

文章编号:1001-6880(2015)1-0077-03

高速逆流色谱分离纯化雷公藤中的雷公藤红素

樊希望^{1,2}, 梁上疆¹, 杜传荣², 刘俊琪², 王建平¹, 韦万兴^{2*}¹南宁市化工研究设计院, 南宁 530022; ²广西大学化学化工学院, 南宁 530004

摘要:以雷公藤植物粗提物为原料,建立了高速逆流色谱分离纯化雷公藤红素的分离纯化方法。优化了两相溶剂体系的组成及配比。优化后的分离纯化溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水,其体积之比为2:3:3:2(上相为固定相,下相为流动相),实验温度为室温,主机转速为800 rpm,正向洗脱,流动相流速为2.0 mL/min。目标产物的分离时间较短、产品纯度高(97.5%)、分离过程稳定。

关键词:高速逆流色谱(HSCCC);雷公藤红素;雷公藤

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.016

Preparation of Celastrol from *Tripterygium wilfordii* Hook. F. by High-speed Countercurrent Chromatography

FAN Xi-wang^{1,2}, LIANG Shang-jiang¹, DU Chuan-rong², LIU Jun-qi², WANG Jian-ping¹, WEI Wan-xing^{2*}¹Nanning Chemical Industrial Research & Design Institute, Nanning 530022, China;²School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: A single-step preparative high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) method was developed for the separation and purification of celastrol from the extract of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. (TWHF). The results showed that under the selected solvent system (n-hexane / ethyl acetate / methanol / water = 2:3:3:2, V/V/V/V, heavy phase as mobile phase and light phase as stationary phase), flow rate of the mobile phase (2.0 mL/min) and clockwise rotation, the mentioned compound was effectively separated at 25.0 °C in rotational speed of 800 rpm. The developed HSCCC method was quick, stable and efficient.

Key words: High-speed countercurrent chromatography; celastrol; *Tripterygium wilfordii* Hook. F.

雷公藤 [*Tripterygium wilfordii* Hook. F. (TWHF)]是卫矛科(Celastraceae)雷公藤属木质藤本植物,主要分布于我国长江流域以南山区和东北长白山区^[1]。雷公藤作为一种传统中药在我国已有几千年的药用历史,最早见于《神农本草经》,名莽草,在《纲目拾遗》中有详细记载,又称山砒霜、断肠草、南蛇藤。作为药物,雷公藤主要用于治疗类风湿性关节炎和某些皮肤病^[2,3]。自上世纪60年代开始雷公藤制剂用于治疗炎症、癌症、麻风病、慢性肾炎、系统性红斑狼疮等^[4-8]疾病。雷公藤中主要含有倍半萜、二萜、三萜化合物及少量木质素和其他化合物。本实验利用硅胶柱色谱法对提取物进行粗分,得到的部位经高速逆流色谱分离得到3个主要成分部位,第1个部位析出单晶,经鉴定为二萜化合

物-雷酚内酯异构体^[9],第3个部位析出红色片状晶体,经鉴定为雷公藤红素。

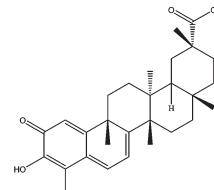


图1 雷公藤红素的分子结构

Fig. 1 Chemical structure of celastrol

1 仪器与材料

高速逆流色谱系统:TBE-300A 高速逆流色谱主机,TBP-50A型恒压恒流泵,TC-1050型恒温循环器、溶剂选择系统(上海同田生物技术有限公司);N (VI) 2000 色谱数据工作站[浙江大学智达信息工程有限公司,赛智科技(杭州)有限公司];8823B型紫外检测仪(北京宾达英创科技有限公司);Rigaku

收稿日期:2014-04-08 接受日期:2014-11-10

基金项目:广西科学与研究开发计划项目(0992003A-14);广西研究生教育创新计划项目(2008105930703M091)

*通讯作者 Tel:86-771-3233718;E-mail:wxwei@gxu.edu.cn

SPIDEK X-单晶衍射仪(日本 Rigaku Inc); KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司); P341LC 型自动旋光仪(德国 Perkin Elmer 公司); Nicolet Nexus 470 FT-IR 红外光谱仪(美国 Nicolet 公司); QP5050A 型 GC-MS(日本岛津); UV2501 紫外可见分光光度计(SHIMADZU); Varian VNMRS 600 MHz 傅立叶变换超导核磁共振仪(美国 Varian 公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); SHZ-D(Ⅲ) 循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司); RE-52A 旋转蒸发仪(河南巩义市英峪予华仪器厂)。硅胶 GF₂₅₄、硅胶 200~300 目(青岛海洋化工厂)。所用试剂均为分析纯。

雷公藤药材采自广西中药材市场,由西北大学生命科学学院倪士峰博士鉴定,标本(080601)收藏于本实验室。

2 提取与分离纯化

雷公藤原材料 5 kg, 用乙醇在常温下浸泡两周, 抽取滤液并浓缩得到总浸膏 400 g。总浸膏用热水分散后依次用乙酸乙酯、异戊醇萃取, 用旋转蒸发仪浓缩, 分别得到乙酸乙酯部位浸膏, 异戊醇部位浸膏及水部位浸膏。乙酸乙酯部位浸膏经 200~300 目硅胶柱层析, 以石油醚和乙酸乙酯体积比为 3:2 洗脱, 得到粗分样品 6 g。

取正己烷、乙酸乙酯、甲醇及水按体积比为 2:3:3:2 的比例配制 2000 mL 的两相溶剂体系于室温下静置平衡过夜, 上相做固定相(即有机相), 下相做流动相(即水相)。取 180 mg 粗分样品, 溶解在流动相中配制成 20 mL 样品溶液。利用所选的溶剂体系及优化后的工艺参数, 确定主机中螺旋管柱旋转速度为 800 rpm, 顺时针方向旋转, 流动相流速为 2.0 mL/min, 实验温度为 25.0 °C, 检测波长为 254 nm, 进样 180 mg 粗分样品进行分离纯化实验。

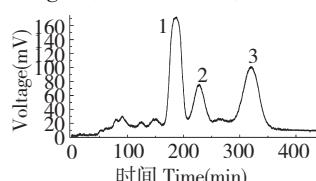


图 2 雷公藤粗提物的高速逆流色谱分离纯化图

Fig. 2 Separation and purification of active components from TWHF extract by HSCCC

得到 3 个主要成分部位, 其保留时间分别为 185、227、320 min。其中第 1 个部位析出无色晶体-雷酚内酯异构体^[9], 第 3 个部位析出红色片状晶体。其高速逆流色谱分离纯化图如图 2 所示。

3 化合物 3 晶体的培养与测定

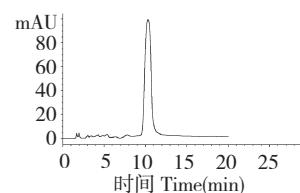


图 3 化合物 3 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of compound 3

化合物 3 的 HPLC 色谱图见图 3, HPLC 的检测条件为色谱柱: 大连依利特反相 C₁₈(5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 柱温: 25.0 °C; 流动相流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 流动相: 甲醇/水 = 80/20。HPLC 分析化合物 3 的纯度(以峰面积百分比计)为 97.5%。

将第 3 部位析出的晶体溶于比例为 1:1 的氯仿和甲醇的混合溶剂, 在室温下静置数天后得到红色片状晶体化合物 3, 选取合适大小的晶体进行结构鉴定。

化合物 3 为红色片状晶体(CHCl₃-MeOH), 较易溶于甲醇和氯仿, 易溶于乙酸乙酯。熔点为 203~205 °C。该化合物与 FeCl₃ 显色剂反应呈阳性。

紫外光谱(MeOH 做溶剂)显示化合物 3 在 207、425 nm 处有吸收峰。红外光谱数据(KBr 压片) ν_{max} cm⁻¹: 3352, 2943, 1703, 1636, 1588, 1547, 1511, 869. EI-MS m/z (%): 450.65 [M]⁺ (55.01), 436 (3.93), 267 (10.72), 253 (27.93), 241 (69.14), 215 (12.84), 202 (100), 187 (7.82), 147 (9.13), 109 (21.42), 95 (35.26), 81 (24.42), 69 (21.86), 55 (45.10), 43 (62.24); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 0.58 (3H, s, 20-CH₃), 1.09 (3H, s, CH₃), 1.25 (3H, s, CH₃), 1.27 (3H, s, CH₃), 1.43 (3H, s, 9-CH₃), 2.24 (3H, s, 4-CH₃), 6.33 (1H, d, J = 7.32 Hz, 7-H), 6.49 (1H, d, J = 1.2 Hz, 1-H), 7.05 (1H, dd, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.08 Hz, 6-H); ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 10.4 (q), 18.7 (q), 21.5 (q), 31.5 (q), 32.4 (q), 38.4 (q), 28.8 (t), 29.3 (t), 29.5 (t), 31.1 (t), 33.8 (t), 34.5 (t), 36.4 (t), 44.3

(d), 118.3 (d), 120.6 (d), 135.3 (d), 30.7 (s), 39.3 (s), 40.0 (s), 43.1 (s), 45.3 (s), 120.3 (s), 127.6 (s), 147.0 (s), 165.0 (s), 172.5 (s), 178.4 (s), 182.4 (s)。

4 讨论

化合物**3**为红色片状晶体,mp 203~205℃,较易溶于甲醇和氯仿,易溶于乙酸乙酯。该化合物与FeCl₃显色剂反应呈阳性,可能是分子中的羟基的缘故。其紫外在207和425 nm处有吸收峰,说明分子中存在较长的共轭体系。红外光谱显示有3352 cm⁻¹(-OH),2943 cm⁻¹(-CH₃),1703 cm⁻¹(-COOH),1636 cm⁻¹(C=O),1588、1547、1511、869 cm⁻¹。化合物的红外光谱与雷公藤红素的红外光谱图匹配度很高,达到95%,其与雷公藤红素具有相同的R_f值。EI-MS给出的分子量为450.65,其与理论值450.62吻合。核磁数据与文献^[10]对照,二者吻合。因此可以鉴定化合物**3**为雷公藤红素(celastrol),其结构如图1所示。化合物**3**分子式为C₂₉H₃₈O₄,为三萜类化合物。

综合考虑样品性质、溶剂体系的稳定性、组分分离度及实验时间,目标产物最佳分离纯化条件为:正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水=2:3:3:2(V/V/V/V),温度为室温(25.0℃),主机转速为800 rpm,流动相流速为2.0 mL/min,上相做固定相,下相做流动相^[11]。目标产物的分离时间较短、产品纯度高、分离过程稳定。

雷公藤红素的分离纯化研究报道较多,大多数为采用硅胶柱色谱进行分离纯化,其存在不可逆吸附及对样品的玷污、失活、变性等影响。本文利用高速逆流色谱分离雷公藤红素,在分离的过程中不存在不可逆吸附,使用的样品可以全部回收再利用。雷公藤粗提物经本文报道的方法进行分离纯化,雷公藤红素的纯度达到97.5%,样品通过回收利用,可以使雷公藤红素达到100%的提取率。

参考文献

- Ma JS, Brach AR, Liu QR. A revision of the genus Tripterygium (Celastraceae). *Edin J Bota*, 1999, 56:33-46.
- Tao X, Davis LS, Lipsky PE. Effect of an extract of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F on human immune responsiveness. *Arth Rheum*, 1991, 34:1274-1281.
- Li XY. Anti-inflammatory and immunosuppressive components of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. *Int J Imm T*, 1993, 9:181-187.
- Tao X, Lipsky PE. The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook. F. *Rheum Dis C*, 2000, 26:29-50.
- Guo JL, Yuan SX, Wang XC, et al. *Tripterygium wilfordii* Hook. F. in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Chin Med J*, 1981, 94:405-412.
- Qin WZ, Liu CH, Yang SM. *Tripterygium wilfordii* Hook. F. in systemic lupus erythematosus. Report of 103 cases. *Chin Med J*, 1981, 94:827-834.
- Xu WY, Zheng JR, Lu XY. *Tripterygium* in dermatologic therapy. *Int J Derm*, 1985, 24:152-157.
- Takaishi Y, Ujita K, Tokuda H, et al. Inhibitory effects of dihydroagarofuran sesquiterpenes on Epstein Barr virus activation. *Cancer Lett*, 1992, 65:19-26.
- Fan XW(樊希望), Liu LH(刘力恒), Wei WX(韦万兴), et al. One stereoisomer of triptophenolide from *Tripterygium wilfordii* Hook. F. by high-speed countercurrent. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 1049-1051, 1054.
- Miao KL(苗抗立), Zhang XK(张晓康), Dong Y(董颖). Studies on triterpenoids constituents of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2000, 12(4):1-7.
- Fan XW(樊希望), Zhou M(周敏), Du CR(杜传荣), et al. Preparation of triptophenolide stereoisomer by high-speed countercurrent. *J Guangxi Univ, Nat Sci Ed*(广西大学学报:自然科学版), 2010, 35:508-512.