

反相制备液相色谱同时分离制备独一味中 4 种环烯醚萜苷类化合物

樊鹏程^{1,2}, 马慧萍^{1,2}, 景临林^{1,2}, 李茂星^{1,2}, 何希瑞^{1,2}, 贾正平^{1,2*}

1. 兰州军区兰州总医院 药剂科, 甘肃 兰州 730050

2. 国家中医药管理局临床药学重点学科, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 建立独一味中环烯醚萜苷类化合物山梗苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷和 8-*O*-乙酰山梗苷甲酯的快速制备色谱方法。方法 独一味水提物经聚酰胺色谱柱和大孔吸附树脂柱分离后, 进行快速制备液相色谱分离, 根据制备色谱图收集流出液, 采用 HPLC 和质谱定性定量分析。结果 质谱法确定实验所得 4 种单体分别为山梗苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷和 8-*O*-乙酰山梗苷甲酯, RP-HPLC 法分析质量分数分别为 95.7%、94.8%、96.3%、98.2%。结论 该分离方法中各组分分离效果较好, 可用于独一味中 4 种环烯醚萜苷类化合物的分离制备。

关键词: 独一味; 反相制备液相色谱法; 环烯醚萜苷; 山梗苷甲酯; 螃蟹甲苷 II、番木鳖苷和 8-*O*-乙酰山梗苷甲酯

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0699-03

Simultaneous isolation and preparation of four iridoid glycosides from *Lamiophlomis rotata* by preparative RP-HPLC

FAN Peng-cheng^{1,2}, MA Hui-ping^{1,2}, JING Lin-lin^{1,2}, LI Mao-xing^{1,2}, HE Xi-rui^{1,2}, JIA Zheng-ping^{1,2}

1. Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Command, Lanzhou 730050, China

2. Key Discipline of Clinical Pharmacy, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To establish a gradient preparative chromatography, RP-HPLC, and mass spectrometry (MS) method for the preparation and identification of four iridoid glycosides from Tibetan medicinal herb *Lamiophlomis rotata*. **Methods** After the plant was extracted with water, the crude extract was purified by polyamide column and macroporous adsorptive resins column. Then preparative liquid chromatography was used to isolate shanzhiside methylester, phloyoside II, loganin, and 8-*O*-acetyl-shanzhiside methylester. The samples were identified by HPLC and MS. **Results** MS determination indicated that the four monomers were identical to be shanzhiside methylester, phloyoside II, loganin, and 8-*O*-acetyl-shanzhiside methylester. The results showed that purities of the products were 95.7% (shanzhiside methylester), 94.8% (phloyoside II), 96.3% (loganin), and 98.2% (8-*O*-acetyl-shanzhiside methylester), respectively. **Conclusion** The method has good separative effect. It is suitable to be used for the prepared separation of four iridoid glycosides from *L. rotata*.

Key words: *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo; preparative RP-HPLC; iridoid glycosides; shanzhiside methylester; phloyoside II; loganin; 8-*O*-acetyl-shanzhiside

独一味来源于唇形科独一味属植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的全草或根及根茎, 主产于甘肃、西藏、青海、云南、四川等省区, 为传统藏药, 藏语称“大巴”、“打巴布”“朶果拉”等, 是我国藏、蒙、纳西等民族民间常用药之一, 具有止血、镇痛消肿、活血化瘀、补髓、行气、续筋接骨等功效^[1-3]。其根及全草中含有山梗苷甲酯、8-*O*-乙酰山梗苷甲酯、独一味素 A~C 等环烯醚萜苷类成分^[4-8], 环烯醚萜苷类各组分的药效活性有所

不同, 但化学结构和性质却十分相近, 一般经典的薄层色谱、柱色谱均难以获得高质量分数的环烯醚萜苷类单体。有文献报道^[9-11]杜仲中金尼泊苷酸、金尼泊苷和桃叶珊瑚苷 3 种环烯醚萜苷类成分的分离纯化, 但关于独一味中山梗苷甲酯及其衍生物单体同时制备分离尚未见报道。本实验首次采用中压制备液相色谱对独一味中的环烯醚萜苷类化合物进行分离纯化, 同时制备了山梗苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梗苷甲酯 4 种高质量分数的

收稿日期: 2011-07-13

基金项目: 兰州军区医药卫生科研基金资助项目 (LXH-200409); 甘肃省科技攻关项目 (2GS054-A43-014-14)

作者简介: 樊鹏程 (1980—), 男, 主管药师, 硕士, 主要从事天然药物化学研究。Tel: (0931)8994671 13919931106 E-mail: fpch2001@yeah.net

*通讯作者 贾正平 Tel: (0931)8994652 E-mail: jiazp166@sina.com

环烯醚萜苷类单体。该法简便、快速，适用于克级制备。

1 仪器与材料

ABI 3200 质谱仪 (美国 AB 公司), Waters 高效液相色谱仪, 含 600 高效液相色谱泵、996 二极管阵列检测器, 600 控制器, Millennium32 色谱工作站 (美国 Waters 公司), AS5150 超声发生器 (上海医用分析仪器厂)。慧德易 HEP—200 制备液相色谱仪, Quiksep UV—250 紫外检测仪, Vantage—L 型耐压玻璃色谱柱 (北京慧德易公司)。提取及制备色谱分离用甲醇、乙醇均为分析纯, 分析用乙腈为色谱纯, 水为双蒸水。山梔苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯对照品为实验室提取并经制备分离重结晶后得到, 参考文献方法鉴定^[12], 质量分数均大于 98.0%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 制备色谱条件 Vantage—L 型耐压玻璃柱 (500 mm×40 mm), ODS C₁₈ 填料粒径 40~65 μm, 湿法装柱, 梯度洗脱: 0~7 min, 甲醇-水 (30:70), 5 mL/min; 7~100 min, 甲醇-水 (30:70), 20 mL/min; 100~180 min, 甲醇-水 (40:60), 20 mL/min; 进样量 20 mL, 检测波长 238 nm。

2.1.2 分析色谱条件 色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱: 0~11 min, 11% A; 11~35 min, 11%~15% A; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 238 nm, 柱温为室温, 进样量 10 μL。

2.2 环烯醚萜苷类化合物的提取富集

取经粉碎并过 60 目筛的独一味粉末 1 kg, 加水浸泡 24 h, 于 80 °C 水浴超声提取 2 h。回收水提液, 60 °C 减压干燥。独一味水提取物加 15 倍量的蒸馏水溶解后先后分别过聚酰胺色谱柱和大孔吸附树脂柱, 经过蒸馏水及 75%、50% 乙醇洗脱后所得独一味总环烯醚萜苷部分得率为 19.8%, 总环烯醚萜苷的质量分数达到 66%。

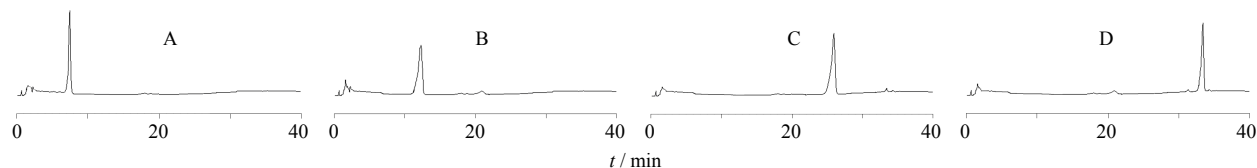


图 2 山梔苷甲酯 (A)、螃蟹甲苷 II (B)、番木鳖苷 (C) 和 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯 (D) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of shanzhizide methylester (A), phloyoside II (B), loganin (C), and 8-*O*-acetylshanzhizide methylester (D)

2.3 环烯醚萜苷类单体的制备色谱分离

取总环烯醚萜苷浸膏 10.0 g 溶解于 20 mL 甲醇后, 进样制备反相液相色谱柱, 分别收集 42~49、55~73、113~135、137~158 min 制备液相色谱洗脱液, 得到组分 I~IV, 并将洗脱液分别进样 HPLC 进行分析。得到的环烯醚萜苷粗品挥干溶剂, 以适量甲醇溶解后同样方法再次进样制备液相色谱, 即可获得高质量分数的环烯醚萜苷单体, 实现了很好的分离效果。减压浓缩、真空干燥后得到 4 种环烯醚萜苷单体化合物白色粉末。环烯醚萜苷类化合物的制备色谱图见图 1。

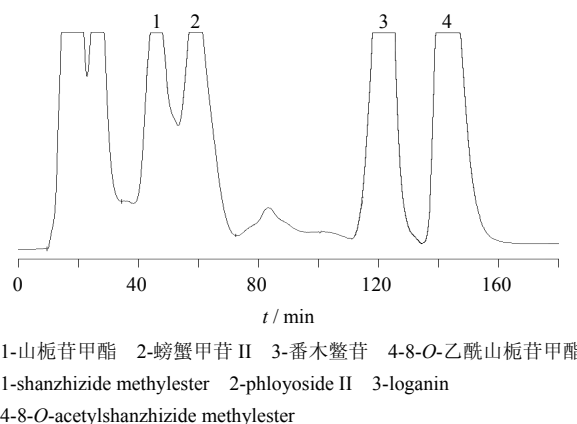


图 1 4 种环烯醚萜苷类化合物制备色谱图

Fig. 1 Preparative chromatogram of four iridoid glycosides

2.4 环烯醚萜苷类单体 HPLC 检测

制备液相色谱所收集不同时间流分按“2.1.2”项下色谱条件进行 HPLC 分析, 色谱图见图 2。山梔苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯 4 种环烯醚萜苷保留时间分别为 7.6、12.5、26.0、33.5 min。通过保留时间定性, 外标法定量, 测得山梔苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯质量分数分别为 95.7%、94.8%、96.3%、98.2%。

2.5 环烯醚萜苷类单体质谱检测

将分离得到的单体化合物进行质谱分析^[13-14], 质谱条件为源温度 450 °C, 离子喷射电压 4 500 V, DP 70, EP10, 阳离子模式。4 种环烯醚萜苷单体质

谱检测结果及碎片峰分别为: 山梔苷甲酯在+Q1、-Q1 及+MS₂ 质谱离子扫描模式下分别可见 [M+Na]⁺ 峰 (*m/z* 429.2)、[M-H]⁻ 峰 (*m/z* 405.2)、子离子峰 (*m/z* 267.4); 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯在+Q1、-Q1 及+MS₂ 质谱离子扫描模式下分别可见 [M+Na]⁺ 峰 (*m/z* 470.9)、[M-H]⁻ 峰 (*m/z* 447.2)、子离子峰 (*m/z* 249.4); 番木鳖苷在+Q1、-Q1 及+MS₂ 质谱离子扫描模式下分别可见 [M+Na]⁺ 峰 (*m/z* 413.2)、[M-H]⁻ 峰 (*m/z* 226.9)、子离子峰 (*m/z* 251.4); 螃蟹甲苷 II 在+Q1、-Q1 及+MS₂ 质谱离子扫描模式下分别可见 [M+Na]⁺ 峰 (*m/z* 479.0)、[M-H]⁻ 峰 (*m/z* 455.2)、子离子峰 (*m/z* 281.3)。

3 讨论

3.1 体积流量及洗脱方式的确定

体积流量及洗脱方式对分离情况影响的结果表明, 随着体积流量减小, 山梔苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯的保留时间延长, 分离度增大。体积流量<5 mL/min 时, 保留时间过长, 色谱峰变宽, 分离效率低。当采用低体积流量时, 得到番木鳖苷后还要用很长的时间才能洗脱出 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯。而体积流量>40 mL/min 时, 虽然 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯可以很快洗脱出来, 但山梔苷甲酯与螃蟹甲苷 II、番木鳖苷与 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯的分离效果均不佳, 影响产品质量。

本实验中的环烯醚萜苷类混合物, 其主要杂质集中在极性较强的山梔苷甲酯、螃蟹甲苷 II 之前, 开始分离时柱压较高, 故选择甲醇-水 (30:70), 5 mL/min 洗脱 7 min, 之后主要大极性杂质被洗脱, 柱压下降后将体积流量提高至 20 mL/min 进行洗脱, 可缩短分离时间, 且保持良好的分辨率, 满足快速制备的要求。

3.2 进样体积、进样量对色谱分辨率的影响

进样量为 5.0 g 时, 进样体积对色谱分辨率影响的结果表明, 随着进样体积增大, 色谱分辨率逐渐降低, 色谱峰发生扩散, 当进样体积大于 30 mL 时, 色谱分辨率急剧下降, 且出现严重的峰形不对称。进样体积对环烯醚萜苷中各流分质量分数的影响结果表明, 进样体积越大, 流分中山梔苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯的质量分数越低。因此, 选择进样体积为 20 mL。在相同进样体积 (20 mL) 的条件下, 随着进样量的增大, 色谱峰变宽, 组分峰重叠加重, 容量因子逐渐减小, 分辨率降低, 且进样量越大, 流分中山梔苷甲酯、螃蟹甲苷 II、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯的质量分数

越低。当进样量大于 20.0 g 以后, 出现峰形不对称, 峰前陡峭而峰后拖尾的现象, 表明进样量已超过等温吸附的线性范围, 选择最佳进样量为 10.0 g。

综上所述, 优化后的反相制备液相系统分离洗脱条件为本实验所选用条件, 实验结果表明, 该流动相系统能够满足分离要求, 保留时间适宜, 分离效果良好。通过制备色谱分离纯化, 可同时得到 4 种环烯醚萜苷高纯产品, 既适于用作对照品, 也可满足新药研发的需要。

参考文献

- [1] 黄晓芹, 祝彼得. 独一味的药效及机理研究现状 [J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2006, 25(2): 121-123.
- [2] 张 凤, 孙连娜, 陈万生. 独一味的化学成分及药理作用 [J]. 药学实践杂志, 2008, 26(3): 169-171.
- [3] 黄 英, 郭 凯, 杨 婷, 等. 独一味胶囊对大鼠机械性皮肤损伤的促愈合作用 [J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(3): 288-291.
- [4] 桑育黎, 郝延军. 藏药独一味化学成分及测定方法研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 附 9-附 10.
- [5] 李旨君, 张晓琦, 轧 霁, 等. 藏药独一味地上部分的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2008, 6(5): 342-344.
- [6] 刘长余, 姚雪芳. 独一味的化学成分与临床应用研究概况 [J]. 海峡医药, 2005, 17(1): 82-83.
- [7] 易进海, 钟炽昌, 罗泽渊, 等. 藏药独一味根化学成分的研究 [J]. 药学报, 1991, 26(1): 37-41.
- [8] 樊鹏程, 李茂星, 贾正平, 等. RP-HPLC 同时测定不同产地独一味药材中 4 种环烯醚萜苷 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 483-485.
- [9] 彭密军, 周春山, 董朝清, 等. 液相色谱法分离制备环烯醚萜化合物 [J]. 应用化学, 2004, 21(5): 455-458.
- [10] 彭密军, 周春山, 董朝青, 等. 制备液相色谱-台阶梯度法分离纯化杜仲中三种环烯醚萜化合物 [J]. 色谱, 2004, 22(2): 184.
- [11] 柳 娜, 陈晓青. 杜仲中环烯醚萜类化合物的快速制备色谱制备及反相高效液相色谱/核磁共振鉴定 [J]. 精细化工, 2006, 23(3): 261-263.
- [12] Li M X, Jia Z P, Zhang R X, et al. The structure of an iridoid glycoside, 8-deoxyshanzhiside, from *Lamiophlomis rotata* [J]. *Carbohydr Res*, 2008, 343(3): 561-565.
- [13] Zhou T, Liu H, Wen J, et al. Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection / electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Rapid Commun Mass SP*, 2010, 24(17): 2520-2528.
- [14] Wu Q, Yuan Q, Liu E H, et al. Fragmentation study of iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in *Radix Scrophulariae* by rapid resolution liquid chromatography with diode-array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(8):808-819.