

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101027

梁森林, 黄永林, 何瑞杰, 等. pH 区带精制逆流色谱法分离制备越南槐中具有抑制 α -糖苷酶活性的生物碱 [J]. 广西植物, 2022, 42(9): 1459–1465.LIANG SL, HUANG YL, HE RJ, et al. Separation and preparation of alkaloids with inhibitory activity of α -glucosidase from *Sophora tonkinensis* by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *Guihaia*, 2022, 42(9): 1459–1465.

pH 区带精制逆流色谱法分离制备越南槐中具有抑制 α -糖苷酶活性的生物碱

梁森林^{1,2}, 黄永林², 何瑞杰², 王亚凤², 阳丙媛², 李典鹏², 司红彬^{1*}

(1. 广西大学 动物科学技术学院, 南宁 530005; 2. 广西植物功能物质与资源持续

利用重点实验室, 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘要: 越南槐 (*Sophora tonkinensis*) 为豆科 (Leguminosae) 灌木, 广泛分布于中国西南地区。其根为中药“山豆根”, 常被用于治疗胃、牙龈、咽喉、肺等部位的炎症。为了充分利用越南槐药用植物资源, 该研究建立了 pH 区带精制逆流色谱法分离制备越南槐地上部位中生物碱的方法。以二氯甲烷-甲醇-水 (5:3:2, V/V) 为溶剂系统, 上相添加 20 mmol · L⁻¹ 盐酸作为固定相, 下相添加 10 mmol · L⁻¹ 三乙胺作为流动相对越南槐地上部位中的总生物碱进行分离制备。分离得到的化合物结构经高分辨质谱, 核磁共振数据分析鉴定。同时用 PNGP 法对分离得到的化合物进行 α -葡萄糖苷酶的抑制活性的测试。结果表明: 从 1.2 g 总生物碱中一次分离制备得到 183 mg 苦参碱和 404 mg 氧化苦参碱, 用高效液相检测其纯度分别为 98.7% 和 98.2%。 α -葡萄糖苷酶的抑制活性的测试结果显示苦参碱和氧化苦参碱对 α -葡萄糖苷酶都具有较弱的抑制作用, 其 IC₅₀ 值分别为 (724.60 ± 90.93) mg · L⁻¹ 和 (115.90 ± 14.05) mg · L⁻¹。该研究结果表明, 尽管寻找到一个合适的溶剂系统比较耗时, 但 pH 区带精制逆流色谱法仍是一种简单且能有效分离越南槐地上部位中生物碱的方法。

关键词: pH 区带精制逆流色谱, 山豆根, 苦参碱, 氧化苦参碱, α -葡萄糖苷酶**中图分类号:** Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)09-1459-07**收稿日期:** 2021-03-02

基金项目: 国家自然科学基金 (32060108, 82060764); 广西自然科学基金 (2018GXNSFAA294033, 2018GXNSFAA281078); 中国博士后专项基金 (200626); 广西植物研究所基本业务费 (桂植业 18004); 广西八桂学者专项 (第三批); 广西创新驱动发展专项基金 (桂科 AA18118015); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金 (ZRJJ2020-2, ZRJJ2018-19); 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室项目 (CMEMR2019-B13); 广东省重点领域研发计划资助 (2020B1111110003); 中央引导地方科技发展专项 (桂科 20111010) [Supported by National Natural Science Foundation of China (32060108, 82060764); Natural Science Foundation of Guangxi (2018GXNSFAA294033, 2018GXNSFAA281078); China Postdoctoral Science Foundation (200626); Fundamental Research Fund of Guangxi Institute of Botany (GUIZHUYE 18004); Project for Bagui Scholars of Guangxi Institute of Botany (The third batch); Special Fund of Guangxi Innovation-Driven Development (GUIKE AA18118015); Open Fund of Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization (ZRJJ2020-2, ZRJJ2018-19); State Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources (CMEMR2019-B13); Project of Key-Area Research and Development Project of Guangdong Province (2020B1111110003); Special Project of Central Government Guiding Local Science and Technology Development (GUIKE 20111010)]。

第一作者: 梁森林 (1996-), 硕士研究生, 主要从事天然产物研究与开发, (E-mail) 992621074@qq.com。**通信作者:** 司红彬, 博士, 教授, 主要从事中兽医学与中西兽医结合研究, (E-mail) shb2009@gxu.edu.cn。

Separation and preparation of alkaloids with inhibitory activity of α -glucosidase from *Sophora tonkinensis* by pH-zone-refining counter-current chromatography

LIANG Senlin^{1,2}, HUANG Yonglin², HE Ruijie², WANG Yafeng²,
YANG Bingyuan², LI Dianpeng², SI Hongbin^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: *Sophora tonkinensis*, a shrub of the Leguminosae family, is widespread in Southwest China. The root of *S. tonkinensis*, “ShanDouGen” in Chinese, is often used to treat inflammation of stomach, gingiva, throat, lung, and other parts. In order to make full use of *S. tonkinensis*, a pH-zone-refining counter-current chromatography (PZRCCC) method is established to separate and prepare alkaloids from its aerial parts. CH_2Cl_2 - CH_3OH - H_2O (5 : 3 : 2, V/V) was selected as the solvent system of PZRCCC, 20 mmol · L⁻¹ HCl was added to the upper aqueous stationary phase as a retainer and 10 mmol · L⁻¹ triethylamine (TEA) to the organic mobile phase as an eluter. The structures of the isolates were elucidated by HRMS and NMR data. The α -glucosidase inhibitory activity of the isolates was determined by PNPG method. A total of 183 mg matrine and 404 mg oxymatrine were obtained from 1.2 g total alkaloids. The purity of matrine and oxymatrine were 98.7% and 98.2%, respectively, as determined by HPLC. Both matrine and oxymatrine had weak inhibitory effects on α -glucosidase with IC₅₀ values of (724.60 ± 90.93) mg · L⁻¹ and (115.90 ± 14.05) mg · L⁻¹, respectively. The present study demonstrated PZRCCC is a simple and efficient method for the separation of alkaloids from the aerial part of *S. tonkinensis*, although finding a suitable solvent system is a time-consuming procedure.

Key words: pH-zone-refining counter-current chromatography, *Sophora tonkinensis*, matrine, oxymatrine, α -glucosidase

山豆根为豆科植物越南槐 (*Sophora tonkinensis*) 干燥的根和根茎(陈兴广等, 2020), 主要分布于广西、云南、贵州等地(中华人民共和国药典, 2010), 具有清热解毒、消肿利咽的功效, 用于治疗胃部、牙龈、咽部、肺部等部位的炎症(Hou et al., 2020)。山豆根药材中的生物碱具有毒性(田雪松, 2016), 也有抗炎(Ding et al., 2006)、抗病毒(戴五好等, 2012)、抑菌(He et al., 2019)等多种生物活性, 其中苦参碱和氧化苦参碱(李丰等, 2020)等喹诺里西啶类生物碱为主要的生物碱成分(陈影等, 2017)。由于山豆根生长环境较为特殊, 家种栽培模式尚处于探索阶段, 近年来山豆根产量下滑趋势明显, 而越南槐的地上部分作为山豆根非药用部位富含生物碱, 但尚未得到开发利用。因此, 为了提高药用植物的利用率, 创建快速分离制备山豆根非药用部位中的生物碱的方法显得尤为必要。

高速逆流色谱(HSCCC)是近数十年发展起来的液-液分配色谱(步知思等, 2018), 具有无柱污染、无不可逆吸附、进样量大, 同一根逆流色谱柱既可用于分析, 也可用于制备等的优点(刘倩, 2016)。pH区逆流色谱由高速逆流色谱发展而来, 利用待分离物质的酸碱解离常数和疏水性的不同进行分离, 目前被广泛应用于离子型化合物如有机酸(徐敏和修彦凤, 2016)、生物碱(马涛等, 2014)等的分离。本研究利用pH区带精制逆流色谱法对越南槐地上部分总生物碱进行分离制备, 共得到两个高纯度的生物碱化合物: 苦参碱和氧化苦参碱(化学结构见图1)。该方法简单, 高效, 分离纯度高。

随着生活水平的提高, 糖尿病这一代谢性疾病的发病率逐年升高, 对糖尿病的研究也因此成为中内外学者近年来所关注的热点(宋彤彤等, 2019)。本研究也报道了越南槐地上部分总提取

物、总生物碱及分离得到的两个生物碱的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

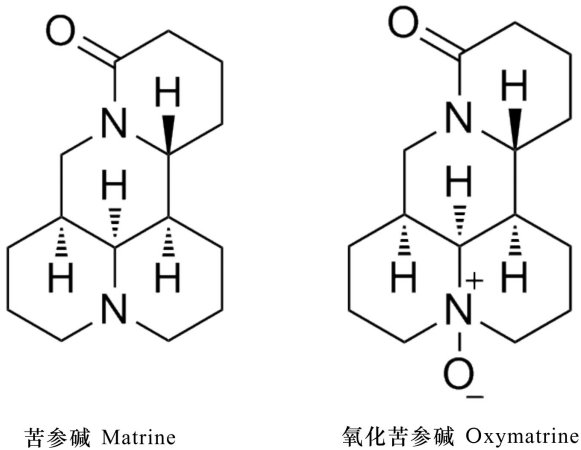


图 1 苦参碱和氧化苦参碱的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of matrine and oxymatrine

1 仪器与材料

TBE-300C 高速逆流色谱仪(上海同田生物技术股份有限公司)、TBP5002 TAUTO 恒流泵(上海同田生物技术股份有限公司)、UV100 紫外检测器(赛谱锐思科技有限公司)、GeneVac miVac 真空离心浓缩仪(英国 GeneVac 公司)、TC-1050 恒温循环器(上海同田生物技术股份有限公司)、CBM-20A 系统控制器(日本岛津公司)、DCU-20A5 脱气机(日本岛津公司)、LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司)、Bruker Avance III HD-500 MHz 超导核磁共振波谱仪(瑞士, Bruker 公司)、SPD-M20A 光电二极管阵列检测器(日本岛津公司)、XS205 DualRange(瑞士苏黎世的梅特勒-托利多集团)分析天平、BRUKER HCT 电喷雾质谱(美国,布鲁克道尔顿公司)和 MAT 95XP 高分辨质谱(美国, Thermo)、ADP440+ 旋光计(德国,优莱博有限公司)、OSB-2100 油浴锅(上海爱朗仪器有限公司)、SP-MAX3500FL 多功能荧光酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)。

阿卡波糖、 α -葡萄糖苷酶、对硝基苯酚- α -D-吡喃葡萄糖苷均购自上海源叶生物科技有限公司; 20 \times PBS(北京索莱宝科技有限公司); 无水碳酸钠、乙腈、二氯甲烷、甲醇(西陇化工股份有限公司, 分析纯); HPLC 分析用水为实验室自制超纯水。

越南槐(*Sophora tonkinensis*)的地上部分于 2018 年 11 月采自广西百色市那坡县, 由广西大学黄荣韶教授鉴定, 标本(编号: 20181103)保存于广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室。

2 实验方法

2.1 越南槐的地上部分总生物碱的制备

取越南槐的地上部分干燥的茎叶 1 kg, 粉碎后用 95% 乙醇浸泡一周, 将滤液浓缩旋干得浸膏, 取部分浸膏用 HCl 调 pH 至 3, 离心后将上清液减压旋干后用适量水溶解过 AB-8 大孔树脂柱, 顺次加入水, 20% 氨水, 70% 甲醇-水进行洗脱, 收集 70% 甲醇-水洗脱馏分, 旋干即得到总生物碱。

2.2 样品溶剂系统及样品溶液的制备

2.2.1 样品溶剂系统的制备 选取二氯甲烷-甲醇-水(5:3:2, V/V)为溶剂系统进行试验, 量取 1 000 mL 二氯甲烷、600 mL 甲醇、400 mL 水置于分液漏斗中, 剧烈震荡后静置半小时, 取出下相和上相, 在上相中加入 HCl ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.344 mL 作为固定相, 在下相中加入 TEA ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.444 mL 作为流动相, 超声脱气 30 min 后备用。

2.2.2 样品溶液的制备 取 1.2 g 总生物碱放于试管中, 加入 7.5 mL 含有 HCl 的上相和 7.5 mL 未添加 TEA 的下相, 超声震荡使其充分溶解, 准备用于 pH 区带逆流色谱分离。

2.3 分离及鉴定

2.3.1 pH 区带逆流色谱分离过程 将超声脱气过的上相以 $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度泵入高速逆流主机中作为固定相使用, 15 min 后观察到出口有液体流出, 说明固定相已完全充满螺旋管。样品溶液用等量的已加入酸的上相和未加入碱的下相溶解, 在 load 模式中将样品溶液注入进样环, 旋转进样口旋钮至 inject 档位, 将主机旋转方向调为顺时针后, 慢慢调节主机转速至 $850 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 待转速稳定后, 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度泵入流动相, 同时开启紫外检测器及记录仪, 设置紫外检测波长为 210 nm, 通过观察色谱图的出峰情况手动收集馏分, 分离完成后, 将主机内液体用压缩空气吹出, 使用 500 mL 量筒收集并计算固定相保留率。

2.3.2 HPLC 分析 用 HPLC 分析越南槐地上部分生物碱粗提物和分离后的各组分。液相色谱柱为

Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水(5:95), 进样量为 20 μL; 流速设定为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 210 nm, 柱温为室温。

对 pH 区带逆流色谱分离到的结构采用高分辨质谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱分析进行鉴定。

2.3.3 化合物结构鉴定

化合物 1 白色粉末, (+) HR-ESI-MS *m/z*: 249.196 67 [M + H]⁺ (计算相对分子质量为 249.196 62), 其对应的分子式为 C₁₅H₂₅N₂O⁺。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 4.38 (1H, dd, *J* = 12.5, 4.1 Hz, H-17e), 3.80 (1H, dt, *J* = 9.5, 6.1 Hz, 11-H), 3.03 (1H, t, *J* = 12.5 Hz, H-17a), 2.80 (2H, d, *J* = 11.6 Hz, H-10e, H-2e), 2.41 (1H, dt, *J* = 17.0, 4.1 Hz, H-14e), 2.23 (1H, m, H-14a), 2.07 (2H, m), 1.90 (3H, m), 1.79 (1H, m, H-9a), 1.73 ~ 1.34 (11H, m)。¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 165.98 (C-15), 63.93 (C-6), 57.43 (C-2), 57.36 (C-10), 43.37 (C-17), 41.60 (C-7), 35.49 (C-5), 32.97 (C-14), 27.90 (C-12), 27.28 (C-4), 26.60 (C-8), 21.32 (C-3), 20.91 (C-9), 19.11 (C-13)。将数据与文献(董刘宏等, 2010)比较, 确定其为苦参碱。

化合物 2 无色粉末, (+) HR-ESI-MS *m/z*: 265.191 61 [M + H]⁺ (计算相对分子质量 265.191 60), 其对应的分子式为 C₁₅H₂₅N₂O₂⁺。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.07 (1H, dt, *J* = 10.4, 6.1 Hz, H-11), 4.38 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.2 Hz, H-17e), 4.15 (1H, t, *J* = 12.0, H-17a), 3.07 (5H, m), 2.64 (2H, m), 2.42 (1H, m, H-14e), 2.20 (2H, m, H-14a, H-12e), 2.02 (1H, m, H-8e), 1.85 ~ 1.50 (9H, m), 1.23 (1H, m, H-12a)。¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 170.26 (C-15), 69.67 (C-10), 69.32 (C-2), 67.32 (C-6), 53.10 (C-11), 42.86 (C-7), 41.84 (C-17), 34.71 (C-5), 33.05 (C-14), 28.67 (C-12), 26.29 (C-4), 24.85 (C-8), 18.78 (C-13), 17.37 (C-3), 17.32 (C-9)。将数据与文献(郭依俐和刘庆, 2019)比较, 确定其为氧化苦参碱。

2.4 阿卡波糖 IC₅₀值的测定

2.4.1 PBS 溶液的配制 将 20×PBS 溶液用蒸馏水稀释 20 倍即得。

2.4.2 1 U·mL⁻¹ α-葡萄糖苷酶溶液的配制 准确称取 1 mg α-葡萄糖苷酶, 溶于 25.4 mL PBS 中, 现配现用。

2.4.3 1 mmol·L⁻¹ PNPG 溶液的配制 称取 3 mg PNPG 加入 10 mL PBS 溶液中超声溶解, 现配现用。

2.4.4 0.2 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 溶液配制 称取 2.16 g Na₂CO₃ 于烧杯中, 加蒸馏水定容至 100 mL。

2.4.5 实验步骤 采用 PNPG 法进行测定(李古月等, 2015), 反应在 96 孔板中进行, 按照顺序加入 50 μL PBS 缓冲液, 20 μL 不同浓度的阿卡波糖溶液, 10 μL α-葡萄糖苷酶溶液, 置于 37 °C 油浴锅中预热 5 min, 然后加入 20 μL PNPG 溶液, 于 37 °C 油浴锅中继续加热 25 min 后取出, 加入 50 μL Na₂CO₃ 终止反应。实验平行 3 次, 于波长 405 nm 处测定吸光度。通过 Statistical Product and Service Solutions 软件计算出其 IC₅₀ 值。

将待测样品代替阿卡波糖按照上述步骤操作, 得到待测样品 IC₅₀ 值。实验平行 3 次, 将测得结果与阳性对照品阿卡波糖的 IC₅₀ 值对比。

α-葡萄糖苷酶抑制率公式:

$$\text{抑制率} = [1 - (A_1 - A_2 / B_1 - B_2)] \times 100\%$$

式中: A₁、A₂、B₁、B₂ 分别代表 405 nm 下测得的样品组、背景组、阴性对照组、空白对照组的吸光值。

表 1 α-葡萄糖苷酶反应体系 (单位: μL)

Table 1 α-glucosidase reaction system (Unit: μL)

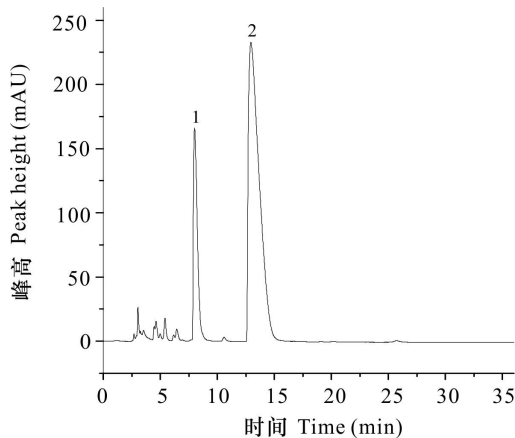
试剂 Reagent	样品组 Test group	背景组 Back- ground group	阴性 对照组 Negative group	空白 对照组 Blank control group
PBS	50	60	70	80
样品 Sample	20	20	0	0
酶液 Enzyme solution	10	0	10	0
PNPG	20	20	20	20
Na ₂ CO ₃	50	50	50	50

3 结果与分析

3.1 HPLC 的条件优化

实验优化了液相色谱条件以确保各组分达到

基线分离,对流动相:甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% TEA 水、乙腈-0.1% TEA 水、甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 磷酸水的分离效果进行了比较,结果显示,当选用乙腈-0.1% 磷酸水(5:95)作为流动相,流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,越南槐地上部分总生物碱中各成分能够实现基线分离,分离效果见图 2。



1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱。
1. Matrine; 2. Oxymatrine.

图 2 总生物碱的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of total alkaloids

3.2 pH 区带精制逆流色谱条件的优化

在分离生物碱的经典 pH 区带精制逆流色谱正向置换模式下,总生物碱中的各类化合物依据其解离常数及疏水性不同,在保留酸的前方形成一系列的溶质区带,达到平衡后,每个溶质区带和保留酸以相同的速率移动。以本实验为例,固定相水相位于管道的上半部分,有机流动相位于下半部分,保留酸形成了一个陡峭的边界,如图 3 所示,在边界右侧,碱性待分离物质从保留酸中获得质子并进入固定相中(位置④),当保留酸边界向前推移时,溶质正离子被置于高 pH 值范围内(位置①),被夺去质子后回到疏水性的非离子形式迅速进入流动相中(位置②),溶质穿过边界后重新置于低 pH 值范围内(位置③),获得质子而回到固定相中(位置④),这一过程不断重复直至保留碱流出色谱柱。会出现具有最小重叠的矩形平台峰(Cai et al., 2020),物质被高度浓缩在平台内(Tong et al., 2013)而杂质被有效祛除并集中在平台两侧(Wang et al., 2012)。本实验首先使用了二氯甲烷-甲醇-水(5:3:2, V/V)(上相加入 $10 \text{ mmol} \cdot$

L^{-1} HCl,下相加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEA)为溶剂系统对总生物碱进行 pH 区带精制逆流色谱分离,其结果如图 4:A 所示,49~98 min 馏分经 HPLC 检测为化合物 1,162~178 min 馏分为化合物 2,但化合物 2 中夹杂有化合物 1,未能实现完全分离。由于待分离物质的解离常数在一定的条件下为常数,其解离程度主要由保留酸决定。调整保留酸的浓度,会导致矩形峰的宽度及出峰时间发生改变。因此,为了获得更好的洗脱效果,加 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 于固定相中,流动相中 TEA 的浓度不变,用 pH 区带精制逆流色谱分离总生物碱的效果如图 4:B 所示,68~113 min 出现了化合物 1,148~200 min 出现了化合物 2,经 HPLC 分析,其纯度分别为 98.7% 和 98.2%。

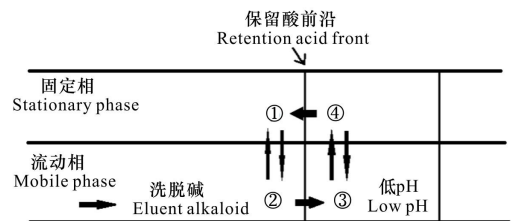


图 3 pH 区带精制逆流色谱分离原理图

Fig. 3 Schematic figure of PZRCC separation principle

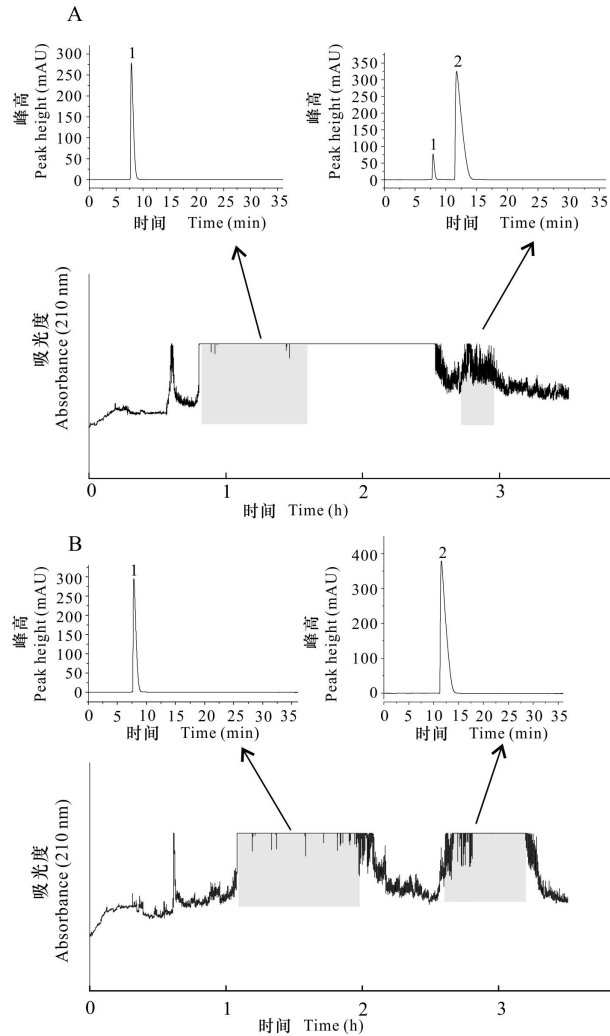
3.3 样品对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

以样品浓度和抑制率作图,求得各样品的 IC_{50} 值如表 2 所示。结果表明,越南槐地上部分总提取物及总生物碱对 α -葡萄糖苷酶抑制作用微弱,而苦参碱和氧化苦参碱均对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制活性,且氧化苦参碱的抑制作用明显强于苦参碱。

表 2 样品的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Table 2 α -glucosidase inhibitory activity of samples

样品 Sample	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
总提取物 Total extract	—
总生物碱 Total alkaloids	—
苦参碱 Matrine	724.60 ± 90.93
氧化苦参碱 Oxymatrine	115.90 ± 14.05
阿卡波糖 Acarbose	0.15 ± 0.01



1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱。溶剂系统: 二氯甲烷-甲醇-水 (5 : 3 : 2, V/V)。A. 上相添加 10 mmol · L⁻¹ 盐酸, 下相添加 10 mmol · L⁻¹ 三乙胺; B. 上相添加 20 mmol · L⁻¹ 盐酸, 下相添加 10 mmol · L⁻¹ 三乙胺。

1. Matrine; 2. Oxymatrine. Solvent system: CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (5 : 3 : 2, V/V)。A. 10 mmol · L⁻¹ HCl in upper phase and 10 mmol · L⁻¹ TEA in lower phase; B. 20 mmol · L⁻¹ HCl in upper phase and 10 mmol · L⁻¹ TEA in lower phase.

图 4 越南槐的地上部分生物碱 pH 区带精制逆流色谱
Fig. 4 PZRWCC of total alkaloids from the aerial part of *Sophora tonkinensis*

4 讨论与结论

生物碱是天然产物中药理活性较好和成药性较高的一类化合物, 对这类化合物使用传统的柱色谱法往往存在拖尾严重和收率低的问题, 因此生物碱的分离一直是分离科学与技术领域中一

个研究热点和难点问题。pH 区带精制逆流色谱法是近年来由高速逆流色谱的基础上发展而来一种分离方法, 由于其依据物质的解离常数 (pKa) 和疏水性的不同而实现分离。本实验以选定的二氯甲烷-甲醇-水为溶剂系统, 采用化学手段, 根据待分离样品的酸碱特性, 通过增加上层水相中 HCl 浓度、下层有机相中 TEA 浓度保持不变, 使样品的色谱分离过程呈现按 pH 区带聚集的特征, 组分的洗脱过程变成了类似置换色谱的洗脱过程, 其色谱图为按 pH 值的大小排列的边界陡峭的矩形峰, 同时杂质被集中在峰的两侧, 其结果是分离容量增大、分离效率提高。因此, pH 区带精制逆流色谱法目前广泛用于生物碱、有机酸的制备性分离。然而, 溶剂系统的选择是一大难点, 一个合适的溶剂系统往往需要经过较长时间的摸索, 而且是决定试验成败的关键因素。本研究利用 pH 区带精制逆流色谱法从山豆根非药用部位中快速高效地分离制备苦参碱及氧化苦参碱, 为其他生物碱的分离制备提供了参考。α-葡萄糖苷酶抑制活性实验结果显示总提物的最大抑制率数倍于总生物碱的最大抑制率, 提示总提取物中可能含抑制活性更强的成分, 这些成分有待进一步的挖掘。同时, 越南槐的茎叶作为中药——山豆根的一个副产物, 资源丰富, 富含苦参碱和氧化苦参碱等生物碱成分, 开发潜力巨大, 能否成为山豆根替代资源仍亟待进一步的研究。

参考文献:

- BU ZS, LÜ LQ, LU MX, et al., 2018. Recent progress in application of pH-zone-refining countercurrent chromatography and its theory [J]. *Chin J Pharm Anal*, 38(6): 927-934. [步知思, 吕力琼, 鲁梦霞, 等, 2018. pH 区带逆流色谱应用与相关理论研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 38(6): 927-934.]
- CAI X, XIAO M, ZOU XW, et al., 2020. Separation of six antioxidants from *Hypsizygus marmoreus* by high-speed countercurrent chromatography utilizing an approach based upon the polarity parameter model [J]. *J Chromatogr A*, 1633: 461650.
- CHEN XG, JIANG S, CHEN YD, et al., 2020. Advances in application of high speed countercurrent chromatography in traditional Chinese medicine [J]. *Guangdong Chem Ind*, 47(18): 105-108. [陈兴广, 江姗, 陈誉丹, 等, 2020. 高速逆流色谱技术在中药领域应用的研究进展

- [J]. 广东化工, 47(18): 105-108.]
- CHEN Y, CHEN LM, TONG Y, et al., 2017. Pharmacological effect and toxicology of *Sophorae tonkinensis* Radix et Rhizoma [J]. Chin J Chin Master Med, 42(13): 2439-2442. [陈影, 陈两绵, 仝燕, 等, 2017. 山豆根药理毒理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 42(13): 2439-2442.]
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2010. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science Press; 25. [国家药典委员会, 2010. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 25.]
- DAI WH, QIAN LW, YANG SY, et al., 2012. Study on antimicrobial activity of alkaloids in *Sophora flavescens* and *S. tonkinensis* [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 18(3): 177-180. [戴五好, 钱利武, 杨士友, 等, 2012. 苦参、山豆根生物碱及其总碱的抑菌活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 18(3): 177-180.]
- DING PL, HUANG H, ZHOU P, et al., 2006. Quinolizidine alkaloids with anti-HBV activity from *Sophora tonkinensis* [J]. Plant Med, 72(9): 854-856.
- DONG LH, TAI ZG, YANG YB, et al., 2010. Chemical constituents of the flowers of *Sophora viciifolia* Hance [J]. W Chin J Pharm Sci, 25(6): 636-640. [董刘宏, 太志刚, 杨亚滨, 等, 2010. 白刺花花的化学成分研究 [J]. 华西药学杂志, 25(6): 636-640.]
- GUO YL, LIU Q, 2019. The studies of chemical constituents of Kang'ai injection [J]. Pharm Today, 29(1): 6-10. [郭依俐, 刘庆, 2019. 康艾注射液的化学成分研究 [J]. 今日药学, 29(1): 6-10.]
- HE LJ, LIU JS, LUO D, et al., 2019. Quinolizidine alkaloids from *Sophora tonkinensis* and their anti-inflammatory activities [J]. Fitoterapia, 139: 104391.
- HOU MY, HU WZ, HAO KX, et al., 2020. Flavonoids and phenolic acids from the roots of *Sophora tonkinensis* Gagnep [J]. Biochem Syst Ecol, 89: 104011.
- LI F, HU CY, SHI YB, et al., 2020. The content determination of matrine and oxidation in *Sophora flavescens* pieces from different habitats by HPLC [J]. Chin Med Modern Dist Educ Chin, 18(2): 102-104. [李丰, 胡春月, 石延榜, 等, 2020. HPLC 法测定不同产地苦参饮片中苦参碱和氧化苦参碱的含量 [J]. 中国中医药现代远程教育, 18(2): 102-104.]
- LI GY, LIU JX, CAI Q, 2015. Inhibitory activity of flavonoids isolated from *Exochorda serratifolia* S. Moore. on α -glucosidase [J]. J Tianjin Univ Trad Chin Med, 34(3): 165-168. [李古月, 刘佳鑫, 才谦, 2015. 齿叶白鹃梅叶中黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究 [J]. 天津中医药大学学报, 34(3): 165-168.]
- LIU Q, 2016. Study on methodology research in separation of alkaloids from seven kinds of plants by pH-zone-refining counter-current chromatography [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University. [刘倩, 2016. pH 区带逆流色谱法分离七种植物中生物碱的方法研究 [D]. 泰安: 山东农业大学.]
- MA T, ZHANG QL, DING CX, et al., 2014. Application of pH-zone-refining counter-current chromatography to separation of alkaloids [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 31(12): 1539-1544. [马涛, 张秋龙, 丁晨曦, 等, 2014. pH 区带精制逆流色谱在分离生物碱类物质的应用 [J]. 中国现代应用药学, 31(12): 1539-1544.]
- SONG TT, GUO T, ZHANG JB, et al., 2019. Study on the inhibition against α -glucosidase and mechanism of *Zanthoxylum armature* DC. [J]. J Food Sci Biotechnol, 38(1): 58-62. [宋彤彤, 郭涛, 章聚宝, 等, 2019. 竹叶椒对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机制研究 [J]. 食品与生物技术学报, 38(1): 58-62.]
- SUN L, GONG CY, YANG P, et al., 2015. Separation and purification of alkaloids from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. Shandong Sci, 28(4): 41-45. [孙丽, 宫成玉, 杨鹏, 等, 2015. 豆豉姜中生物碱的 pH 区带逆流色谱分离研究 [J]. 山东科学, 28(4): 41-45.]
- TIAN XS, 2016. The intervention of major alkaloids in *Sophorae tonkinensis* on immune liver injury in mice [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 22(6): 230-234. [田雪松, 2016. 山豆根中生物碱的毒性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 22(6): 230-234.]
- TONG SQ, YU Q, LI XN, et al., 2013. Preparative separation of tertiary alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. J Liq Chromatogr Related Technol, 36(2): 229-238.
- WANG X, DONG HJ, SHU XK, et al., 2012. Large-scale separation of alkaloids from *Corydalis bungeana* Turcz by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. Molecules, 17(12): 14968-14974.
- XU M, XIU YF, 2016. The application of pH-Zone-refining counter-current chromatography in the chemical separation [J]. Acta Univ Trad Med Sin Pharmacol Shanghai, 30(2): 87-90. [徐敏, 修彦凤, 2016. pH 区带精制逆流色谱法在中药成分分离中的应用 [J]. 上海中医药大学学报, 30(2): 87-90.]