

· 基础研究 ·

高速逆流色谱技术分离纯化藜芦中甾体类生物碱

姜姣姣^{1,2}, 闫慧娇², 文蕾^{1,2}, 郑秀花^{1,2}, 王晓^{2*}, 陈燕平³

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355;

2. 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, 山东 济南 250014;

3. 烟台出入境检验检疫局, 山东 烟台 264000)

[摘要] **目的:** 采用高速逆流色谱(HSCCC)技术对藜芦中的甾体类生物碱进行分离鉴定。**方法:** 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:3:7, V/V)为溶剂系统, 在转速为 $850\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、流速为 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、检测波长为 280 nm 的实验条件下进行分离。**结果:** 从 300 mg 粗提物中分离得到 2.1 mg 的藜芦酰棋盘花胺(veratroylzygadenine)和 9.3 mg 的介芬胺(Jervine), 经HPLC分析, 其纯度分别为 91.34% 、 98.10% 。**结论:** 该方法简便、重现性好、分离量大, 适合于甾体类生物碱的分离纯化。

[关键词] 高速逆流色谱; 藜芦; 甾体类生物碱

Separation and Purification of Steroidal Alkaloids from *Veratrum nigrum* by High-speed Counter-current ChromatographyJIANG Jiaojiao^{1,2}, YAN Huijiao², WEN Lei^{1,2}, ZHENG Xiuhua^{1,2}, WANG Xiao^{2*}, CHEN Yanping³

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

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

3. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, China)

[Abstract] **Objective:** To separate and purify steroidal alkaloids from the crude extract of *Veratrum nigrum* L. by HSCCC. **Methods:** Petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (5:5:3:7, V/V) was used as the solvent system. Separation was performed at a rotating speed of $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$. The flow rate was $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the detection wavelength was set at 280 nm . **Results:** 2.1 mg veratroylzygadenine and 9.3 mg jervine were purified from 300 mg of the crude extract with the purity of 91.34% and 98.10% determined by HPLC, respectively. **Conclusion:** The method is simple, good reproducible and efficient which is suitable for the separation of steroidal alkaloids.

[Keywords] High-speed counter-current chromatography; *Veratrum nigrum* L.; steroidal alkaloids

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.5.011

藜芦 *Veratrum nigrum* L. 为百合科藜芦属植物^[1], 多年生草本, 主要生长在海拔较高的山坡林下或草丛中, 主产于中国的东北、华北、贵州、陕西等地区^[2]。藜芦又名黑藜芦、山葱, 在《神农本草经》、《别录》和《本草纲目》中均有记载, 其味辛、苦, 性寒, 具有祛痰、催吐、杀虫等作用^[3], 通常用于治疗中风、癫痫、疟疾、跌打损伤、头癣等疾病, 此外还可灭蛆、蝇^[4], 其主要药效成分有藜芦生物碱、萜类、二肽类、黄酮类及其他化合物^[5]。

近年来, 研究发现藜芦中有效成分藜芦生物碱还具有强心降压、改善脑循环、抗癌等生理活性^[6-7], 但是目前国内对藜芦生物碱的研究还比较少。藜芦生物碱主要为甾体类生物碱, 其基本母核为胆甾烷类化合物, 特点是没有紫外吸收, 且含量较低, 为藜芦生物碱的分离纯化增加了很大的难度。传统的分离方法主要包括柱色谱法^[8]、薄层色谱法^[9]、高效液相色谱法^[10]等。这些方法不仅耗时间长、效率低, 还容易对被分离成分产生死吸附、变性等影响。为了进一步研究藜芦生物碱的生理活

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(ZR2016YL006); 山东省科技进步计划(2014GZX219003)

* [通信作者] 王晓, 研究员, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 天然产物研究与开发; Tel: (0531) 82605319, E-mail: wangx@sdas.org

性,更好地开发利用藜芦生物碱,本文研究建立一种高效的分离制备藜芦生物碱的方法,制备了纯度较高的藜芦酰棋盘花胺和介芬胺两个单体化合物(化学结构式见图1)。

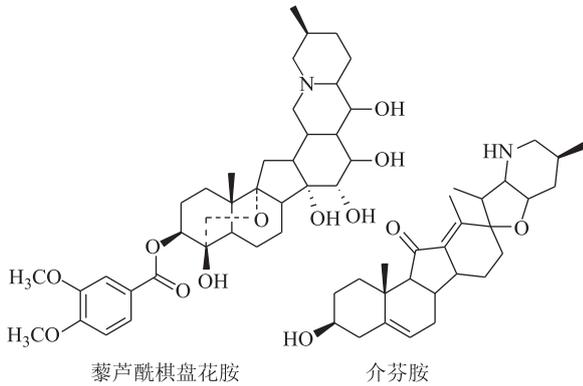


图1 藜芦酰棋盘花胺和介芬胺的化学结构

1 仪器与材料

TBE-300A 高速逆流色谱仪(上海同田生物技术有限公司),该系统由 TBP5002 泵、多层聚四氟乙烯螺旋管、8823-B 紫外检测器(上海胜斯贸易有限公司)、3057-11 记录仪(上海精科实业有限公司)组成; Agilent 1260 高效液相色谱系统 [配有蒸发光散射检测器(ELSD),美国 Agilent 公司]; 旋转蒸发器(上海况胜科技有限公司)。

样品前处理以及高速逆流色谱中所用到的石油醚、乙酸乙酯、甲醇均为分析纯(邹平鲁岳化工有限公司),水为过滤蒸馏水; 高效液相色谱所用乙腈为色谱纯(美国天地公司),实验用水为过滤蒸馏水及娃哈哈纯净水。

藜芦药材购于哈尔滨三棵树药材专业市场,经山东中医药大学李佳教授鉴定为百合科植物藜芦 *Veratrum nigrum* L. 的干燥根茎。

2 方法

2.1 藜芦生物碱粗提物的制备

将藜芦药材 5 kg 粉碎,过 40 目筛,将其平均置于 3 个 10 L 的圆底烧瓶中,分别加入 95% 的乙醇 6 L 回流提取 3 次(提取时间分别为 3、2、2 h),过滤,合并滤液,减压浓缩至无乙醇味道,得浓缩液 1200 mL。在浓缩液中慢慢加入 10% HCl 溶液,调节溶液 pH 值达到 3,然后加入等体积的石油醚萃取 3 次,将石油醚萃取后的水相加入氨水调节溶液至

pH 值达到 10,得沉淀 105 g。将 105 g 沉淀溶于 pH 值为 10 的碱水溶液中,超声振荡后用乙酸乙酯萃取,回收溶剂得乙酸乙酯萃取物,将其用酸水溶解后,再加入氨水调节 pH 值为 10,过滤得较纯样品 30 g,用于进一步分离。

2.2 两相溶剂系统和样品溶液的制备

实验所采用的溶剂体系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:3:7, V/V),将上述溶剂按比例置于 2000 mL 的分液漏斗中,充分振荡,静置,使其分层。使用前分出上下相,将上层溶液作为固定相,下层作为流动相,放于不同容器中,然后超声脱气 5 min,待用。

取 400 mg 纯化后的样品,因其溶解性差,在上相中稍好,故取上述溶剂系统的上相溶解样品,作为样品溶液。

2.3 分离和鉴定

2.3.1 HSCCC 的分离制备过程 将预先准备好的上相,以 $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速泵入 HSCCC 的螺旋管中,待上相充满 HSCCC 的螺旋管时,启动仪器,顺时针缓慢调节转速至 $850 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,转速稳定后,以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速泵入下相,当在出口观察到有下相流出时,说明上下相已经建立了动态平衡。将样品溶液通过进样阀注入分离柱中,然后开启紫外检测器(检测波长 280 nm)和记录仪,根据 HSCCC 图谱手动收集馏分。

2.3.2 HPLC 分析 根据 HSCCC 图谱将分离得到的馏分及吹出液用 HPLC 进行分析。色谱柱为 Inertsil ODS-SP(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温为 25 °C; 检测波长为 265 nm; 流动相为乙腈(A相)、0.1% 三氟乙酸水溶液(B相),梯度洗脱(0~5 min, 20% A; 5~30 min, 20% A~40% A; 30~40 min, 40%~100% A; 40~45 min, 100% A); 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: 20 μL。

3 结果与讨论

3.1 HPLC 条件的优化

本实验考察了甲醇-水、乙腈-0.05% 甲酸水溶液、甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液和乙腈-0.1% 三氟乙酸水溶液等作为流动相时样品中各组分的分离效果,也考察了等度洗脱和梯度洗脱的影响。结果发现当采用乙腈-0.1% 三氟乙酸的水溶液进行梯度洗脱时,样品中的各组分具有较好的分离效果,如图 3 所示。

3.2 HSCCC 分离条件的优化

HSCCC 分离效果的好坏关键在于所选择的溶剂系统是否合适,而溶剂系统是根据两相溶剂中的分配系数(K_D)为指标来决定的。通常, K_D 值范围是0.5~2.0时说明此溶剂系统较好^[11]。本实验利用 HPLC 测定了在不同比例的石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水中目标化合物的 K_D 值。结果发现,当溶剂体系石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水的比例为5:5:3:7时,样品中的两个生物碱具有合适的 K_D 值,见表1。

表1 样品中的2个生物碱在不同溶剂系统中的 K_D 值

石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (V/V)	分配系数 (K_D)	
	化合物1	化合物2
6:4:6:4	0.28	0.67
5:5:4:6	0.54	0.83
5:5:3:7	0.79	1.25
4:6:4:6	1.12	2.34

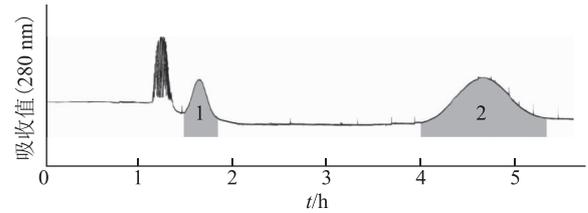
从表1中的数据可以看出,样品中的2个生物碱在石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:6:4, V/V)的溶剂系统中 K_D 值较小,使用这个溶剂系统能够很快洗脱样品中的2个生物碱,因此两组分将得不到较好的分离。当溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(4:6:4:6, V/V)时,化合物1、2的 K_D 值分别为1.12和2.34,可以看出此时的 K_D 偏大,需要较长的时间才能使两个组分洗脱出来。而溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水5:5:4:6和5:5:3:7时,两个目标化合物的 K_D 值基本符合要求。通过实验发现,当石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水体积比为5:5:3:7更为合适,两组分的分离效果更好,且分离时间较短。

3.3 HSCCC 分离纯化

利用上述优化的溶剂系统石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:3:7, V/V)进行化合物的分离。一次进样300 mg 藜芦生物碱粗提物,在5.5 h内完成一次分离,根据图2进行馏分的手动收集,最终得到藜芦酰棋盘花胺(峰1)2.1 mg和介芬胺(峰2)9.3 mg,分离制备的化合物经 HPLC 进行分析,其纯度分别为91.34%和98.10%(见图3)。

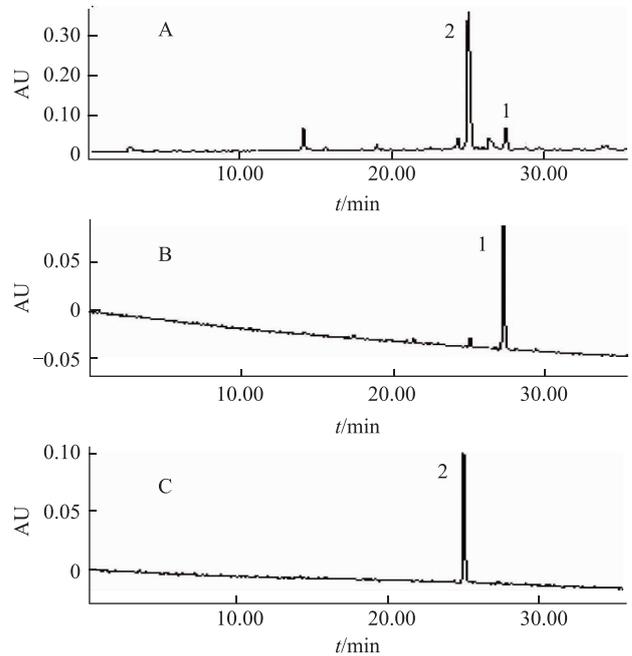
3.4 化合物的结构鉴定

化合物1:无色针状结晶,碘化铋钾试剂显黄色,¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ : 1.06 (3H,



注: 1. 藜芦酰棋盘花胺峰; 2. 介芬胺峰。

图2 藜芦中甾体生物碱的 HSCCC 图谱



注: A. 藜芦粗提物; B. 藜芦酰棋盘花胺; C. 介芬胺; 1. 藜芦酰棋盘花胺峰; 2. 介芬胺峰。

图3 藜芦粗提物及得甾体生物碱的 HPLC 图

s, H-19), 1.08 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-27), 1.25 (3H, s, H-21), 3.29 (1H, s, OH-20), 3.81 (3H, s, OMe-4'), 3.84 (3H, s, OMe-5'); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 32.64 (C_1), 26.76 (C_2), 75.47 (C_3), 104.15 (C_4), 46.64 (C_5), 19.17 (C_6), 17.02 (C_7), 43.92 (C_8), 95.41 (C_9), 43.92 (C_{10}), 95.41 (C_{11}), 46.92 (C_{12}), 32.85 (C_{13}), 80.52 (C_{14}), 69.58 (C_{15}), 70.30 (C_{16}), 45.56 (C_{17}), 63.52 (C_{18}), 19.51 (C_{19}), 72.06 (C_{20}), 19.71 (C_{21}), 70.75 (C_{22}), 17.59 (C_{23}), 30.93 (C_{24}), 26.76 (C_{25}), 62.52 (C_{26}), 17.42 (C_{27}), 165.30 ($C_{1'}$), 122.70 ($C_{2'}$), 111.57 ($C_{3'}$), 148.91 ($C_{4'}$), 153.48 ($C_{5'}$), 112.22 ($C_{6'}$), 123.63 ($C_{7'}$), 56.14 ($C_{OMe-4'}$), 55.95 ($C_{OMe-5'}$)。以上数据与文献对比^[12-13],数据基本一致,鉴定为藜芦酰棋盘花碱(veratroylzygadenine)。

化合物2: 无色针状结晶, 碘化铯钾试剂显黄色, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 0.93 (3H, d, $J=6.4\text{ Hz}$, H-27), 1.12 (3H, d, $J=7.1\text{ Hz}$, H-21), 1.09 (3H, s, H-19), 2.06 (3H, s, H-18), 2.50 (1H, m, H-8), 2.52 (1H, m, H-14), 3.05 (1H, m, H-22), 3.28 (1H, m, H-23), 3.52 (1H, m, H-3), 5.33 (1H, m, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ : 36.95 (C_1), 31.26 (C_2), 70.48 (C_3), 41.82 (C_4), 142.75 (C_5), 120.79 (C_6), 30.42 (C_7), 38.37 (C_8), 62.09 (C_9), 38.17 (C_{10}), 206.88 (C_{11}), 137.05 (C_{12}), 145.75 (C_{13}), 44.09 (C_{14}), 24.51 (C_{15}), 30.61 (C_{16}), 85.1 (C_{17}), 12.08 (C_{18}), 18.51 (C_{19}), 41.23 (C_{20}), 11.13 (C_{21}), 66.39 (C_{22}), 75.58 (C_{23}), 38.94 (C_{24}), 32.07 (C_{25}), 54.06 (C_{26}), 19.08 (C_{27})。以上数据与文献对比^[14-15], 数据基本一致, 鉴定为介芬胺(jervine)。

4 结论

藜芦具有广泛的药用价值, 为了进一步筛选出具有药理活性的化学成分, 需要高纯度的单体化合物, 因此高效快速地分离纯化技术显得尤为重要。本研究采用酸溶碱沉的方法对藜芦中生物碱进行提取, 然后将粗提物作为样品, 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:3:7, V/V)为溶剂系统, 经一次高速逆流色谱分离, 在5 h内从300 mg藜芦粗提物中得到藜芦酰棋盘花胺(2.1 mg)和介芬胺(9.3 mg), 纯度分别为91.34%和98.10%。该方法简便易操作, 且所得单体纯度高, 为甾体类生物碱制备及分离提供了一种新思路。

参考文献

[1] 薛兵, 温辉梁, 温文. 藜芦中化学成分[J]. 南昌大学学报

(理科版), 2013, 37(2):152-154.

- [2] 赵瑜, 陆国才, 张卫东, 等. 藜芦甾体生物碱药理毒理学研究进展[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4):310-311.
- [3] 赵朗, 欧志强, 王刊, 等. 兴安藜芦中甾体生物碱成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23):3039-3042.
- [4] 梁光义. 藜芦属植物中生物碱的研究概况[J]. 药学报, 1984, 19(4):309-320.
- [5] 李伟, 陆艳娟, 王清, 等. 黑藜芦生物碱的降压作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2011, 32(1):97-99.
- [6] 周剑侠, 康露, 毕京博, 等. 异甾体生物碱-环巴胺的研究进展[J]. 中国天然药物, 2006, 4(6):468-472.
- [7] 赵瑜, 陆国才, 张卫东, 等. 藜芦生物碱药理和毒理学研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(3):240-242.
- [8] 聂利月, 汤建, 李慧梁, 等. 兴安藜芦乙酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(13):971-973.
- [9] 全香花, 朴惠善, 孙向红, 等. 兴安藜芦的化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(12):914-916.
- [10] 张盛, 周剑侠, 寿清耀, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定藜芦中的介藜芦碱和藜芦胺[J]. 色谱, 2008, 26(1):56-59.
- [11] Shu X K, Duan W J, Liu F, et al. Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr B, 2014, 947-948(1):62-67.
- [12] Kadota S, Chen S Z, Li J X, et al. A steroidal alkaloid from *Veratrum oblongum* [J]. Phytochemistry, 1995, 38(3):777-781.
- [13] 周剑侠, 康露, 沈征武. 天目藜芦生物碱成分研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(18):1379-1380.
- [14] Wang L S, Zhao D Q, Liu Y H. Quality assessment of *Veratrum nigrum* L. By LC-ELSD fingerprints and LC quantitative analysis [J]. Chromatographia, 2008, 68:961-967.
- [15] Atta-ur-Rahman, Ali R A, Ashraf M, et al. Steroidal alkaloids from *Veratrum Album* [J]. Phytochemistry, 1996, 43(4):907-911.

(收稿日期 2016-07-20)