

## 高效液相色谱法制备胡黄连中胡黄连甙 II 的对照品

薄 涛, 赵长家, 李克安, 刘虎威

(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

**摘要** 运用高效液相色谱法(HPLC)制备了胡黄连中胡黄连甙 II 的对照品, 色谱条件为 C<sub>18</sub>制备柱(300 mm×20 mm i.d., 10 μm), 流动相为甲醇-水(体积比为 1:1), 流速 8 mL/min, 265 nm 紫外检测, 进样量 100 μL。用 HPLC 和毛细管区带电泳法(CZE)测定了自制对照品的纯度, 结果表明, 自制对照品的纯度在 99.0% 以上, 稳定性好, 且 2 种方法测定的结果具有可比性。

**关键词** 高效液相色谱法; 毛细管区带电泳; 制备; 胡黄连甙 II; 胡黄连

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)03-0242-03

## Preparation of Picroside II Control from *Rhizoma Picrorhizae* by High Performance Liquid Chromatography

BO Tao, ZHAO Changjia, LI Kean, LIU Huwei

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract**: A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the preparation of picroside II control from *Rhizoma Picrorhizae* using a C<sub>18</sub> column (300 mm×20 mm i.d., 10 μm) and methanol-water (1:1, v/v) as mobile phase at a flow rate of 8 mL/min. This method provided great improvements over some conventional chromatographic methods which often suffered from instability, tedious steps and low purity of picroside II. The purity of the prepared picroside II determined by the HPLC method was compared against that obtained by a capillary zone electrophoretic (CZE) method. A C<sub>18</sub> column and a mobile phase of methanol-water-acetic acid (40:60:0.3, v/v) were adopted in the HPLC analysis with UV detection at 265 nm while 100 mmol/L boric acid (pH 9.5), 30 kV of applied voltage and 25 °C of temperature were selected for the CZE analysis with an uncoated fused silica capillary of 58.5 cm×50 μm i.d. and UV detection at 210 nm. The linearity, repeatability and recovery of both methods were satisfactory. The study demonstrated that the results from the HPLC method and the CZE method were comparable, while the speed of analysis by the CZE method was faster than by the HPLC method. Moreover, the stability of picroside II control was investigated, and the result showed that the control was stable for at least twelve months.

**Key words**: high performance liquid chromatography; capillary zone electrophoresis; preparation; picroside II; *Rhizoma Picrorhizae*

胡黄连(*Rhizoma Picrorhizae*)为玄参科植物胡黄连(*Picrorhiza scrophulariiflora*)的干燥根茎, 主要分布于四川西部、云南西北部和西藏南部。有清湿热、除骨蒸和消痞热的功效, 临床用于湿热泻痢、黄疸、疟疾、骨蒸潮热和小儿疳积<sup>[1]</sup>。目前, 已经从胡黄连中分离出许多活性成分, 如胡黄连甙 I, II, III 以及萜类、有机酸、酚类等, 其中胡黄连甙 II(其分子结构式见图 1)为主要的药效成分, 有很强的利胆、保肝和抗炎作用<sup>[1]</sup>。胡黄连甙 II 属于环烯醚萜

类化合物, 热稳定性差。运用经典柱色谱方法分离、纯化胡黄连甙 II 的过程中, 常常需要回流、回收溶剂、干燥等操作, 洗脱时间长, 胡黄连甙 II 易分解, 收率低<sup>[1]</sup>。因此, 常常将胡黄连甙 II 乙酰化衍生后再纯化, 但最后需要脱乙酰化, 操作繁琐<sup>[1]</sup>, 且脱乙酰化时样品易分解。

本文采用制备型高效液相色谱(HPLC)制备胡黄连中胡黄连甙 II 的对照品, 运用分析型 HPLC 和毛细管区带电泳(CZE)测定其纯度, 并测定了胡黄

收稿日期 2002-07-21

作者简介 薄 涛, 男, 1972 年生, 博士研究生, E-mail: botao@chem.pku.edu.cn.

通讯联系人 刘虎威, 教授, 博士生导师, E-mail: hwhliu@chem.pku.edu.cn, Tel: (010) 62754976.

基金项目 国家自然科学基金面上项目(项目号 20275001).

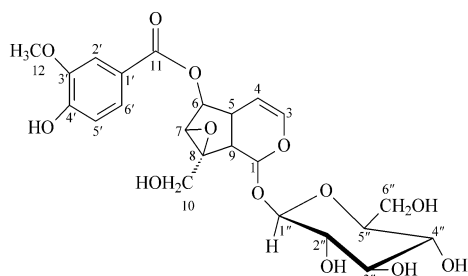


图1 胡黄连甙II的分子结构式

Fig. 1 Structure of picroside II

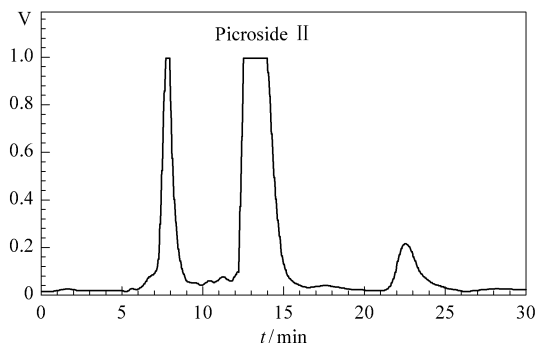


图2 胡黄连甙II的制备色谱图

Fig. 2 Preparative chromatogram of picroside II

连药材中胡黄连甙II的含量,对两种分析方法的测定结果进行了比较研究。对自制的胡黄连甙II对照品的稳定性进行了考察。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

仪器:JASCO HPLC 1580 高效液相色谱仪; DYNAMAX C<sub>18</sub> 制备柱(300 mm×20 mm i.d., 10 μm); Zorbax ODS(150 mm×4.6 mm i.d., 5 μm)分析柱;安捷伦 3D 毛细管电泳仪;十万分之一分析天平(日本岛津);AR×400 核磁共振仪;Philips Pye Unicam 型紫外光谱仪;Perkin-Elmer 983G 型红外光谱仪;AEI S-50 质谱仪;X-4 型显微熔点仪;ADP220 型旋光仪。

试剂和材料:胡黄连药材由中国医学科学院药用植物研究所提供。胡黄连甙II对照品由Sigma公司提供。乙醇、甲醇和冰醋酸均为分析纯,水为双蒸水。活性炭(60目,柱色谱用)由北京化工厂提供。石英毛细管(58.5 cm×50 μm i.d.)购自河北永年光导纤维厂。

### 1.2 胡黄连甙II的提取、纯化

将胡黄连根茎粉碎,用70%(体积分数,下同)乙醇浸润2 h后,用70%乙醇渗漉,收集8倍柱体积的渗漉液,于60℃以下减压真空干燥,用无水乙醇转溶,弃掉不溶物,将乙醇溶液于60℃以下减压(约2 000 Pa(15 mmHg))干燥即得粗提物。

取活性炭,于150℃下活化4 h后装柱。取胡黄连粗提物(与活性炭质量比为1:10),配制成25 g/L的水溶液,上柱(120 cm×30 cm i.d.)进行吸附色谱分离。依次以水、50%乙醇、95%乙醇洗脱,收集95%乙醇洗脱液,于60℃下减压浓缩并干燥,即得胡黄连甙II粗品。

将胡黄连甙II粗品用50%甲醇溶液溶解(质量浓度为80 g/L),进行HPLC制备。色谱条件:流动相甲醇-水(体积比为1:1),流速8 mL/min;检测波长265 nm;进样量100 μL。收集相应的组分(见图

2),60℃下减压除去甲醇,水溶液经冷冻干燥,即得胡黄连甙II对照品。

### 1.3 对照品溶液和样品溶液制备

对照品溶液:精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的胡黄连甙II对照品5 mg,置于10 mL容量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,从中精密量取1.0 mL,置于10 mL容量瓶中,甲醇稀释至刻度,即得。自制胡黄连甙II对照品溶液同此法配制。

样品溶液:分别精密称取胡黄连药材80 mg,置于10 mL具塞试管中,加入甲醇7 mL,室温下超声提取20 min,离心(3 000 r/min)取上清液。重复提取步骤2次,合并3次上清液,用0.45 μm的微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

### 1.4 色谱条件

HPLC法:柱温为室温;检测波长265 nm;流动相组成为甲醇-水-冰醋酸(40:60:0.3,体积比);流速1 mL/min;进样量10 μL。

CZE法:100 mmol/L硼酸缓冲液(pH 9.5),电压30 kV;柱温25℃;检测波长210 nm;在此条件下,分析物的分离时间短且与样品中其他成分完全分离;为了提高分析的重现性,每次进样前,毛细管分别用1 mol/L NaOH溶液冲洗1 min,双蒸水冲洗2 min,运行缓冲液冲洗3 min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 自制胡黄连甙II的物理常数及结构鉴定

性状:白色片状结晶,易溶于甲醇。

熔点和比旋度:熔点为141~143℃,比旋度为-115°。

紫外光谱最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ (甲醇溶液):220, 263和292 nm。

红外光谱 $\sigma_{\max}$ (KBr压片):3 418, 1 707, 1 654, 1 598, 1 505  $\text{cm}^{-1}$ 。

核磁共振光谱(NMR)溶剂:CD<sub>3</sub>OD)结构式

参照图 1 如下：

<sup>1</sup>H 谱：H-1 ,5.22 (1H ,d ,J = 9.1 Hz)；H-3 ,6.40 (1H ,d ,J = 7.3 Hz)；H-4 ,5.01 (1H ,m)；H-5 和 H-9 2.65~2.69 (2H ,m)；H-6 ,5.15 (1H ,bd ,J = 7.7 Hz)；H-7 ,3.77 (1H ,bs)；H-10 ,3.87 和 4.20 (2H ,AB ,J = 13.1 Hz)；H-1' ,4.82 (1H ,d ,J = 7.9 Hz)；H-2' ,H-3' ,H-4' ,H-5' ,3.27~3.43 (4H ,m ,sugar-H)；H-6' ,3.66 (1H ,m) ,3.94 (1H ,m)；H-2' ,7.59 (1H ,d ,J = 1.7 Hz)；H-5' ,6.88 (1H ,d ,J = 8.2 Hz)；H-6' ,7.62 (1H ,dd ,J = 1.7 Hz 和 8.2 Hz)；H-11 ,OCH<sub>3</sub> 3.93 (3H ,s)

<sup>13</sup>C 谱：C-1 ,95.07；C-3 ,142.42；C-4 ,102.96；C-5 ,36.77；C-6 ,81.72；C-7 ,61.30；C-8 ,66.88；C-9 ,43.24；C-10 ,62.96；C-11 ,167.87；C-12 ,56.48；C-1' ,122.08；C-2' ,113.66；C-3' ,153.19；C-4' ,148.83；C-5' ,116.01；C-6' ,125.32；C-1'' ,99.72；C-2'' ,74.87；C-3'' ,78.68；C-4'' ,71.80。

所有理化常数和光谱数据都与文献数据<sup>[2,3]</sup>一致,且购得的胡黄连甙 II 对照品和自制对照品的 HPLC 保留时间及 CZE 迁移时间一致,采用标准加入法测定,峰重叠,表明本品确为胡黄连甙 II。

### 2.2 HPLC 和 CZE 测定胡黄连甙 II 的含量及纯度

#### 2.2.1 CZE 和 HPLC 法的方法学考察

以峰面积(Y)对浓度(X, g/L)作图, HPLC 和 CZE 法的标准曲线分别为  $Y = 7.717 \times 10^{-8} X + 0.003498$  ( $r = 0.9995$ ) 和  $Y = 5.615X - 34.36$  ( $r = 0.9913$ ), 线性区间分别为 0.0184~0.166 g/L 和 0.028~0.432 g/L; 峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.93% 和 0.74% ( $n = 5$ ), 保留时间和迁移时间的 RSD 分别为 0.54% 和 0.22% ( $n = 5$ ); 回收率分别为 97.2% (RSD = 0.50%,  $n = 5$ ) 和 99.2% (RSD = 2.38%,  $n = 5$ )。

#### 2.2.2 胡黄连药材和自制胡黄连甙 II 对照品的含量和纯度测定

运用 HPLC 和 CZE 法对胡黄连药材和自制胡黄连甙 II 对照品进行了含量和纯度测定 ( $n = 5$ ), 结果表明, 运用 HPLC 和 CZE 法, 药材中胡黄连甙 II 的含量分别为 8.84% (RSD = 1.33%) 和 9.13% (RSD = 4.21%), 自制胡黄连甙 II 的纯度分别为 99.6% (RSD = 0.89%) 和 99.1% (RSD = 1.27%), 二者的结果具有可比性。CZE 法比 HPLC 法更加快速, 适合于高通量样品的分析。

图 3 是对照品和药材样品的典型色谱图; 图 4 是对照品和药材样品的电泳图。

#### 2.2.3 胡黄连甙 II 对照品稳定性的研究

实验表明自制胡黄连甙 II 的纯度高于 99.0% ,

可作为对照品使用。运用 HPLC 法对其稳定性进行了考察, 结果表明, 胡黄连甙 II 在密闭容器中、避光、低温和干燥的条件下保存 12 个月, 在 0, 1, 2, 3, 6, 12 个月时, 分别测定其纯度, 结果为 99.6% , 99.9% , 99.5% , 99.6% , 99.7% 和 99.7% , 说明其稳定性良好。

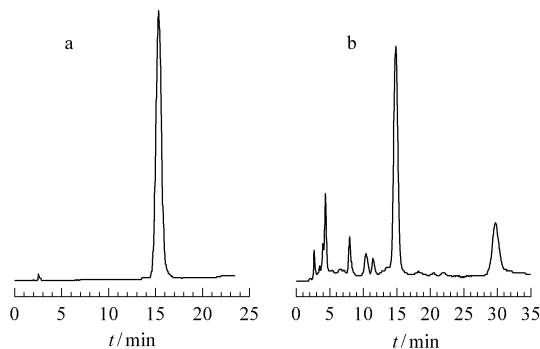


图 3 自制对照品(a)和胡黄连药材(b)的色谱图  
Fig.3 Chromatograms of prepared picroside II control (a) and Rhizoma Picrorhizae sample (b)

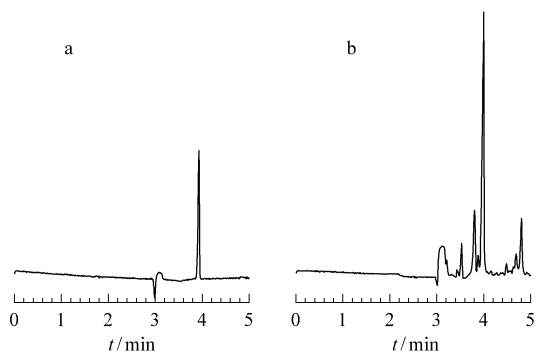


图 4 自制对照品(a)和胡黄连药材(b)的电泳图  
Fig.4 Electropherograms of prepared picroside II control (a) and Rhizoma Picrorhizae sample (b)

### 3 结论

该法采用渗漉法提取、活性炭吸附柱色谱、高效液相色谱法纯化以及减压回收溶剂和减压干燥等步骤进行制备, 克服了以前用常规方法提取、纯化过程中胡黄连甙 II 不稳定、操作繁琐和纯度低的缺点。

自制胡黄连甙 II 的纯度高于 99.0% , 可作为对照品使用。

### 参考文献：

[1] Zheng Huzhan , Dong Zehong , She Jing. Research and Application of Herbal Medicine Modernization. Beijing : People's Medical Publishing House, 1995. 3230  
郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 3230

[2] Iwagawa T, Nakamura S, Masuda T. Phytochemistry, 1990, 29 (6): 1913

[3] Wang Daqi. Acta Botanica Yunnanica, 1993, 15(1): 83  
王答祺. 云南植物研究, 1993, 15(1): 83