

pH 区带逆流色谱法分离制备荷叶中生物碱

郑振佳^{1,2}, 杨 滨³, 徐美霞¹, 耿岩玲², 林小静², 王 晓^{2,3*}

1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018

2. 山东省科学院 中药过程控制研究中心, 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: 目的 建立对荷叶生物碱进行分离的 pH 区带逆流色谱方法。方法 溶剂系统为叔丁基甲醚-甲醇-水 (4:1:5), 上相添加三乙胺 (10 mmol/L) 作为固定相, 下相添加盐酸 (5 mmol/L) 为流动相进行洗脱, 在主机转速 800 r/min、体积流量 1.5 mL/min、检测波长 254 nm 条件下进行分离制备。结果 从 2.18 g 荷叶提取物中一次分离得到 *N*-去甲荷叶碱 110 mg、*O*-去甲荷叶碱 420 mg、荷叶碱 310 mg 和莲碱 190 mg 4 种生物碱, 质量分数均大于 98%; 各化合物通过 HPLC、MS 和 ¹H-NMR 进行了化学结构鉴定。结论 pH 区带逆流色谱法是一种快速高效的分离纯化荷叶生物碱的方法。

关键词: 荷叶; 生物碱; pH 区带逆流色谱; *N*-去甲荷叶碱; *O*-去甲荷叶碱; 荷叶碱; 莲碱

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0684-03

Separation and preparation of alkaloids in *Nelumbinis Folium* by pH-zone-refining counter-current chromatography

ZHENG Zhen-jia^{1,2}, YANG Bin³, XU Mei-xia¹, GENG Yan-ling², LIN Xiao-jing², WANG Xiao^{2,3}

1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2. Process Control Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shandong Analysis and Test Center, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective A novel method for the separation of alkaloids from *Nelumbinis Folium* by pH-zone-refining counter-current chromatography (pH-ZRCCC). **Methods** The two-phase solvent system composed of MtBE-methanol-water (4:1:5), 10 mmol/L triethylamine (TEA) in organic stationary phase and 5 mmol/L HCl in aqueous mobile phase. The upper phase was used as the stationary phase, while the lower phase was used as the mobile phase. In one-step elution under the conditions of a flow rate of 1.5 mL/min, 800 r/min and the effluent was detected at 254 nm. **Results** From 2.18 g of the crude extract, 110 mg *N*-normuciferin, 420 mg *O*-normuciferin, 310 mg nuciferine, and 190 mg roemerine were obtained and each with a purity of over 98% as determined by HPLC. The structures of the isolated compounds were identified by HPLC, MS, and ¹H-NMR. **Conclusion** The present pH-ZRCCC method may be applied to the purification of other various alkaloids from natural products.

Key words: *Nelumbinis Folium*; alkaloids; pH-zone-refining counter-current chromatography (pH-ZRCCC); *N*-normuciferin; *O*-normuciferin; nuciferine; roemerine

生物碱是荷叶的主要活性成分之一, 无论在药材还是在制剂中, 荷叶生物碱的量均作为其质量控制的重要指标^[1]。传统的分离方法由于固相吸附等因素的影响, 分离困难且效率低下^[2-3]。由于缺少高效快捷的荷叶生物碱的制备方法, 限制了对荷叶

资源的进一步开发利用^[4-5]。已有学者探索采用新的方法提取分离荷叶生物碱^[6-7]。pH 区带逆流色谱 (pH-zone-refining counter-current chromatography, pH-ZRCCC) 利用待分离有机酸 (碱) 的酸 (碱) 解离常数及疏水性的不同进行分离。该技术可以使

收稿日期: 2010-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20872083); 中国中医科学院中药研究所自然科学基金资助项目 (ZZ20090107); 山东省科技攻关项目 (2010GSF10287); 济南市高等院所自主创新计划项目 (201004010)

作者简介: 郑振佳 (1985—), 男, 山东烟台人, 在读硕士, 主要从事天然产物分离纯化与活性研究。

Tel: 13615487552 E-mail: pengyou-jia@163.com

*通讯作者 王 晓 Tel: (0531)82605319 Fax: (0531)82964889 E-mail: wangx@keylab.net

杂质被集中在平台的两侧, 具有样品分离容量大、分离纯度和分离效率高等优点^[8-9]。本实验以荷叶粗提物进行 pH 区带逆流色谱分离纯化, 对建立生物碱成分的高效分离纯化方法具有重要意义。

1 仪器与试剂

GS10A 高速逆流色谱仪(北京新技术研究所); Agilent 1120 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 配自动进样器); 1100 LC/1946 MSD 液质联用仪(美国安捷伦公司); INOVA 600 MHz 核磁共振波谱仪(美国瓦里安公司)。

粗提物的制备及 pH 区带逆流色谱分离所用溶剂均为分析纯(济南巨业化学试剂有限公司); HPLC 分析用乙腈为色谱纯(山东禹王实业有限公司); 水为二次蒸馏水。

荷叶购于山东中医药大学中鲁医院, 经山东中医药大学周洪雷教授鉴定为莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 样品制备

取荷叶 5 kg, 粉碎, 用 90%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压蒸馏, 回收乙醇, 石油醚萃取后用氨水调至碱性, 氯仿萃取, 合并萃取液浓缩至干。残留物加 1%盐酸超声溶解, 氨水调至碱性, 氯仿萃取, 合并萃取液, 减压浓缩除去氯仿后, 真空冷冻干燥, 得 6.5 g 褐色荷叶粗提物, 放置于冰箱中冷藏备用。

2.2 两相溶剂系统及样品溶液的制备

pH 区带逆流色谱的溶剂系统为叔丁基甲醚-甲醇-水(4:1:5), 配制于分液漏斗中并剧烈振荡, 体系分相平衡后分离出上下相, 上层有机相加 10 mmol/L 三乙胺作为固定相, 下层水相加 5 mmol/L 盐酸作为流动相。

称取 2.18 g 粗提物于试管中, 加入 5 mL 添加三乙胺的上相和 5 mL 不加盐酸的下相, 超声振荡使之溶解, 以备 pH 区带逆流色谱分离用。

2.3 液相色谱和质谱条件

液相色谱条件: Welch Materials C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1%三乙胺水溶液; 梯度洗脱程序: 0~10 min, A 由 30%升至 40%; 10~25 min, A 由 40%升至 70%; 25~30 min, A 由 70%升至 100%; 柱温为室温; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 270 nm; 进样量 10 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子扫描模式,

干燥气流量为 10 L/min, 雾化室压力 206.85 kPa, 干燥气温度 350 °C, 毛细管电压 4 kV。

2.4 pH-ZRCCC 分离过程及结果

首先将固定相用泵以 9 mL/min 灌满逆流色谱分离柱, 然后将溶有一定量样品的上下相混合液通过进样器进入色谱柱, 开启速度控制器, 使逆流色谱仪的色谱分离柱正转, 达到 800 r/min, 以 1.5 mL/min 泵入流动相。在 254 nm 下检测色谱峰, 以每管 5 mL 进行样品收集, 并用 pH 计测定其 pH 值。

图 1 所示是一个典型的 pH 区带逆流色谱图, 上样量 2.18 g, 固定相保留率为 56%, 生物碱以不规则的矩形峰形式被洗脱, 分离过程共出现 B、C、D、E 共 4 个吸收平台, pH 值测量结果也显示相应的收集部分呈现 pH 平台, 杂质和次要成分被高度集中在矩形峰的两侧, 表明荷叶中的生物碱得到了成功分离。峰 B 得到 110 mg, 峰 C 得到 420 mg, 峰 D 得到 310 mg, 峰 E 得到 190 mg。经 HPLC 测定, B、C、D、E 峰所得成分的质量分数分别为 98.1%、98.9%、98.7%、99.1%, 均大于 98%。色谱图见图 2。

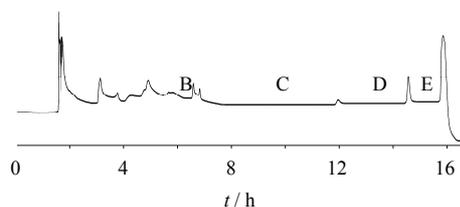


图 1 荷叶提取物的 pH 区带逆流色谱图

Fig. 1 pH-ZRCCC chromatogram of crude extracts from *Nelumbinis Folium*

2.5 生物碱的鉴定

组分 B: 白色结晶, ESI-MS m/z : 282 $[M+H]^+$. ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 8.40 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-11), 7.21~7.33 (3H, m, H-8, 9, 10), 6.66 (1H, s, H-3), 3.89 (3H, s, C₁-OCH₃), 3.66 (3H, s, C₂-OCH₃), 3.50, 3.51 (N-H, dd, $J=5.4, 6.0$ Hz, N-H)。数据与文献报道^[10-11]*N*-去甲荷叶碱一致, 证明组分 B 为 *N*-去甲荷叶碱。

组分 C: 白色结晶, ESI-MS m/z : 282 $[M+H]^+$. ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 8.27 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-11), 7.22~7.32 (3H, m, H-8, 9, 10), 6.67 (1H, s, H-3), 3.57 (3H, s, C₁-OCH₃), 2.55 (3H, s, N-CH₃)。数据与文献报道^[10]*O*-去甲荷叶碱一致, 证明组分 C 为 *O*-去甲荷叶碱。

组分 D: 白色结晶, ESI-MS m/z : 296 $[M+H]^+$ 。

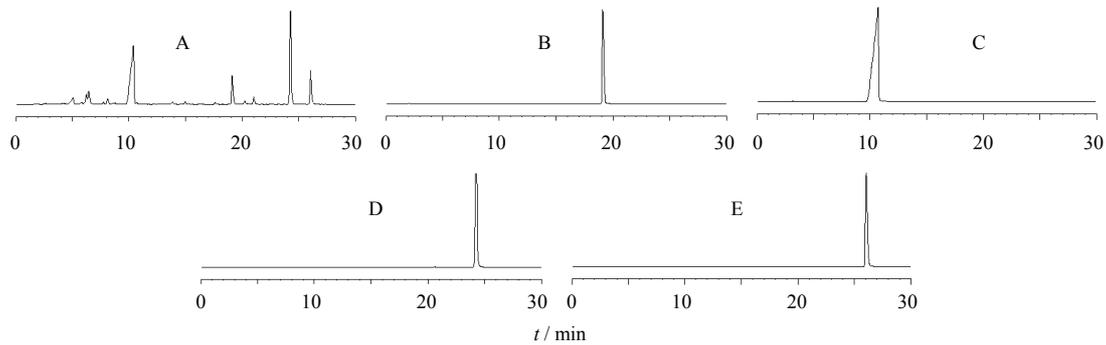


图 2 荷叶总生物碱 (A) 和 pH-区带逆流色谱分离组分 (B~E) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of crude alkaloids from *Nelumbinis Folium* (A) and separated fractions by pH-ZRCCC (B~E)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 8.36 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-11), 7.21~7.32 (3H, m, H-8, 9, 10), 6.63 (1H, s, H-3), 3.89 (3H, s, $\text{C}_1\text{-OCH}_3$), 3.66 (3H, s, $\text{C}_2\text{-OCH}_3$), 2.54 (3H, s, N- CH_3)。数据与文献报道^[11-12]荷叶碱一致, 证明组分 D 为荷叶碱。

组分 E: 黄色结晶, ESI-MS m/z : 280 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 8.06 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-11), 7.22~7.33 (3H, m, H-8, 9, 10), 6.66 (1H, s, H-3), 6.09 (1H, d, $J=1.2$ Hz, OCH_2), 5.94 (2H, d, $J=1.8$ Hz, OCH_2), 2.54 (3H, s, N- CH_3)。数据与文献报道^[11-12]莲碱一致, 证明组分 E 为莲碱。

3 讨论

3.1 HPLC 条件优化

分别以甲醇-0.1%乙酸、甲醇-0.1%三乙胺及乙腈-0.1%乙酸, 乙腈-0.1%三乙胺作为 HPLC 流动相时荷叶粗提物中各组分的分离效果。结果表明, 当采用乙腈-0.1%三乙胺体系进行梯度洗脱时, 可取得良好的分离效果 (图 2-A)。

3.2 pH 区带逆流色谱分离条件优化

选择合适的两相溶剂系统是逆流色谱分离纯化天然植物中活性成分的关键。本实验根据所分离化合物的特性, 考察了叔丁基甲醚-甲醇-水 (4:1:5) 溶剂系统在不同酸度下相的分离情况, 结果发现下相为 10 mmol/L HCl 的溶剂系统分离效果不理想, 4 种生物碱没有完全分离。在此基础上, 调整下相盐酸的浓度, 发现下相为 5 mmol/L HCl 时荷叶中的生物碱能得到很好的分离。因此溶剂系统叔丁基甲醚-甲醇-水 (4:1:5), 上相添加三乙胺 (10 mmol/L) 作为固定相, 下相添加 HCl (5 mmol/L) 为流动相。

本实验应用 pH 区带逆流色谱法从荷叶粗提物中一步分离得到了质量分数大于 98% 的 *N*-去甲荷叶碱、*O*-去甲荷叶碱、荷叶碱和莲碱 4 种生物碱。

生物碱类是荷叶的重要活性成分, 其标准物质的制备对荷叶的质量评价和相关的药理研究具有重要的意义。所建立的 pH 区带逆流色谱法具有制备量大、操作简单等特点, 对荷叶生物碱的快捷有效制备、荷叶资源的进一步开发利用具有重要参考价值。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 单斌, 邓泽元, 熊冬梅, 等. 荷叶中生物碱的提取及组成成分的分析 [J]. 食品科技, 2008(10): 163-166.
- [3] 罗金波, 肖文军, 刘仲华. 荷叶生物碱类成分的研究进展 [J]. 今日药学, 2008, 18(3): 9-12.
- [4] 刘婧婧, 罗旭彪, 陈波, 等. 制备高效液相色谱分离纯化荷叶碱 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 55-57.
- [5] 李文龙, 陈军辉, 殷月芬, 等. 加速溶剂提取-高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱联用分析莲子心中生物碱 [J]. 分析化学, 2008, 36(1): 79-82.
- [6] 黄鑫, 周永传, 陈德煦. 罐组逆流提取荷叶生物碱的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1229-1232.
- [7] 刘婧婧, 罗旭彪, 陈波, 等. 制备高效液相色谱分离纯化荷叶碱 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 55-57.
- [8] Wang X, Geng Y L, Li F W, et al. Large-scale separation of alkaloids from *Corydalis decumbens* by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1115(1/2): 267-270.
- [9] 姜华, 杜琪珍, 王奎武, 等. pH 区带逆流色谱法分离三尖杉生物碱 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(2): 188-191.
- [10] 蒋益虹, 席巧芳, 张英. 荷叶抑菌活性成分的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [11] Zheng Z J, Wang M L, Wang D J, et al. Preparative separation of alkaloids from *Nelumbo nucifera* leaves by conventional and pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(19): 1647-1651.
- [12] 王玲玲, 刘斌, 石任兵. 荷叶的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 416-419.