

制备型高效液相色谱法分离纯化川西 獐牙菜提取物中的龙胆苦苷

雷宇佳, 高明哲, 王莉, 肖红斌*

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要 :龙胆苦苷(GPS)是龙胆类药材及其相关制品质量控制的指标成分。本研究利用制备型高效液相色谱从川西獐牙菜提取物中分离纯化龙胆苦苷对照品。对制备色谱的流动相组成、流速、进样量和检测波长等制备参数进行了优化。采用的色谱柱为 C_{18} 柱(200 mm × 50 mm, 5 μ m),流动相为甲醇和0.1%乙酸水溶液(体积比为30:70),流速为75 mL/min,检测波长为254 nm,进样体积为500 μ L。在30 min的运行时间内,龙胆苦苷与其他干扰成分得到了很好的分离,产品纯度达到了99%以上。此方法具有快速高效、产品纯度高的特点,可用于制备龙胆苦苷对照品和对龙胆苦苷制品的质量控制。

关键词 :制备型高效液相色谱法;龙胆苦苷;川西獐牙菜

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)09-0902-03

Preparation of gentiopicroside from the extract of *Swertia mussotii* Franch by preparative high performance liquid chromatography

LEI Yujia, GAO Mingzhe, WANG Li, XIAO Hongbin*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract : A new method for isolation of gentiopicroside (GPS) from *Swertia mussotii* Franch with reversed phase preparative high performance liquid chromatography (Pre-HPLC) is described. After 95% ethanol extract was obtained with solvent extraction and macroporous resin separation, a fraction containing GPS was acquired and subjected to Pre-HPLC for isolation of target component. The optimum operation parameters were selected as follows: a C_{18} column (200 mm × 50 mm, 5 μ m), methanol-0.1% acetic water (30:70, v/v) as the mobile phase at flow rate of 75 mL/min, the detection wavelength at 254 nm, and the injection volume of 500 μ L at the mass concentration of 225 g/L. The purity of the product was detected by HPLC method. The result showed that the purity of product was above 99%. The effective and rapid method has been successfully applied to the preparation of GPS from *Swertia mussotii* Franch.

Key words : preparative high performance liquid chromatography (Pre-HPLC); gentiopicroside; *Swertia mussotii* Franch

川西獐牙菜(*Swertia mussotii* Franch)系龙胆科獐牙菜属一年生草本植物,主要分布在四川省西北部和青海省玉树地区^[1]。其全草可用于治疗肝胆疾病^[2]。研究表明川西獐牙菜中主要含有龙胆苦苷(GPS)、獐牙菜苦苷、芒果苷、当药黄素和齐墩果酸等成分^[3]。GPS作为川西獐牙菜的主要有效成分之一^[4],具有保肝、健胃利胆和降压等作

用^[5]。研究也表明GPS有较强的致DNA损伤和致突变作用^[6],从而引起人们对含GPS药品的安全性的关注。由于GPS纯品的需求量较大,因此分离制备GPS是控制龙胆科中草药及其相关制品的质量和安全性评价的重要环节。目前GPS的分离制备方法主要是采用大孔树脂吸附分离法从濒危植物秦艽中提取^[7-9],例如:张雅惠等^[8]发现HPD-100型

* 通讯联系人:肖红斌,博士,研究员。E-mail: hbxiao@dicp.ac.cn.

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(No. 2009ZX09502-023)和中国科学院重要方向项目(No. KSCX2-YW-R-209)。

收稿日期:2010-04-07

大孔树脂对 GPS 的吸附能力优于其他树脂,并通过此方法分离得到 GPS,其纯度达到 73.25%;陈国锋^[9]等通过星点设计-效应面优化法优化分离条件,使 HPD-300 树脂分离纯化 GPS 的纯度达到 78.5%。这些方法均需要进一步纯化才能制备高纯度的 GPS。皇甫泽坤等^[10]用高速逆流色谱从秦艽中分离制备得到纯度为 94% 的 GPS,许有威等^[11]用高速逆流色谱从龙胆中分离得到纯度为 99% 的 GPS,但也存在分离时间过长等不足之处^[12]。

制备型高效液相色谱(Pre-HPLC)作为一种高效的分离纯化技术有着溶剂系统简单、单次分离时间短、分离效率高等优点^[12]。为了深层次利用开发川西獐牙菜等药用植物,控制相关药品的质量,我们采用 Pre-HPLC 法,运用本实验室装填的动态轴向压缩制备色谱柱,从川西獐牙菜中分离制备了高纯度的 GPS。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Waters Delta 4000 制备型高效液相色谱仪, Waters 2690 型高效液相色谱仪,配 996 型二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);Finigan TSQ 三重四极杆质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);旋转蒸发器(日本 Eyela 公司)。

甲醇(色谱纯,中国禹王试剂公司);分析型 HPLC 用乙酸(色谱纯,美国 Tedia 公司),制备型 HPLC 用乙酸(分析纯,沈阳化学试剂厂);实验用水由 Millipore 纯水系统制备。

川西獐牙菜由中国科学院西北高原生物研究所鉴定并提供。

1.2 原料处理

川西獐牙菜全草切段,用 95% 乙醇回流提取,减压蒸馏得川西獐牙菜浸膏,加水悬混,依次用 3 倍体积的乙酸乙酯、正丁醇萃取。将正丁醇萃取部分浓缩蒸干,溶于 5% 乙醇,过 HP-20 大孔树脂,收集 30% 乙醇洗脱产物,减压蒸馏得膏状物。

1.3 色谱条件

1.3.1 制备型 HPLC 条件

本实验室装填 50 mm 内径的美国 Varian 公司动态轴向加压柱,装填填料为 5 μm Microsorb C_{18} 硅胶,柱装填高度为 200 mm;流动相为甲醇-0.1% 乙酸水溶液(体积比为 30:70),流速为 75 mL/min;进样量为 500 μL ,检测波长为 254 nm。

1.3.2 分析型 HPLC 条件

Novapak C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 4

μm),流动相 A 为甲醇,B 为 0.1% 乙酸水溶液(体积比为 25:75),流速为 0.6 mL/min;进样量为 10 μL ;检测波长为 274 nm。

1.4 对照品的制备

将膏状产物用水溶解,制成 225 g/L 的供试品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。采用制备型 HPLC 柱分离,多次进样,收集 18 ~ 20 min 洗脱的色谱峰(见图 1),浓缩干燥得到对照品样品。

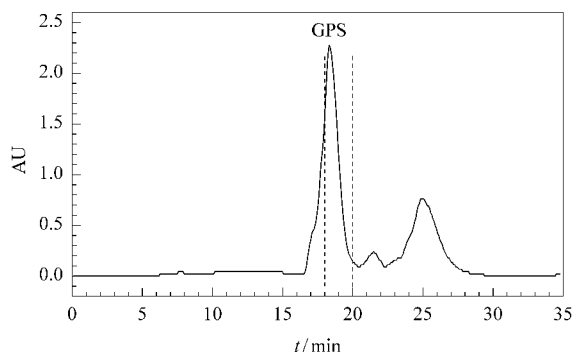


图 1 GPS 的制备 HPLC 谱图

Fig. 1 Pre-HPLC chromatogram of GPS

2 结果与讨论

2.1 产品纯度的测定

产物经分析型 HPLC 检测,归一化定量,其纯度(以质量分数计)在 99% 以上(如图 2 所示)。

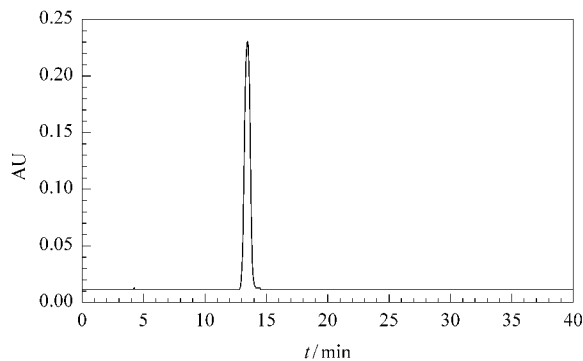


图 2 GPS 产品的 HPLC 纯度分析谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of GPS product

2.2 结构确证

在制备产物的电喷雾质谱(ESI-MS)谱图(如图 3 所示)中,主要显示 m/z 356.9 和 194.7 的碎片峰,分别对应于 GPS 的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 和失去 1 个葡萄糖的苷元峰 $[M + H - 162]^+$ 。同时,该制备产物的核磁共振谱(NMR)、紫外吸收(UV)等数据与文献[3]相符,据此判断该化合物为 GPS。

2.3 样品溶解条件的选择

样品溶解条件的选择对样品的制备影响很大,用于溶解样品的溶剂应与流动相尽可能一致,同时

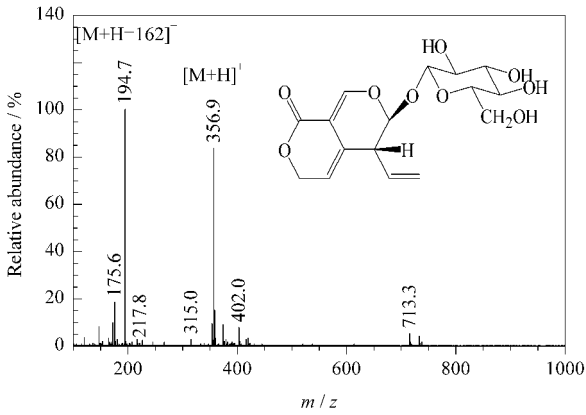


图 3 制备产物的 ESI-MS 谱图

Fig. 3 ESI-MS spectrum of GPS product in positive mode

不干扰样品分离。本实验用水做溶剂,制得质量浓度为 225 g/L 的样品溶液。

2.4 流动相的选择

甲醇作为流动相组分具有价格低廉、易分离的特点,但由于流动相中甲醇-水的比例和速度都难以达到需要的分离效果,因此考察了添加 0.1% 乙酸情况下的分离情况。结果显示在甲醇-0.1% 乙酸水溶液的体积比为 30:70 的情况下分离度最好。

2.5 流速和进样量的选择

制备型 HPLC 流动相的流速、进样量分别按照文献[13]进行优化。在综合考虑分离时间、分离效果、样品浓缩等因素后,流动相流速选择为 75 mL/min,进样量选择为 500 μ L。

3 结论

本实验建立了制备 GPS 对照品的方法,操作方便,重现性好,产品纯度高,可用于 GPS 对照品的制备和对 GPS 制品的质量控制。并且可同时收集到较高浓度的川西獐牙菜活性成分獐牙菜苦苷和芒果苷,供进一步纯化研究。

参考文献:

- [1] Zou H Y. Development and Application of Herbal Medicine in Qinghai Province. Beijing: East Publishing House (邹寒雁. 青海省中药资源开发及利用研究. 北京: 东方出版社), 1990: 40
- [2] Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences. Record of Plants in Qinghai: Vol. 3. Xining: Qinghai People's Press (中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志: 第 3 卷. 西宁: 青海人民出版社), 1996: 8
- [3] Boros C A, Stermitz F R. J Nat Prod, 1990, 53: 1055
- [4] Wang C H, Cheng X M, Annie Bligh S W, et al. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44: 1113
- [5] Wang C J, Wang Z M, Wang W H, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (王彩君, 王智民, 王维皓, 等. 中国中药杂志), 2009, 34(23): 2987
- [6] Mustafayeva K, Giorgio C D, Elias R, et al. J Nat Prod, 2010, 73(2): 99
- [7] Wang L G. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (王良贵. 时珍国医国药), 2007, 18(11): 2723
- [8] Zhang Y H, Sun W J. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (张雅惠, 孙文基. 药物分析杂志), 2007, 27(11): 1752
- [9] Chen G F, Han L M, Shi W, et al. Chinese Pharmaceutical Journal (陈国锋, 韩丽妹, 施雯, 等. 中国药学杂志), 2009, 44(15): 1163
- [10] Huangfu Z K, Ni S F, Sun W J, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (皇甫泽坤, 倪士峰, 孙文基, 等. 分析化学), 2007, 35(6): 883
- [11] Xu Y W, Qi Y, Han X, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (许有威, 齐艳, 韩旭, 等. 中国中药杂志), 2007, 32(24): 2595
- [12] Hou Z G, Luo J G, Kong L Y. Chinese Journal of Natural Medicine (侯志国, 罗建光, 孔令义. 中国天然药物), 2010, 8(1): 62
- [13] Gao M Z, Yuan X Y, Xiao H B, et al. Chinese Journal of Chromatography (高明哲, 袁晓艳, 肖红斌, 等. 色谱), 2008, 26(3): 362