

白屈菜红碱、血根碱单体的分离和鉴定

冯泓瑞, 黄松*, 陈玲玲, 鲁芹飞, 林吉, 赖小平
(广州中医药大学新药研发中心, 广州 510006)

[摘要] 目的: 分离及鉴定白屈菜红碱和血根碱单体。方法: 采用柱色谱分离技术对白屈菜红碱和血根碱进行分离纯化, 通过 HPLC 进行鉴定。结果: 采用柱色谱法可获得单一成分, 经 HPLC 鉴定为白屈菜红碱和血根碱单体, 纯度分别为 98.6%, 95.7%。结论: 采用柱色谱技术可从博落回中提取、分离到高纯度的白屈菜红碱和血根碱单体。

[关键词] 柱色谱; 白屈菜红碱; 血根碱; 博落回; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0036-03

[doi] 10.11653/syfj2013140036

Separation and Identification of Chelerythrine and Sanguinarine Monomer

FENG Hong-rui, HUANG Song*, CHEN Ling-ling, LU Qin-fei, LIN Ji, LAI Xiao-ping
(New Drug Research and Development Center, Guangzhou University
of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and identify chelerythrine and sanguinarine monomer. **Method:** Chelerythrine and sanguinarine were isolated and purified by column chromatography technology, and identified by HPLC. **Result:** Single component could be obtained by column chromatography method, chelerythrine and the sanguinarine monomer were identified by HPLC with purity of 98.6%, 95.7%, respectively. **Conclusion:** Column chromatography technology could obtain high purity chelerythrine and sanguinarine monomer from *Macleaya cordata*.

[Key words] column chromatography; chelerythrine; sanguinarine; *Macleaya cordata*; HPLC

博落回系罂粟科博落回属植物 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., 始载于《本草拾遗》, 别名号

筒草、勃遛回等, 具有消肿、解毒、杀虫等功效, 用于治疗疔毒脓肿、恶疮溃疡、烫伤、顽癣等^[1]。国内外

[收稿日期] 20130117(018)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI29B00)

[第一作者] 冯泓瑞, 在读硕士, 从事新药研究与开发, Tel:13560258780, E-mail:379580469@qq.com

[通讯作者] *黄松, 博士, 副研究员, 从事新药研发, Tel:020-39358103, E-mail:hsl318@yahoo.com.cn

[9] 利毛才让, 热增才旦, 李春婷, 等. 微波消解 ICP-MS 法测定唐古特青兰中无机元素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):80.

[10] 王春丽. 电感耦合等离子体质谱法测定冰硼散中硼、汞含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):109.

[11] 吴艳萍, 林旭楷. 胃舒散中重金属铋在大鼠体内药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):108.

[12] 刘浩, 仇仕林, 王红武. HPLC-蒸发光散射检测法测

定注射用头孢他啶中碳酸钠的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(3):225.

[13] 乐健, 陈桂良. HPLC-蒸发光散射器检测注射用头孢曲松钠中钠离子的含量[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(7):632.

[14] 袁红梅, 宋燕玲, 杨欣. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定注射用磷霉素钠含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(11):1678.

[责任编辑 全燕]

研究表明,博落回含血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱等生物碱^[2-7],其中血根碱和白屈菜红碱的含量较高。白屈菜红碱是一种选择性蛋白激酶,并被广泛用于抗肿瘤和与细胞增殖、再生有关的细胞信号传道的研究^[8]。血根碱也具有较弱的抗肿瘤作用,但其主要是干扰 DNA 双螺旋结构,对正常细胞与肿瘤细胞的选择性较白屈菜红碱差^[9]。因此,深入研究博落回中白屈菜红碱和血根碱具有重要意义和开发价值。目前对博落回中白屈菜红碱和血根碱的提取分离方法研究不多,本实验对博落回提取物中总生物碱进行提取,采用柱色谱技术进行分离、纯化,并通过 HPLC 鉴定所得化合物单体。

1 材料

UV-1 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),CP2250 型 1/10 万电子天平(德国 sartorius),DK-98-11A 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),有机玻璃柱(40 mm × 700 mm,广州东巨实验仪器公司)。

博落回提取物(广州泽力医药有限公司,批号 20110321),柱色谱硅胶(化学纯,100 ~ 200 目,青岛海洋化工厂分厂),白屈菜红碱、血根碱对照品(HPLC 均 ≥ 98%,阿拉丁生物制品有限公司,批号 111718-200501),乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 博落回提取物中总生物碱的提取 称取博落回提取物干燥粉末 100 g,加 95% 乙醇 1 L,再加适量氨水,将 pH 调至 9 ~ 10,混匀,于 90 °C 水浴中冷凝回流 90 min,连续提取若干次,合并提取液,放冷,加入硫酸将 pH 调至 1 ~ 2,此时产生大量橙红色絮状沉淀,静置过夜,抽滤出沉淀,置于 60 °C 干燥箱中烘干,称定质量,即得博落回总生物碱硫酸盐。

2.2 白屈菜红碱和血根碱的提取分离 称取博落回总生物碱硫酸盐 50 g,加适量氨水将 pH 调至 9 ~ 10,混匀;加三氯甲烷 200 mL,于 65 °C 水浴中冷凝回流 120 min,过滤;残渣加三氯甲烷 100 mL 于同样条件下提取,过滤;合并 2 次提取液,减压浓缩至干,得到紫白色固体粉末。用少量三氯甲烷溶解粉末,待柱色谱分离。另取 100 ~ 200 目柱色谱硅胶 300 g,经 105 °C 活化 60 min,用乙酸乙酯调制成糊状,湿法装入有机玻璃柱(40 mm × 700 mm)中,静置过夜,加入样品三氯甲烷溶液,用乙酸乙酯展开至柱底。此时柱子最下层呈橙红色,上层呈现黄色,用 95% 乙醇洗脱,分别用容器接收橙红色和黄色洗脱

液,减压回收乙醇至溶液体积约 150 mL,分别吸出浓缩液于 250 mL 烧杯中,室温放置 2 ~ 3 d 后,黄色部分浓缩液得晶体 1,橙红色部分浓缩液得晶体 2。分别滤过 2 种晶体,用无水乙醇清洗晶体各 3 次,用氨性无水甲醇重结晶,进一步干燥,称定质量,避光保存。

2.3 HPLC 鉴定

2.3.1 色谱条件 Diamonsil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(30:70),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 270 nm,柱温室温,进样量 5 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 准确称取白屈菜红碱对照品 20.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解,超声 30 min,冷却定容,用甲醇定容,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得,备用。同法制备 0.2 g·L⁻¹ 血根碱对照品溶液,备用。

2.3.3 供试品溶液的制备 准确称取晶体 1 和晶体 2 各 20.0 mg,置于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解,超声 30 min,冷却定容,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,备用。

2.3.4 进样顺序 在上述操作条件下,待仪器基线稳定后,连续注入数针标样试液,直至相邻两针生物碱响应值相对变化 < 1.5% 后,按标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行色谱测定。

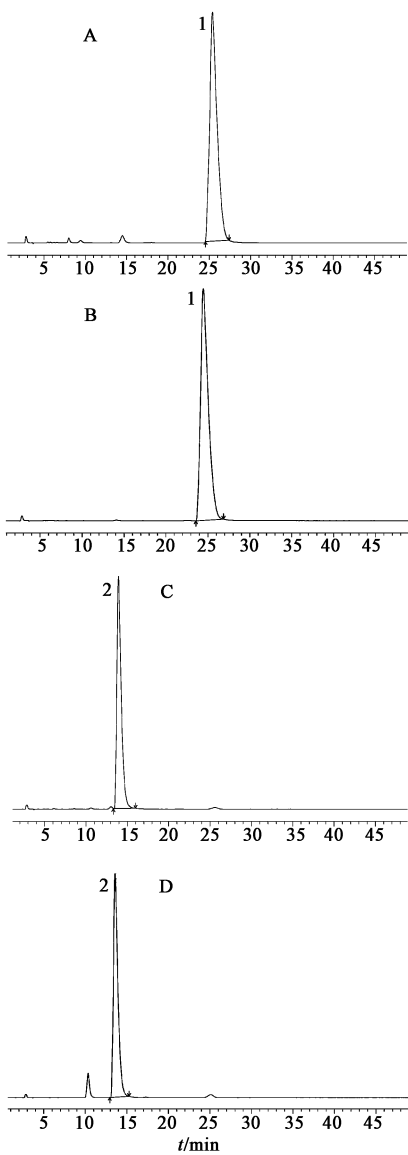
2.4 提取率测定 取 2.1 项下沉淀,经干燥后称重,得总生物碱约 57 g,总得率 57%。

2.5 白屈菜红碱和血根碱纯度的检测 取博落回提取物 100 g,经 95% 乙醇提取后制得总生物碱硫酸盐约 57 g,取其中 50 g 进行柱色谱分离,分别得晶体 1 和晶体 2 约 2.37, 2.14 g。HPLC 鉴定见图 1,晶体 1 为白屈菜红碱,晶体 2 为血根碱,且 2 种单体分离度均较高,纯度分别为 98.3%, 95.6%,说明该分离工艺良好。

3 讨论

硅胶柱色谱是根据混合物中不同极性成分吸附保留时间的差异,达到分离提纯目的的方法。硅胶表面带有羟基,能与极性物质形成氢键,极性越强的物质与硅胶吸附得越牢固。用不同极性的溶剂对硅胶进行洗脱时,溶剂极性越强,越容易洗脱与硅胶吸附的物质,极性弱的溶剂洗脱能力越差^[10]。白屈菜红碱和血根碱同为季铵碱,极性较大,能被硅胶所吸附。在吸附、解吸附、再吸附、再解吸附的整个层析过程中,制备高纯度白屈菜红碱和血根碱单体。

由于白屈菜红碱和血根碱结构较为相似,因此



A. 对照品; B. 晶体 1; C. 对照品; D. 晶体 2;
1. 白屈菜红碱; 2. 血根碱

图 1 博落回提取物 HPLC

在浓缩橙红色洗脱液时会有少量白色粉末析出。经 HPLC 检测,血根碱纯度 72.3%,白屈菜红碱纯度 25.8%。收集白色粉末,用少量三氯甲烷溶解,经硅胶色谱柱分离得到纯度较高的血根碱,经验证,其纯度与之前分离得到的血根碱晶体相当。

刘铭等^[11]曾从植物血水草中分离制备出白屈菜红碱和血根碱,并比较了不同提取方法、萃取剂、洗脱剂等因素对两者提取的影响。本实验采用硅胶柱色谱法可对 2 种单体进行充分分离,整个过程操作简单,得到的产品纯度与对照品相当,经塔板理论计算可设计出特大号色谱柱,也适用于对大量白屈菜红碱和血根碱单体的分离,是一种较为理想的分离方法。

[参考文献]

[1] 江苏省新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 86.
[2] 胡之璧, 徐垠, 冯胜初, 等. 博落回果实中有效成分的研究[J]. 药学学报, 1979, 14(9): 536.
[3] 田书英, 李冰, 朱宇旌. 博落回的研究进展[J]. 养殖与饲料, 2010, 11(3): 65.
[4] 郭小清, 唐莉苹. 中药博落回的研究进展[J]. 兽药市场指南, 2006, 34(5): 11.
[5] 肖竦. 高效毛细管电泳测定小果博落回中血根碱和白屈菜红碱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 87.
[6] 郭宇鸽, 曾建国, 谈满良, 等. 博落回叶与小果博落回叶中 4 种生物碱的含量比较[J]. 中南药学, 2011, 27(11): 829.
[7] 刘浩, 谈满良, 单体江, 等. 博落回生物碱与生物活性及其应用[J]. 中国野生植物资源, 2009, 6(5): 21.
[8] 曾建国, 肖俐, 王宇红, 等. 博落回提取物对实验性肝纤维化的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 134.
[9] 罗国富, 肖世玖. 血根碱的药理作用及其应用[J]. 兽药与饲料添加剂, 2009, 14(5): 22.
[10] 刘湘, 汪秋安. 天然产物化学[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 73.
[11] 刘铭, 陈波, 彭飞, 等. 血水草中血根碱和白屈菜红碱的分离制备研[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2009, 6(1): 5.

[责任编辑 全燕]