应用高速逆流色谱技术从延胡索中分离制备延胡索乙素*

□俞 雁 金 艳 徐 超 (华东理工大学化学与制药学院 上海 200237)
沈平壤** 张继全 (国家中药制药工程技术研究中心 上海 201203)

摘 要:利用高速逆流色谱技术,一次进柱过程即可从延胡索粗提物中分离到活性成分延胡索乙素。两相溶剂系统用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水四元系统,上相为固定相,下相为流动相,转速为850r/min,流速为1.2ml/min。通过EI-MS和^{1}H-NMR鉴定,基本确认了其化学结构。经HPLC分析,纯度达96.4%。

关键词:高速逆流色谱 延胡索 延胡索乙素

高速逆流色谱(High-Speed Counter-Current Chromatography,HSCCC)技术是近年来迅速发展的新型液液分离技术。与其它液相色谱分离方法相比,它不使用固相载体作固定相,被分离的物质在互不相溶两相分配分离,避免了样品在固相载体中的不可逆吸附、损失和污染[1-2]。由于其分离的快速性及被分离物质回收的便捷性使得分离、纯化、制备可同步完成,越来越多用于提取和制备天然产物的纯品,这项技术成为21世纪最有前景的色谱技术之一[3-4]。

延胡索为罂粟科植物延胡索(*Corydalis yanhusuo* W.T. Wang)的干燥块茎中提取的有效成分。延胡索主要成分为生物碱,其中属叔胺类者含量约0.65%,属季胺类者约0.3%。已分离得近20个生物碱,计有延胡索甲素(延胡索碱,d-corydaline)、延胡索乙素(dl-四氢掌叶防己碱,dl-tetrahydropalmatine)、延胡索丙素(原阿片碱,protopine)、延胡索丁素(1-四氢黄连碱,1-Tetrahydricopthsine)、延胡索戊素(dl-四氢黄连碱)、延胡索己素(1-四氢古伦胺碱,1-Tetrahydrocolumbamine)等[5-6]。现代药理学研究表明,延胡索总碱,延胡索甲素、乙素均有镇痛作用,以乙素较强。除镇痛作用外,延胡索乙素还具有较强较广泛的生理活性:有一定的镇静、安定作用,其左旋体为新型的中枢抑制剂。可抑制胃液分泌;还可影响甲状腺功能,使甲状腺重量增加。

目前各种延胡索的分离分析方法中以液相色谱居多,如高效液相色谱(HPLC),还有薄层扫描法、紫外分光光度法等。但这些方法都无法大量分离出延胡索中多种或一种活性成分。而传统的柱层析方法由于其不可避免的死吸附现象及耗时太长,使其难以工业化生产。我们首次采用HSCCC,选择出合适的溶剂体

收稿日期:2005-10-19
修回日期:2005-11-17
★ 上海市科委基金项目(03DZ19536):中药饮片的标准化研究,负责人:张继全。
★★ 联系人:沈平壤,本刊编委,教授,从事中药现代化科技创新研究,Tel:021-50805522,E-mail:spn@enrcmtcm.com。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

系，从延胡索中分离出生物碱成分，且用此方法得到延胡索乙素的纯品，为以后从中草药中分离纯化和制备生物碱等中极性化合物提供了技术依据。

一、实验部分

1. 仪器与试剂

TBE-300 型高速逆流色谱仪(深圳同田生化有限公司)，A KTA purifier P-900 泵，UV-900 紫外检测器(上海安玛西亚有限公司)HX-1050 恒温循环器。

石油醚，乙酸乙酯，甲醇均为分析纯，水为超纯水。延胡索药材由上海康桥饮片厂提供。

2. 延胡索粗提物的制备

将延胡索粉碎为粗粉，取 200g 粗粉加入 70%乙醇 600ml，回流提取 3h，过滤，旋转蒸干，得棕黑色浸膏备用。

3. HSCCC 的分离操作

两相溶剂系统采用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(16:31:19:21)，临用前分开上下相，超声 30min。以溶剂系统的上相为固定相，下相为流动相，以 9.99ml/min 的流速将上相泵入管路，待固定相充满整个管路后，停泵，启动主机，把转速调至 850 r/min，然后以 1.2 ml/min 的流速泵入流动相。当流动相从出口处流出，即上下相平衡时，记录固定相被推出的体积，可得固定相保留值 0.50[7-8]。供试品 120mg 溶解于 20ml 流动相，浓度 6mg/ml，进样量为 10ml，通过六通阀进样，继续以 1.2ml/min 的流速泵入流动相。紫外检测波长 280 nm，根据紫外检测谱图，接收各峰的组分，将各峰对应的收集液分别浓缩，干燥。用 TLC 检测。

二、实验结果

1. 分离结果

延胡索粗品的 HSCCC 见图 1。进样 70min 后开始出峰，7h 内出 7 个峰，收集各峰所对应得流出液。

用 TLC 与延胡索乙素标准品对照，甲苯-丙酮(9:2)展开，碘熏显色[9]，峰 5 与标准品在相同位置显示同一斑点。

2. 结构鉴定

(1)核磁共振(NMR)对 HSCCC 分离峰的结构分析。

^{1}HNMR (CDCl3)：6.89 (1H，d，J=8.4Hz)，6.80(1H，d，J=8.4Hz)，6.73 (1H，s)，6.62 (1H，s)，4.26 (1H，d，J=15.8Hz)，3.88 (12H，m)，3.59 (2H，m)，3.28(1H，m)，3.20(1H，m)，3.12(1H，m)，2.85(1H，m)，2.66(2H，m)。以上数据与延胡索乙素文献数据一致[10]。

(2)质谱(EI-MS)对 HSCCC 分离峰的结构分析。

EI-MS：m/Z：355($[M]^+$)，m/Z：356($[M+H]^+$)，m/Z：354($[M-H]^+$)，与延胡索乙素的分子量吻合。

(3)HPLC 对 HSCCC 分离峰的纯度分析。

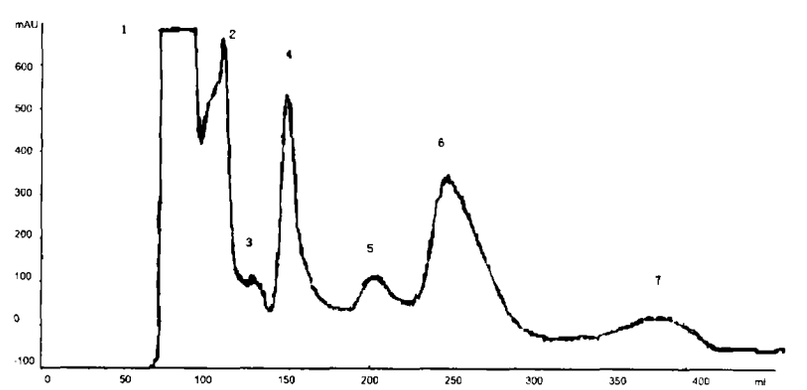

图 1 延胡索 HSCCC 分离图

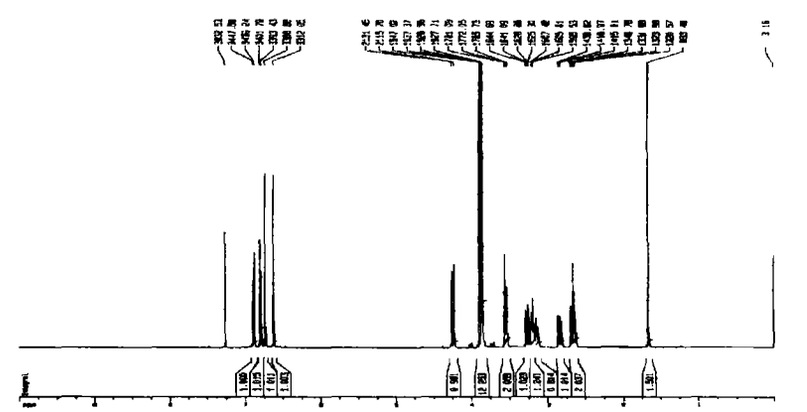

图 2 组份 5 的 1HNMR 图

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

精密称量5号峰干燥物质4.3mg，甲醇完全溶解，10ml定容，过滤，得供试品溶液。按照HPLC的色谱条件，进10ul供试品溶液，见图4。

相同色谱条件，进10ul已知浓度的延胡索乙素标准品溶液，见图5。

外标法测定组分5的含量，纯度为96.4%。

三、讨　论

应用高速逆流色谱方法从延胡索中分离提纯延胡索乙素未见文献报道，我们首次引用此技术，一次进柱过程即可将分离纯化和制备完成，得到有效成分延胡索乙素。延胡索乙素一直用有机溶剂提取，然后多级萃取以及酸碱水解法和柱层析的梯度洗脱得到纯度较高的延胡索乙素，对于植物中微量有效成分来说，这些方法成本较高，步骤繁琐，耗时长。而HSCCC法进样量可以达到mg数量级，甚至g数量级，预处理方法简便，时间短，回收率高，在中药分离提取领域前景良好[11]。如何更有效地发挥HSCCC在中药质量标准制定方面的作用，有待深入研究。

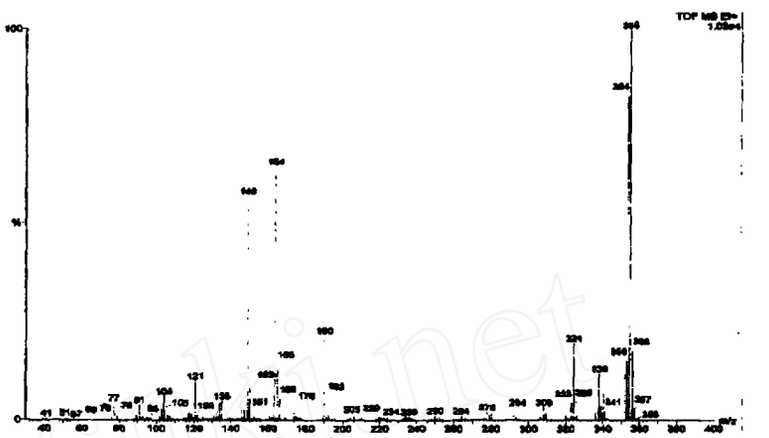

图3　组分5的EI-MS图

图4　组分5的HPLC图

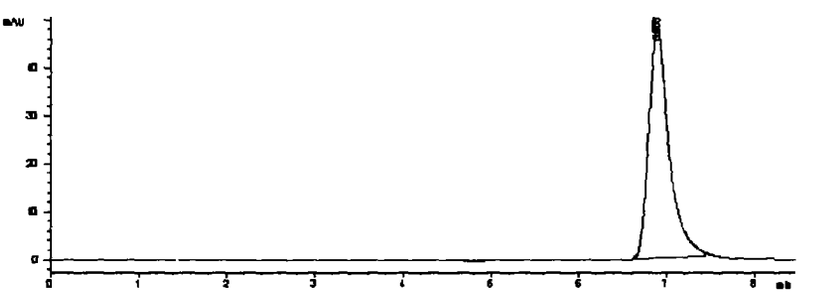

图5　延胡索乙素标准品的HPLC图

参考文献

1　魏芸，张天佑，吴克友. 高速逆流色谱法对刺五加有效成分刺五加苷E的分离制备. 色谱，2002，20(6)：543~545.

2　戴德舜，伍方勇，王义明，等. 高速逆流色谱试验体系的选择和优化. 分析仪器.2001，(3)：31~33.

3　张天佑. 逆流色谱技术，北京：北京科学技术出版社，1991，3.

4　袁黎明，傅若农，张天佑.高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用.药物分析杂志.1998，18(1)：60.

5　郑俊华. 生药学. 北京：人民卫生出版社，1999.

6　郑虎占，董泽宏，佘靖. 中药现代研究与应用，北京：学苑出版社，1997.

7　Yoichiro Ito. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high speed counter-current chromatography. J. Chromatogr.A. 1065(2005)：145~168.

8　Yang Fuquan，Zhang Tianyou，ZhangRen. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of alkaloids from copis chinesis Franch. J.Chromatogr.A. 829(1998)：137~141.

9　国家药典委员会. 中国药典2005年版一部. 北京：化学工业出版社，94.

10　许翔鸿，王峥涛，余国奠，等.延胡索中生物碱成分的研究. 中国科大学学报，2002，33(6)：483~486.

11　孙媛媛，唐玉海. 高速逆流色谱技术在中草药有效成分分离中的应用. 西北药学杂志，2003，18(6)：282~283.

(Continued on page 5)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Clinical study by way of Combining Diseases with Differentiation of their syndromes, An Important Mode in Study on Combination of Chinese Traditional and Western Medicine

Chen Keji

(Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091)

Song Jun

(Fujian Academy of Integrative Medicine, Fuzhou 350108)

This article shows with specific cases that the mode of clinical diagnosis, treatment and study of diseases, which combines the diagnosis in Western medicine and the differentiation of syndromes in traditional Chinese medicine (TCM), is an important one of clinical study in the combination of Chinese traditional and Western medicine. The authors of this article hold that such a mode is an inevitable outcome of the development of traditional Chinese medical science and that its wide application in clinical diagnosis and treatment may offer a great contribution to its development. It fully embodies the complementarity of the advantages of Chinese traditional and Western medicine and appears as a form of expression of their organic integration and a practical embodiment of their combination at a higher lever as well.

Key Words: Combination of Chinese traditional and Western medicine, combination of diseases with differentiation of their syndromes, mode

(责任编辑:付建华,责任编审:王 阶,责任译审:秦光道)

(Continued from page 19)

Separation and Preparation of dl-tetrahydropalmatine from Crude Extract of Corydalis Yanhusuo W.T.Wang by High-speed Countfercurrent Chromatography Technology

Yu Yan,Jin Yan and Cu Chao

(East China University of Science and Technology,Shanghai 200237)

Shen Pinniang and Zhang Jiquan

(National Engineering Research Center for Traditional Chinese Medicine,Shanghai 201203)

The active components of dl-tetarohydropalmatine can be separated from the crude extract of corydalis yanhusuo W.T.Wang in the process of one-step elution by the technology of high-speed countercurrent chromatography.The binary system of its solvents consists of petroleum ether-ethyl acetate-methanol-the quarternary system of water with the stationary phase as its upper layer and the mobile phase as its lower layer,850r/min as the operational speed of the instrument used and 1.2ml/min as the flow speed of the solvents.The chemical structure of the separated dl-tetrahydropalmatine is confirmned through the identification of EI-MS and IH-NMR and its purity reaches 96.4% by HPLC analysis.

Key Words: high-speed countercurrent Chromatography,Corydalis yanhusuo W.T.Wang,dl-tetrahydropalmatine.

(责任编辑:刘维杰,责任编审:叶祖光,责任译审:秦光道)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net