

延胡索中生物碱成分的研究

冯静^{1,2}, 于宗渊³, 杨洪军⁴, 许海玉⁴, 刘娜娜², 王晓^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省分析测试中心, 济南 250014;
3. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 4. 中国中医科学院研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立高速逆流色谱结合半制备高效液相色谱法分离纯化延胡索中生物碱的方法。方法: 延胡索生物碱经高速逆流色谱法分离, 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(2:3:3:2)为溶剂系统, 上样量 300 mg, 得到 1 个混合物和 2 个生物碱单体。混合物再以半制备高效液相色谱分离, 得到 2 个生物碱单体, 所得产物采用 ESI-MS, NMR 进行结构鉴定。结果: 分离得到 4 个高纯度的生物碱单体: 海罂粟碱(125 mg, 1)、四氢巴马亭(40.5 mg, 2)、d-紫堇碱(23.5 mg, 3)、四氢小檗碱(10 mg, 4), 其纯度分别为 96.5%, 97.54%, 98.3%, 97.3%。结论: HSCCC 结合半制备高效液相色谱是一种有效的分离制备延胡索生物碱的方法。

[关键词] 延胡索; 高速逆流色谱; 半制备高效液相色谱; 生物碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0124-04

Chemical Constituents from *Corydalis yanhusuo*

FENG Jing^{1,2}, YU Zong-yuan³, YANG Hong-jun⁴, XU Hai-yu⁴, LIU Na-na², WANG Xiao^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Shandong Analysis and Test Center, Ji'nan 250014, China;

3. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

4. China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for separation and purification of alkaloids from the crude extract of *Corydalis yanhusuo* by combination of semi-preparative HPLC and high-speed counter-current chromatography (HSCCC). **Method:** First, high speed counter-current chromatography was successfully performed with a two-phase solvent system, petroleum ether-ethyl acetate-Methanol-water (2:3:3:2). From 300 mg of crude extract, a mixture and two compounds were obtained. And then, the mixture was separated by semi-preparative HPLC. The structures of the target compounds were identified by ESI-MS and NMR. **Result:** 4 compounds with glaucine (125 mg, 1), tetrahydropalmatine (40.5 mg, 2), tetrahydroberberine (23.5 mg, 3) and d-corydaline (10 mg, 4) were obtained with purities of 96.5%, 97.54%, 98.3% and 97.3%, respectively. **Conclusion:** Combination of HSCCC and semi-preparative HPLC is an efficient method for separation of alkaloids from the crude of *C. yanhusuo*.

[Key words] *Corydalis yanhusuo*; HSCCC; semi-preparative HPLC; alkaloids

延胡索为罂粟科植物延胡索的干燥块茎, 味辛、

苦, 性温, 归心、肝、脾经, 具有活血、利气、止痛之功效, 用于胸胁、腕腹疼痛、经闭通经、产后瘀阻、跌扑肿痛等^[1]。延胡索的主要活性成分是生物碱类成分, 具有显著的镇痛、镇静和催眠作用, 对冠心病、心律失常、胃溃疡等多种疾病有较好的临床效果^[2-5]。因此建立延胡索生物碱的快速分离制备方法, 对延胡索药材的质量控制及相关药物的开发十分必要。硅胶柱色谱在延胡索生物碱的分离制备上存在着耗

[收稿日期] 20120906(016)

[基金项目] 国家科技支撑计划(2008BA151B03); 国家自然科学基金项目(81202793); 中医科学院自选项目(Z02063)

[第一作者] 冯静, 硕士研究生, 从事中药资源与质量控制研究

[通讯作者] * 王晓, E-mail: wangxiao2008@yahoo.cn

时长、易造成样品的不可逆吸附、分离效率低等缺点。高速逆流色谱 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 法是一种液液分配色谱, 根据样品在两相溶剂中分配系数的不同实现分离, 分离效率高、产品纯度高、溶剂消耗少、可避免因不可逆吸附而引起的样品损失, 已被广泛应用于天然产物有效成分的分离制备中^[6-11]。本研究采用 HSCCC 结合半制备高效液相色谱对延胡索中的生物碱成分进行分离纯化, 快速制备出 4 个高纯度的生物碱成分: 海罂粟碱 (glaucine)、四氢巴马亭 (tetrahydropalmatine)、四氢小檗碱 (tetrahydroberberine)、d-紫堇碱 (d-corydaline)。

1 材料

TBE-300A 型高速逆流色谱仪 (上海同田生物技术有限公司), 配有聚四氟乙烯管分离柱 (内径 1.6 mm, 分离柱体积 266 mL), HX-1050 型恒流泵 (北京博康实验仪器有限公司), 8823AUV 检测器 (北京宾达英创科技有限公司), Waters 600 高效液相色谱仪, Varian INOVA-600 核磁共振波谱仪 (美国 Varian 公司), 1100 Series 6320 iontrap 电喷雾离子阱质谱仪 (美国 Agilent 公司)。

甲醇为色谱纯, 石油醚、乙酸乙酯、氯仿、甲醇等均均为分析纯, 硅胶 (200 ~ 300 目) 及 GF254 硅胶板 (购自青岛海洋化工厂), 水为滤过蒸馏水及娃哈哈纯净水。

延胡索药材购自山东省宏济堂大药店, 经山东省中医药研究院于宗渊研究员鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。

2 方法

2.1 样品的制备 延胡索干燥块茎 20 kg, 粉碎过筛, 用 85% 乙醇渗漉提取, 渗漉液减压回收乙醇, 浓缩液加稀盐酸调节 pH 2 ~ 3, 过滤, 滤液加氨水调节 pH 9 ~ 10, 静置, 过滤, 得总生物碱沉淀 160 g, 经硅胶柱色谱粗分, 氯仿-甲醇洗脱, 得到氯仿-甲醇 (20:1) 洗脱组分, 冰箱保存备用。

2.2 HPLC 条件 分析型 Hypesil ODS-2 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (0.2% 三乙胺) (60:40), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.3 两相溶剂系统及样品溶液的制备 HSCCC 溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (体积比为 2:3:3:2), 按比例配制于分液漏斗中, 室温下静置过夜, 分出上下相, 使用超声波脱气 10 min, 备用。样品 300 mg 溶解于 5 mL 上相和 5 mL 下相中, 超声使其

完全溶解。

2.4 分离及鉴定

2.4.1 HSCCC 分离过程 将上相 (固定相) 以 20 mL · min⁻¹ 流速泵入 HSCCC 螺旋管中, 待上相充满整个螺旋管后, 缓慢调节主机转速至 850 r · min⁻¹, 顺时针旋转, 待转速稳定后, 接泵自 HSCCC 首端以 2.0 mL · min⁻¹ 流速泵入下相, 同时开启紫外检测器和记录仪, 检测波长为 254 nm; 待上下相平衡后, 将 10 mL 样品注入进样圈, 根据色谱图收集各色谱峰组分, 见图 1。

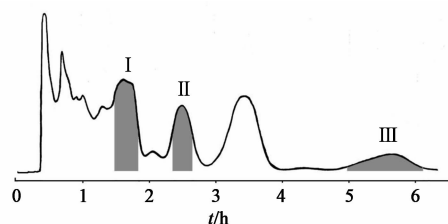


图 1 延胡索生物碱的高速逆流色谱

2.4.2 半制备高效液相色谱分离 Sim-pack PREP-ODS 半制备型色谱柱: (20 mm × 250 mm, 15 μm), 流动相甲醇-水 (60:40), 流速 10 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 25 °C, 进样量 100 μL, 收集方式为手动收集。半制备高效液相色谱图见图 2。

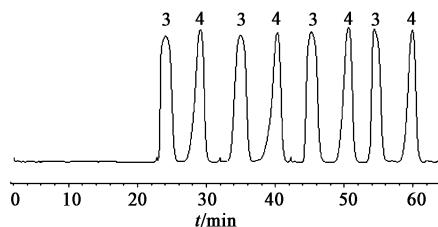


图 2 组分 III 的半制备高效液相色谱

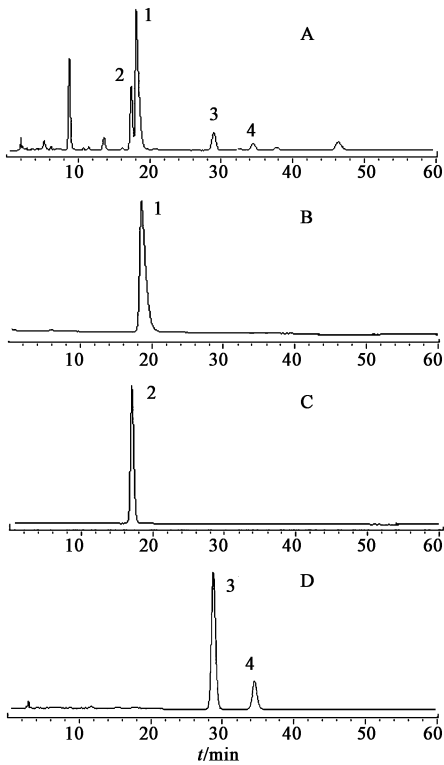
各组分的结构根据 ESI-MS, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 的数据进行鉴定。

3 结果与讨论

3.1 HSCCC 分离条件的优化 测定了目标化合物在不同溶剂体系 KD, 结果表明当采用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水为两相溶剂体系时, 可实现目标化合物的分离。目标化合物在不同比例的石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水体系中的 KD 见表 1。由表 1 可看出石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水的体积比为 2:3:3:2 时, 4 种化合物的 KD 差异较大, 能保证各组分间具有较好的分离度, 整体的分离时间又不会过长, 因此最终选择溶剂体系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (2:3:3:2)。进样 300 mg 分离得到海罂粟碱, 四氢巴马亭和由 d-紫堇碱、四氢小檗碱组成的混合物, HPLC 分析图谱见图 3。

表1 延胡索生物碱中4种化合物在不同比例溶剂体系中的KD

石油醚-乙酸 乙酯-甲醇-水 (2:3:3:2)	海罂粟碱	四氢巴马亭	d-紫堇碱	四氢小檗碱
5:525:5	2.19	0.71	4.70	3.92
2:3:3:2	1.34	0.85	2.51	1.95
2:3:2:3	4.34	1.02	3.13	3.38



A. 总生物碱; B. 组分 I; C. 组分 II; D. 组分 III;
1. 海罂粟碱; 2. 四氢巴马亭; 3. d-紫堇碱; 4. 四氢小檗碱

图3 延胡索生物碱和HSCCC分离组分HPLC

3.2 结构鉴定 化合物1 黄色粉末(甲醇),熔点120 °C,碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z 356 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 8.10(1H, s, H-11), 6.78(1H, s, H-8), 6.59(1H, s, H-3), 3.93(3H, s, $-OCH_3$), 3.90(3H, s, $-OCH_3$), 3.89(3H, s, $-OCH_3$), 3.65(3H, s, $-OCH_3$), 3.03(4H, m, He-4, He-5, He-6, He-7), 2.61(3H, m, Ha-4, Ha-5, H-6), 2.55(3H, s, $-NCH_3$)。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 151.9(C-2), 148.0(C-9), 147.5(C-10), 144.3(C-1), 129.2(C-7a), 128.8(C-13a), 127.0(C-3b), 126.9(C-11b), 124.5(C-11a), 111.6(C-11), 110.8(C-8), 110.4(C-3), 62.5(C-6a), 60.2($-OCH_3$), 60.1($-OCH_3$), 55.9($-OCH_3$), 55.8($-OCH_3$), 53.2(C-5), 43.8($-NCH_3$), 34.4(C-7), 29.1(C-4)。以上数据与文

献[12]数据一致,鉴定为海罂粟碱(glaucine)。

化合物2 无色方晶(甲醇),熔点147 °C,碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z 356 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 6.89(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-12), 6.80(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-11), 6.73(1H, s, H-1), 6.62(1H, s, H-4), 4.26(1H, d, $J = 15.8$ Hz, He-8), 3.89(3H, s, $-OCH_3$), 3.87(3H, s, $-OCH_3$), 3.86(3H, s, $-OCH_3$), 3.85(3H, s, $-OCH_3$), 3.56(2H, m), 3.26(3H, m), 2.84(1H, m), 2.66(2H, m)。以上数据与文献[12-14]数据一致,鉴定为四氢巴马亭(tetrahydropalmatine)。

化合物3 无色棱柱结晶(甲醇),熔点135 °C,碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z 370 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 6.90(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-12), 6.82(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-11), 6.68(1H, s, H-1), 6.61(1H, s, H-4), 4.20(1H, d, $J = 15.8$ Hz, He-8), 3.87(12H, m, $4 \times -OCH_3$), 3.69(1H, brs, H-14), 3.50(1H, d, $J = 15.8$ Hz, Ha-8), 3.23(1H, m, H-13), 3.18(2H, m, H-6), 2.61(2H, m, H-5), 0.95(3H, d, $J = 6.9$ Hz, $-CH_3$)。以上数据与文献[12-15]数据一致,鉴定为d-紫堇碱(d-corydaline)。

化合物4 淡黄色针晶(甲醇),碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 340 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 6.87(1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.79(1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.73(1H, s), 6.59(1H, s), 5.92(2H, s, $O-CH_2-O$), 4.24(1H, d, $J = 15.7$ Hz), 3.85(6H, s, $2 \times -OCH_3$), 3.54(2H, m), 3.20(3H, m), 2.82(1H, m), 2.65(2H, m)。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 150.3(C-9), 146.1(C-2, C-3), 145.0(C-10), 130.8(C-14a), 128.3(C-12a), 127.8(C-4a, C-8a), 123.9(C-12), 110.9(C-11), 108.4(C-4), 105.5(C-1), 100.8($O-CH_2-O$), 60.2(C-14), 59.6($-OCH_3$), 55.9($-OCH_3$), 53.9(C-8), 51.4(C-6), 36.4(C-13), 29.5(C-5)。以上数据与[12,14,16]数据一致,鉴定为四氢小檗碱(tetrahydroberberine)。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 130.
[2] 王晓玲,郑振,洪战英,等. 中药延胡索的化学成分与质量控制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011(1): 227.

血畅宁组方有效部位总皂苷 HPLC 特征图谱研究

林辉, 饶剑花, 潘毅*, 阳涛, 徐大量, 张鹏
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立血畅宁组方有效部位总皂苷的 HPLC 特征图谱。方法: 采用 HPLC 法, 色谱条件 Synergi Fusion-RP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水溶液, 梯度洗脱进行色谱分离; 检测波长 203 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 (30 ± 5) °C。结果: 12 批不同批次的血畅宁组方药材所得皂苷部位中, 除 3 批外, 其余 9 批与系统生成的对照特征图谱的相似度均在 0.9 以上; 归纳出血畅宁组方皂苷部位有 19 个共有峰, 不同批次样品中主要化学成分组成相似, 但相对比例有明显的差异。结论: 所建立的方法简单可行, 能有效控制血畅宁组方有效部位总皂苷的质量。

[关键词] 血畅宁组方; 有效部位; 总皂苷; 高效液相色谱; 特征图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0127-04

Studies of HPLC Characteristic Chromatogram of Saponins in Effective Parts of Xuechangning Formula

LIN Hui, RAO Jian-hua, PAN Yi*, YANG Tao, XU Da-liang, ZHANG Peng
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20120924(006)

[基金项目] 广东省科技计划课题项目(2010B030700036); 国家自然科学基金项目(81173181)

[第一作者] 林辉, 研究员, 硕士生导师, 从事中药有效部位研究与新药开发, Tel: 020-39358838, E-mail: linhuijw@126.com

[通讯作者] * 潘毅, 教授, 博士生导师, 从事中药防治心脑血管病研究, Tel: 13533718763, E-mail: panyil11111@126.com

- [3] 刘芳, 罗跃娥. 延胡索研究概况[J]. 天津中医学院学报, 2005, 24(4): 240.
- [4] 常新全, 丁丽霞. 中药活性成分分析手册[M]. 北京: 学苑出版社, 2002: 847
- [5] 王晓玲, 郑振, 洪战英, 等. 中药延胡索的化学成分与质量控制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 227.
- [6] 韩利文, 陈锡强, 袁延强, 等. 高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 241.
- [7] 陈欣霞, 张丽艳, 万金志, 等. 高速逆流色谱同时分离头花蓼中的没食子酸和短叶苏木酚酸[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 1957.
- [8] 许有威, 齐艳, 韩旭, 等. 高速逆流色谱结合大孔树脂从龙胆中快速分离高纯度龙胆苦苷[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24): 2595.
- [9] 王岱杰, 刘建华, 耿岩玲, 等. 夏天无生物碱的高速逆流色谱分离纯化[J]. 分析化学研究报告, 2010, 38(6): 783.
- [10] 陈红英, 李学刚, 叶小利, 等. 黄连中胆碱的分离及其对小檗碱在 HepG₂ 细胞中糖代谢作用的影响[J]. 2012, 37(12): 1771.
- [11] 管仁军, 王岱杰, 于宗渊, 等. 高速逆流色谱分离纯化蔓荆子中的活性成分[J]. 色谱, 2010, 28(11): 1043.
- [12] 许翔鸿, 王峥涛, 余国奠, 等. 延胡索中生物碱成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(6): 483.
- [13] 胡甜甜, 张雪, 马世中, 等. 延胡索中的生物碱成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1917.
- [14] 张晓丽, 曲扬, 侯家鸣, 等. 延胡索的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(7): 537.
- [15] 王文蜀, 肖巍, 喻蓉, 等. 中药延胡索化学成分研究[J]. 中央民族大学学报, 2007, 16(1): 80.
- [16] 吕子明, 孙武兴, 段绪红, 等. 胡索化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 235.

[责任编辑 邹晓翠]