH-zone-refining countercurrent chromatography) 对三尖杉生物碱进行分离。方法: 将三氟乙酸加入乙酸乙酯-石油醚-水 (3:1:4) 溶剂系统的上相 (固定相) 作为保留剂, 用含 10% 氨水、中性和含三氟乙酸的下相 (流动相) 依次进行梯度洗脱, 取得了较好的分离效果。结果: 1 次分离可进样 500 mg 分离得到 4 组三尖杉生物碱, 其中 2 组经核磁共振 (NMR) 分析为三尖杉碱和乙酰三尖杉碱。经 HPLC 分析, 2 种生物碱的纯度分别为 95.4% 和 98.9%。结论: pH 区带逆流色谱法是一种较好的三尖杉生物碱分离方法。

关键词: 三尖杉; 生物碱; pH 区带逆流色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0188-04

Separation of alkaloids from *Cephalotaxus fortunei* by pH-zone-refining countercurrent chromatography

JIANG Hua, DU Qi-zhen, WANG Kui-wu, XIU Li-li

(Institute of Food Biological Engineering Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310035, China)

Abstract Objective Separation of cephalotaxine-type alkaloids in *Cephalotaxus fortunei* by pH-zone-refining countercurrent chromatography was studied in this paper. **Method** Trifluoroacetic acid was added to the stationary phase of a solvent system composed of acetate-light petroleum-water (3:1:4) as a retainer, cephalotaxine-type alkaloids were eluted by step-gradient elution with 10% ammonia water, water and trifluoroacetic acid orderly. **Result** In each separation, 500 mg crude sample can be successfully separated into 4 sections of cephalotaxine-type alkaloids in which two were acetylcephalotaxine and cephalotaxine identified by ^1H and ^{13}C NMR. The purity of the two alkaloids was 95.4% and 98.9%. **Conclusion** It is a good way to separate the alkaloids from *Cephalotaxus fortunei* by pH-zone-refining countercurrent chromatography.

Key words *Cephalotaxus fortunei*, alkaloids, pH-zone-refining countercurrent chromatography

生物碱是一类具有生理活性的物质, 是许多药用植物的有效成分之一。三尖杉的枝、叶、根、种子中均含有生物碱, 其中三尖杉碱型生物碱与抗癌有密切关系, 含量也较高, 是三尖杉中的主要成分。三尖杉植物的主产国在我国, 主要分布在云南、海南等地。过度的砍伐和利用使我国的三尖杉资源几近匮乏^[1]。为了更有效地开发利用三尖杉资源, 本实验采用 pH 区带逆流色谱法 (pH-zone-refining countercurrent chromatography) 对三尖杉生物碱进行分离, 得到三尖杉碱 (cephalotaxine) 和乙酰三尖杉碱 (acetylcephalotaxine) 2 种物质。这对提高有限资源的利用, 具有十分重要的意义。

1 试药与仪器

1.1 原料 三尖杉粗总生物碱, 总生物碱含量为 12% ~ 20%, 其中三尖杉碱约占总碱的一半。

1.2 试剂 甲醇, 德国默克 (Merck); 石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷 (分析纯), 杭州汇普化工仪器有限公司; 水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

1.3 仪器 高速逆流色谱仪 (HSCCC-D390), 浙江工商大学; 泵 (K-1800), 德国 Knauer 公司; BCHI Fraction Collector B-684 德国 BCHI 公司; 高效液相色谱仪 (SPD-20A), 日本岛津; NMR 仪 (AVANCE DMX 500), 德国 Bruker 公司; GF254 铝箔 TLC 板, 20 cm × 20 cm, 德国 Merck 公司。

2 试验方法

2.1 总生物碱的制备 将三尖杉的枝叶根用氨水碱化, 95%乙醇浸泡 24 h 渗漉, 直至无色。把此渗漉液减压过滤, 并用旋转蒸发器回收乙醇, 得深褐色浸膏。在浸膏中加入等体积 2% 盐酸, 充分搅拌后常压过滤, 弃去不溶物。用氯仿萃取稀酸液, 弃去氯仿后的滤液用氢氧化钾溶液调 pH 为 9.6。再用氯仿萃取此碱液, 弃去碱水液。将氯仿液旋蒸浓缩, 得深褐色固体, 即为粗总生物碱。总生物碱含量为 12% ~ 20%, 其中三尖杉碱约占总碱的一半。

2.2 溶剂系统准备 溶剂系统以乙酸乙酯-石油醚-水 (3: 1: 4) 的比例配制。在室温下, 将其在分液漏斗中混合均匀, 静置分层后即可使用。上相 (固定相) 主要为乙酸乙酯和石油醚, 下相 (流动相) 主要是被上相饱和过的水。在固定相中加入 0.05% 三氟乙酸作为保留酸, 流动相则在下相的基础上, 分别添加 10% 氨水、不添加洗脱酸碱和添加 0.01% 三氟乙酸。

2.3 pH 区带逆流色谱法

高速逆流色谱仪操作步骤: 在 20 mL 流动相中加入 500 mg 样品, 充分振荡, 使样品完全溶解, 注入三通进样阀。将固定相以一定的流速充满色谱柱, 然后将柱的首段与三通进样阀相接。开启速度控制器, 当转速达到 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速泵入流动相, 并通过三通进样阀进样。当流动相从色谱柱流出时用部分收集器按每试管 8 mL 收集^[2]。

更换 pH 梯度流动相原则: 当某一梯度下所有物质分离完成, 即薄层层析点板后未显色, 则换下一梯度继续洗脱, 直至所有组分完全分离。样品分离结束后, 根据薄层层析的分析结果, 将各单点组分分别收集和浓缩干燥, 用 HPLC 测定单点组分的纯度。

2.4 薄层色谱 (TCL) 检测 展开剂: 氯仿-水 (7: 0.5)。显色剂: 碘蒸气。将各试管洗脱液在 TLC 板上展开, 观察比较显色后的斑点颜色和展板高度。

2.5 HPLC 条件 YMC-Pack ODS-AQ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。流动相: 甲醇 - $0.0008 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2 \text{CO}_3$ 溶液 (58: 42)。柱温 35 °C; 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 290 nm。进样量 10 μL。

2.6 NMR 条件 采用核磁共振 (^1H ^{13}C -NMR) 对纯度较高组分进行光谱测试。样品以氘代氯仿 (CDCl_3) 溶解。

3 结果与分析

3.1 pH 区带逆流色谱法分离结果

三尖杉生物碱在碘蒸气中显色后, 呈紫红色。经 pH 区带逆流色谱法分离后, 不同类型生物碱在 TLC 板上呈现的高度和颜色不尽相同, 结果见图 1。

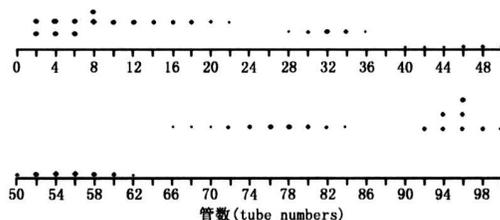


图 1 pH 区带逆流色谱法 TLC 分离结果

Fig 1 TLC analysis of fractions from pH-zone countercurrent chromatography separation

图中 1~40 管为流动相中含 10% 氨水的洗脱液, 40~84 为中性流动相洗脱液, 90~100 管流动相中含 0.01% 三氟乙酸的洗脱液。由图可以看出生物碱重叠较少, 得到了较好分离, 且分离得到 4 组三尖杉生物碱。结果表明, pH 区带逆流色谱法能够较好地分离三尖杉生物碱。

3.2 HPLC 分析 对 pH 梯度高速逆流色谱法分离得到的各单点组分用 HPLC 进行纯度分析。由色谱图可知, 所得 40~62 管和 91~92 管组分表现为单一的色谱峰 (图 2), 且纯度很高, 分别达到 95.4% 和 98.9% (面积归一法)。将收集的 40~62 管和 91~92 管洗脱液浓缩干燥, 得到组分 A 32.6 mg 和组分 B 12.6 mg。

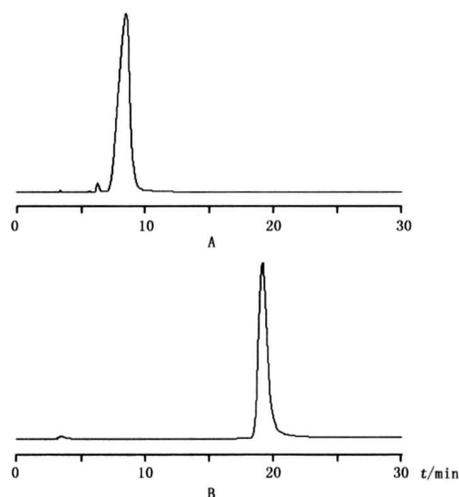


图 2 组分 A 和 B 的 HPLC 谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of component A and B

3.3 NMR 分析 表 1、表 2 分别是组分 A 和 B 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 归属。组分 A 的 ^1H NMR 中,

信号峰 δ_{H} 6.67 和信号峰 δ_{H} 6.64 为单峰 (各 1H), 为苯环上的对位质子 (H_{14} 和 H_{17}); 信号峰 δ_{H} 5.90 为单峰 (2H), 为苯环上 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 基团的 2 个 H; δ_{H} 4.92 为单峰 (1H), 没有相邻 C 上的 H 与之耦合, 为双键 C-1 上的 H; δ_{H} 4.75 双峰 (1H) 与 δ_{H} 3.67 双峰 (1H) 耦合 ($J=9.5$), 分别归属 C-3 和 C

4。再由 ^{13}C NMR 图谱 (归属见表 2) 及其他相关谱可确定其为三尖杉碱。同样, 组分 B 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 数据与乙酰三尖杉碱的数据^[4] 完全吻合。三尖杉碱和乙酰三尖杉碱的化学结构如图 3 所示。

表 1 生物碱 A 和 B 的 ^1H NMR 数据 (500 MHz, CDCl_3)

Tab 1 ^1H NMR spectrum data of alkaloids A and B

生物碱 (alkaloids)	不同位置的 H 的化学位移 [chemical shift (δ)]							
	1	3	4	14	17	18 a	18 b	1'
A	4.92 s	4.75 d (9.5)	3.67 d (9.5)	6.67 s	6.64 s	5.90 s	5.90 s	
B	4.99 s	5.73 d (9.5)	3.76 d (9.5)	6.56 s	6.53 s	5.82 d (8)	5.82 d (8)	1.52 s

注 (note): 括号内为耦合常数 (The datum in the brackets are the coupling constants)

表 2 生物碱 A 和 B 的 ^{13}C NMR 数据 (500 MHz, CDCl_3)

Tab 2 ^{13}C NMR spectrum data of alkaloids A and B

C	化学位移 [chemical shift (δ)]		C	化学位移 [chemical shift (δ)]	
	A	B		A	B
1	97.42	100.97	12	127.93	131.95
2	160.87	159.48	13	134.09	126.77
3	73.30	74.37	14	112.63	113.52
4	57.81	57.54	15	146.89	147.14
5	70.99	72.26	16	146.09	146.06
6	43.19	41.74	17	110.34	109.79
7	20.22	19.62	18	100.92	100.97
8	53.70	53.36	19	57.24	57.54
10	48.41	47.89	1'		170.12
11	31.48	30.07	2'		20.09

4 讨论

4.1 三尖杉生物碱分离方法选择 三尖杉生物碱具有抗肿瘤功能, 且属于稀缺物种。因此, 摸索高效的三尖杉生物碱提纯分离技术, 对提高有限资源的利用, 具有十分重要的意义。但目前国内常采用的分离方法一般为酸碱梯度分离、氧化铝 (或硅胶) 柱层析, 结合逆流分配法反复分离^[5]。该方法流程长、操作烦琐, 分离效率较低, 而且大量有机溶剂难以回收利用, 易对环境造成污染。而本实验采用的 pH 区带逆流色谱法是在普通制备型高速逆流色谱的基础上发展起来的^[6]。其利用待分离有机酸碱的酸 (碱) 解离常数及疏水性的不同进行分离。其分离容量大、分离纯度和效率高等优点, 对天然产物有效成分的分离具有很大的优势, 被广泛用于生物碱的提取和分离。经实验证明, 利用 pH 区带逆流色谱法对三尖杉提取物进行分离纯化后, 得到了三尖杉碱和乙酰三尖杉碱 2 种高纯度的三尖杉碱类化合物, 这对三尖杉生物碱的有效开发利用有一定的现实意义, 是一种极具潜力的工业化生产三尖杉生物碱的方法。

4.2 pH 区带逆流色谱法溶剂系统选择 逆流色谱分离效果主要取决于各组分的分配系数的差异。实验尝试了用常规溶剂系统乙酸乙酯-石油醚-水溶液 (3:1:4) 进行分离, 结果发现生物碱种类重叠严重, 分离效果很不理想。在此溶剂系统的基础上, 改变溶剂的比例及添加甲醇等组分均未能取得好的结果。基于三尖杉生物碱的结构特点, 并根据各组分的分配系数, 采用 pH 梯度进行洗脱, 使得部分生物碱在碱性条件下洗脱下来的同时, 有一部分生物碱能被保留下来, 从而得到较好的分离效果。因此, 溶剂系统最终为乙酸乙酯-石油醚-水 (3:1:4), 上

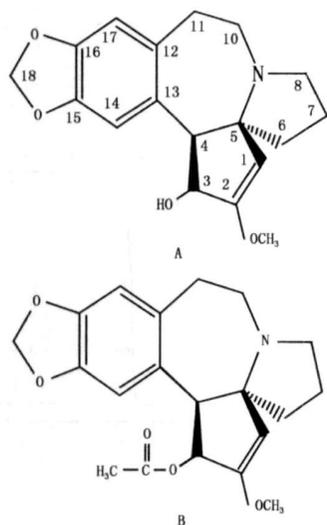


图 3 三尖杉碱 (A) 和乙酰三尖杉碱 (B) 的化学结构

Fig 3 Structures of cephalotaxine (A) and acetylcephalotaxine (B)

相作固定相,流动相则在下相的基础上依次添加 10% 氨水、不添加和添加 0.01% 三氟乙酸,进行梯度洗脱。

参考文献

- 1 FU Li-guo(傅立国). The study of the cephalotaxus (三尖杉属的研究). *Acta Phytotaxon Sin*(植物分类学报), 1984, 22(4): 277
- 2 YUAN Li-ming(袁黎明), FU Ruo-nong(傅若农), ZHANG Tian-you(张天佑). Application of high speed countercurrent chromatography in separations of effective components of natural products (高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1998, 18(1): 60
- 3 GENG Ying-ying(耿莹莹), JUE Hui-qing(厥慧卿), DENG Si-shan(邓思珊), *et al*. Determination of homoharringtonine in the cul-

tered tissue of plant by HPLC (高效液相色谱法测定组织培养株中高三尖杉脂碱的含量). *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2006, 41(3): 238

- 4 ZHU Yun-xia(朱云霞), HOU Wei(侯卫), LIM ing(李明), *et al*. Isolation and identification of alkaloids from *Cephalotaxus fortunei* by HPLC (福建三尖杉中生物碱的高效液相分离与鉴定). *J Fudan Univ(Nat Sci)*(复旦学报自然科学版), 2004, 43(6): 1124
- 5 ZHANG Feng-xian(张凤仙), WANG Zhu-hao(王铸豪), PAN Wen-dou(潘文斗), *et al*. A study on the antitumor plant *Cephalotaxus oliveri* Mast(抗癌植物篮子三尖杉的研究). *Acta Bot Sin*(植物学报), 1978, 20(2): 129
- 6 Ito Y, Ma Y. pH-Zone-refining countercurrent chromatography. *J Chromatogr A*, 1996, 753(1): 1

(本文于 2008 年 7 月 15 日收到)

药物非临床安全评价科研项目 获 2008 年度国家科学技术进步二等奖

2009 年 1 月 9 日上午,中共中央、国务院在人民大会堂隆重举行 2008 年度国家科学技术奖励大会,奖励取得重大科技成果的科研人员。党和国家领导人胡锦涛、温家宝、李长春、习近平、李克强出席大会并为获奖代表颁奖。

中国药品生物制品检定所为独立完成单位完成的“符合国际 GLP 标准的药物非临床安全评价平台关键技术的建立与应用”项目(主要完成人:桑国卫、王军志、李波、邢瑞昌、王秀文、沈连忠、李佐刚、李保文、霍艳、孟建华等)获 2008 年度国家科学技术进步二等奖。该项目负责人全国人大副委员长桑国卫院士出席大会并在主席台就坐。项目主要完成人王军志研究员参加了颁奖大会。

该项目组历经十余年的潜心研究,通过国际合作,引进国际 GLP 标准,整合毒理、药理、病理、分析等多学科技术力量,率先在国内创建了符合国际 GLP 标准的安全评价技术体系,并先后通过国家 GLP 认证、日本 JCA 认证和国际 AAALAC 认证,为目前国内唯一获得国际认可的安全评价机构。已按照 OECD 美国 FDA 标准完成了 64 项国外委托及国内一类药物的安全性研究,改变了我国没有符合国际 GLP 标准的药物安全评价技术体系的状况,使我国在该领域的研究水平已基本与国际相一致。并在甲氨蝶呤、鱼腥草、欣弗等重大药物不良事件的应对与技术处置中,发挥平台技术优势,及时、准确确定药害原因,为不良事件的科学分析及行政执法提供了重要依据,保障了公众用药安全。

(中国药品生物制品检定所科研处供稿)