

中压液相色谱法快速制备木犀草素-7- O-β-D-葡萄糖醛酸苷单体及鉴别

陈家骄^{1,2}, 王凤玉^{1,2}, 田旭辉¹, 邓昌瑞¹, 黄小萍¹, 王东^{1,2}, 刘东春^{1,2*}

¹沈阳药科大学中药学院; ²沈阳药科大学中韩分子生药学研究室, 沈阳 110016

摘要: 本文采用二元中压制备液相色谱系统, 以装有反相 C₁₈ (Chromatorex, MB 100-40/75) 分离填料的两端具有锥形不锈钢接口的耐压玻璃柱(φ49 mm × H310 mm) 作为制备色谱柱, 流动相为甲醇(A)/含 0.05% 冰醋酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0 ~ 20 min, 10% (A); 20 ~ 230 min, 30% (A); 230 ~ 270 min, 60% (A); 270 ~ 300 min, 100% (A), 流速: 50 mL/min, 检测波长 254 nm, 进样量: 200 mL, 从抱茎苦苣菜(苦碟子)总黄酮中快速、高效地分离得到木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(L7GU) 单体。所得单体经 UV、IR、TOF-MS、¹H NMR、¹³C NMR 方法进行了结构确证。经硅胶和聚酰胺薄层色谱检查, 在 365 nm 紫外灯下均呈单一的黄绿色荧光斑点; HPLC-UV 分析表明, 在 210、254、290、348 nm 四个波长下, 采用色谱峰面积归一化方法计算产品纯度均在 98% 以上。所得产品可直接作为对照品用于苦碟子药材及制剂的质量控制。

关键词: 抱茎苦苣菜; 苦碟子; 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; 分离; 制备液相色谱

中图分类号: R284.1; R284.2

文献标识码: A

Preparation and Identification of Luteolin-7-O-β-D-glucuronide by Preparative Medium Pressure Liquid Chromatography

CHEN Jia-jiao^{1,2}, WANG feng-yu^{1,2}, TIAN Xu-hui¹, DENG Chang-rui¹,
HUANG Xiao-ping¹, WANG Dong^{1,2}, LIU Dong-chun^{1,2*}

¹School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University; ²Laboratory of China and Korea Molecular Pharmacognosy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: To establish a rapid and efficient method for isolation and purification of luteolin-7-O-β-D-glucuronide (L7GU) from herb of *Ixeris sonchifolia* (Bge) Hance, a preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC) method was developed and used. The MPLC system consisted two-unit pumps and a glass column (φ49 mm × H310 mm) linked with cone-shaped stainless steel port and packed with C₁₈ particles (Chromatorex, MB 100-40/75). The mobile phase was methanol (A)-water (containing 0.05% acetic acid, B). The gradient elution program was as follows: 0-20 min, 10% A; 20-230 min, 30% A; 230-270 min, 60% A; 270-300 min, 100% A. The flow rate was 50 mL/min, and the detection wavelength was set at 254 nm. The structure of isolated L7GU was subsequently confirmed by analyzing its UV, IR, TOF-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. Silica gel HPTLC, polyamide TLC and HPLC analyses were performed to test and verify the purity of isolated L7GU. One single yellowish green spot under UV at 365 nm was detected in both TLC analyses. The HPLC analyses at detection wavelength of 210 nm, 254 nm, 290 nm and 348 nm demonstrated the purity of isolated L7GU was more than 98%. The high-purity L7GU prepared by this method can be used as reference substance for the quality control of herb of *I. sonchifolia* and its proprietary medicine.

Key words: *Ixeris sonchifolia*; Kudiezi; luteolin-7-O-β-D-glucuronide; isolation; preparative liquid chromatography

苦碟子注射液是由抱茎苦苣菜(苦碟子) *Ixeris sonchifolia* (Bge) Hance 为原料经过现代工艺科学

精制而成的静脉注射剂, 在冠心病、心绞痛及脑梗塞方面的临床疗效显著^[1,2]。黄酮苷类成分是苦碟子注射液中的主要有效成分之一, 其中以木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(L7GU, 图1) 在制剂中含量最高, 适合用于注射剂的质量控制^[3-5]。但是大规模制备高纯度的 L7GU 对照品比较困难, 目前尚未有

收稿日期: 2013-08-01 接受日期: 2013-11-19

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20130727010YY)

* 通讯作者 Tel: 86-24-23984318; E-mail: liudongchun@outlook.com

L7GU 的国家标准对照物可用于注射剂的质量控制。本研究旨在建立一种快速制备高纯度 L7GU 对照品的方法,可满足苦碟子注射剂等相关制剂的质量控制需求及其药用活性的深入研究。

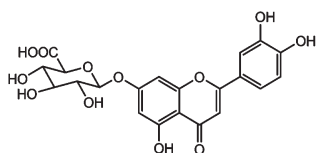


图1 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的结构式

Fig. 1 Chemical structure of luteolin-7-O-β-D-glucuronide

1 材料与仪器

苦碟子药材采于辽宁省沈阳地区,经沈阳药科大学生药学教研室刘东春副教授鉴定为菊科植物抱茎苦茛菪菜 *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance 的干燥全草;D101 大孔树脂(沧州宝恩化工有限公司);Chromatorex C₁₈ 制备色谱填料(C₁₈ MB 100-40/75, 日本 Fuji Sylysia Chemical Ltd.);高效硅胶薄层板(HPTLC GF₂₅₄, 德国 Merck 公司)。

显色剂:2% (W/V) 的三氯化铝乙醇溶液;TLC 展开剂:(1)三氯甲烷/甲醇/冰醋酸/水 80:30:25:7.5, (2)正丁醇/冰醋酸/水 4:1:5 上层;色谱甲醇、色谱乙腈、色谱甲酸(美国 fisher);其他试剂均为分析纯。

高效液相色谱仪(具自动进样器,UV 检测器,LC-2010A,日本岛津公司),色谱工作站软件 Class-VP Ver. 6;中高压液相色谱制备系统(MPLC-20,苏州汇通色谱分离纯化有限公司);中高压制备色谱塔(φ49 mm × H310 mm,苏州汇通色谱分离纯化有限公司);冷冻干燥机(LGS-18,北京松源华兴科技发展有限公司);旋转蒸发器(N-1100,东京理化器械株式会社);紫外分光光度计(UV-1700,日本岛津制作所);傅立叶变换红外光谱仪(IFS55,德国 Bruker 公司);飞行时间质谱仪(micrOTOF-Q,德国 Bruker 公司);超导核磁共振仪(Bruker Avance 600, TMS 内标,瑞士布鲁克公司)。

2 方法与结果

2.1 苦碟子总黄酮的制备

2.1.1 苦碟子浓缩液的制备

将苦碟子药材 50 kg,加水煎煮两次,第一次 1 h,第二次 0.5 h,合并煎煮液,浓缩至每 1 mL 相当于

原生药 0.5 g,放冷至 40 °C 以下,在搅拌下加 10% 氢氧化钙乳调节 pH 值至 10,放置 12 h,离心,离心沉淀物称重,混悬于 5.3 倍量 95% 乙醇中,使含醇量达 80%,加 50% 硫酸溶液调节 pH 值至 3~4,充分搅拌使反应完全,离心,转移上清液并加 40% 氢氧化钠溶液中和 pH 值至 7.0,滤过,滤液回收乙醇,并挥尽乙醇,得到苦碟子浓缩液(约相当于原生药 5~6 g/mL)备用^[6]。

2.1.2 大孔树脂富集纯化黄酮类化合物

D101 大孔树脂装入洗脱柱(φ10 × 150 cm),去离子水洗脱至流出液澄清,用 95% 乙醇浸泡过夜后洗脱,至流出液不浑浊,用去离子水洗至无醇味待用。取苦碟子浓缩液,加水稀释。(约相当于原生药 2.0 g/mL),用硫酸(50% ,v/v)调 pH 值 4~4.5。以 100 mL/min(约 0.5 BVe/h) 的流速缓慢将上样吸附液加至树脂柱的上端,同时打开树脂柱出口阀门,使流出速度与流入速度相等。吸附完成后,依次用去离子水,10%、50%、95% 的乙醇进行梯度洗脱。以 3 BVe/h 流速进行洗脱,每一梯度的洗脱液颜色明显变淡(约 8 BVe/梯度)后即更换到下一梯度继续洗脱,收集 50% 乙醇洗脱部分,减压回收至干,得到黄酮粗提取物。

2.2 MPLC 法分离提纯 L7GU 单体

称取上述黄酮粗提取物 2 g,加入 200 mL 超纯水,超声使溶解完全,必要时过滤待用;将此粗黄酮溶液注入色谱塔,以流动相(A:甲醇,B:0.05% 冰醋酸水溶液)进行梯度洗脱,梯度洗脱程序:0~20 min,10% (A);20~230 min,30% (A);230~270 min,60% (A);270~300 min,100% (A),流速:50 mL/min,检测波长 254 nm,收集 100~180 min 流份,减压蒸馏除去甲醇后,冷冻干燥得到黄色无定型粉末 1.36 g。制备色谱图见图 2。

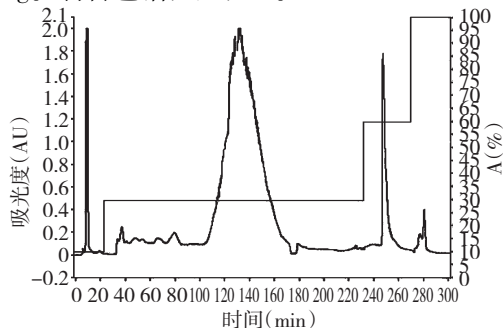


图2 中高压液相色谱系统制备 L7GU 图谱

Fig. 2 MPLC chromatogram of total flavonoid of *I. sonchifolia* for the isolation of L7GU

2.3 L7GU 结构确证

产品为黄色无定型粉末,可溶于甲醇、乙醇、乙腈、水,易溶于四氢呋喃、吡啶。盐酸-镁粉反应和 Molish 反应均呈阳性,提示为黄酮苷类化合物。UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 348 (2.85), 257 (2.85), 209 (3.04) nm, λ_{\min} (log ϵ) 295 (2.44), 236 (2.67) nm, 与文献报导木犀草素的 UV 光谱基本一致^[7,8]; ESI-MS: m/z 463.0896 [M + H]⁺ (calcd. for C₂₁H₁₈O₁₂, 463.0896); IR (KBr) ν_{\max} 3425, 2923, 2853, 1734, 1658, 1601, 1499, 1446, 1383, 1335, 1304, 1258, 1171, 1092, 1033, 839, 684, 622; ¹H NMR (DM-SO-*d*₆, 600 MHz): δ_{H} 13.00 (1H, s, H-5), 7.43 (1H, s, H-2'), 6.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.45 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.47 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.77 (1H, s, H-3), 5.30 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1a), 根据偶合常数确定葡萄糖构型为 β 构型; ¹³C NMR (DM-SO-*d*₆, 150 MHz), δ : 164.6 (C-2), 103.3 (C-3), 182.0 (C-4), 161.3 (C-5), 99.3 (C-6), 162.6 (C-7), 94.7 (C-8), 157.1 (C-9), 105.6 (C-10), 121.5 (C-1'), 113.7 (C-2'), 145.9 (C-3'), 150.0 (C-4'), 116.1 (C-5'), 119.3 (C-6'), 99.5 (Glc-1), 72.9 (Glc-2), 75.5 (Glc-3), 71.4 (Glc-4), 75.7 (Glc-5), 170.3 (Glc-6)。测得的氢谱和碳谱数据与文献^[8-10]报道的木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷的数据基本一致,确定为木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷。

2.4 L7GU 的纯度检查

2.4.1 薄层色谱纯度检查

取上述成品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液。作为供试品溶液。参照药典薄层色谱法试验(中国药典 2010 年版一部,附录 VI B),吸取上述供试品溶液 0.2 μ L,分别点样于高效硅胶薄层板 GF₂₅₄和聚酰胺薄层层析板,以正丁醇/冰醋酸/水 4:1:5、三氯甲烷/甲醇/冰醋酸/水 80:30:25:7.5 为展开剂,分别各自展开,展开完毕后,挥干展开剂,喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热数分钟,置紫外光灯(365 nm)下检视,两种不同的展开体系下的供试品色谱中,均呈单一的黄绿色荧光斑点,且原点无色斑残留,表明本品为单一化合物。薄层色谱图见图 3。

2.4.2 HPLC-UV 法纯度标定

L7GU 样品干燥参照中国药典 2010 年版一部

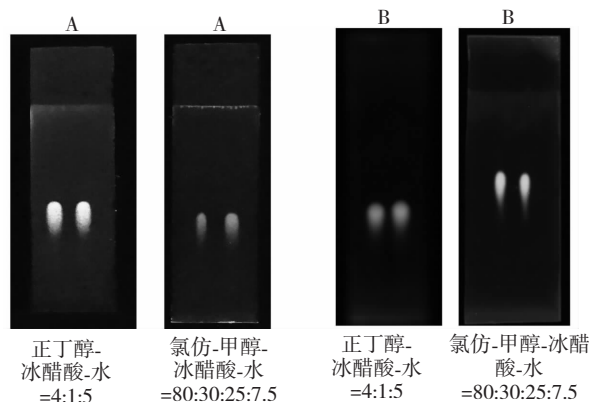


图 3 L7GU 样品的薄层层析检查

Fig. 3 TLC analyses of L7GU

A: 硅胶 TLC; B: 聚酰胺 TLC

A: silica gel TLC; B: polyamide TLC

附录 IX H 水分测定法第三法,采用五氧化二磷为干燥剂,室温减压干燥 24 h 后迅速精密称取干燥样品适量,配制成约 50 μ g/mL 样品甲醇溶液;

分析色谱条件:液相色谱仪:SHIMADZU LC-2010A,紫外-可见检测器;色谱柱 Ultimate AQ C-18 (4.6 \times 150 mm, 5 μ m, Welch Materials Inc.) 柱;保护柱 C₁₈ (4 \times 3.0 mm, Phenomenex);流动相:甲醇/水(水相中含 0.5% 甲酸)38:62;流速:1 mL/min;进样量 10 μ L;柱温 40 $^{\circ}$ C;检测波长:210、254、290 和 348 nm;采用色谱峰面积归一化方法计算四个波长下纯度,结果纯度均在 98% 以上。

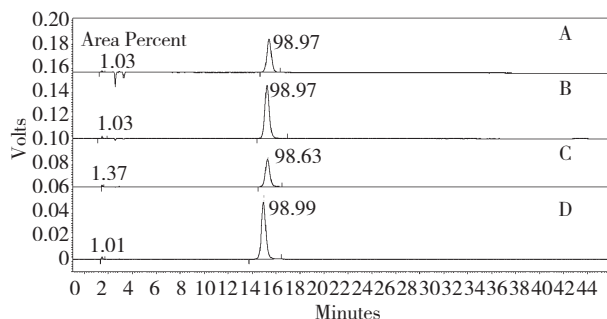


图 4 HPLC-UV 法 L7GU 纯度检查

Fig. 4 HPLC-UV chromatograms of L7GU at UV detection wavelength of 210 nm (A), 254 nm (B), 290 nm (C) and 348 nm (D)

3 讨论

采用高压液相制备色谱法分离提纯化合物一般存在设备昂贵、操作要求高、随着上样量的增加柱效

急剧降低等问题^[11]。使用一般的中压制备色谱系统分离提纯化合物虽然具有上样量大的优点,但是往往在运行几次后,分离效能下降明显,其主要原因是填料松动造成填料不均匀甚至产生所谓“壁流”现象。本实验采用的色谱塔两端具有特殊的锥形接口设计,可以容易的使物料填实,因而不需要额外的动态压缩装置即可以保证装柱及运行过程中色谱塔内填料的紧密,防止大容量中压色谱柱常见的“壁流”现象发生,因而保证了良好的柱效,并且因为采用耐压玻璃,可以直接观察设备运行情况,特别对带有颜色信息物质的提纯分离十分方便。与高压液相制备色谱系统相比,此中压分离系统操作更简便、产量大、运行成本低,非常适合用于天然产物的大量制备与纯化。

致谢:本研究为吉林省科技发展计划资助项目(20130727010YY)。

参考文献

- 1 Liu P(刘沛). Study on pharmacological functions and clinical application of Kudiezi Injection. *Chin Pharm* (中国药师), 2008, 12:1445-1447.
- 2 Yang JY(杨嘉颐), Wang SJ(王少杰), Bai W(白文), *et al.* Study on ischemic cerebral vascular disease treatment of Kudiezi Injection. *Beijing J Tradit Chin Med*(北京中医药), 2010, 7:566-568.
- 3 Dong YX(董玉霞). Study on quality control of Ixeries of Sonchifolia Hance and Ixeries of Sonchifolia Hance Injec-

tion. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, MSc. 2005.

- 4 Luo HM(罗浩铭). Research on the effective fractions of Kudiezi injection. Jilin:Jilin University, MSc. 2010.
- 5 Liu BJ(刘冰洁), Peng Y(彭纓), Zhou LY(周玲艳), *et al.* Simultaneous determination of four components in injection of *Ixeris sonchifolia* (Bge) Hance by HPLC. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2012, 01:70-73.
- 6 Hua YQ(华玉强). The extraction method and application of Luteolin-7-O- β -D-glucuronide. CN200510082836. 1, 2006-6-28.
- 7 Wu LJ(吴立军). Natural Medicinal Chemistry fifth edition (天然药物化学. 第5版), Beijing: People's Medical Publishing House, 2008. 4, 189.
- 8 Lu Y, Foo LY. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 2000, 55:263-267.
- 9 Xue PF, Liang H, Wang B, *et al.* Chemical constituents from *Potentilla multifida* L. *J Chin Pharm Sci*, 2005, 2:86-88.
- 10 Ringl A, Prinz S, Huefner A, *et al.* Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis on (*R*)- and (*S*)-Eriodictyol-7-O-glucuronide and luteolin-7-O-glucuronide. *Chem Biodivers*, 2007, 4:154-162.
- 11 Wang YL(王永禄), Wang LY(王丽瑶). Preparative high performance liquid chromatography and its applications in traditional Chinese Medicine. *Tradit Chin Med J* (中医药通报), 2006, 5:60-63.

(上接第 694 页)

- 5 Zhou R(周嵘), Wang T(汪涛), Du XZ(杜新贞). Study on chemical compositions of the *Myricaria bracteata* Royle. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2006, 31:474-476.
- 6 Meng YY(蒙永业), Liang H(梁红), Li XS(李修善). On the technique of extracting volatile oil from honeysuckle. *Enter Sci Techol Dev* (企业科技与发展), 2012, 15:67-71.
- 7 Peng ZB(彭宅彪), Zhang QG(张琼光), Dai HJ(代虹健), *et al.* Progress on pharmacology of eugenol. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), 2006, 17:2079-2081.

- 8 Sun BS(孙宝山), Zhao YQ(赵余庆), Guan J(关键). Pharmaceutical use of himachalol(雪松醇的制药用途). N 200910010901, 2012-10-7.
- 9 Qu HQ(曲洪琴), Zhao DM(赵冬梅), Cheng MS(程卯生). Synthesis of 3, 5-ditertbutyl-4-hydroxyl benzaldehyde. *Liaoning Chem Ind*(辽宁化工), 2005, 34(2):51-52.
- 10 Xu RB(许瑞波), Liu WW(刘玮炜), Wang MY(王明艳), *et al.* Advances in the preparation and application of squalene. *Shandong Med J*(山东医药), 2005, 45(35):69-70.