

凌霄花中洋丁香苷的制备

张 桥^{1,2,3}, 沈 娟^{1,2,3}, 赵祎武^{1,2,3}, 王振中^{1,2,3}, 萧 伟^{1,2,3*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001

摘要:目的 从凌霄花中制备洋丁香苷。方法 凌霄花 70%乙醇提取液经 D-101 型大孔吸附树脂纯化、凝胶 Sephadex LH-20 柱精制制备洋丁香苷。结果 产品经 HPLC、ESI-MS 分析确定为洋丁香苷, 质量分数 >95%。结论 该方法操作简便, 克服耗费大量有机溶剂、收率低等弊端, 适合洋丁香苷制备。

关键词: 凌霄花; 洋丁香苷; D-101 大孔吸附树脂; Sephadex LH-20 柱色谱; HPLC

中图分类号: R284.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)12-2465-03

Preparation of acteoside from *Campsis Flos*

ZHANG Qiao^{1,2,3}, SHEN Juan^{1,2,3}, ZHAO Yi-wu^{1,2,3}, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Jingsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China
3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China

Key words: *Campsis Flos*; acteoside; D-101 macroporous resin; Sephadex LH-20 column chromatography; HPLC

凌霄花为常用中药, 收载于《中国药典》2010 年版, 来源于紫葳科植物凌霄 *Campsis grandiflora* (Thunb.) K. Schum. 或美洲凌霄 *Campsis radicans* (L.) Seem. 的干燥花, 具有凉血、化瘀、祛风的功效, 用于月经不调、经闭癥瘕、产后乳肿、风疹发红、皮肤瘙痒、疮痍等症。主要化学成分是以齐墩果酸、熊果酸、 α -香树脂醇、 β -香树脂醇为主的三萜类化合物、苯乙醇苷类等^[1-2]。洋丁香苷 (acteoside) 是其中的一个主要活性成分, 具有抗氧化^[3]、免疫抑制^[4]等作用。齐墩果酸等常用作药材及其相关制品的质量控制指标, 未见把洋丁香苷列入质控指标之中。增添洋丁香苷为质控指标, 可以更全面控制凌霄花药材质量。文献报道^[5]肉苁蓉中洋丁香苷制备方法主要是有机溶剂萃取、纤维素柱色谱梯度洗脱。本实验采用大孔树脂吸附技术对凌霄花提取液进行了分离纯化、凝胶 Sephadex LH-20 色谱玻璃小柱精制, 得到质量分数超过 95% 的洋丁香苷, 克服文献方法^[5]耗费大量有机溶剂、工艺烦琐、收率低等弊

端, 为从其他科属植物中制备洋丁香苷提供依据。

1 仪器与材料

凌霄花药材经南京中医药大学吴启南教授鉴定为紫葳科植物凌霄 *Campsis grandiflora* (Thunb.) K. Schum. 的干燥花; 洋丁香苷 (批号 111530-200706, 中国药品生物制品检定所); D-101、HPD-100、HPD-450 大孔吸附树脂 (天津农药总厂), AB-8 大孔树脂 (南开大学化工厂); 柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 填料 (上海信然生物技术有限公司); 甲醇 (色谱纯, Tedia, 美国); 水 (重蒸馏, 自制); 甲醇、磷酸、药用 95% 乙醇 (南京化学试剂有限公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配自动进样器、四元泵、MWD 检测器; AE240 电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇 (A)-0.1%

收稿日期: 2011-05-25

基金项目: 国家科技部重大新药创制“创新中药中试放大研究技术平台”(2009ZX09313-032)

作者简介: 张 桥, 男, 硕士, 工程师, 从事中药新药研究与开发。Tel: (0518)85521949 E-mail: dafuyuan_hubei@163.com

*通讯作者 萧 伟 Tel: (0518)85521956 E-mail: wzhzh-nj@tom.com

磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 40%~46% A; 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 334 nm。

2.2 提取工艺

取凌霄花 10.0 kg, 依次加入 10 倍、8 倍 70% 乙醇回流提取 2 次, 合并提取液, 滤过, 滤液减压浓缩至 1:1 (药液为含药材 1 g/mL)。搅拌加入乙醇至乙醇体积分数为 80%, 静置过夜, 滤过, 滤液减压回收至无醇味, 加水稀释至 1:1, 静置过夜, 滤过, 弃去不溶物, 得滤液备用。

2.3 纯化工艺

2.3.1 树脂筛选 由于“2.2”项下制备的滤液含大量极性杂质成分, 需要用树脂工艺纯化。考察 D-101、HPD-100、HPD-450、AB-8 4 种大孔树脂对样品中洋丁香苷的吸附、解吸附效果。首先对树脂

预处理: 取 D-101、HPD-100、HPD-450、AB-8 大孔吸附树脂适量, 分别用乙醇浸泡、溶胀, 并用乙醇洗脱, 直至流出的乙醇液与水混合不呈现白色乳浊现象; 再加纯化水洗脱至无醇味, 备用。

按“2.2”项下工艺制备样品液 (含生药材 1 g/mL), 平行取 4 份, 100 mL/份, 分别加入到已处理好的含 40 g HPD-450、D-101、HPD-100、AB-8 大孔吸附树脂柱中, 吸附, 水洗, 水液减压浓缩, 甲醇定容至 100 mL; 适量 50%乙醇洗脱, 合并洗脱液, 回收乙醇, 至无醇味, 甲醇定容至 100 mL。

取上样液和洗脱浓缩液, 分别采用 HPLC 法测定, 计算, 结果见表 1。可以看出 D-101 大孔吸附树脂的吸附及解吸附能力较理想。

2.3.2 洗脱溶剂的筛选 取 D-101 大孔吸附树脂 40 g, 上样液 (含生药材 1 g/mL) 100 mL, 平行 6

表 1 树脂种类筛选

Table 1 Screening of resin types

树脂种类	上样液洋丁香苷			洗脱液洋丁香苷			水洗液洋丁香苷		
	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	解吸率/ %	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	解吸率/ %	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	解吸率/ %
HPD-450	1.13	—	—	0.81	2.82	71.68	0	—	—
HPD-100	1.13	—	—	0.92	2.82	81.42	0	—	—
D-101	1.13	—	—	1.09	2.82	96.46	0	—	—
AB-8	1.13	—	—	0.77	2.12	90.59	0.28	—	—

份, 上样吸附, 水洗脱至 Molish 反应呈阴性后, 分别用 20%、30%、40%、50%、60%、95%乙醇 200 mL 洗脱, 收集洗脱液, 浓缩至 100 mL。HPLC 法测定, 计算回收率, 结果见表 2。结果表明 5 倍树脂量 40%、50%乙醇洗脱, 洋丁香苷回收率均超过 90%, 其他体积分数乙醇洗脱, 洋丁香苷回收率均小于 80%。综合成本等因素考虑, 确定采用 40%乙醇洗脱洋丁香苷, 洗脱体积与树脂质量比为 5:1。

2.3.3 洗脱体流量的筛选 另取预处理完毕的 3 根 D-101 大孔吸附树脂色谱柱 (树脂 40 g), 分别上样 100 mL (含生药材 1 g/mL), 吸附, 水洗脱至 Molish 反应呈阴性后, 用 40%乙醇洗脱, 体流量分别为 1、2、3 BV/h, 收集洗脱液, 浓缩, 定容至 100 mL, HPLC 检测, 计算回收率, 结果见表 3。结果洗脱体流量确定为 1~2 BV/h。

2.3.4 最佳树脂纯化工艺 取“2.2”项下备用液通过 D-101 大孔树脂色谱柱 (树脂与生药质量之比为 4:10), 水洗脱至 Molish 反应呈阴性后, 再以 5 倍

表 2 不同体积分数乙醇对洋丁香苷洗脱的影响

Table 2 Influence of different ethanol concentration on acteoside elution

乙醇	洋丁香苷		乙醇	洋丁香苷	
	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	回收率/ %		质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	回收率/ %
20%	0.655	57.98	50%	1.091	96.52
30%	0.811	71.76	60%	0.863	76.35
40%	1.094	96.80	95%	0.366	32.37

表 3 体流量对洋丁香苷洗脱的影响

Table 3 Influence of flow rate on acteoside elution

体流量/(BV·h ⁻¹)	洋丁香苷	
	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	回收率/%
1	1.084	95.92
2	1.035	91.58
3	0.958	84.75

树脂量 40%乙醇洗脱, 体积流量为 1~2 BV/h, 收集醇洗脱液, 减压浓缩至适量, 备用。

3 批验证重复实验收率(按生药计算, 下同)分别为 4.1%、4.3%、4.0%, 其中洋丁香苷平均质量分数为 26.15%, 说明工艺收率稳定。

2.3.5 硅胶纯化工艺确定 对色谱硅胶(200~300目)用量进行考察, 硅胶量超过浸膏量 5 倍, 洋丁香苷回收率大幅降低; 硅胶量小于浸膏量 4 倍, 样品洋丁香苷质量分数降低, 故确定硅胶与浸膏质量之比为 4~5。

对洗脱液醋酸乙酯-乙醇(95:5、9:1、8:2)进行考察, 结果醋酸乙酯-乙醇(95:5)洗脱洋丁香苷很难洗脱; 醋酸乙酯-乙醇(8:2)洋丁香苷易洗脱但杂质多; 醋酸乙酯-乙醇(9:1)效果较好。

最佳硅胶纯化工艺: 取“2.3.4”项下浸膏, 加适量乙醇溶解后加入等量粗硅胶(80~100目)拌匀, 烘干, 添加在装有 4~5 倍量色谱硅胶(200~300目)色谱柱上, 用 4 倍柱体积醋酸乙酯-乙醇(9:1)洗脱, 收集目标组分(365 nm 荧光下蓝色荧光), 减压蒸干, 粉碎, 得黄色粉末, 为洋丁香苷粗品, 备用。3 批验证重复实验收率分别为 1.3%、1.3%、1.1%, 其中洋丁香苷平均质量分数为 70.24%, 说明工艺收率稳定。

2.4 精制

对 Sephadex LH-20 色谱洗脱溶剂甲醇、乙醇进行比较, 结果基本一致, 综合考虑甲醇有毒性的因素选用乙醇作为洗脱溶剂。对粗品与填料不同比例(1:10、1:15、1:20、1:25)进行比较, 结果填料用量小, 产物质量分数低; 填料用量大, 乙醇溶剂消耗大。故选用粗品与填料质量之比为 1:20。

精制工艺: 取“2.3.5”项下粗品, 适量乙醇溶解, 通过 Sephadex LH-20 色谱玻璃小柱(样品与填料质量之比为 1:20), 4 倍柱体积乙醇洗脱, 收集目标组分, 70 °C 以下减压蒸干, 粉碎, 即得淡黄色粉末。3 批验证重复实验收率分别为 0.075%、0.069%、0.071%, 说明工艺收率稳定。

2.5 纯度检测

取“2.4”项下淡黄色粉末, 加甲醇溶解, 采用 HPLC 外标法检测, 结果洋丁香苷保留时间为 6.6 min, 峰面积归一化测得其质量分数为 95.82%。精制产物经 ESI-MS 分析, 得准分子离子峰 623 [M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 1.08 (3H, d, J =

6 Hz, 鼠李糖甲基质子), 2.81 (2H, t, J = 7 Hz, Ar-CH₂-CH₂-), 3.84 (3H, s, -OCH₃), 4.34 (1H, d, J = 8 Hz, 葡萄糖端基质子), 5.15 (1H, s, 鼠李糖端基质子), 6.27 (1H, d, J = 16 Hz, Ar-CH=CH-), 6.5~7.1 (6H, Ar-H), 7.59 (1H, d, J = 16 Hz, Ar-CH=CH-)。¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 苷元: 131.9 (C-1), 116.7 (C-2), 145.1 (C-3), 146.6 (C-4), 117.6 (C-5), 121.8 (C-6), 72.7 (C-α), 37.1 (C-β); 咖啡酸: 128.2 (C-1), 115.1 (C-2), 150.0 (C-3), 147.1 (C-4), 117.0 (C-5), 123.7 (C-6), 168.7 (C-α), 115.4 (C-β), 148.4 (C-γ); 葡萄糖: 104.7 (C-1), 76.4 (C-2), 82.1 (C-3), 70.9 (C-4), 76.6 (C-5), 62.9 (C-6); 鼠李糖: 103.5 (C-1), 72.4 (C-2), 72.9 (C-3), 74.3 (C-4), 71.2 (C-5), 18.9 (C-6)。与洋丁香苷^[1]完全相符。

3 讨论

本实验以凌霄花为原料, 采用乙醇提取、醇沉、水沉、大孔吸附树脂制备洋丁香苷, 克服了耗费大量有机溶剂、工艺烦琐、收率低等弊端, 为从其他科属植物中制备洋丁香苷提供实验依据。

本实验采用醇沉、水沉等工艺去除大量杂质, 能延长后续工艺中大孔吸附树脂使用寿命; 大孔吸附树脂纯化能大大降低硅胶柱纯化中硅胶、有机试剂的用量, 硅胶柱等度洗脱, 操作方便且提高收率。

粗品洋丁香苷通过凝胶 Sephadex LH-20 玻璃色谱小柱纯化, 乙醇洗脱, 杂质成分先流出, 收集蓝色荧光部分(365 nm), 即可获得质量分数超过 95%的洋丁香苷。

参考文献

- [1] Zhao Q, Liao M C, Guo J X. Studies on the chemical constituents of the flower of *Campsis grandiflora* (Thunb.) K. Schum. and its contraceptive effect [J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(3): 1-6.
- [2] 马英丽, 刘丽娟. 凌霄花中齐墩果酸的分离鉴定和含量测定 [J]. 中草药, 1993, 24(4): 186-186.
- [3] 李 丽, 时东方, 任长忠, 等. 车前子中苯乙醇苷化合物抗氧化活性研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(11): 1949-1951.
- [4] 张洪泉, 翁晓静, 陈莉莉, 等. 管花肉苁蓉麦角甾苷对衰老小鼠端粒酶活性和免疫功能的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(4): 270-273.
- [5] 李 谦, 杨 杰, 肖海涛, 等. 肉苁蓉中麦角甾苷对照品的制备及含量测定 [J]. 中成药, 2010, 32(6): 1007-1010.