

固相萃取分离纯化杜仲中环烯醚萜类化合物

曹 慧¹, 陈晓青²

(1. 南通大学化学化工学院, 江苏 南通 226000; 2. 中南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410083)

杜仲是我国传统的名贵药材, 有补肝降压、增强免疫功能及抗癌、抗疲劳等多种药理作用^[1,2]。药理研究表明, 杜仲中的京尼平苷、京尼平苷酸等环烯醚萜类化合物是主要的降血压活性成分, 而其中的桃叶珊瑚苷却具有升高血压的作用^[3,4]。因此, 将杜仲中京尼平苷、京尼平苷酸与桃叶珊瑚苷分离十分有应用价值。固相萃取技术是一个包含液相和固相的物理过程, 在药物、环境、农药等的分析中常作为一种预处理手段, 具有分离纯化效率高、操作简便、溶剂耗量少等优点^[5]。本实验采用以未键合的硅胶为填料进行固相萃取, 以不同极性的溶剂萃取分离纯化杜仲中的环烯醚萜类化合物, 所得产品质量分数高, 易实现工业化生产。

1 仪器、试剂与材料

日本岛津 2010A 高效液相色谱仪; SPD—M10A VP 检测器; 甲醇为色谱纯; 高效液相色谱所用水为石英亚沸水; 其他试剂均为分析纯; 京尼平苷对照品(质量分数 $\geq 98\%$)、京尼平苷酸对照品(质量分数 $\geq 98\%$), 日本和光纯药工业株式会社提供; 硅胶(100~140 目), 青岛海洋化工厂; 杜仲药材购于湖南张家界, 经笔者鉴定为杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮。

2 方法与结果

2.1 京尼平苷和京尼平苷酸的 HPLC 测定^[6,7]

2.1.1 色谱条件: VP-ODS 反相 C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm), 预柱(10 mm \times 4.6 mm), 流动相甲醇-水-冰醋酸(20:79.5:0.5), 体积流量 1.0 mL/min, 测定波长 237 nm, 进样量 10 μ L, 柱温 25 $^{\circ}$ C。

2.1.2 标准曲线的制备: 以对照品溶液质量浓度(X)对色谱峰面积(Y)进行线性回归。结果表明, 京尼平苷在 5.1~20.4 μ g/mL, 京尼平苷酸在 4.0~16.0 μ g/mL 与峰面积呈良好的线性关系。线性回归方程分别为京尼平苷: $Y=33\ 314.5+13\ 026.1X$, $r=0.999\ 5$; 京尼平苷酸 $Y=23\ 114.0+27\ 273.8$

X , $r=0.999\ 9$ 。

2.1.3 测定: 用峰高增加法定性, 标准曲线法定量。

2.2 硅胶的预处理: 先用甲醇浸泡 12 h, 甲醇具有净化和活化硅胶的双重作用。然后用甲醇淋洗以除去硅胶中的杂质和惰性溶剂, 再用大量蒸馏水淋洗, 以除去硅胶中残留的甲醇, 最后把硅胶置于干燥炉里, 于 120 $^{\circ}$ C 干燥活化 24 h。

2.3 有效成分的分离: 精确称取干燥杜仲粗粉 8 g 于索氏提取器中, 加入 80 mL 60% 乙醇, 在 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中提取 2 h, 提取次数为 3 次, 滤过, 合并滤液, 减压蒸馏, 浓缩至约 10 mL, 20 mL 石油醚萃取 3 次, 石油醚萃取液用 20 mL 醋酸乙酯萃取 3 次, 醋酸乙酯萃取液再用 20 mL 正丁醇萃取 3 次。合并正丁醇萃取液, 减压蒸馏, 回收正丁醇, 并蒸至近干, 所得膏状物用 40 mL 甲醇溶解完全后, 转移入 200 mL 烧杯中, 加入 24 g 处理后的硅胶, 在 60 $^{\circ}$ C 水浴中加热, 挥发除去甲醇, 加热时不停搅拌(防止受热不均, 硅胶溅出)。将上述硅胶于法装入底部已铺玻璃纤维(防止硅胶随溶液流出)的 500 mL 分液漏斗中, 用不同配比的氯仿-甲醇溶液作萃取剂, 高效液相色谱法跟踪指标成分。先加入萃取液(14:1)80 mL, 充分振荡, 放出萃取液, 重复操作 2 次。再依次加入萃取液(11:1, 9:1, 6:1)重复上述操作。合并萃取液(11:1), 减压蒸馏, 得京尼平苷粗品, 冷冻干燥, HPLC 测定质量分数为 67.86%。合并萃取液(6:1), 减压蒸馏, 得京尼平苷酸粗品, 冷冻干燥, HPLC 测定质量分数为 63.73%。

2.4 有效成分的纯化: 将京尼平苷粗品用 20 mL 甲醇溶解完全后, 转移入 200 mL 烧杯中, 加入 30 g 处理后的硅胶, 其余操作与 2.3 项下方法相同, 先用氯仿-甲醇(14:1)萃取液 80 mL 萃取, 再用萃取液(11:1)80 mL 萃取, 重复操作 2 次, 合并萃取液(11:1), 减压蒸馏蒸至近干。用 10 mL 甲醇溶解完全后, 重结晶, 得京尼平苷精品, HPLC 测其质量分

收稿日期: 2006-02-06

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(90209047); 湖南省科研计划项目(02JZY3029); 湖南省计委科研项目(2002-772)

作者简介: 曹 慧(1978-), 女, 江苏东台人, 硕士, 助教, 主要从事天然药物分离分析研究, 在国内核心期刊和 SCI/EI 核心期刊发表论文 10 多篇。

数为 93.09%。

将京尼平苷酸粗品用 20 mL 甲醇溶解完全后, 转移入 200 mL 烧杯中, 加入 30 g 处理后的硅胶, 其余操作与 2.3 项中相同, 先采用氯仿-甲醇(9:1)萃取液 80 mL 萃取, 再用萃取液(6:1)80 mL 萃取, 重复操作 2 次, 合并萃取液(6:1), 减压蒸馏蒸至近干。用 10 mL 甲醇溶解完全后, 重结晶, 得京尼平苷酸精品, HPLC 测定其质量分数为 95.74%。

2.5 吸附剂用量的选择: 在吸附过程中, 吸附剂的用量是一个非常重要的参数。吸附剂用量直接影响到吸附是否完全、吸附剂的利用率和分离的效果。本实验考察了硅胶用量与京尼平苷、京尼平苷酸收率的关系, 见表 1。

表 1 收率与硅胶用量的关系

Table 1 Relationship between yield and silica gel use level

原料/g	硅胶量/g	京尼平苷收率/%	京尼平苷酸收率/%
19.88	40.15	52.11	50.03
20.00	50.04	58.05	55.87
20.02	60.11	69.45	67.52

可知, 在吸附剂用量与原料比达到 3:1 时, 京尼平苷和京尼平苷酸的收率均较高, 分别达到了 69.45% 和 67.52%。继续增大吸附剂用量, 收率没有显著提高, 且增加了成本; 较低的吸附剂用量又会导致收率的降低, 所以选择吸附剂用量与原料质量的比例为 3:1。

2.6 萃取液的选择: 采用固相萃取小柱进行预试验选择萃取剂时, 考虑到实验的简便, 采用氯仿-甲醇溶液。因氯仿和甲醇的配比不同, 混合溶液的极性呈梯度变化, 分别萃取出不同极性的物质。不同配比氯仿-甲醇溶液对环烯醚萜类化合物进行萃取, 萃取液中甲醇体积分数对成分萃取率的曲线关系见图 1。

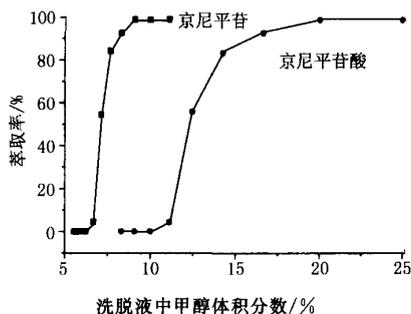


图 1 不同配比的萃取液与萃取率的关系

Fig. 1 Relationship between extract solution in various ratios and extracting rates

可知, 当萃取液中甲醇体积分数为 6.67%, 即氯仿-甲醇(14:1)时, 京尼平苷开始被萃取出, 但量较少, 至甲醇体积分数为 9.09%, 即氯仿-甲醇

(10:1)时, 京尼平苷全部被萃取出。当萃取液中甲醇体积分数为 11.11%, 即氯仿-甲醇(9:1)时, 京尼平苷酸开始被萃取出, 至甲醇体积分数为 20.00%, 即氯仿-甲醇(5:1)时, 京尼平苷酸全部被萃取出。考虑到溶剂的消耗和萃取组分的纯度, 京尼平苷粗品收集配比为 13:1、12:1、11:1 的萃取液, 京尼平苷酸粗品收集配比为 8:1、7:1、6:1 的萃取液, 萃取率分别达到 92.51% 和 92.48%。

2.7 回收试验: 精确称取 40 g 杜仲样品, 提取, 减压蒸馏, 浓缩提取液, 定容至 50 mL。移取 10 mL, 稀释至适当质量浓度, 测定提取液中京尼平苷和京尼平苷酸的量。其余取 4 份 10 mL 浓缩液, 制备得京尼平苷和京尼平苷酸精品, 测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果

Table 2 Results of recovery yield test

化合物	原量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	RSD/%
京尼平苷	5.04	3.415	67.76	2.20
京尼平苷酸	6.24	3.985	63.86	2.38

3 讨论

回收试验中有一部分京尼平苷和京尼平苷酸在制备过程中损失了, 其原因可能是硅胶上的不可逆吸附; 有机溶剂萃取的不完全; 重结晶过程中的损失。采用的固相萃取分离纯化技术与中药中有效成分的其他分离制备方法如制备色谱法、柱色谱法相比, 具有对仪器要求不高、成本低、产品纯度高的优点。从杜仲中通过优化的提取、分离和纯化方法获得京尼平苷和京尼平苷酸纯品, 不仅为进一步的药剂药效研究奠定了基础, 而且为中试规模的生产提供了技术支持。

References:

- [1] Yang J S, Zhang Y M. Recent situation and prospects of the study of *Eucommia ulmoides* [J]. *J Nat Resour* (自然资源学报), 1997, 12(1):60-67.
- [2] Zhao J T, Zhang C. Research and application of chemical ingredients in different partial of *Duzhong* [J]. *J Prac Med Tech* (实用医技杂志), 2003, 10(9):1025-1026.
- [3] Zhang Y C, Kang C Z, Zhang Y M. Experimental study on hypotensive effect of compound *folium Eucommiae* mixture on boby [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(6):418-421.
- [4] Takeshi D, Sansei N, Yoshihisa N. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and *Siberian ginseng* [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2001, 22(12):1057-1070.
- [5] Tang D Y, Hu Q F, Yang G Y. HPLC Determination of mannitol in *Cordyceps sinensis* with solid-phase extraction [J]. *Phys Test Chem Anal Chem Anal* (理化检验: 化学分册), 2003, 39(10): 585-586.
- [6] Dong J E, Ma B L, Jia E H. Study on measuring method of aucubin in *Eucommia ulmoides* leaf [J]. *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), 2001, 16(1):53-55.
- [7] Qi X Y, Chen W J, Zhang S H. A RP-HPLC method for the determination of geniposide, geniposidic acid and chlorogenic acid in *Eucommia ulmoides* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(1): 22-24.