

HPLC 法制备巫山淫羊藿中的淫羊藿属苷 A 和朝藿定 C 对照品

谢娟平¹, 王浩东¹, 孙文基²

1. 安康学院 化学化工系, 陕西 安康 725000

2. 陕西省生物医药重点实验室, 陕西 西安 710069

摘要: 目的 研究制备型高效液相分离纯化巫山淫羊藿中淫羊藿属苷 A 和朝藿定 C 的条件。方法 巫山淫羊藿粗提物经大孔吸附树脂和硅胶柱色谱得朝藿定 C 与淫羊藿属苷 A 的混合物, 进行 HPLC 制备色谱分离, 以乙腈-水 (24:76) 为流动相, 收集相应流分浓缩至干, 甲醇溶解, 滤过, 滤液蒸干即得。结果 该法所得产品极易结晶, 用面积归一化法定量, 质量分数大于 98.0%, 经紫外、红外、核磁共振确定结构, 与文献数据基本一致。结论 本法简便快捷, 可获得高纯度的淫羊藿属苷 A 和朝藿定 C, 解决在常规柱色谱法制备朝藿定 C 对照品中存在的不易结晶和纯度不够的问题, 产品可用作分析用对照品。

关键词: 巫山淫羊藿; 朝藿定 C; 淫羊藿属苷 A; 制备高效液相色谱; 对照品

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0094-03

Preparation of epimedoside A and epimedin C reference substance from *Epimedium wushanense* by HPLC

XIE Juan-ping¹, WANG Hao-dong¹, SUN Wen-ji²

1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Ankang University, Ankang 725000, China

2. Shaanxi Province Key Laboratory of Biology and Medicine, Xi'an 710069, China

Key words: *Epimedium wushanense* T. S. Ying; epimedin C; epimedoside A; preparative high performance liquid chromatography (pre-HPLC); reference substance

巫山淫羊藿为小檗科淫羊藿属植物巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying 的干燥叶^[1-2]。研究表明, 巫山淫羊藿中的主要活性成分是黄酮类化合物朝藿定 C 而非淫羊藿苷^[3-6], 因此, 《中国药典》2010 年版将其单列。在对照品分离中, 常见的是经典柱色谱^[7], 但是在朝藿定 C 对照品分离中, 由于朝藿定 C 和淫羊藿属苷 A 两者结构相似、极性相近, 即使采用经典硅胶柱色谱联合凝胶分离, 经重结晶后, 在薄层色谱检查中, 仍然可以看到淫羊藿属苷 A 的微小斑点, 柱色谱很难得到高纯度的朝藿定 C, 朝藿定 C 在结晶时也很难结晶。为了解决这一问题, 提供符合标准的朝藿定 C 对照品, 本实验采用制备型高效液相色谱 (preparative high performance liquid chromatography, pre-HPLC)^[8-9]从巫山淫羊藿中分离制备得到淫羊藿属苷 A 和朝藿定 C 单体。方法简单、可行, 产品可用作样品分析的对照品。

1 仪器与材料

Amersham 制备型液相色谱仪 (瑞典 Amersham 公司), 包括 UV—900 紫外检测器、3 mL 进样环、Frac—900 型流分收集器、P—900 泵; Waters Alliance 2695-2487 分析型液相色谱仪 (Waters 公司), 包括 Waters2695 分离单元、Waters 2487 双波长检测器、Empower 工作站; Nicolet IR100 型红外仪 (Thermo Nicolet 公司), Bruker Avance DRX—500 型核磁共振仪 (瑞士 Bruker)。乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为双蒸水, D-101 型大孔吸附树脂 (西安蓝深公司); 柱色谱用硅胶 G (100~200 目, 青岛海洋化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

取巫山淫羊藿 1 kg, 切碎, 8 倍量 75%乙醇渗漉至无色, 收集渗漉液, 减压浓缩, 回收乙醇, 得

收稿日期: 2011-05-08

基金项目: 《中国药典》2010 版修订项目 (国家药典中发 [2008] 99 号); 陕西省教育厅基金项目 (09JK319, 2010JS098); 安康学院科研资助项目 (AYQDZR200801)

作者简介: 谢娟平 (1972—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为天然产物分离分析与开发。Tel: 15877352906 E-mail: xjp_731205@163.com

浸膏 80 g。取上述浸膏,用 500 mL 水溶解,离心,上清液上 D-101 型大孔吸附树脂,吸附过夜,用蒸馏水洗脱杂质,用乙醇梯度洗脱,取 50%乙醇洗脱部分,回收乙醇,浓缩,用硅胶拌样,上硅胶 G 柱,用氯仿-甲醇-水(3:1:0.1)洗脱,配合同体系溶剂薄层检测,得单点部分 A 和混合部分 B。单点部分 A 洗脱液浓缩,得黄色固体粉末 30 mg,即化合物 1。混合部分 B 洗脱液,减压浓缩至干,得淡黄色粉末约 12 g,用甲醇溶解,作为制备色谱用样品溶液。

2.2 制备色谱分离

2.2.1 制备色谱条件 色谱柱为 Spherigel 100A C₁₈ 柱(300 mm×15.0 mm, 5 μm, 大连中汇达科学仪器有限公司),流动相为乙腈-水(24:76),体积流量 3 mL/min,检测波长 270 nm,柱温为室温。进样量 2.5 mL,流份收集器步速为 15 mL/管。

2.2.2 色谱制备 将所得样品溶液每次进样 2.5 mL,流分收集为 15 mL/管,根据紫外检测,收集相应峰对应的试管流出液,得到样品 1 和样品 2 两部分。减压回收溶剂,甲醇溶解,滤过,滤液减压回收后得到制备目标产物化合物 1 和化合物 2,制备色谱图见图 1-I(流动相为 24%乙腈,体积流量 2.5 mL/min),同时进行薄层色谱检测,展开剂为氯仿-甲醇-水(3:1:0.1),薄层色谱图均为单点。

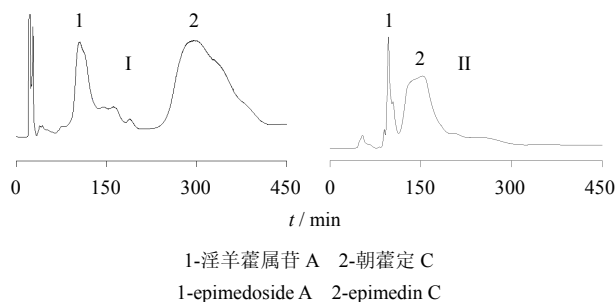


图 1 淫羊藿属苷 A 和朝藿定 C 的制备 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of epimodoside A and epimedin C

2.3 结构鉴定

化合物 1: 黄色固体粉末, mp 210~211 °C, HCl-Mg 反应呈红色, Molish 反应呈阳性, 喷 1% AlCl₃ 乙醇溶液后显黄色荧光。薄层水解反应鉴定糖为葡萄糖及鼠李糖, ESI *m/z*: 661 [M-H]⁻, 分子式 C₃₂H₃₈O₁₅。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 524, 3 454, 3 321 (-OH), 3 050 (CH=), 2 904 (-CH-), 1 652 (C=O), 1 600, 1 556, 1 507 (苯环); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ : 12.59 (1H, s, 5-OH), 10.22 (1H, s, 4'-OH), 7.79 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.62 (1H, s, H-6), 5.29 (1H, s, Rha-H-1), 5.15 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-2''), 4.99 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, Glu-H-1), 1.68 (3H, s, H-5''), 1.59 (3H, s, H-4''), 0.79 (3H, d, *J* = 5 Hz, Rha-H-6); ¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 157.6 (C-2), 134.3 (C-3), 178.1 (C-4), 159.0 (C-5), 98.0 (C-6), 160.4 (C-7), 108.2 (C-8), 152.9 (C-9), 105.5 (C-10), 120.5 (C-1'), 130.5 (C-2', 6'), 115.3 (C-3', 5'), 160.0 (C-4'), 21.3 (C-1''), 122.1 (C-2''), 130.9 (C-3''), 25.3 (C-4''), 17.7 (C-5'')。以上数据与文献报道^[10]的淫羊藿属苷 A 氢谱、碳谱数据基本一致。

化合物 2: 黄色颗粒状结晶, mp 198~200 °C, HCl-Mg 反应红色, Molish 反应阳性, 喷 1% AlCl₃ 乙醇溶液后显黄色荧光。薄层水解反应鉴定糖为葡萄糖及鼠李糖, ESI *m/z*: 845 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₉H₅₀O₁₉。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 403 (-OH), 3 050 (CH=), 2 913(-CH-), 1 650 (C=O), 1 597, 1 510 (苯环)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.60 (1H, s, 5-OH), 7.94 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2', 6'), 7.17 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3', 5'), 6.68 (1H, s, H-6), 5.43 (1H, brs, Rha-H-1), 5.20 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2''), 5.05 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, Glu-H-1), 4.92 (1H, brs, Rha'-H-1), 3.90 (3H, s, -OMe), 1.73 (3H, s, H-5''), 1.64 (3H, s, H-4''), 1.14 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, Rha'-H-6), 0.86 (3H, d, *J* = 5.5 Hz, Rha-H-6); ¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 157.3 (C-2), 134.6 (C-3), 178.3 (C-4), 159.1 (C-5), 98.2 (C-6), 160.6 (C-7), 108.4 (C-8), 153.0 (C-9), 105.6 (C-10), 122.2 (C-1'), 130.6 (C-2', 6'), 114.1 (C-3', 5'), 161.5 (C-4'), 21.4 (C-1''), 122.1 (C-2''), 131.2 (C-3''), 25.5 (C-4''), 17.9 (C-5''), 55.5 (-OMe)。以上数据与文献报道^[11]的朝藿定 C 氢谱、碳谱数据基本一致。

2.4 纯度检测

2.4.1 分析色谱条件 色谱柱为 Waters SunfireTM-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(25:75), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温为室温。

2.4.2 色谱分析 取适量目标产物淫羊藿属苷 A 和朝藿定 C, 用甲醇溶解, 按分析色谱条件进样测定, 面积归一化法计算两者的质量分数分别为 98.9%和 99.1%, 分析色谱图见图 2^[3, 5]。

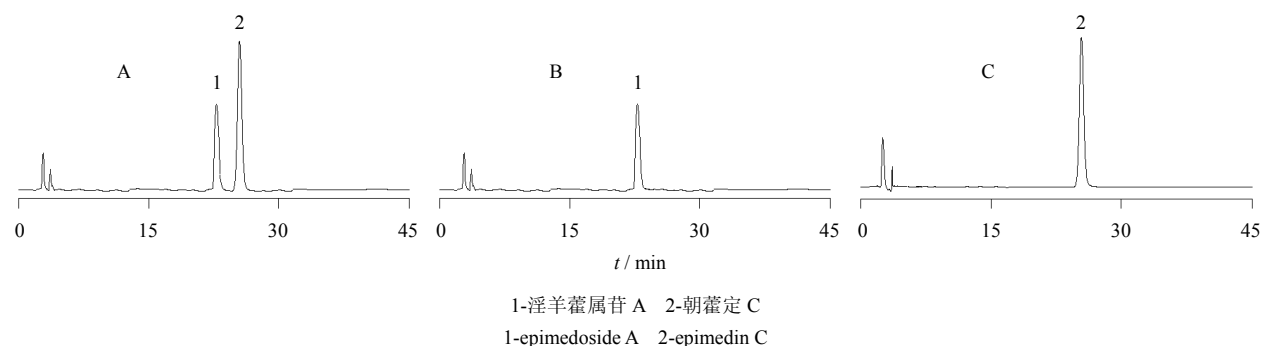


图 2 混合对照品 (A) 和样品 (B 和 C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and samples (B and C)

3 讨论

3.1 样品液的制备

制备色谱分离时样品溶液中目标产物的质量分数对制备效率影响很大,为了获得较高的制备效率,需对样品进行预处理,本实验采用大孔树脂梯度洗脱和柱色谱 G 硅胶对样品进行前处理,去除了大部分杂质,并取其 50%乙醇洗脱部分,使两个目标产物得到富集,同时也延长了制备色谱柱的使用寿命。

3.2 流动相的选择

从分析色谱条件可知,乙腈-水 (25:75) 即可将两者很好分离。在制备液相色谱中,曾利用梯度洗脱 (0 min, 35%乙腈; 5 min, 30%乙腈; 50 min, 40%乙腈; 体积流量 2 mL/min), 制备色谱见图 1-II (梯度洗脱: 0~5 min, 35%~30%乙腈; 5~50 min, 30%~40%乙腈), 一次性得到质量分数大于 99% 的朝藿定 C, 但此时另一化合物淫羊藿属苷 A 质量分数不能达到要求, 考虑到制备液相进样量大, 体积流量高, 故将流动相中乙腈-水比例降为 (24:76), 结果两者在制备柱上一次达到良好分离 (图 1-I)。

3.3 进样量与体积分量的选择

每次进样 3 mL 以上时, 分离时间明显延长, 分离效果较差; 体积流量增加至 3 mL/min 以上, 朝藿定 C 和淫羊藿属苷 A 的质量分数都有所降低, 但只要在 5 mL/min 以内, 均可以得到符合质量要求 (质量分数大于 98%, HPLC) 的产物, 考虑到对色谱柱的保护, 选用 3 mL/min 的体积流量进行制备分离。

3.4 产品纯度分析及收率

1 g 制备色谱用样品可制备约 40 mg 淫羊藿属苷 A 和 200 mg 朝藿定 C, 其中朝藿定 C 在溶剂回收 (重结晶) 中黏度明显降低, 容易得到黄色颗粒状结晶, 面积归一化计算淫羊藿属苷 A 和朝藿定 C

产品质量分数分别为 98.9% 和 99.1%, 外标法定量确定产品质量分数分别为 99.8% 和 100.5%, 收率分别达到了 65% 以上, 可以作为《中国药典》2010 年版新增单列品种——巫山淫羊藿项下新的检测指标朝藿定 C 对照品的制备方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [J]. 一部. 2010.
- [2] 谢娟平, 孙文基. 生长期巫山淫羊藿不同部位 5 种黄酮类成分的动态积累研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1480-1483.
- [3] 谢娟平, 胥道宝, 孙文基. RP-HPLC 法测定巫山淫羊藿中 4 种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(3): 437-440.
- [4] Xie J, Sun W, Duan K, et al. Chemical constituents of roots of *Epimedium wushanense* and evaluation of their biological activities [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(7): 600-605.
- [5] 郭宝林, 王春兰, 肖培根, 等. HPLC 法分析淫羊藿的黄酮类成分 [J]. 西北药学杂志, 1996, 11(5): 201-203.
- [6] 裴利宽, 郭宝林, 黄文华. 淫羊藿属主要资源种类的 HPLC 指纹图谱特征和种类鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1662-1668.
- [7] 娄方明, 王艳, 钱静. 淫羊藿中淫羊藿苷分离纯化工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(8): 4073-4074.
- [8] 常宗策, 成艳, 梁永民, 等. 箭叶淫羊藿提取液的高效液相色谱分离及淫羊藿苷的色谱制备 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 415-419.
- [9] 艾秀珍, 沈波, 危凤, 等. 反相制备液相色谱分离纯化辣椒碱单体 [J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(5): 774-778.
- [10] 周颖欣, 贾敏鸽, 涂光忠, 等. 巫山淫羊藿根的化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 817-818.
- [11] 王丹红. 巫山淫羊藿化学成分研究及酒制淫羊藿初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.