

文章编号:1001-6880(2016)12-1943-04

pH 区带精制逆流色谱法分离制备黄藤中巴马汀和药根碱

井 凤,耿岩玲,刘 伟,段文娟,王岱杰,王 晓*

山东省中药质量控制技术重点实验室 山东省分析测试中心,济南 250014

摘要:建立了黄藤生物碱快速分离制备的 pH 区带精制逆流色谱方法。采用 95% 乙醇加热回流提取制备黄藤生物碱粗提物,利用 pH 区带精制逆流色谱法对生物碱粗提物进行直接分离制备,以氯仿-甲醇-水(4:3:3)为溶剂系统,下相添加三乙胺(10 mmol/L)为流动相,上相加盐酸(40 mmol/L)作为固定相,在主机转速 800 rpm,流动相流速 2 mL/min,检测波长 254 nm 条件下进行分离制备。从 1.5 g 黄藤提取物中一次分离得到 231.6 mg 药根碱和 436.8 mg 巴马汀,纯度均大于 98%。化合物通过 MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 进行了结构鉴定。pH 区带精制逆流色谱法是一种快速高效的分离纯化黄藤生物碱的方法。

关键词:黄藤;pH 区带精制逆流色谱;生物碱;药根碱;巴马汀

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.016

Separation and Preparation of Palmatine and Jateorrhizine in *Fibraurea recisa* Pierre. by pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography

JING Feng, GENG Yan-ling, LIU Wei, DUAN Wen-juan, WANG Dai-jie, WANG Xiao *

Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China

Abstract: A rapid method was developed for the preparative separation of alkaloids from *Fibraurea recisa* Pierre. by pH-zone-refining counter-current chromatography. The crude sample was prepared by 95% ethanol reflux extraction and directly separated by pH-zone-refining counter-current chromatography. The solvent system was chloroform-methanol-water (4:3:3, v/v) with 40 mM HCl in the upper stationary phase and 10 mM TEA in the lower mobile phase. The rotation speed was set at 800 rpm. The flow rate was 2.0 mL/min and the detective wavelength was 254 nm. From 1.5 g of the crude sample, 231.6 mg of jatorrhizine and 436.8 mg of palmatine were obtained and each with a purity higher than 98% as determined by HPLC. The chemical structures were identified according to MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. The pH-zone-refining counter-current chromatography was a rapid and efficient method for the separation of alkaloids from *Fibraurea recisa* Pierre.

Key words: *Fibraurea recisa* Pierre.; pH-Zone-refining counter-current chromatography; alkaloids; palmatine; jatorrhizine

黄藤为防己科植物黄藤 *Fibraurea recisa* Pierre. 的干燥藤茎^[1],具有清热、解毒、利尿、通便的功效,用于妇科炎症,伤口感染,痢疾、呼吸道和泌尿系统感染,以及眼结膜炎等症^[2]。黄藤的主要活性成分为巴马汀、药根碱等异喹啉类生物碱^[3]。巴马汀即黄藤素,是从黄藤药材中提取纯化得到的生物碱,具有广谱抗菌、抗病毒、抗炎、增加白细胞吞噬功能等药理作用^[4],因此,建立主要活性成分的分离制备方法对黄藤药材及其产品的质量控制十分必要。

由于黄藤生物碱的化学结构、极性和碱性非常

相似,采用常规分离方法费时费力且成本较高。pH 区带精制逆流色谱(pH-zone-refining counter-current chromatography, pH-ZRCCC)是由高速逆流色谱发展而来,根据化合物的碱(酸)性强弱和极性大小实现混合组分的分离,具有实验条件易优化、进样量大、馏分高度浓缩、对无紫外吸收的化合物进行检测等优点^[5-8],该技术已经广泛应用于生物碱^[9,10]、有机酸^[11]等可电离化合物的分离。

本研究采用 95% 乙醇回流提取技术制备黄藤生物碱粗提物,运用 pH 区带精制逆流色谱对粗提物进行分离制备,得到两个高纯度生物碱单体:巴马汀和药根碱(化学结构式见图 1)。该方法快速、高效、成本较低,为黄藤中生物碱的研究和开发利用提

收稿日期:2016-03-04 接受日期:2016-05-05

基金项目:山东省科技发展计划(2014GZX219003);山东省三院联合专项(ZR2016YL006)

* 通讯作者 Tel:86-013031748019;E-mail:wxjn1998@126.com

供技术支撑。

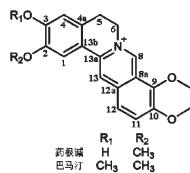


图 1 药根碱和巴马汀的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of palmatine and jatrorrhizine

1 仪器与材料

TBE-300A 高速逆流色谱仪(上海同田生物技术股份有限公司);TBP5002 泵(上海同田生物技术股份有限公司);8823-B 紫外检测器(北京宾达英创科技有限公司);3057-11 记录仪(重庆川仪总厂有限公司);旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限公司);KDM 型调温电热套(山东光明仪器有限公司);超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城科技工贸有限公司);恒温循环器(郑州长城科技工贸有限公司);Agilent 1260 高效液相色谱仪(配有光电二极管阵列检测器 DAD, 美国 Agilent 公司);Agilent 5973N 质谱仪(离子源:ESI, 阳离子模式, 离子源温度:250 °C, 毛细管电压:4.0 kV, 载气:普氮, 载气流速:10 L/min, 扫描范围:29~400, 扫描时间:1 s, 美国安捷伦公司);Bruker ADVANCE DPX 400 核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司)。

黄藤粗提物制备及 pH 区带逆流色谱所使用的试剂均为分析纯(济南恒化科技有限公司);HPLC 分析用甲醇为色谱纯(山东禹王实业有限公司),乙腈为色谱纯(美国天地公司);HPLC 分析用水为 Millipore 超纯水(美国 Millipore 公司)。

黄藤购于安徽亳州药材市场,经山东中医药大学李佳教授鉴定为黄藤 *Fibraurea recisa* Pierre. 的干燥藤茎。

2 实验方法

2.1 黄藤粗提物的制备

取黄藤药材 1.0 kg, 粉碎过 20 目筛, 用 95% 乙醇回流提取(料液比为 1:4, g/mL)3 次, 第一次和第二次每次 3 h, 第三次 2 h, 过滤, 合并滤液, 减压回收乙醇, 得到 256 g 棕褐色粗提物, 置于 4 °C 冰箱中待用。

2.2 溶剂系统及样品溶液的制备

pH 区带精制逆流色谱的最佳溶剂系统为氯仿-甲醇-水(4:3:3, v/v), 分别将氯仿、甲醇和水按比例置于分液漏斗中, 配制 2000 mL, 剧烈震荡后静置分层, 分出上下相, 上相 800 mL, 下相 1200 mL, 在上层水相中加入 HCl(40 mmol/L) 1.376 mL 作为固定相, 在下层有机相中加入三乙胺(TEA, 10 mmol/L) 0.444 mL 作为流动相。超声除去上下相中的气泡同时使酸碱混合均匀。取 1.5 g 黄藤生物碱粗提物置于 20 mL 试管中, 分别加入 10 mL 加酸的上相和 10 mL 不加碱的下相, 超声使粗提物完全溶解, 用于 pH 区带逆流色谱分离。

2.3 分离及鉴定

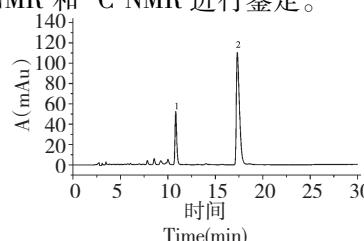
2.3.1 pH 区带逆流色谱分离过程

上层水相以 20 mL/min 的流速泵入高速逆流色谱仪的螺旋管中作为固定相, 待出口处有液体流出时表明固定相已充满螺旋管, 将样品溶液注入进样圈, 开启逆流色谱仪, 转速设定为 800 rpm, 同时开启循环冷凝水, 待仪器转速稳定后, 以 2.0 mL/min 的流速泵入流动相, 开启检测器和记录仪, 检测波长设定为 254 nm, 待出口处有流动相流出时, 以每管 12 mL 的量对馏分进行收集。待分离过程结束后, 用压缩空气吹出分离柱中的内容物于 500 mL 的量筒中, 计算固定相的保留率。

2.3.2 HPLC 分析及结构鉴定

黄藤粗提物和高速逆流色谱分离各组分用 HPLC 分析。液相色谱柱为 YMC-Pack ODS-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-2.0% 乙酸 0.1% TEA 水(25:75);柱温为室温;流速为 1.0 mL/min;检测波长为 345 nm;进样量为 10 μL。

pH 区带逆流色谱分离各组分结构经 ESI-MS、¹H NMR 和¹³C NMR 进行鉴定。

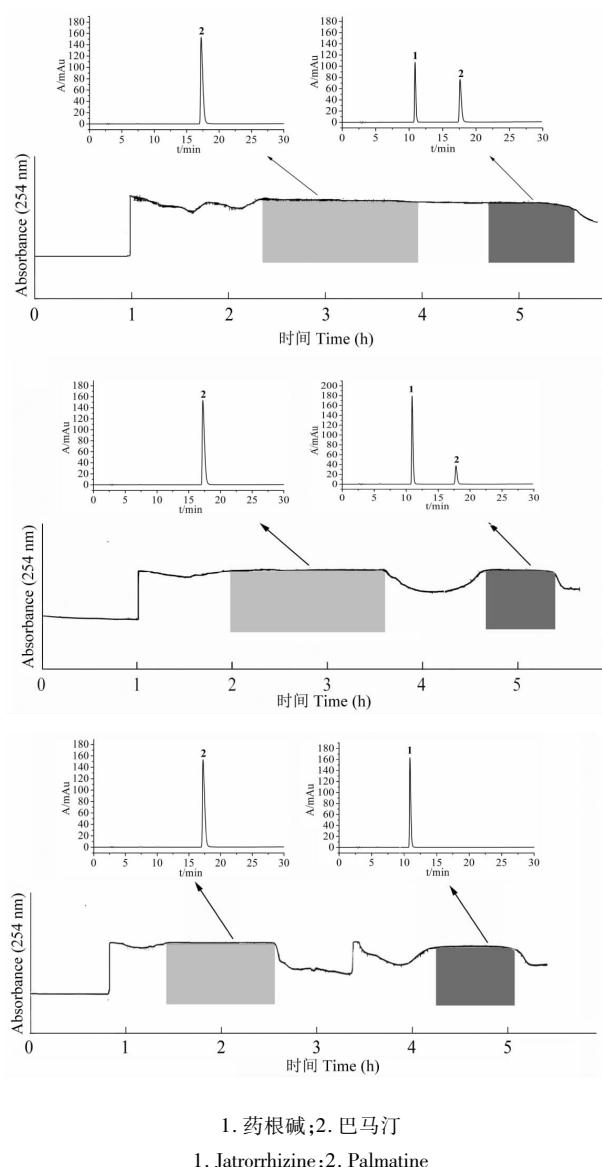


1. 药根碱;2. 巴马汀

1. Jatrorrhizine;2. Palmatine

图 2 黄藤粗提物的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of *F. recisa* crude extract



3 结果与讨论

3.1 HPLC 条件的优化

优化液相条件确保化合物和杂质达到基线分离。考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2% TEA 水, 乙腈-0.2% TEA 水, 甲醇-2.0% 乙酸 0.1% TEA 水, 乙腈-2.0% 乙酸 0.1% TEA 水等流动相, 结果表明, 当选用乙腈-2.0% 乙酸 0.1% TEA 水(25:75)进行洗脱, 流速设定为 1.0 mL/min 时, 黄藤粗提物中的各成分能够实现基线分离, 分离效果如图 2 所示。

3.2 pH 区带精制逆流色谱分离条件的优化

在 pH 区带精制逆流色谱中, 成功的分离碱性化合物需选择合适的两相溶剂系统, 同时样品在溶剂系统中要有好的溶解度^[12,13]。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的两端^[14]。由于黄藤生物碱属于苄基异喹啉类季胺生物碱, 属于水溶性生物碱, 易溶于水、酸水等极性大的溶剂^[4]。因此本实验基本溶剂系统为氯仿: 甲醇: 水(4:3:3, v/v), 上相加入盐酸, 下相加入三乙胺。实验首先考察了氯仿: 甲醇: 水(4:3:3)(上相加入盐酸, 浓度达到 20 mmol/L, 下相加入三乙胺, 浓度达到 10 mmol/L)溶剂体系的分离效果, 虽然出现平台峰, 但样品分离效果不佳, 经 HPLC 分析, 2.4 h 至 3.9 h 出现了化合物 2, 4.8 h 出现化合物 1, 但化合物 1 中始终夹杂着化合物 2, 如图 3(a)所示。因此采用增加保留酸浓度的方法, 上相中盐酸的浓度达到 30 mmol/L, 下相三乙胺的浓度达到 10 mmol/L, 化合物 1 的纯度仍然不高, 如图 3(b)所示。进一步增加保留酸的浓度到 40 mmol/L 时, 分离效果达到最好, 从 1.5 g 黄藤粗提物中经一次 pH 区带精制逆流色谱分离, 得到化合物 1(231.6 mg)、2(436.8 mg)。经 HPLC 分析, 化合物 1、2 的纯度都达到 98.0%, 如图 3(c)所示。

3.3 化学结构鉴定

化合物 1 红色针晶, ESI-MS, m/z 338 [M + H]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 9.50 (1H, s, H-8), 8.47 (1H, s, H-13), 7.99 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 7.80 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.26 (1H, s, H-1), 6.24 (1H, s, H-4), 4.74 (2H, s, H-6), 4.04 (3H, s, 10-OCH₃), 4.00 (3H, s, 9-OCH₃), 3.77 (3H, s, 2-OCH₃), 2.94 (2H, s, H-5); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 116.4 (C-1), 148.5 (C-

图 3 黄藤生物碱的 pH 区带精制逆流色谱分离图

Fig. 3 pH-zone-refining counter-current chromatograms of *F. recisa* crude extract

注: 溶剂系统: 氯仿: 甲醇: 水(4:3:3, v/v), (a) 上相加 20 mmol/L 盐酸, 下相加入 10 mmol/L 三乙胺, 固定相保留率 46%; (b) 上相加入 30 mmol/L 盐酸, 下相加入 10 mmol/L 三乙胺, 固定相保留率 46%; (c) 上相加入 40 mmol/L 盐酸, 下相加入 10 mmol/L 三乙胺, 固定相保留率 46%

Note: Solvent system: CHCl₃-MeOH-H₂O (4:3:3, v/v), (a) 20 mmol/L HCl in upper aqueous phase and 10 mmol/L TEA in lower organic phase; retention of stationary phase: 46%; (b) 30 mmol/L HCl in upper aqueous phase and 10 mmol/L TEA in lower organic phase; retention of stationary phase: 46%; (c) 40 mmol/L HCl in upper aqueous phase and 10 mmol/L TEA in lower organic phase; retention of stationary phase: 46%

2), 150.3(C-3), 109.4(C-4), 27.0(C-5), 62.1(C-6), 144.7(C-8), 151.7(C-9), 143.6(C-10), 127.1(C-11), 131.0(C-12), 120.1(C-13), 143.5(C-14), 116.8(C-15), 135.1(C-16), 141.7(C-17), 123.1(C-18), 57.6(10-OCH₃), 56.7(9-OCH₃), 55.8(2-OCH₃)。数据与文献^[15]报道的药根碱一致,表明化合物1为药根碱。

化合物2 黄棕色结晶,ESI-MS, *m/z* 352 [M + H]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 9.90 (1H, s, H-8), 9.09 (1H, s, H-13), 8.22 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 8.05 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.73 (1H, s, H-1), 7.10 (1H, s, H-4), 4.96 (2H, s, H-6), 4.11 (3H, s, 10-OCH₃), 4.07 (3H, s, 9-OCH₃), 3.94 (3H, s, 2-OCH₃), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃), 3.23 (2H, s, H-5); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 111.8(C-1), 149.2(C-2), 152.0(C-3), 109.3(C-4), 26.5(C-5), 62.4(C-6), 145.9(C-8), 150.7(C-9), 144.1(C-10), 123.9.1(C-11), 127.3(C-12), 120.4(C-13), 138.2(C-14), 119.4(C-15), 129.1(C-16), 133.6(C-17), 121.8(C-18), 57.6(10-OCH₃), 56.7(9-OCH₃), 56.4(3-OCH₃), 55.9(2-OCH₃)。数据与文献15报道的巴马汀一致,表明化合物2为巴马汀。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010, 285-286.
- 2 State Administration of Traditional Chinese Medicine Chinese Herb Commission (国家中医药管理局中华草本编委会). Chinese Herb (中华草本:第三卷). Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999, 1958.
- 3 Liu RM (刘润民), Zhao SX (赵守训), Min ZD (闵知大), et al. A study on quaternary alkaloids of the Chinese folk drug "huang-teng". *J Nanjing Colle Pharm* (南京药学院学报), 1982, 19(2):77-82.
- 4 Chen HP (陈鸿平), Cheng B (程贝), Liu YP (刘友平), et al. Optimization of extraction technology of fibruretinin from *Fibraureae Caulis*. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med* (成都中医药大学学报), 2011, 34(4):59-61.
- 5 Qin QX (秦秋香), Wei D (魏东), Guo SY (郭祀远). Separation of oligopeptides with high fisher's ratio by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20:866-869.
- 6 Ito Y, Ma Y. pH-Zone-refining countercurrent chromatography. *J Chromatogr A*, 1996, 753:1-36.
- 7 Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2005, 1065:145-168.
- 8 Ito Y. pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications. *J Chromatogr A*, 2013, 1271:71-85.
- 9 Zheng ZJ (郑振佳), Yang B (杨滨), Xu MX (徐美霞), et al. Separation and preparation of alkaloids in *Nelumbinis Folium* by pH-zone-refining counter-current chromatography. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42:684-686.
- 10 Wang DJ (王岱杰), Liu JH (刘建华), Geng YL (耿岩玲), et al. Separation of alkaloids from *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers by high speed counter-current chromatography. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2010, 38:783-788.
- 11 Hamzaoui M, Renault JH, Reynaud R, et al. Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: An efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compound. *J Chromatogr B*, 2013, 937:7-12.
- 12 Wang X, Geng YL, Li FW, et al. Preparative separation of cichoric from *Echinacea purpurea* by pH-zone-refining counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2006, 1103:166-169.
- 13 Wang TT, Jiang XH, Yang L, et al. pH-gradient counter-current chromatography isolation of natural antioxidant chorogenic acid from *Lonicera Thunb.* using an upright coil planet centrifuge with three multi-layer coils connected in series. *J Chromatogr A*, 2008, 1180:53-58.
- 14 Ito Y. High-speed countercurrent chromatography. *Anal Chem*, 1986, 17:65-143.
- 15 Deng YC, Zhang M, Luo HY. Identification and antimicrobial activity of two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Tinospora capillipes*. *Ind Crop Prod*, 2012, 37:298-302.