

应用高速逆流色谱技术从附子中 分离制备苯甲酰新乌头原碱*

□吴平丽 刘雯 卓超 (华东理工大学药学院 上海 200237)
张继全 沈平壤** (国家中药制药工程技术研究中心 上海 201203)

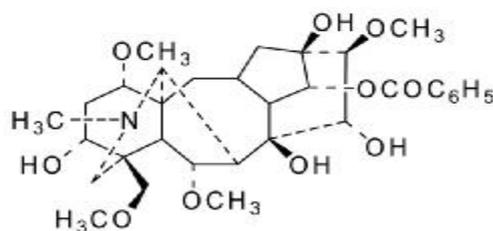
摘要:利用高速逆流色谱技术,一次进柱即可实现从附子粗提物中分离得到苯甲酰新乌头原碱。两相溶剂系统用氯仿-甲醇-0.3mol/L 盐酸三元系统,上相为固定相,下相为流动相,转速为 892rpm,流速为 1.2ml/min。通过 ESI-MS、¹³C-NMR、¹H-NMR 鉴定,确认了其化学结构。经 HPLC 分析,纯度达 98%以上。

关键词:高速逆流色谱 附子 苯甲酰新乌头原碱

高速逆流色谱 (High-Speed Counter-Current Chromatography, HSCCC) 技术是一种液液分离技术,它通过样品中各组分在两相中的分配系数不同达到分离的效果,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,越来越多用于分离和制备天然产物的纯品。

附子为毛茛科植物乌头 (*Aconitum Carmicadi Debx*) 的子根,是常用中药,具有抗炎止痛、利尿、强心促进新陈代谢等作用。附子中生物碱含量很高,且多数结构已确定,主要含有乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、北乌碱、苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱等^[3]。附子中的双酯型生物碱:乌头碱、新乌头碱、次乌头碱,去氧乌头原碱是附子中的活性成分也是其毒性

成分,用药前需炮制解毒,在炮制过程中将其 8 位的乙酰基去掉得到相应的单酯型生物碱-苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰去氧乌头原碱达到解毒的效果,炮制过后的附子称为制附子,其中苯甲酰新乌头原碱是制附子中重要的活性成分,药理学研究表明,苯甲酰新乌头原碱具有明显的抗炎止痛作用^[4]。



苯甲酰新乌头原碱

采用常规的分​​离方法分离生物碱比较困难,死吸附严重,本研究首次采用 HSCCC 技术,选择合适的溶剂体系实现附子中的苯甲酰新乌头原碱的分离制备。

收稿日期: 2009-03-05

修回日期: 2009-04-06

* 国家科技部科技支撑计划课题(2008BAI49B05):戒毒中药济泰片的药效物质、作用机制与质量标准研究,负责人:沈平壤。

** 联系人:沈平壤,教授,本刊编委,主要研究方向:从事中药现代化科技创新研究,E-mail:spn@nercmtcm.com.cn。

一、实验部分

1. 仪器与试剂

TBE-300A 型高速逆流色谱仪(上海同田生化有限公司), ÄKTA purifier P-900 泵(美国 GE Healthcare), UV 检测器, HX-1050 恒温循环器(北京博医康)。氯仿、甲醇为分析纯, 水为超纯水。附子药材由上海康桥饮片有限公司提供。

2. 供试品的制备

将制附子粉碎为粗粉, 取 150g 加入 1500mL 75% (V/V) 乙醇, 盐酸调 pH4, 回流提取 2h, 提取液过滤, 减压蒸干, 得棕黑色浸膏, 进样分离前用流动相溶解。

3. HSCCC 分离操作

两相溶剂体系采用氯仿-甲醇-0.3mol/L 盐酸(10:3:4), 临用前分开上下相, 超声 15min。上相为固定相, 下相为流动相, 以 10mL/min 的流速将上相泵入管路, 待固定相充满色谱柱, 停泵, 启动主机, 调整转速为 892rpm, 然后以 1.2mL/min 的流速将流动相泵入柱内; 待固定相不再流出, 即上下相建立动态平衡, 由进样阀进样; 设定紫外检测波长为 240nm, 接收目标成分, TLC、HPLC 分析分离结果。

二、实验结果

1. 实验结果

HSCCC-UV 图谱如图 1 所示, 进样 35min 后开始出峰, 4h 内出 3 个峰, 分别对应收集流出液。根据已有文献^[9]的液相条件来初步确定成分, 峰 3 为苯甲酰新乌头原碱。

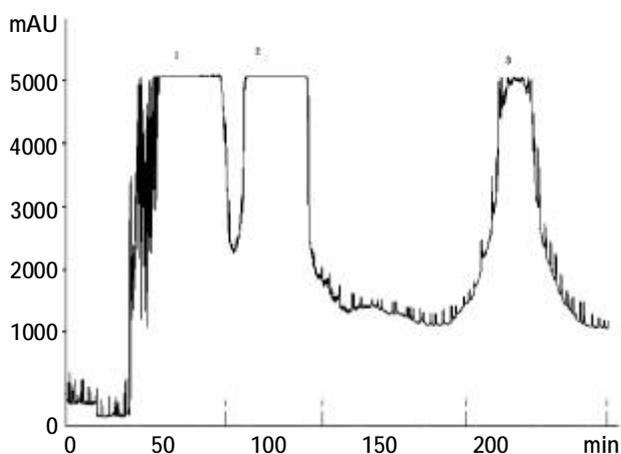


图 1 附子 HSCCC 分离图

采用薄层色谱分析, 展开剂为石油醚-氯仿-甲醇(15:8:2)加一滴氨水, 用碘化铋钾显色为单一橘红色斑点。

2. 结构鉴定

(1)核磁共振(NMR)对 HSCCC 分离峰的结构分析。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CH_3OD): δ : 1.60 (1H, d, 2 β), 1.85 (1H, H-5), 2.26 (1H, H-19), 2.29 (1H, 2 α), 2.44 (2H, H-11), 2.54 (2H, H-7, H-19), 2.94 (3H, -NH₃), 3.70, 3.48, 3.39, 3.38 (12H, 4 \times OCH₃), 4.17 (1H, H-6), 4.22 (1H, H-16), 4.58 (1H, H-15), 5.00 (1H, H-14), 7.48 (2H, ph-3'5'), 7.61 (1H, ph-4'), 8.10 (2H, ph-2'6')。

$^{13}\text{C-NMR}$ (125M, CH_3OD): δ : 81.3 (C-1), 37.9 (C-2), 70.9 (C-3), 43.1 (C-4), 46.4 (C-5), 81.9 (C-6), 44.3 (C-7), 93.5 (C-8), 44.6 (C-9), 42.5 (C-10), 49.9 (C-11), 33.4 (C-12), 76.3 (C-13), 79.3 (C-14), 76.5 (C-15), 93.5 (C-16), 61.5 (C-17), 76.5 (C-18), 49.1 (C-19), 56.1 (1-OCH₃), 13.5 (-N-CH₃), 58.3 (6-OCH₃), 59.3 (18-OCH₃), 168.3 (-O-CH₃), 131.8 (C-1'), 129.4 (C-2', C-6'), 131.0 (C-3', C-5')。

根据以上数据以及参考文献^[6-8], 可确定为苯甲酰新乌头原碱。

(2)质谱(ESI-MS)对 HSCCC 分离峰的结构分析, 见图 2 所示。

ESI-MS: m/Z: 590 ([M+1]⁺), m/Z: 591 ([M+2]⁺), m/Z: 592 ([M+3]⁺), 与苯甲酰新乌头原碱的分子量吻合, 结果与文献^[9]一致。

3. 纯度分析

将目标成分进行 HPLC 分析, 纯度达到 98% 以上, 结果见图 3 所示。

三、讨论

应用高速逆流色谱技术从附子中分离提纯苯甲酰新乌头原碱未见文献报道, 我们首次采用此技术一次性分离纯化得到苯甲酰新乌头原碱。常规的柱色谱分离, 需要将提取物多级萃取和柱层析的梯度洗脱才能得到纯度较高的苯甲酰新乌头原碱, 步骤繁琐, 耗时长, 而应用 HSCCC 技术, 预处理方法简便, 耗时短, 回收率高, 体现了高速逆流色谱在一次性分离方面的优势, 在以后的应用过程中, 可采用常规柱色谱与高速逆流色谱结合, 进一步提高分离效率, 使其更广泛的应用于中药分离领域。目前 HSCCC

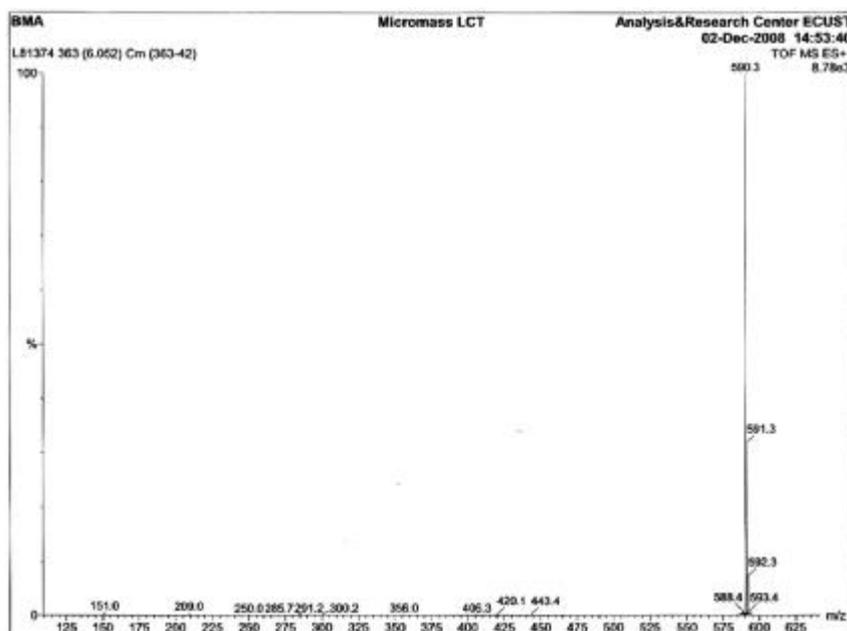


图 2 苯甲酰新乌头原碱 ESI-MS 图

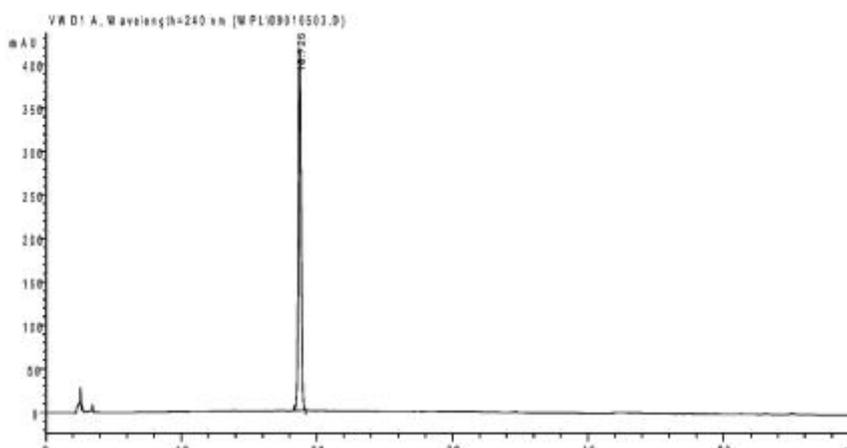


图 3 苯甲酰新乌头原碱 HPLC 图

技术的虽然已经有了重要的发展与改进,但仍处于起步阶段,随着实验技术方法和仪器的不断改良发展,它必将成为分离科学领域一种有效常用的手段,有着广阔的应用前景。

参考文献

- 1 张天佑. 逆流色谱技术. 北京:北京科学技术出版社. 1991.3.
- 2 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用. 北京:化学工业出版社, 2005.3.
- 3 周远鹏. 附子及其主要成分的药理作用和毒性. 药学学报. 1983, 18(5):394-400.
- 4 Zhaohong Wang, Jiao Wen. Quantitative determination of diterpenoid alkaloids in four species of Aconitum by HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006(40):1031-1034.
- 5 王瑞, 孙毅坤, 王耘, 等. 附子生药的高效液相色谱指纹图谱研究. 药物分析杂志, 2007, 27(5):639-642.
- 6 陈德昌. 中药化学对照品工作手册. 北京:中国医药科技出版社. 2000:59
- 7 常全新, 丁丽霞. 中药活性成分分析手册. 北京:学苑出版社. 2002:255.
- 8 E.Arlandini, M.Ballabio, B.GioiA. N -deethylaconitine from Aconitum Napellus SSP.vulgare. Journal of Natural Products. 1987.9, 50(5):937-939.
- 9 Hikoto Ohta, et al. Determination of Aconitum alkaloids in blood and urine samples II. Capillary liquid chromatographic-frit fast atom bombardment mass spectrometric analysis. Journal of Chromatography B. 1998(714):215-221.

Separating Benzoylmesaconitine from Aconite Using HSCCC

Wu Pingli, Liu Wen, Zhuo Chao

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

Zhang Jiquan, Shen Pingniang

(National Traditional Medicine Engineering Center, Shanghai 201203)

Authors separated Benzoylmesaconitine from raw aconite in an immediate manner using HSCCC. A methanol-methylene chloride-hydrochloric acid (-0.3mol/L) solvents system was used, with a rotation speed at 892rpm and a flow rate 1.2ml/min, making the upper part the fixed phase, and the lower part the mobile phase. The chemical composition was determined through ESI-MS, ¹³C-NMR, and ¹H-NMR screening. HPLC test showed a purity as high as 98% or above.

Keywords: HSCCC, aconite, Benzoylmesaconitine

(责任编辑:王 瑀, 责任译审:邹春申)