

高效液相制备色谱制备土贝母中土贝母昔甲、乙、丙对照品的研究

金晓东¹, 张杰², 李佑², 顾正兵^{2*}

1. 中国人民解放军第一六一医院 药械科, 湖北 武汉 430010

2. 江苏永健医药科技有限公司, 江苏 泰州 225300

摘要: **目的** 研究高效液相制备色谱从土贝母中制备土贝母昔甲、乙、丙对照品。**方法** 采用大孔吸附树脂和制备液相色谱等多种方法进行分离纯化, 并根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构。**结果** 分离得到 3 个化合物, 分别鉴定为土贝母昔甲、土贝母昔乙、土贝母昔丙, 收率分别为 0.58%、0.13%、0.13%, HPLC 归一化法测得质量分数均大于 98%。**结论** 本方法上样量大, 重现性好, 收率高, 适合土贝母昔甲、乙、丙的大量制备生产。

关键词: 土贝母; 土贝母昔甲; 土贝母昔乙; 土贝母昔丙; 高效液相制备色谱

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)12-1361-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.12.007

Preparation of tubeimosides I, II, and III reference substances from *Bolbostemma paniculatum* by preparative HPLC

JIN Xiao-dong¹, ZHANG Jie², LI You², GU Zheng-bing²

1. Department of drug and equipment, 161st Hospital of PLA, Wuhan 430010, China

2. Jiangsu Yongjian Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Taizhou 225300, China

Abstract: Objective To study the preparation technology of tubeimosides I, II, and III reference substances from *Bolbostemma paniculatum* by preparative HPLC. **Methods** Chemical constituents were isolated and purified by macroporous adsorption resin and preparative high performance liquid chromatography. Their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectroscopic data. **Results** Three compounds were isolated and they were identified as tubeimosides I, II, and III. The yields were 0.58%, 0.13%, and 0.13%. And the purity detected by HPLC was above 98%. **Conclusion** The method has the advantages of large samples and good repeatability. It can be applied to large-scale preparation of tubeimosides I, II, and III.

Key words: *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet; tubeimoside I; tubeimoside II; tubeimoside III; preparative HPLC

土贝母为葫芦科植物土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet 的干燥块茎, 具有解毒、散结、消肿的功效, 主治乳痈、瘰疬、痰核^[1]。其主要成分为皂苷类^[2], 而皂苷主要为土贝母昔甲、乙和丙, 三者均有显著地抗炎、抗肿瘤作用, 土贝母昔乙和丙的抗肿瘤作用强于土贝母昔甲, 且毒性均低于土贝母昔甲, 是最有希望用于临床试验的活性成分^[3-5]。但是这 3 种皂苷结构相似, 分离难度大, 尤其是土贝母昔乙和丙。土贝母昔甲、乙和丙的结构见图 1。目前, 土贝母昔乙和丙作为分析使用的对照品难以买到, 从而限制了对其深层次的研究和广泛应用。本实验对土贝母中土贝母昔甲、乙和丙

的制备进行了系统研究, 为其进一步的研究提供物质基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Varian Inova 400 型核磁共振仪 (美国 Varian 公司); Q-Tof 质谱仪、Waters Delta Prep 4000 制备型高效液相色谱仪、Waters 1525 分析型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

1.2 材料

HSHF254 硅胶预制板 (烟台芝罘黄务硅胶开发试验厂); AB-8 吸附树脂 (天津正天成澄清技术有限公司); 液相用甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均

收稿日期: 2014-08-28

作者简介: 金晓东 (1973—), 男, 主管药师, 研究方向为临床药学。Tel: 13114397388 E-mail: 751943787@qq.com

*通信作者 顾正兵, 博士, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0523) 80183620 E-mail: zbg@youjing.com

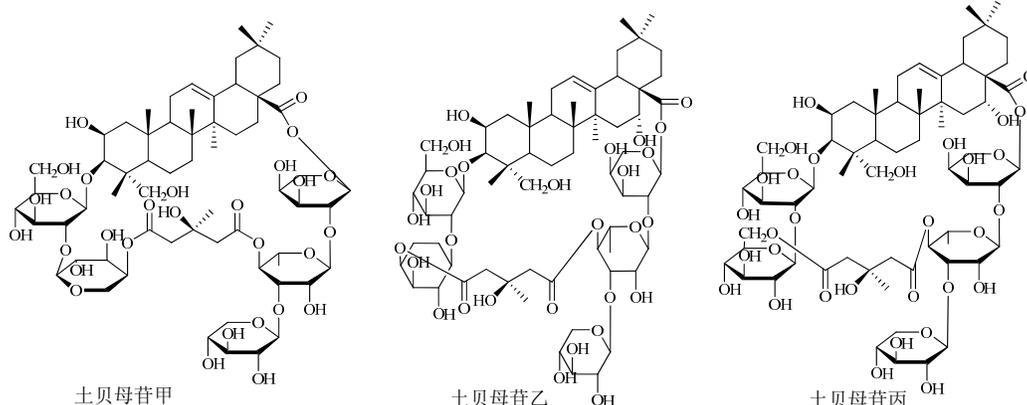


图 1 土贝母苷甲、乙和丙的结构

Fig. 1 Structures of tubeimosides I, II, and III

均为分析纯。土贝母药材来源于安徽亳州，经嘉兴学院医学院王峻副教授鉴定为土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet 的鳞茎。

2 提取分离

2.1 样品处理

取土贝母药材 10 kg 粉碎后，过 3 号筛，用甲醇回流提取 3 次，每次 8 倍量，提取 3 h。提取液减压浓缩得到其浸膏 1.21 kg。浸膏以水混悬，用石油醚 - 醋酸乙酯 (1:1) 萃取 2 次，取下层溶液，合并，经减压回收溶剂，得溶液体积 16 L，密度为 1.16 g/mL。溶液分两次过 AB-8 吸附树脂柱 (柱体积为 20 L)，每次上样体积为 8 L，依次用水洗脱 3 倍柱体积、20%乙醇洗脱 3 倍柱体积、40%乙醇洗脱 5 倍柱体积、60%乙醇洗脱 5 倍柱体积和 80%乙醇洗脱 3 倍柱体积，氯仿 - 甲醇 - 水 (65:35:10) 薄层色谱检测，得出 40%乙醇洗脱部分主要含皂苷类成分及 60%乙醇洗脱部分含有少量皂苷类成分，两者合并后经减压浓缩得到总皂苷部分 180 g，用 2 L 甲醇溶解，放冷，静置过夜，滤过，取沉淀即粗品 157 g，以待制备纯化。

2.2 对照品的制备

2.2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 制备柱 (250 mm×50 mm, 10 μm); 体积流量为 50 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长 214 nm; 进样量为 4 mL。

2.2.2 化合物 1 的制备 取上述粗品 20 g 用 20%乙腈溶液溶解，配制成 150 mg/mL 溶液，在上述色谱条件下流动相为乙腈 - 水 (36:64) 时进样得到其制备色谱图，见图 1。收集以下 3 个流分：流分 1 (收集时间为 111~115 min); 流分 2 (收集时间为 115.5~122min); 流分 3 (收集时间为 146~167 min)。

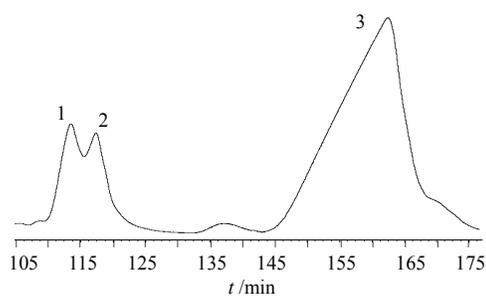


图 1 第 1 次制备色谱图

Fig. 1 First preparation chromatogram

由于化合物 1、2 两组分分离难度大，经第 1 次制备后纯度未达标，将其制备液减压浓缩，冷冻干燥得其粗品 2.46 g，用 18%乙腈溶液溶解，配制成 165 mg/mL 溶液，在上述色谱条件流动相为乙腈 - 水 (34:66) 下进行第 2 次制备。收集其制备液经减压浓缩后，冷冻干燥得其半成品 2.05 g，用 20%乙腈溶液溶解并配制成 125 mg/mL 溶液，利用上述色谱条件流动相为乙腈 - 水 (34:66) 时进行第 3 次制备，最终得化合物 1 纯品 1.73 g，其制备收率为 0.13%，第 2 次和第 3 次制备色谱图见图 2。

2.2.3 化合物 2 的制备 收集上述第 1 次制备的流分 2 制备液，减压浓缩后经冷冻干燥得到其半成品 1.98 g，用 20%乙腈溶液溶解并配制成 185 mg/mL 溶液，利用上述色谱条件流动相为乙腈 - 水 (34:66) 时进行第 2 次制备纯化，最终得化合物 2 纯品 1.66 g，其制备收率为 0.13%，制备色谱图见图 3。

2.2.4 化合物 3 的制备 化合物 3 峰分离度好，制备难度较小。经第 1 次制备收集的制备液经减压浓缩后，经冷冻干燥处理得到其半成品 9.19 g，用 20%乙腈溶液溶解，配制成 190 mg/mL 的溶液，利用上

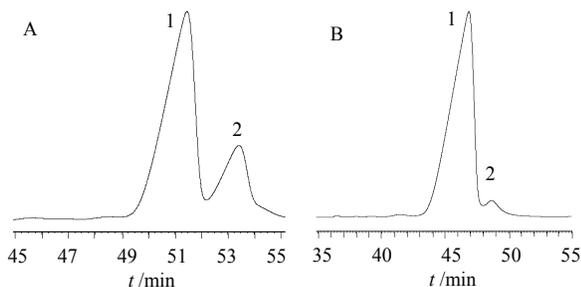


图 2 流分 1 第 2 次 (A) 和第 3 次 (B) 的制备色谱图
Fig. 2 Second (A) and third (B) preparation chromatogram of flow A

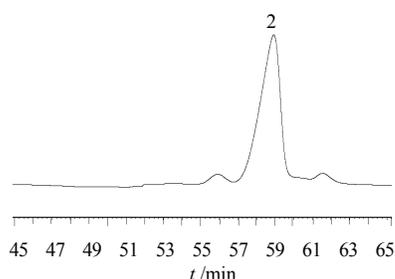


图 3 流分 2 的第 2 次制备色谱图
Fig. 3 Second preparation chromatogram of flow B

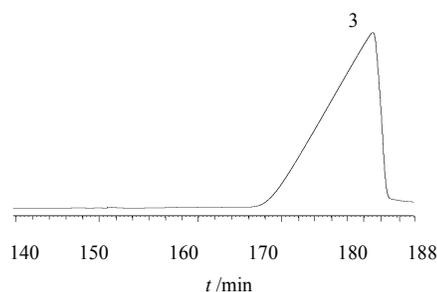


图 4 流分 3 的第 2 次制备纯化色谱图
Fig. 4 Second preparation chromatogram of flow C

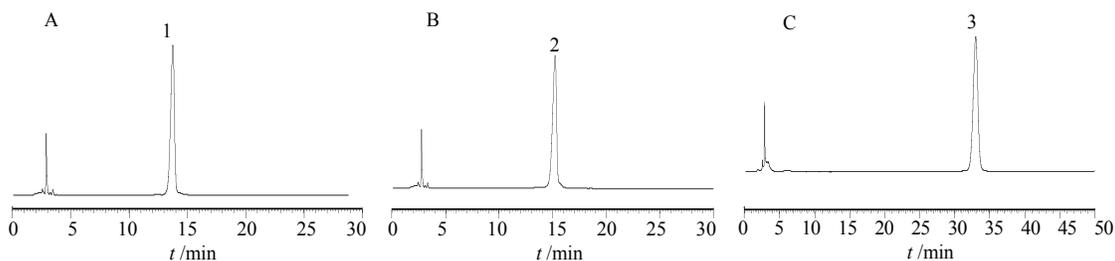


图 5 化合物 1、2、3 的色谱图
Fig. 5 Chromatograms of compounds 1 (A), 2 (B), and 3 (C)

3 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末。EI-MS m/z : 1 335 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{63}H_{98}O_{30}$ 。 ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 44.35 (C-1), 70.15 (C-2), 83.68 (C-3), 43.39 (C-4), 47.81 (C-5), 18.99 (C-6), 33.37 (C-7), 40.86 (C-8), 47.72 (C-9), 37.41 (C-10), 24.54 (C-11), 123.50 (C-12), 144.62 (C-13), 41.83 (C-14), 36.75 (C-15), 74.99 (C-16), 49.11 (C-17), 40.86 (C-18), 46.60 (C-19), 30.80 (C-20), 36.75 (C-21), 32.29 (C-22), 64.58 (C-23), 15.71 (C-24), 18.27 (C-25), 18.27 (C-26), 24.45 (C-27), 175.50 (C-28), 33.37 (C-29), 24.45 (C-30), 171.16 (C-1'), 47.32

述色谱条件流动相为乙腈 - 水 (34 : 66) 时进行第 2 次制备纯化, 最终得化合物 3 纯品 7.42 g, 其制备收率为 0.58%, 制备色谱图见图 4。

2.3 纯度考察

2.3.1 色谱条件 Kromasir C_{18} 分析柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 水 (31 : 69), 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 $^{\circ}C$; 检测波长 214 nm, 进样量为 10 μL 。

2.3.2 纯度测定 在上述色谱条件下, 采用面积归一化法测定其质量分数均大于 98%。其检测色谱图见图 5。

(C-2'), 70.15 (C-3'), 47.81 (C-4'), 171.32 (C-5'), 26.13 (C-6'), 103.23 (3-O-Glu-1), 80.00 (3-O-Glu-2), 78.87 (3-O-Glu-3), 71.45 (3-O-Glu-4), 78.14 (3-O-Glu-5), 62.49 (3-O-Glu-6), 104.63 (Ara-1), 73.73 (Ara-2), 72.54 (Ara-3), 72.36 (Ara-4), 64.58 (Ara-5), 94.15 (28-O-Ara-1), 74.99 (28-O-Ara-2), 71.45 (28-O-Ara-3), 67.36 (28-O-Ara-4), 64.41 (28-O-Ara-5), 100.65 (Rha-1), 72.54 (Rha-2), 78.51 (Rha-3), 73.27 (Rha-4), 68.08 (Rha-5), 18.27 (Rha-6), 106.38 (Xyl-1), 74.99 (Xyl-2), 78.14 (Xyl-3), 71.45 (Xyl-4), 67.36 (Xyl-5)。以上碳谱数据与文献报道^[5]的土贝母皂苷乙基本一致。结合以上分析故鉴定化合物 1

为土贝母昔乙。

化合物 2: 白色无定形粉末。EI-MS m/z : 1 365 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{64}H_{100}O_{31}$ 。 ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 44.19 (C-1), 70.06 (C-2), 83.11 (C-3), 42.49 (C-4), 47.82 (C-5), 18.70 (C-6), 33.81 (C-7), 40.38 (C-8), 47.82 (C-9), 37.08 (C-10), 24.06 (C-11), 123.24 (C-12), 144.64 (C-13), 42.49 (C-14), 36.84 (C-15), 73.48 (C-16), 49.31 (C-17), 40.92 (C-18), 46.69 (C-19), 30.77 (C-20), 36.04 (C-21), 32.37 (C-22), 64.60 (C-23), 15.24 (C-24), 17.49 (C-25), 17.76 (C-26), 27.35 (C-27), 175.60 (C-28), 33.12 (C-29), 24.41 (C-30), 171.54 (C-1'), 47.23 (C-2'), 70.06 (C-3'), 47.75 (C-4'), 171.54 (C-5'), 26.13 (C-6'), 103.18 (3-O-Glu-1), 84.07 (3-O-Glu-2), 77.39 (3-O-Glu-3), 70.99 (3-O-Glu-4), 78.18 (3-O-Glu-5), 62.53 (3-O-Glu-6), 105.59 (Glu-1), 77.39 (Glu-2), 77.80 (Glu-3), 70.99 (Glu-4), 75.73 (Glu-5), 64.60 (Glu-6), 94.54 (28-O-Ara-1), 76.99 (28-O-Ara-2), 74.86 (28-O-Ara-3), 69.53 (28-O-Ara-4), 67.38 (28-O-Ara-5), 102.27 (Rha-1), 72.49 (Rha-2), 78.34 (Rha-3), 73.48 (Rha-4), 68.01 (Rha-5), 18.21 (Rha-6), 106.25 (Xyl-1), 74.86 (Xyl-2), 78.18 (Xyl-3), 70.92 (Xyl-4), 67.38 (Xyl-5)。以上碳谱数据与文献报道^[5]的土贝母昔丙基本一致, 综合以上分析故鉴定化合物 2 为土贝母昔丙。

化合物 3: 白色无定形粉末。EI-MS m/z : 1 319 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{63}H_{98}O_{29}$ 。 ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 46.02 (C-1), 70.90 (C-2), 83.17 (C-3), 44.21 (C-4), 48.61 (C-5), 22.76 (C-6), 33.97 (C-7), 41.84 (C-8), 48.61 (C-9), 37.22 (C-10), 26.00 (C-11), 123.44 (C-12), 144.25 (C-13), 43.08 (C-14), 30.71 (C-15), 23.92 (C-16), 48.61 (C-17), 43.08 (C-18), 47.44 (C-19), 32.22 (C-20), 37.22 (C-21), 33.97 (C-22), 66.84 (C-23), 17.66 (C-24), 18.67 (C-25), 18.67 (C-26), 26.39 (C-27), 176.01 (C-28), 33.97 (C-29), 26.00 (C-30), 171.15 (C-1'), 47.72 (C-2'), 71.40 (C-3'), 48.61 (C-4'), 171.32 (C-5'), 26.39 (C-6'), 104.49 (3-O-Glu-1), 80.16 (3-O-Glu-2), 80.16 (3-O-Glu-3), 72.48 (3-O-Glu-4), 78.87 (3-O-Glu-5), 64.31 (3-O-Glu-6), 106.45 (Ara-1), 74.68 (Ara-2), 73.72 (Ara-3), 73.72 (Ara-4), 66.84

(Ara-5), 94.12 (28-O-Ara-1), 77.89 (28-O-Ara-2), 72.48 (28-O-Ara-3), 69.05 (28-O-Ara-4), 64.93 (28-O-Ara-5), 102.81 (Rha-1), 72.72 (Rha-2), 80.16 (Rha-3), 74.68 (Rha-4), 69.05 (Rha-5), 18.67 (Rha-6), 106.45 (Xyl-1), 77.89 (Xyl-2), 80.16 (Xyl-3), 72.48 (Xyl-4), 67.89 (Xyl-5)。以上碳谱数据与文献报道^[3]的土贝母昔甲数据基本一致, 结合以上数据分析故鉴定化合物 3 为土贝母昔甲。

4 讨论

本实验对土贝母昔甲、乙和丙的制备进行了系统研究, 制备分离得到的纯度好, 得率高。三者结构极其相似, 均为含有 5 个糖基的皂苷化合物, 且极性差异小, 常规柱色谱分离很难得到其纯品, 必须用制备液相色谱进行分离纯化。土贝母中土贝母昔甲量最高, 土贝母昔乙和丙的量相对很低, 制备工作量大, 分离难度高。皂苷类成分不易结晶, 需不断调整流动相, 经反复制备才能得到纯品。在确定流动相系统时, 曾比较过甲醇-水和乙腈-水系统, 由于检测波长小, 甲醇在此波长附近末端吸收比较大, 基线漂移不平稳, 影响分离效果, 最终确定选用乙腈-水系统进行洗脱。在提取分离时, 合并得到总皂苷部分后, 曾尝试少量干法拌样过硅胶柱纯化, 但效果不佳且工作量大、效率低; 经摸索后利用各类皂苷成分溶解度差异, 选择在甲醇中结晶析出而进一步纯化。

《中国药典》2010 年版仅以土贝母昔甲为质控指标, 不能全面评价药材质量, 本实验制备出土贝母昔甲、乙和丙的纯品, 且收率较高, 为以后土贝母药材的深入研究提供物质基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 18-19.
- [2] 马挺军, 李 军, 屠鹏飞, 等. 土贝母中一个新的三萜皂苷 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 327-329
- [3] 孔凡华, 朱大元, 徐任生, 等. 土贝母化学成分的研究(III) 土贝母贰甲的结构 [J]. 化学学报, 1988, 46(8): 772-778.
- [4] 孔凡华, 朱大元, 徐任生, 等. 土贝母化学成分的研究(IV)土贝母贰乙、丙、丁的结构 [J]. 化学学报, 1988, 46(4): 409-411.
- [5] Kasai R, Miyakoshi M, Nie R L, et al. Saponins from *Bolbostemma paniculatum*: cyclic bisdesmosides, tubeimosides II and III [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(5): 1439-1446.