

## 半制备型高速逆流色谱分离制备铁棒锤根中的一种咪唑生物碱

刘永玲<sup>1,2</sup>, 陈涛<sup>1</sup>, 陈晨<sup>1</sup>, 邹登朗<sup>1,2</sup>, 李玉林<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 采用高速逆流色谱(HSCCC)技术从铁棒锤根氯仿提取物中分离制备了一种高纯度咪唑类生物碱1*H*-imidazole-2-carboxylic acid, butyl ester (ICABE)。采用高效液相色谱(HPLC)测定目标化合物在两相溶剂中的分配系数, 优化HSCCC分离ICABE的溶剂体系, 确定了以正己烷-氯仿-乙醇-水(10:1:13:2, v/v/v/v)为HSCCC的两相溶剂系统, 以上相为固定相, 下相为流动相, 流动相流速为1.8 mL/min, 主机转速850 r/min, 检测波长为230 nm条件下进行分离制备, 在350 min内从100 mg粗样品中一步分离得到7.5 mg ICABE, 经HPLC检测其纯度达98%以上(峰面积归一化法), 结构由UV、<sup>1</sup>H-NMR和<sup>13</sup>C-NMR得以鉴定。该方法简便、快速, 所得产物纯度高, 适合于铁棒锤中ICABE的制备分离。

**关键词:** 半制备; 高速逆流色谱; 咪唑生物碱; 铁棒锤

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2014)05-0543-04

## Isolation and preparation of an imidazole alkaloid from *radix of Aconitum pendulum* Busch by semi-preparative high-speed counter-current chromatography

LIU Yongling<sup>1,2</sup>, CHEN Tao<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>1</sup>, ZOU Denglang<sup>1,2</sup>, LI Yulin<sup>1\*</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** *Aconitum pendulum* Busch is rich C<sub>19</sub> diterpenoid alkaloids, but there is no report of imidazole alkaloid in *Aconitum pendulum* Busch. In this study, an imidazole alkaloid named 1*H*-imidazole-2-carboxylic acid, butyl ester (ICABE) was successfully separated from *Aconitum pendulum* Busch with semi-preparative high-speed counter-current chromatography (HSCCC). The partition coefficient was measured by HPLC to select the solvent systems for ICABE separation by HSCCC. The separation was performed with a two-phase solvent system composed of *n*-hexane-chloroform-ethanol-water (10:1:13:2, v/v/v/v). The upper phase was used as the stationary phase and the lower phase as the mobile phase. It was operated at a flow rate of 1.8 mL/min. The apparatus was rotated at 850 r/min, and the detection wavelength was set at 230 nm. Under the selected conditions, a high efficiency separation of HSCCC was achieved, and 7.5 mg of ICABE was obtained from 100 mg of the crude sample of *Aconitum pendulum* in one-step separation within 350 min. The HPLC analysis showed that the purity of the compound was over 98%. The chemical structure was confirmed by UV, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. The established method is simple, highly efficient and suitable for large scale separation of ICABE from radix of *Aconitum pendulum* Busch.

**Key words:** semi-preparation; high-speed counter-current chromatography (HSCCC); imidazole alkaloid; *Aconitum pendulum* Busch

铁棒锤是毛茛科乌头属植物铁棒锤(*Aconitum pendulum* Busch)的块根, 气特异, 味辛而麻舌, 有毒,

为陕、甘、宁等省应用较广的一种民间草药。该药具有祛瘀活络、止血镇痛等作用, 可用于神经痛、风湿

\* 通讯联系人, E-mail: liyulin@nwiqb.cas.cn.

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-J26).

收稿日期: 2013-12-10

关节痛、妇女痛经、胃痛、牙痛及跌打损伤等治疗。现代药理研究发现,该药具有抗炎、麻醉止痛、抗肿瘤等作用<sup>[1-2]</sup>。文献<sup>[3-6]</sup>报道其化学成分主要是  $\alpha$ -conitine 型 C<sub>19</sub>二萜生物碱,该成分具有药用作用的同时还有较强的毒性;此外,还有甾体及糖苷等成分。咪唑类生物碱作为生物碱的一个重要组成部分,在抗菌、抗病毒、抗凝血、镇痛、抗炎症、抗肿瘤和抗心血管疾病等方面表现出很好的生物活性<sup>[7-8]</sup>。但目前尚未见铁棒锤中咪唑类生物碱的相关报道。

有关铁棒锤化学成分分离的研究报道大多采用传统柱色谱方法<sup>[9,10]</sup>,该方法存在样品组分损失、污染、变性、失活、拖尾、分离困难及回收率低等不足。高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)是一种不使用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术,它克服了固相载体对样品的吸附损失、变性等缺点,因而在植物有效成分的分离与制备方面得到了广泛的应用<sup>[11-13]</sup>。本课题组利用 HSCCC 技术从存放 3 年的铁棒锤根中分离得到了一种咪唑类生物碱成分 1*H*-imidazole-2-carboxylic acid, butyl ester (ICABE) (化学结构式见图 1),为铁棒锤化学成分的进一步开发利用奠定了基础。

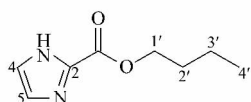


图 1 咪唑类生物碱 ICABE 的化学结构  
Fig. 1 Chemical structure of an imidazole alkaloid ICABE

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、材料与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪,配备 Chemstation for LC 3D system (B. 04. 03) 工作站、G1311C 四元泵(内置脱气机)、G1316 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱、G1329B 自动进样器、色谱柱为 Eclipse XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国安捷伦公司); N-4001 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); TBE-300B 半制备型高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司),配有 TBP-5002 泵、UV500 紫外检测系统、聚四氟乙烯管 (PTFE) 分离柱(内径 2.6 mm, 分离柱体积 290 mL) 及 N2010 色谱工作站和溶剂选择系统(浙江大学智达信息工程有限公司); DC-0506 恒温循环器(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); AM400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。

铁棒锤根于 2009 年 8 月采集于青海省互助县

北山乡,由中国科学院西北高原生物研究所孙菁副研究员鉴定。萃取及 HSCCC 分离用的试剂氯仿、甲醇、乙酸乙酯、无水乙醇和正己烷均为分析纯,氨水(白银银环化学试剂厂),浓盐酸(含量 37%), HPLC 分析用甲醇为色谱纯(山东禹王公司),实验用水为超纯水。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品制备

取干燥的铁棒锤根 4 kg,粉碎,按 23 mL/g 液料比投料,于 58 °C 下用 95% 的酸性乙醇(精确量取 0.83 mL 浓盐酸,以 95% 的乙醇定容到 1 L,得 pH 2 的酸性乙醇)回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液后减压浓缩至无醇味;加入使浸膏能充分溶解的最少量的水,置于分液漏斗中,用 2 倍体积的氯仿萃取除去杂质,然后用氨水调 pH 至 10 左右,再用氯仿萃取 3 次,回收氯仿,得到提取物 22.2 g,作为 HSCCC 待分离样品,放置冰箱内备用。

#### 1.2.2 分配系数的测定

取 1~2 mg 待分样品加入静置分层的两相溶剂系统中,剧烈振荡 1 min,待样品充分溶解、分层后,取上、下两相各 2 mL,用高效液相色谱(HPLC)检测,上相峰面积为  $A_1$ ,下相峰面积为  $A_2$ ,分配系数  $K = A_1/A_2$ 。

#### 1.2.3 溶剂体系及样品溶液的制备

在分液漏斗中按正己烷-氯仿-乙醇-水(10:1:13:2, v/v/v/v) 配制两相溶剂系统共 2 080 mL,充分振荡后静置过夜。以上相为固定相,下相为流动相,使用前分别超声脱气 30 min。将 100 mg 待分离样品粉末完全溶解于 10 mL 上相溶液中,备用。

#### 1.2.4 HSCCC 分离制备

以最大流速将溶剂系统上相泵入主机并充满分离螺旋管,开启循环水浴并将温度设定为 25 °C。开启主机电源以 850 r/min 正向旋转,待转速稳定后,泵入流动相,待流动相从管柱出口流出且基线稳定后,将样品溶液由进样圈注入。管柱出口处流出液在 230 nm 波长下连续检测,根据色谱图手动收集各色谱峰组分,用 HPLC 检测纯度。

#### 1.2.5 HPLC 分析及结构鉴定

色谱柱: Eclipse XDB-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈和水;梯度洗脱程序: 0~30 min, 59% 乙腈; 30~32 min, 59% 乙腈~70% 乙腈; 32~40 min, 70% 乙腈~90% 乙腈; 40~50 min, 90% 乙腈。流速 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 230 nm; 进样量: 10 μL。

HSCCC 分离得到的化合物 ICABE 结构由<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 数据进行鉴定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HSCCC 溶剂系统的选择及分离条件的优化

在 HSCCC 中,溶剂体系的选择至关重要。主要考虑溶剂对分离物质的溶解性、分配系数  $K$ 、分离因子  $\alpha$ 、分层时间及分离过程中固定相保留率等的影响。HSCCC 最合适的  $K$  值范围是 0.5 ~ 2,当  $K < 0.5$  时,目标化合物与杂质峰重叠无法分离;当  $K > 2$  时,会使分离时间延长、峰展宽严重,目标化合物的纯度降低<sup>[14-16]</sup>;分离因子  $\alpha$  应大于 1.5;另外,溶剂系统的乳化会将固定相带出,进而影响保留率,因此其分层时间应小于 30 s<sup>[17]</sup>。

本实验根据文献和经验,选用了 3 种不同的溶剂系统,采用 HPLC 方法测定目标化合物在两相中的分配系数  $K$ 。从铁棒锤氯仿提取物的 HPLC 谱图可以看出,目标化合物邻近有 3 个峰干扰程度较大(见图 2),因此我们分别分析比较了 3 种不同溶剂系统对目标化合物及邻近 3 个干扰峰的分配系数,结果见表 1。

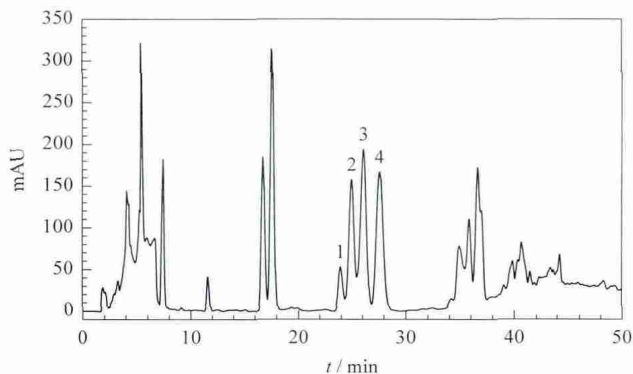


图 2 铁棒锤氯仿提取物的 HPLC 谱图  
Fig. 2 HPLC chromatogram of chloroform extract from *Aconitum pendulum*  
Peaks 1-3: interference compounds; peak 4: ICABE.

由表 1 可知,在所选溶剂系统中,采用氯仿-甲

醇-0.08 mol/L 盐酸和正己烷-氯仿-乙醇-水(10:1:11:2, v/v/v/v) 时,干扰峰的分配系数与目标成分的分配系数接近,不利于目标成分的分离;正己烷-氯仿-乙醇-水(10:1:13:2, 10:1:14:2, v/v/v/v) 及正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(10:1:11:2, 10:1:13:2, v/v/v/v) 可以给出满足条件的  $K$  值。采用上述 4 个溶液系统时干扰峰与目标成分的分离因子  $\alpha$  (以最小的  $\alpha$  计) 分别为 2.1、1.44、1.81、1.54。考虑到样品成分复杂,为尽量减小干扰峰的影响,故选择正己烷-氯仿-乙醇-水(10:1:13:2, v/v/v/v) 作为 HSCCC 分离的溶剂系统。

实验同时对流动相流速、主机转速和分离温度进行了优化,结果发现在流速为 1.8 mL/min、转速为 850 r/min、温度为 25 °C 条件下,固定相保留率达到 75%,分离结果令人满意。在此分离条件下,从 100 mg 待分离样品中一次性分离得到 7.5 mg ICABE。HSCCC 分离谱图见图 3。经峰面积归一化法测定 ICABE 的纯度大于 98% (见图 4)。

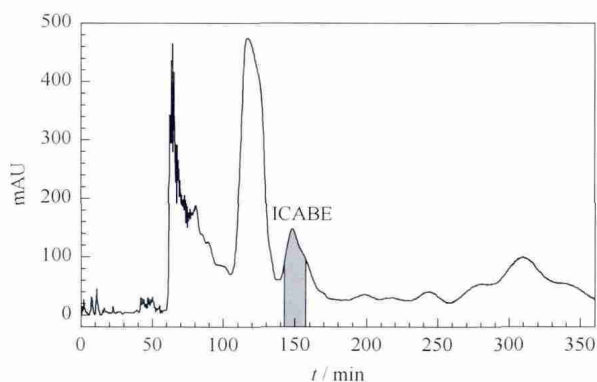


图 3 铁棒锤氯仿提取物的 HSCCC 谱图  
Fig. 3 HSCCC chromatogram of chloroform extract from *Aconitum pendulum*

### 2.2 HSCCC 制备组分的结构鉴定

HSCCC 制备获得的化合物为淡黄色油状物,其<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 数据: 7.71 (m, 1H, H-4), 7.52 (m, 1H, H-5), 4.31 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, H-1'), 1.72 (m, 2H, H-2'), 1.45 (m,

表 1 目标化合物在不同溶剂系统中的分配系数 ( $K$ )

Table 1 Partition coefficients ( $K$ ) of the targeted compound in three solvent systems

Solvent system	Volume ratio	$K_1$	$K_2$	$K_3$	$K_4$
Chloroform-methanol-0.08 mol/L HCl	4:1.0:2	0.29	0.37	0.37	0.31
	4:0.8:2	2.05	1.58	1.38	2.18
	4:0.5:2	2.58	2.14	2.08	2.72
<i>n</i> -Hexane-chloroform-ethanol-water	10:1:11:2	3.60	5.00	2.20	2.00
	10:1:13:2	3.00	3.20	2.10	1.00
	10:1:14:2	2.10	2.30	1.30	0.90
<i>n</i> -Hexane-ethyl acetate-ethanol-water	10:1:11:2	4.80	5.90	3.80	2.10
	10:1:13:2	2.00	3.00	2.90	1.30

$K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  and  $K_4$  represent the partition coefficients of corresponding peaks shown in Fig. 2.

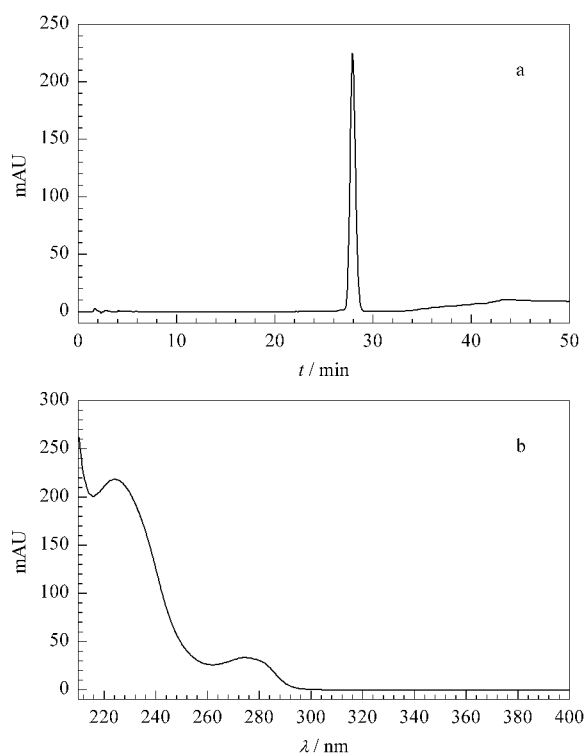


图 4 HSCCC 制备组分 ICABE 的 (a) HPLC 谱图及 (b) 紫外光谱图

Fig. 4 (a) HPLC chromatogram and (b) UV spectrum of ICABE prepared by HSCCC

2H, H-3'), 0.96(t,  $J=6.0$  Hz, 3H, H-4'); 其 $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 数据: 167.6 (C=O), 132.2 (C-2), 130.8 (C-4), 128.7 (C-5), 65.4 (C-1'), 30.5 (C-2'), 19.1 (C-3'), 13.6 (C-4')。核磁共振碳谱中 167.6 数据表明分子中存在 -COO-基团; 氢谱中 7.71 (m, 1H) 和 7.52 (m, 1H) 数据结合碳谱中 132.2、130.8 和 128.7 数据表明分子存在一个咪唑环, 且酯基中的羰基碳和咪唑环  $\text{C}_2$  (132.2) 相连, 氢谱中 4.31 (t,  $J=6.0$  Hz, 2H)、1.72 (m, 2H)、1.45 (m, 2H)、0.96 (t,  $J=6.0$  Hz, 3H) 数据结合碳谱中 65.4、30.5、19.1 和 13.6 数据表明分子中存在 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 基团。通过以上数据确定该化合物为 1*H*-imidazole-2-carboxylic acid, butyl ester (ICABE)。

### 3 结语

本研究利用高速逆流色谱技术, 以正己烷-氯仿-乙醇-水 (10:1:13:2, v/v/v/v) 为两相溶剂系统, 从铁棒锤醇提物的氯仿提取物中分离到了

一种咪唑类生物碱 ICABE, 经峰面积归一化法测定纯度达到 98% 以上。本研究不仅弥补了铁棒锤咪唑类生物碱分离研究的空白, 而且提供了一种高效的分离制备方法, 与传统分离方法相比, 该方法具有简便、快速、节省溶剂的特点, 具有较好的实际应用价值。

### 参考文献:

- [1] Zhang Y W, Dong L, Ma X Q, et al. Journal of Ningxia Medical University (张义伟, 董琳, 马学琴, 等. 宁夏医科大学学报), 2009, 31(1): 9
- [2] Chen F E. Journal of Anhui Agricultural Sciences (陈凤娥. 安徽农业科学), 2007, 35(32): 10353
- [3] Ai C, Zhu Y Y, Zhao C Q. Natural Product Research and Development (艾嫦, 朱妍妍, 赵长琦. 天然产物研究与开发), 2012, 24(2): 248
- [4] Liu M Z, Zhang S J, Yang C H, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘敏卓, 张思佳, 杨春华, 等. 色谱), 2011, 29(5): 430
- [5] Zhang P P, Zhang F C, Wang Z H, et al. Chinese Journal of Chromatography (张盼盼, 张福成, 王朝虹, 等. 色谱), 2013, 31(3): 211
- [6] Cai C Q, Yang C H, Liang J Y, et al. Strait Pharmaceutical Journal (蔡超群, 杨春华, 梁敬钰, 等. 海峡药学), 2013, 25(3): 1
- [7] Beck G, Heitzer H, Eue L, et al. European Patent, EP31086A1, 1981-07-01
- [8] Hassan W H B, Al-Taweel A M, Proksch P. Saudi Pharm J, 2009, 17(4): 295
- [9] Zhang F, Wang X M, Peng S L, et al. Chinese Pharmaceutical Journal (张帆, 王兴明, 彭树林, 等. 中国药学杂志), 2006, 41(24): 1851
- [10] Wang Y J, Zeng C J, Yao Z, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (王毓杰, 曾陈娟, 姚喆, 等. 中草药), 2010, 41(3): 347
- [11] Zhang S J, Wang M Y, Wang C H. Sep Purif Technol, 2011, 76(3): 428
- [12] Sutherland I A, Fisher D. J Chromatogr A, 2009, 1216(4): 740
- [13] Liu Y, Yu G X. Chinese Journal of Chromatography (刘云, 俞桂新. 色谱), 2007, 25(5): 735
- [14] Wang Y Y. [MS Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University (王颖滢. [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学), 2012
- [15] Guan R Q, Zhang M D, Shi X P, et al. Science and Technology of Food Industry (关荣琴, 张鸣镝, 石雪萍, 等. 食品工业科技), 2011, 32(7): 257
- [16] Zhang N S, Wang J B, Wang X Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (章能胜, 王金彬, 汪小艳, 等. 色谱), 2010, 28(1): 68
- [17] Dai D S, Wang Y M, Luo G A. Chinese Journal of Analytical Chemistry (戴德舜, 王义明, 罗国安. 分析化学), 2001, 29(5): 586