

高纯度獐牙菜苦苷的制备方法

韩冬¹, 田成旺², 张铁军^{2*}, 刘莹¹

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要:目的 从川西獐牙菜药材中制备高纯度獐牙菜苦苷。方法 川西獐牙菜经醇提水沉后, 上清液经 HPD-300 大孔吸附树脂吸附洗脱后得獐牙菜苦苷粗提物, 再用闪式柱色谱对其进行分离。结果 制备得到的獐牙菜苦苷, 纯度在 90% 以上, 工艺总收率为 79.94%。结论 本实验建立的制备高纯度的獐牙菜苦苷的方法, 可操作性强, 重现性较好, 工艺收率和产品纯度均较为理想。

关键词: 闪式柱色谱; 大孔树脂; 獐牙菜苦苷; 川西獐牙菜; 制备方法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)03-0191-03

The preparation of high purity swertiamarin

HAN Dong¹, TIAN Cheng-wang², ZHANG Tie-jun², LIU Ying¹

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin, 300193, China)

Abstract: **Objective** To prepare swertiamarin with high purity from *Swertia mussotii* Franch. with macroporous resin and flash chromatography. **Methods** Herba *S. Mussotii* was extracted with ethanol solvent. The extract solvent was adsorpted and separated with HPD-300 to obtain crude extract of swertiamarin, then the crude extract is purified with flash chromatography. **Results** The purity of swertiamarin was more then 90%; recovery rate was 79.94%. **Conclusion** The preparation method established in this experiment can be operated easily with good reproducibility and high recovery rate. The purity of the swertiamarin can be up to 90%.

Key words: flash chromatography; macroporous resin; swertiamarin; *Swertia mussotii* Franch.; preparation method

藏茵陈是我国传统藏药, 主要来源有川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. 和抱茎獐牙菜 *S. franchetiana* H. Smith^[1]。川西獐牙菜为龙胆科獐牙菜属植物, 主要分布在青海、西藏、云南和四川部分地区^[2], 全草入药, 具有清肝利胆、退诸热之功效, 主要用于黄疸型肝炎、病毒性肝炎和血病^[3-4]。现代研究证明, 獐牙菜苦苷是藏茵陈中抗肝炎的主要活性成分之一^[5], 因此, 獐牙菜苦苷作为抗肝炎新药成为关注热点, 獐牙菜苦苷的精制和制备也成为研究的重点之一^[6]。但是, 目前獐牙菜苦苷多采用开放硅胶柱色谱的方法进行分离精制和制备^[6-8], 该方法

存在周期较长、成本较高、操作安全性差等缺点。为了克服这些困难, 本实验拟采取大孔树脂吸附技术和闪式柱色谱技术联合使用的方法进行獐牙菜苦苷的制备。

闪式柱色谱(flash chromatograph)技术起源于 1978 年^[9]。相比于传统的开放柱色谱, 该方法由于分离过程中持续加压, 可有效提高分离过程的速度和效率。同时, 由于闪式柱色谱的填料可选用不同粒径大小的硅胶、反相硅胶等, 从而大大增加了分离样品的种类和选择性^[10]。此外, 随着在线检测系统和自动收集系统在闪式柱色谱上的广泛使用, 可有

基金项目 天津市自然基金项目(08JCZDJC24700 和 10JC2DJC21400)

作者简介 韩冬(1984—), 女, 回族, 天津人, 天津中医药大学药物分析硕士研究生, 研究方向为天然药物分析。

E-mail: handong5@eyou.com

* 通讯作者 张铁军, Tel: (022) 23006848, E-mail: tiezheng4@sina.com

效缩短操作周期,提高分离效率、产品收率和纯度等,使得闪式柱色谱技术越来越得到大家的认可。

1 仪器与材料

EZ Purifier 闪式色谱系统(上海利穗化工科技有限公司),高效液相色谱仪(LabAlliance 有限公司),SepaFlash 预装快速液相色谱分离柱(内装 50 g ODS 填料)

獐牙菜苦苷对照品(实验室自制,质量分数大于 98%,可供定量测定),HPD-300 大孔吸附树脂为河北沧州化工厂产品,甲醇(色谱纯)、乙醇(工业纯)均购自天津市康科德科技有限公司,纯净水。獐牙菜药材购自青海省玉树自治州,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为龙胆科獐牙菜属川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. 全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.04%磷酸水(23:77);体积流量 1 mL/min;检测波长 237 nm;温度 35℃;进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取獐牙菜苦苷对照品适量,加甲醇制成含獐牙菜苦苷 55 μg/mL 的溶液,即得。

2.3 标准曲线的绘制

精密吸取上述对照品溶液 0.5、1、2.5、5、10 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按“2.1”项下色谱条件分别进样检测,以獐牙菜苦苷的浓度为横坐标(X),峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 26134 X - 4162$, $r = 0.9998$,线性范围为 2.75~55 μg/mL。

2.4 獐牙菜苦苷的测定

精密称取 0.5 g 川西獐牙菜全草粗粉(过 3 号筛),置具塞锥形瓶中,加入 40 mL 90%乙醇,称质量,加热回流 2 h,放冷,用 90%乙醇补足原质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,按“2.1”项下色谱条件进样检测,测得药材中獐牙菜苦苷的质量分数为 3.08%。

2.5 獐牙菜苦苷粗提物的制备及测定

取一定量的川西獐牙菜药材,粉碎,加 12 倍量 90%乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,65℃减压浓缩至无醇味,加入一定量的蒸馏水水沉,静置,离心,得上清液即为上柱液,过预处理好

的 HPD-300 大孔树脂,以 2 BV/h 的速度上柱,水洗 3 BV 后,依次用 20%乙醇 7 BV 和 70%乙醇 5 BV 以 2 BV/h 的速度梯度洗脱,收集洗脱液,65℃减压浓缩至干,得到 20%乙醇洗脱部分干燥粉末,为含獐牙菜苦苷 45.57% 的粗提物,收率为 84.83%。

2.6 高纯度獐牙菜苦苷的制备

利用全自动闪式柱色谱制备高纯度的獐牙菜苦苷,色谱分离柱填料为 ODS,先用甲醇-水(35:65)平衡色谱分离柱约 20 min,将獐牙菜苦苷粗提物 1 g 用少量水溶解后上样,再用甲醇-水(35:65)洗脱 60 min,根据在线检测系统进行自动收集,最后用纯甲醇冲柱,体积流量为 10 mL/min,检测波长为 237 nm,合并收集液,减压旋干,干燥物为 90%以上的高纯度獐牙菜苦苷,收率为 94.24%。

经高效液相色谱检测,各样品色谱图见图 1。

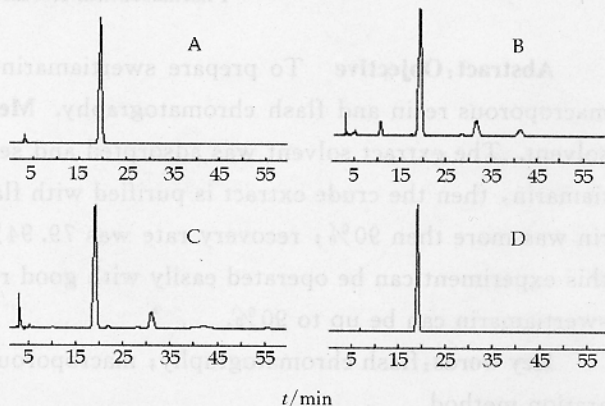


图 1 獐牙菜苦苷对照品(A)、川西獐牙菜药材(B)、獐牙菜苦苷粗提物(C)、獐牙菜苦苷精制品(D)的 HPLC 图

3 讨论

3.1 大孔树脂分离工艺的确定

本实验对大孔树脂分离精制川西獐牙菜环烯醚萜类成分的工艺过程进行了系统研究,并确定了最佳工艺参数,已另文发表^[11]。

3.2 獐牙菜苦苷粗提物的进一步分离精制

本实验前期分别考察了开放式硅胶柱色谱、开放式 ODS 柱色谱以及闪式柱色谱法对獐牙菜苦苷粗提物进行分离精制,结果见表 1。

表 1 獐牙菜苦苷粗提物分离方法的比较

色谱法	上样量/g	周期	质量分数/%	收率%
开放硅胶柱色谱	100	8 d	65.5	53.6(总)
开放硅胶柱色谱 (二次上样)	50	7 d	80.3	
开放 ODS 柱色谱	3	5 d	>90	90.3
闪式柱色谱	1	2 h	>90	94.2

从表1可以看出,开放式硅胶柱色谱上样量大,但是产品质量分数和收率低,开放 ODS 柱色谱的产品质量分数和收率较高,但上样量少,相对周期比较长,闪式柱色谱周期短,产品质量分数高、收率高,故采用闪式柱色谱法分离獐牙菜苦苷粗品。

3.3 最佳上样量的确定

实验过程中分别考察了上样量为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 g 的情况,结果表明当上样量小于 1.0 g 时样品能实现较好分离;当上样量大于 1.0 g 分离效果不理想,獐牙菜苦苷的质量分数低于 90%,因此确定 1.0 g 为最佳上样量。同时为了延长填料的使用寿命,本实验在分离柱前安装了一个上样小柱,效果较好。

3.4 本实验方法的优点

专利 CN1966511^[12] 提供了獐牙菜苦苷的制备方法,为药材提取液经大孔树脂预分离、硅胶色谱柱精制、脱色干燥。本实验方法与专利方法的主要区别在于粗品的精制,专利使用硅胶色谱柱精制,此法工艺复杂,有机试剂使用量大且毒性大,操作安全性低,獐牙菜苦苷的回收率较低(64%);而本实验采用闪式柱色谱法精制獐牙菜苦苷粗品,分离速度快、过程简单、有机试剂使用量小,獐牙菜苦苷回收率高,可达到 94.2%。

但是本法单次上样量少,收获的样品量小,对样品的要求较高,适合较纯的样品的分离制备,离工业化规模生产还有一定的距离,且对仪器的依赖性较强。不过,随着工业色谱的不断发展和应用,本实验可以为快速柱色谱方法应用于獐牙菜苦苷的工业制备提供一定的研究基础。

4 小结

本实验采用大孔吸附树脂吸附分离和全自动闪

式柱色谱联用的方法从川西獐牙菜药材中制备獐牙菜苦苷,质量分数在 90% 以上,收率为 79.94%。此法工艺简单,可操作性强,效率高,可用于高纯度獐牙菜苦苷的快速制备。

参考文献

- [1] 青海省卫生厅. 青海省药品标准 [S]. 西宁: 青海人民出版社, 1992.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1996.
- [3] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- [4] 马丽娜, 田成旺, 张铁军, 等. 獐牙菜属植物中环烯醚萜类成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 790-795.
- [5] Johji Y, Makoto K, Hisashi M, et al. Anticholinergic action of *Swertia japonica* and an active constituent [J]. J Ethnopharmacol, 1991, 33(1): 31-35.
- [6] 田 微, 张喜民, 陈朝晖, 等. 正交试验优选獐牙菜的提取工艺 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 545-548.
- [7] 陈家春, 黄先石. 湖北獐牙菜属植物的化学成分分析 [J]. 中药材, 1990, 13(2): 29-30.
- [8] 曾光尧, 谭桂山, 徐康平, 等. 川东獐牙菜水溶性化学成分 [J]. 药学报, 2004, 39(5): 351-353.
- [9] Still C W, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution [J]. J Org Chem, 1978, 43(14): 2923-2925.
- [10] Raman G, Cho M, Brodbelt J S, et al. Isolation and purification of closely related *Citrus* limonoid glucosides by flash chromatography [J]. Phytochem Anal, 2005, 16: 155-160.
- [11] 马丽娜, 张铁军, 田成旺, 等. 大孔树脂分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜苷类和吡啶酮类成分的工艺研究. 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集 [C]. 2007: 538-539.
- [12] 范小兵, 张 盛, 殷梦龙, 等. 獐牙菜苦苷单体的分离纯化方法: 中国, CN 1966511A [P]. 2007-05-23.

(收稿日期 2009-11-06)

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、Chinese Herbal Medicines、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》)为提高稿件处理效率,更好地为广大读者和作者服务,从 2010 年 1 月开始,中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国> 或 www.tiprpress.com 点击进入 4 刊网页,在页面左侧有“作者登录”链接,第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿;作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

在此,对广大作者、读者和编委对本刊长期以来的支持表示深深的感谢!

天津中草药杂志社