3.1.8 检测波长的选择: 采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察, 记录并比较不同波长的色谱图, 根据分析物的紫外吸收特征, 发现在 240 nm 波长处, 被测物质均有较好的吸收, 故选择 240 nm 为检测波长。

3.2 共有峰面积与总峰面积比值的计算: 对各样品的峰面积进行统计, 计算各样品指纹图谱中的 9 个共有峰的总面积各占总峰面积的比值。结果显示所有样品的共有峰总面积占总峰面积的比值均大于 90%, 满足指纹图谱的技术要求。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.

[2] 贾德贤, 闫兴丽, 张建军, 等. 山茱萸化学及药理研究进展[J]. 中医药信息杂志, 2002, 9(7): 83-84.

[3] 苗明三, 杨 云. 山茱萸多糖抗氧化作用研究[J]. 河南中医, 2002, 22(2): 12-13.

[4] 李建民, 周 勇, 张 丽, 等. 山茱萸总苷对人脐静脉内皮细胞表达 α4β7 整合素影响[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21(5): 298-300.

[5] 周京华, 李春生, 李电东. 山茱萸有效化学成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 808-811.

[6] 杨 晋, 陈随清, 冀春茹, 等. 山茱萸化学成分的分离鉴定[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1380-1782.

制备高效液相色谱从竹根中制备苜蓿素的研究

张 锐[1], 刘建群[1], 刘丽艳[2], 徐 彭[1*]

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西省肿瘤医院, 江西 南昌 330000)

摘 要: 目的 研究从竹根中制备苜蓿素对照品的方法。方法 结合硅胶柱色谱、制备 HPLC 法对竹根醋酸乙酯部位进行分离纯化, 通过熔点及 UV、IR 波谱学方法对其分离产物进行结构鉴定。结果 所得苜蓿素用归一化法定量, 质量分数大于 98%。结论 本法简便, 制备成本低, 所得苜蓿素可作为中药定性、定量分析使用的对照品。

关键词: 竹根; 苜蓿素; 对照品; 制备

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-1985-03

Preparation of tricin from *Bambusa textilis* by preparative HPLC

ZHANG Rui[1], LIU Jian-qun[1], LIU Li-yan[2], XUE Peng[1]

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang 330000, China)

Abstract: Objective To establish a separation method of tricin reference substance from *Bambusa textilis*. **Methods** After extracted with ethyl acetate, the extract of *B. textilis* was isolated and purified by silica gel column chromatography and preparative HPLC. Tricins were identified by melting point, UV, and IR spectroscopy. **Results** The content of tricin was over 98% by normalization method of HPLC. **Conclusion** The developed method is simple with lower cost, by which tricin can be used as reference substances for the qualitative and quantitative analyses of Chinese herbal medicine.

Key words: *Bambusa textilis* Mc Clure; tricin; reference substance; preparation

苜蓿素属黄酮类化合物, 广泛存在于禾本科植物中, 其中在竹根中的量较高。本研究所用制备苜蓿素的原料为禾本科竹亚科箬竹属植物青皮竹 *Bambusa textilis* Mc Clure 的干燥根。本研究前期的药理实验表明, 青皮竹的竹根具有显著的抗过敏作用, 并从抗过敏有效部位中分离鉴定了 15 个化合物[1-2], 通过致敏豚鼠的离体肠平滑肌过敏性收缩实验, 发现苜蓿素具有显著的抗过敏活性。此外苜蓿素还具有显著的抗癌活性[3]。目前市场上无苜蓿素对照品出售, 限制了对苜蓿素进一步的开发与研究。本实验结合硅胶柱色谱分离和制备 HPLC 法对竹根醋酸乙酯部位进行分离纯化, 制备苜蓿素对照品, 对进一步揭示竹根药效的物质基础、控制药材质量和开发新的天然药物具有十分重要的意义。

收稿日期: 2010-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660220)

作者简介: 张 锐(1976—), 男, 江西进贤人, 副研究员, 硕士, 研究方向为中药化学成分及质量评价。

Tel: (0791)7118657 E-mail: work037@sohu.com

* 通讯作者 徐 彭 Tel: (0791)6811604 E-mail: xp0420@163.com

1 仪器与药品

美国 Waters 高效液相色谱仪(2695 高效液相色谱仪, 2996 DAD 二极管阵列检测器, 串联Alltech ELSD 2000 型 蒸发光散射检测器); 美国Agilent 1100 制备型高效液相色谱仪; 美国 Labconco 公司 FREEZONE 冷冻干燥机; R—52AA 旋转蒸发仪; XT4—100x 显微熔点测定仪; 美国 Bruker 公司 Vertex 70 FT-IR 红外光谱仪, Bruker AV—400 型核磁共振仪。

青皮竹竹根采自江西中医学院湾里校区周围, 经江西中医学院中药鉴定教研室褚小兰教授鉴定为禾本科箬竹属植物青皮竹 *B. textilis* Mc Clure 的干燥根; 苜蓿素对照品(本实验室提取、精制, NMR 光谱鉴定, 经归一化法测定质量分数大于 99.3%); 甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Tedia 试剂公司), 其他试剂均为分析纯; CMC-Na、薄层色谱硅胶、柱色谱硅胶(100~ 200 目, 青岛海洋化工分厂)。

2 方法与结果

2.1 浸膏的提取: 称取竹根粗粉(60 目) 1.3 kg, 6 倍 80% 乙醇浸泡过夜, 回流提取 3 次, 第 1 次 3 h, 第 2 次 2 h, 第 3 次 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 浸膏用水分散, 加等量醋酸乙酯萃取 6 次, 减压浓缩至无醋酸乙酯味, 即得竹根浸膏(42.2 g)。

2.2 化合物的分离

2.2.1 硅胶富集: 硅胶(100~ 200 目) 400 g 干法装柱, 取醋酸乙酯萃取所得浸膏, 加等量硅胶拌样, 上样后柱色谱分离, 用氯仿-甲醇溶剂系统以50∶1、20∶1、15∶1、10∶1、5∶1 梯度洗脱, 每个梯度冲洗 5 倍柱体积(约 2 L), 收集氯仿-甲醇(15∶1)馏分, 每 100 mL 作为一个馏分, 根据薄层色谱检查, 合并相同的斑点部分, 并用 50% 乙醇重结晶 1 次, 得苜蓿素的粗品 0.45 g。

2.2.2 苜蓿素供试品的制备: 苜蓿素粗品部分通过制备型高效液相色谱分离纯化。制备色谱条件: Waters SymmetryPrep™ C_{18} 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 7 μm); 流动相: 甲醇-水(40∶60); 柱温: 30 ℃; 体积流量: 3 mL/min; 检测波长: 349 nm; 进样量: 100 μL; 色谱图见图 1。馏分收集器自动收集流出液, 收集时间为 27~ 29 min 的馏分, 冷冻干燥后得黄色粉末约 0.3 g。

2.3 定性鉴定和定量测定

2.3.1 薄层色谱法: 取适量制备所得苜蓿素供试品点样于硅胶 G 板上, 以苜蓿素对照品溶液为对照, 分别以氯仿-甲醇(10∶1)及石油醚-醋酸乙酯(1∶1)为展开剂, 展开, 晾干, 以 10% 三氯化铝乙醇溶液为显色剂, 105 ℃加热 5 min, 紫外灯下(365 nm)观察, 结果在供试品色谱中, 仅在与对照品色谱相应的位置上显一个黄绿色斑点, Rf 值分别为 0.46、0.30。另将制备所得苜蓿素供试品点样于聚酰胺薄层板上, 以苜蓿素对照品溶液为对照, 90% 乙醇为展开剂, 展开, 晾干, 以 10% 三氯化铝乙醇溶液为显色剂, 105 ℃加热 5 min, 紫外灯下(365 nm)观察, 结果在供试品色谱中, 仅在与对照品色谱相应的位置上显一个黄绿色斑点, Rf 值为 0.73。

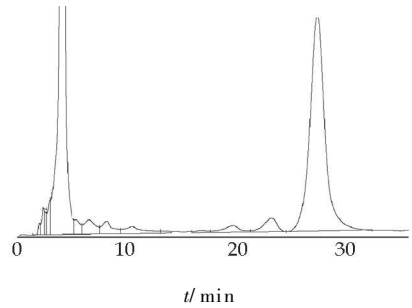

图 1 苜蓿素粗品的制备高效液相色谱图

Fig 1 Preparative HPLC chromatogram of crude tricin

2.3.2 高效液相色谱法: 色谱条件为 Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(40∶60); 体积流量: 0.8 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 ℃; DAD 检测波长 200~ 400 nm; ELSD 参数设置为漂移管温度 93.0 ℃, 气体体积流量为 2.6 L/min; Gain: 1; Impactor: off。不同色谱条件下, 苜蓿素供试品均为一个主峰, 改变流动相分析未见异常峰。DAD 峰质量分数检查, 峰质量分数角小于阈值角, 且均小于 1, 证明色谱峰为纯峰。按面积归一化法计算, DAD 检测(349 nm)与 ELSD 检测两者的质量分数均达 98% 以上(图 2), 证明质量分数已达到对照品的要求。

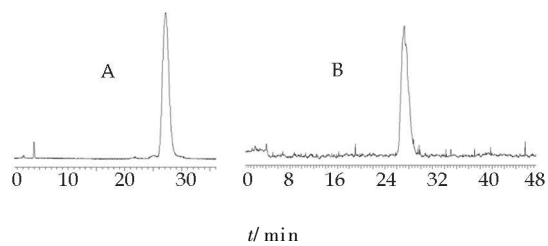

图 2 苜蓿素供试品的高效液相-二极管阵列(A)和蒸发光散射(B)色谱图

Fig 2 HPLC-DAD (A) and HPLC-ELSD (B) Chromatogram of tricin products

2.4 结构确定: 分别取苜蓿素供试品与对照品分别测定熔点、紫外光谱、红外光谱。结果苜蓿素供试品的熔点为 289~ 290 ℃; UV λ_{max}^{MeOH} nm: 270、349; IR ν_{max}^{KBr}

cm^{-1}: 3 347、2 946、2 848、1 655、1 614、1 507、1 466、1 360、1 264、1 170、1 120、836。^{1}H-NMR (DMSO) δ: 7.33 (2H, s, H-2′, H-6′), 6.98 (1H, s, H-3), 6.59 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.23 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 3.89 (6H, s, -OCH_3 × 2); ^{13}C-NMR (DMSO) δ: 181.7 (C-4), 163.8 (C-2), 163.6 (C-7), 161.0 (C-9), 157.3 (C-5), 148.0 (C-3′, C-5′), 139.7 (C-4′), 120.4 (C-1′), 104.1 (C-2′, C-6′), 104.0 (C-10), 103.6 (C-3), 98.6 (C-6), 94.2 (C-8), 56.2 (-OCH_3 × 2)。以上数据与对照品所测得数据相同, 因此确定所制备的供试品为苜蓿素。

3 讨论

苜蓿素为多种禾本科植物的共有成分, 在竹根量较高, 性质稳定, 用上述制备方法进行提取、分离、纯化, 操作方便, 重现性好, 符合对照品的质量分数要求, 因而可作为对照品使用, 供竹根药材及禾本科植物的定性、定量分析; 也可为从其他原料中提取苜蓿素对照品提供工艺参考。

苜蓿素为黄酮类化合物, 为了在增大提取效率的同时尽量减少其他组分的引入, 通过 TLC、HPLC 法对比水、不同体积分数的乙醇提取液的色谱峰, 并对比石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取物的色谱峰, 结果用 80% 乙醇提取后用醋酸乙酯萃取的选择性较好, 进而对提取时间和提取次数进行了优化, 确定了本实验的条件, 使苜蓿素的制备收率提高。

提取后的样品通过硅胶柱色谱处理, 可以去除样品中大量的杂质, 并通过 50% 乙醇溶液重结晶, 此时可以得到粗品, 质量分数可达 91%, 但仍含有多种杂质, 需进一步纯化。曾将硅胶柱色谱后得到的苜蓿素粗品进行制备薄层色谱制备, 得到苜蓿素结晶, 但质量分数仍达不到对照品的要求。故选择制备高效液相色谱分离纯化, 既减少了样品的损耗, 又提高了制备的效率。

本研究采用 HPLC/DAD/ELSD 串联检测制备所得供试品的质量分数, 利用 DAD 与 ELSD 性能上的互补, 一次进样即可得到样品紫外光谱图、峰质量分数等信息。

参考文献:

[1] 吴燕红, 张 锐, 王少军, 等. 竹根化学成分的研究(Ⅰ) [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2404-2405.

[2] 张 锐, 徐 彭, 吴艳红. 竹根的化学成分研究(Ⅱ) [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1856-1858.

[3] Verschoyle R D, Greaves P, Cai H, *et al*. Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricin, a naturally occurring flavone [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57(1): 1-6.

HPLC 法测定甘遂及其醋制品中 3 种二萜类成分

张 丽, 李征军, 束晓云, 唐于平, 丁安伟*, 段金廒

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘 要: 目的 测定甘遂与醋甘遂饮片中 3 种二萜类成分。方法 采用 HPLC 法, 分别在 235 nm 和 268 nm 测定了甘遂和醋甘遂饮片中甘遂大戟萜酯 C、3-*O*-苯甲酰基-20-去氧巨大戟二萜醇和 3-*O*-(2′E, 4′Z-癸二烯酰基)-20-*O*-乙酰基巨大戟二萜醇。结果 甘遂大戟萜酯 C、3-*O*-苯甲酰基-20-去氧巨大戟二萜醇和 3-*O*-(2′E, 4′Z-癸二烯酰基)-20-*O*-乙酰基巨大戟二萜醇的进样量分别在 1.636~0.052 μg (r = 0.9998), 1.458~0.046 μg (r = 0.9996) 和 1.782~0.056 μg (r = 0.9996) 呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.96% (RSD = 2.71%)、99.21% (RSD = 2.88%)、96.44% (RSD = 2.78%)。结论 该法简便、快速、准确, 重现性好, 可用于甘遂与醋甘遂饮片的质量控制。

关键词: 甘遂; 醋甘遂; 甘遂大戟萜酯 C; 3-*O*-苯甲酰基-20-去氧巨大戟二萜醇; 3-*O*-(2′E, 4′Z-癸二烯酰基)-20-*O*-乙酰基巨大戟二萜醇

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)12-1987-04

甘遂为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根[1], 别名主田、猫儿眼、黄甘遂、京甘遂、苦泽、甘泽、白泽、肿手花根、重泽、鬼丑、陵泽、甘藁、陵藁、化骨丹、萱根子、

收稿日期: 2010-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672678, 30973940); 国家教育部"新世纪优秀人才支持计划"(NCET-09-0163); 江苏省中医药管理局课题(H05075); 江苏高等学校优秀科技创新团队支持计划(2009 年度)

作者简介: 张 丽(1971—), 女, 辽宁大连人, 博士, 主要研究方向为中药炮制与质量控制。 E-mail: zhangliguanxiong@163.com

* 通讯作者 丁安伟 E-mail: awding105@163.com