

高速逆流色谱法从多花蒿中分离制备阿格拉宾

刘 钊¹, 陈卫平¹, 李清娟¹, 李 健²

1. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司 河北省制剂工程技术研究中心, 河北 石家庄 050051

2. 石家庄市第二医院, 河北 石家庄 050051

摘要: **目的** 采用高速逆流色谱法分离制备多花蒿中阿格拉宾。**方法** 多花蒿乙醇提取物经硅胶柱色谱分离, 所得组份 Fr. 1 用高速逆流色谱进一步分离, 采用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1.2:0.8:1.5:0.5)为两相溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 主机转速 850 r/min, 体积流量 2.0 mL/min, 检测波长为 254 nm。采用波谱法对所得化合物进行结构鉴定, HPLC 法测定产品的纯度。**结果** 从 500 mg 组分 Fr. 1 中得到 260 mg 质量分数为 99.5% 的阿格拉宾。**结论** 该方法操作简单, 可用于阿格拉宾化学对照品的分离制备。

关键词: 多花蒿; 阿格拉宾; 高速逆流色谱; 对照品

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2012)04-0363-03

Separation and preparation of arglabin from *Artemisia myriantha* by high speed counter-current chromatography

LIU Fang¹, CHEN Wei-ping¹, LI Qing-juan¹, LI Jian²

1. Hebei Pharmaceutical Technology and Engineering Research Center, Shijiazhuang Pharm. Group Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co. Ltd., Shijiazhuang 050051, China

2. The Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050051, China

Abstract: Objective To establish a method for the isolation and preparation of arglabin from *Artemisia myriantha* by high speed counter-current chromatography (HSCCC). **Methods** The ethanol extract of *A. myriantha* was separated with silica gel column chromatography, and the obtained Fr. 1 was further separated by HSCCC with a two-phase solvent system composed of *n*-hexane-ethylacetate-methanol-water (1.2:0.8:1.5:0.5). The lower phase was used as mobile phase, and the upper phase was used as the stationary phase. Main engine speed was 850 r/min, and the detection wavelength was 254 nm at a flow rate of 2.0 mL/min. The obtained fraction was identified by spectral analysis and analyzed by HPLC. **Results** A total of 260 mg arglabin with the purity of 99.5% was successfully obtained from 500 mg Fr. 1. **Conclusion** The results indicate that HSCCC is a simple and rapid method for the separation and preparation of arglabin reference substance.

Key words: *Artemisia myriantha* Wall. ex Bess.; arglabin; high speed counter-current chromatography (HSCCC); reference substance

多花蒿 *Artemisia myriantha* Wall. ex Bess. 又名蒿枝、苦蒿、黑蒿, 为菊科蒿属多年生草本植物, 产于我国山西中条山、甘肃南部、青海、四川、贵州、云南及广西, 常见生于山坡、路旁和灌丛中。民间认为多花蒿具有清热、祛暑、凉血止血的功效, 用于治疗夏季感冒、中暑发热、骨蒸、潮热、吐血、衄血^[1]。研究发现多花蒿含有的倍半萜内酯类化合物阿格拉宾(arglabin)具有抗肿瘤活性, 可用于肝癌、乳腺癌等多种癌症的治疗^[2]。阿格拉宾的结构

式见图 1。高速逆流色谱是近几十年来迅速发展起来的一种连续高效的液-液分配色谱分离技术, 其特点是被分离物质在两液相中进行分配分离, 不需任何固相支撑体, 克服了固相载体不可逆吸附而引起样品的损失、失活和变性, 具有适用范围广、操作灵活、高效快速、制备量大、费用低的优点, 已被广泛应用于天然产物分离等领域^[3-6]。本实验采用高速逆流色谱从多花蒿中分离、制备活性成分阿格拉宾, 为制备阿格拉宾化学对照品提供了一种简捷、

收稿日期: 2012-05-17

基金项目: 科技部“十一五”重大新药创制项目(2010ZX09401-402)

作者简介: 刘 钊(1969—), 女, 河北省张北县人, 工程师, 硕士, 主要从事新药研发工作。E-mail: fangl1121@126.com

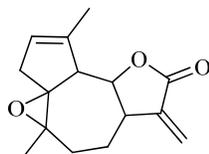


图 1 阿格拉宾的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of arglabin

实用的方法。

1 仪器与材料

TBE—300B 型高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); X—4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司); API 4000 型 LC/MS(美国 ABI 公司); AM—500 型核磁共振仪(Bruker); BS323S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

柱色谱用硅胶(100~200 目, 青岛海洋化工集团公司); GF254 薄层硅胶板(烟台信德化学有限公司)。多花蒿药材购于云南省昆明市郊区, 经中国科学院华南植物园刘焕芳博士鉴定为菊科蒿属植物多花蒿 *Artemisia myriantha* Wall. ex Bess.。阿格拉宾对照品(实验室自制, 质量分数为 99.7%); 乙腈(色谱纯, Fisher 试剂公司); 其他试剂均为分析纯; 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

多花蒿药材晒干, 粉碎, 过 60 目筛, 取 100 g 药材粉末, 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压回收乙醇, 得稠膏 15 g。以二氯甲烷溶解, 与 100 目硅胶搅拌均匀, 挥干溶剂, 上于 100 目硅胶柱, 以石油醚—醋酸乙酯(8:2)洗脱, 根据薄层色谱检测结果合并相同流份, 蒸干, 共得 6 个组分 Fr. 1~Fr. 6, 对组分 Fr. 1 进行减压浓缩、干燥, 得 1.2 g 干膏。

2.2 高速逆流色谱分离

2.2.1 溶剂体系的选择 结合阿格拉宾的化学性质, 选择氯仿—甲醇—水和正己烷—醋酸乙酯—甲醇—水两种体系通过薄层色谱法进行筛选。分别按不同比例配制上述两个体系, 取上、下相各 10 mL 于 50 mL 具塞量瓶中, 加入干膏 20 mg, 振摇, 转移至分液漏斗中, 静置分层, 分别吸取上、下两层溶液各 10 μ L, 另取阿格拉宾对照品溶液 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚—醋酸乙酯(7:3)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10%

硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。薄层色谱的结果表明: 溶剂体系为氯仿—甲醇—水(4:3:2、4:3:1、4:3:1)时, 阿格拉宾基本集中在下相中, 不符合溶剂体系选择的要求; 溶剂体系为正己烷—醋酸乙酯—甲醇—水(1:1:1:1、2:1:2:1、1.2:0.8:1.2:0.8、1.2:0.8:1.5:0.5)时, 阿格拉宾在上、下相溶剂体系中都有不同程度地出现, 其中以正己烷—醋酸乙酯—甲醇—水(1.2:0.8:1.5:0.5)时分配系数最接近 1, 体系的分层时间为 15 s, 符合溶剂体系选择的要求。因此通过薄层色谱对溶剂体系的试验, 确定正己烷—醋酸乙酯—甲醇—水(1.2:0.8:1.5:0.5)为高速逆流色谱分离多花蒿中阿格拉宾的溶剂体系。

2.2.2 分离操作 将正己烷—醋酸乙酯—甲醇—水(1.2:0.8:1.5:0.5)溶剂系统加入分液漏斗中, 充分振摇后, 静置 24 h 分相, 以上相为固定相, 下相为流动相, 采取正相洗脱方式进行分离。取 Fr. 1 组分干膏 500 mg, 用溶剂体系的上相和下相各 10 mL 溶解样品, 备用; 将上、下相超声脱气 60 min, 先将固定相以 20 mL/min 灌满分离柱, 待有上相流出后, 停泵, 缓慢调节高速逆流色谱仪的转速至 850 r/min, 以 2 mL/min 泵入流动相, 设定检测波长为 254 nm, 分离温度为 25 $^{\circ}$ C, 待基线平稳后进样 20 mL, 采集数据, 根据色谱图手动收集各色谱峰组分, 分别进行浓缩、干燥。结果固定相保留率为 57.7%, 分离时间 2 h, 进样后 40 min 开始出峰, 共 3 个峰, 其中 1、2 号峰成分复杂, 有待于进一步分析研究; 得到 3 号峰的流份质量为 260 mg。高速逆流色谱图见图 2。

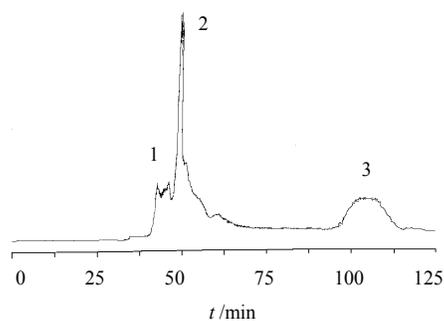


图 2 组分 Fr. 1 的高速逆流色谱图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of Fr. 1

2.3 结构鉴定

白色针状结晶(正己烷), mp 100~102 $^{\circ}$ C, ESI-MS m/z : 515.9 $[2M+Na]^+$, 269.7 $[M+Na]^+$,

247.1 $[M+H]^+$, 确定其相对分子质量为 246。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.35 (3H, s, H-14), 1.97 (3H, s, H-15), 2.18 (2H, H-2), 2.73 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-7), 2.95 (1H, d, $J=10$ Hz, H-5), 4.00 (1H, t, $J=10$ Hz, H-6), 5.58 (1H, s, H-3), 6.1 (1H, s, H-13), 5.42 (1H, s, H-13)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 18.2 (C-15), 21.4 (C-8), 22.7 (C-14), 33.4 (C-9), 39.7 (C-2), 51.0 (C-7), 52.8 (C-5), 62.6 (C-10), 72.3 (C-1), 82.96 (C-6), 118.2 (C-13), 124.8 (C-3), 139.1 (C-11), 140.4 (C-4), 170.4 (C-12)。以上波谱数据与文献报道^[7]一致, 确定其为阿格拉宾。

2.4 纯度分析

色谱条件: Angilent Zorbax C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水 - 乙腈 (38 : 62); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 进样量: 10 μL 。对 3 号峰阿格拉宾进行 HPLC 检测, 结果保留时间为 6.80 min。采用峰面积归一化法计算其质量分数为 99.56%。

3 讨论

溶剂体系选择是高速逆流色谱法分离的关键环节, 通常在上下两相分层时间小于 30 s, 待分离组分的分配系数在 0.6~1.5 时分离效果较好。本实验所确定溶剂体系分层时间为 15 s, 阿格拉宾上下两相的分配系数接近 1, 取得了较好的分离效果。

试验前期曾试图从多花蒿乙醇提取物中直接分离阿格拉宾, 但由于多花蒿化学成分复杂, 阿格拉

宾紫外吸收较弱, 难以实现分离, 后采用硅胶柱色谱结合高速逆流色谱分离, 可以有效地对阿格拉宾进行分离。

本实验建立了高速逆流色谱从多花蒿中分离、制备阿格拉宾的方法, 该方法具有操作简便快速、重复性好、样品制备量大且纯度高等特点, 可作为阿格拉宾化学对照品的制备方法。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 第 76 卷第 2 分册. 北京: 科学出版社, 1991: 164.
- [2] Appendino G, Gariboldi P, Menichini F. The stereochemistry of arglabin, a cytotoxic guaianolide from *Artemisia myriantha* [J]. *Fitoterapia*, 1991, 62: 275-276.
- [3] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1.
- [4] 陈小芬, 黄新异, 郑媛媛, 等. 高速逆流色谱分离纯化天然产物中生物碱类成分的应用进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 1026-1032.
- [5] 韩利文, 陈锡强, 袁延强, 等. 高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(4): 241-246.
- [6] Wan J Z, Chen X X, Qiu C M, *et al.* Isolation and purification of isoaloesin D and aloin from *Aloe vera* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 148-152.
- [7] Wong H F, Brown G D. Dimeric guaianolides and a fulvenoguaianolide from *Artemisia myriantha* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(4): 481-486.