

文章编号:1001-6880(2016)10-1585-05

制备型高效液相色谱法纯化紫丁香苷的研究

杨 洋,张勇民,朱忠良,刘胜家,孙文基*

西北大学西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 西北大学陕西省生物医药重点实验室,西安 710069

摘要:救必应药材经粉碎过筛后用50%乙醇超声提取,再以大孔吸附树脂XDA-1分离富集获得紫丁香苷粗提物,然后用制备型高效液相色谱法:采用Welchrom C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 10 μm)色谱柱,优化条件,获得DAC-HB50(50 mm × 1000 mm)制备色谱柱初始色谱条件;再以Chromatorex C₁₈(10 μm, 300 g)为制备色谱柱填料,优化条件探索最佳进样量,并制备获得目标化合物。通过薄层色谱法和分析型高效液相色谱法对该化合物进行定性和定量分析,结果表明所得化合物的纯度为98.6%。以X-单晶衍射方法测定该化合物的分子结构信息,并解析数据,进一步确定该化合物是紫丁香苷。

关键词:制备型高效液相色谱;紫丁香苷;救必应;X-单晶衍射;纯化

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.016

Purification of Syringin by Preparative High Performance Liquid Chromatography

YANG Yang,ZHANG Yong-min,ZHU Zhong-liang,LIU Sheng-jia,SUN Wen-ji*

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China (Northwest University), Ministry of Education;
Biomedicine Key Lab. of Shaanxi Province , Northwest University , Xi'an 710069 , China

Abstract: In this study, *Ilex rotunda* Thunb sample was pulverized and extracted with 50% ethanol. Consequently, the crude product of syringin was obtained from the ethanol crude extract through purification with XDA-1-macroporous adsorption resin. In order to prepare syringin with the preparative HPLC, the initial chromatographic conditions of the preparative DAC-HB50 column (50 mm × 1 000 mm; the packing material: chromatorex C₁₈, 10 μm, 300 g) were investigated with the analytical welchrom C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 10 μm) on the preparative HPLC. Furthermore, syringin was acquired from the crude product of syringin under the best loading amount that was sought through the optimization of the initial separation condition. Finally, the TLC and analytical HPLC analysis results showed that the final obtained product was syringin with the purity of 98.6%. The molecular structure was determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. According to the data, the final obtained product was further confirmed as syringin.

Key words: preparative high performance liquid chromatography; syringin; *Ilex rotunda* Thunb; single-crystal X-ray diffraction; purification

救必应,又名龙胆仔、大叶冬青等,为冬青科冬青属植物铁冬青(*Ilex rotunda* Thunb)的干燥树皮或根皮,是我国南方常用的中药。味苦,性寒,具有清热解毒、利湿、行气止痛、凉血止血等功效,临幊上常用于感冒、扁桃体炎、咽喉炎、急性肠胃炎、痢疾、骨痛等。紫丁香苷(Syringin, 1)是救必应中的主要有效成分之一,含量可达到1% ~ 3%^[1]。1又名刺五

加苷B,是一种抗肝毒药物,具有恢复微粒体酶系统的酶活性和抑制脂质过氧化的作用,可以促进肝毒物的代谢,并改善肝功能,使之正常化^[2]。研究表明它还对1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)诱导的PC12细胞损伤有保护作用^[3],此外还具有抗炎和抗肿瘤的活性^[4,5]。因1在救必应中含量相对较高,以及具有较强和广泛的药理活性,所以建立救必应中1的分离纯化工艺方法具有实际意义。文献报道1的分离纯化多采用大孔吸附树脂法^[6,7]。大孔吸附树脂可有效除去糖、蛋白等杂质,但难以得到高纯度的1(≥98%),而制备型高效液相色谱法在天然

收稿日期:2016-05-26 接受日期:2016-07-15

基金项目:西北大学陕西省生物医药重点实验室与陕西省创新药物研究中心合作项目(2015SF2-06)

*通讯作者 Tel:86-29-88304569;E-mail:swj@nwu.edu.cn

产物的分离纯化中具有快速、灵敏度高、自动化程度高、纯化产物纯度高和可重复性好等优点。因此,本试验拟通过大孔吸附树脂法初步纯化富集获得1粗提物,再以制备型高效液相色谱法纯化粗提物得到高纯度的1($\geq 98\%$),并采用X-单晶衍射法确证1的分子结构。

1 仪器与材料

分析型高效液相色谱仪:2695型高效液相色谱仪、2487型紫外-可见光检测器和Empower色谱工作站(美国Waters公司);制备型高效液相色谱仪:NP7000 C型高效液相色谱泵、NU3010C型紫外-可见光检测器、EasyChrom-1000色谱工作站、DAC-HB50型动态轴向压缩制备柱(江苏汉邦科技有限公司);SMART APEX II CCD型X-射线单晶衍射仪(德国Bruker公司);FD-1C-8低温冷冻干燥机(上海豫明仪器有限公司)。

救必应根皮[购自西安市药材市场,经本学院刘胜家教授鉴定为铁冬青(*Ilex rotunda* Thunb.)的干燥根皮];紫丁香昔对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$,批号111574-200603);薄层硅胶G板(青岛海浪硅胶干燥厂);XDA-1型大孔吸附树脂(陕西蓝深特种树脂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 紫丁香昔粗提物的制备

取干燥的药材10 kg,粉碎过筛(100~200目),所得药材粗粉用50%乙醇(料液比=1:10 000)超声提取3次,每次30 min^[8]。合并提取液后减压浓缩至原体积的1/100,照“2.2.1”项下色谱条件以外标法计算得浓缩液中1的含量为0.267 g/mL。用

95%乙醇处理XDA-1型大孔树脂后装柱(10 cm×120 cm),以树脂量:浓缩液=50:1上样,分别以10%乙醇8 BV和45%乙醇10 BV洗脱,控制流速为1 BV/h,收集45%乙醇洗脱液,减压回收溶剂得1粗提物(765.5 g)^[7],照“2.2.1”项下色谱条件以外标法计算得1的含量约为32.3%。取此粗品适量,加水溶解过滤,配制成浓度大约为6 mg/mL的溶液。

2.2 确定初始色谱分离条件

2.2.1 确定对照品在分析型色谱柱上的保留时间

对照品溶液的配制:取1对照品3 mg加50%甲醇溶解并定容至10 mL,即得。

采用制备型高效液相色谱仪,色谱柱Welchchrom C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,10 μm);流动相10%乙腈^[9];流速1.0 mL/min;柱温:常温;检测波长265 nm;进样量10 μL。取对照品溶液连续测定3次,结果如图1A。

2.2.2 确定粗提物中紫丁香昔在分析型色谱柱上的保留时间

采用“2.2.1”项下色谱条件。取“2.1”项下制得的粗提物溶液,连续测定3次。收集与对照品保留时间相同的峰1(见图1B)成分,浓缩后与对照品溶液点于同一硅胶G板,以氯仿:甲醇:水(80:30:10)下层为展开剂展开,用10%硫酸乙醇作显色剂,加热显色,结果显示待测化合物与对照品具有相同的R_f值,因此确定峰1为1的色谱峰。

2.2.3 色谱条件的优化

流动相优化:取“2.1”项下制得的粗提物溶液,按表1中流动相组成进样测定($n=3$),其他色谱条件同“2.2.1”项。结果表明,各条件下1的出峰时间和分离度(R)见表1,故确定最佳条件为20%甲醇。

表1 流动相的优化

Table 1 Optimization of mobile phase

流动相 Mobile Phase	1的保留时间 Retention time of 1 (min)	Resolution	分离度的SD值 Resolution of SD
10%乙腈	15~16	$1 < R < 1.5$	0.078
10%甲醇	25~26	$1 < R < 1.5$	0.065
20%甲醇	13~14	$1 < R < 1.5$	0.095
30%甲醇	4~5	$R < 1$	0.083

进样量优化:分别取“2.1”项下制备的粗提物溶液0.5、1和1.5 mL,以峰1与杂质峰的分离度为评价依据。结果显示进样量为0.5 mL($1 < R < 1.5$,

$SD = 0.093$)和1 mL($1 < R < 1.5$, $SD = 0.076$)时,峰1与杂质完全基线分离;进样量为1.5 mL($R < 1$, $SD = 0.087$)时峰1与杂质未完全分离。

2.3 制备型色谱条件的确定

2.3.1 DAC-HB50 制备柱

采用 DAC-HB50 制备柱($50\text{ mm} \times 1000\text{ mm}$)，Chromatorex C₁₈($10\text{ }\mu\text{m}$, 300 g)填料，根据“无限直径”效应^[10-12]，保持有效柱长与“2.2.1”项下所用分析柱相同，以异丙醇为分散剂，氮气加压装填，柱压为 110 psi。

2.3.2 DAC-HB50 制备柱的色谱条件

采用制备型高效液相色谱仪，流动相 20% 甲醇；流速 40 mL/min；检测波长 265 nm。

2.3.3 进样量的放大

确定初始进样量：按照线性放大的基本假

设^[13]，以采用“2.2.1”项下所用分析柱时粗品溶液的进样量 1 mL 为基准，乘以线性放大系数(线性放大系数 = 制备色谱柱截面积 / 分析色谱柱截面积，即 $50^2 / 4.6^2 = 118$)，得初始进样量为 118 mL。

进样量的非线性放大：以收率(收率 = 每次纯化后所得目标物的量 / 每次进样量中含有的目标物的量 $\times 100\%$)和纯度(照“2.2.1”项下方法测定)为评价依据，确定最佳进样量。

采用表 2 中的进样量($n=3$)，其他照“2.3.1”和“2.3.2”项。考虑到纯化效率，进样量为 150 mL 时较适宜，故选用。

表 2 制备型色谱条件下进样量的优化
Table 2 Optimization of loading amount in preparative HPLC

进样量 Loading amount (mL)	纯度 Purity (%)	收率 Yield (%)
118	99.2 ± 0.24	93.1 ± 1.46
130	99.0 ± 0.26	93.2 ± 1.52
140	98.8 ± 0.23	93.1 ± 1.68
150	98.5 ± 0.21	92.3 ± 1.55
160	97.3 ± 0.19	87.3 ± 1.78
170	96.2 ± 0.25	85.6 ± 1.45

2.4 紫丁香苷的制备

照“2.3”项下的优化条件，采用制备型高效液相色谱仪纯化粗品溶液，收集峰 1(见图 1C)对应的

流份，过滤后减压回收溶剂至干，所得白色残留物于低温冷冻干燥机中干燥，得白色粉末，收率为 92.7%。

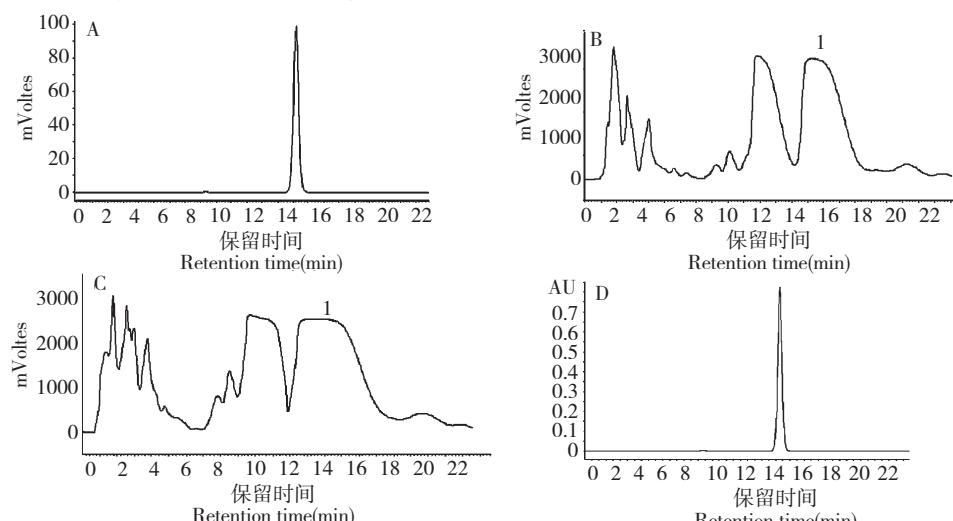


图 1 对照品溶液(分析柱)(A)、粗品溶液(分析柱)(B)、粗品溶液(DAC-HB50 制备柱)(C)及纯化后 1(分析型液相)(D)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of syringin standard (A), crude syringin extract on analytical column (B), crude syringin extract on preparative column (C) and purified 1 (D)

2.5 紫丁香苷的检测

薄层色谱法: 取 1 对照品和“2.4”项下所得白色粉末各 3~5 mg, 用甲醇 5 mL 溶解, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿: 甲醇: 水 (80: 30: 10) 下层展开, 10% 硫酸乙醇作显色剂, 加热后目标物显蓝色, 在紫外灯 254 nm 下检测, 结果“2.4”项下所得白色粉末与对照品具有相同 R_f 值且呈现单一斑点。

定量分析: 分别称取 1 对照品 4.26 mg, “2.4”项下所得白色粉末 7.21 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 mL。按“2.2.1”项下色谱条件, 以外标法计算得目标物含量为 98.6% (见图 1D)。

2.6 X-单晶衍射法确证紫丁香苷的结构

晶体衍射数据的收集和结构分析: 取“2.4”项下所得白色粉末 0.5 g, 溶于 80% 乙醇 50 mL 中, 室温下析晶。在显微镜下选取合适的目标物(无色柱状晶体)单晶, 于 296 K 用 X-射线单晶衍射仪, 以石墨单色器单色化的 Mo-K 射线 ($\lambda = 0.071073$ nm) 辐射为光源, 以-扫描方式收取衍射数据。在 2.03~25.08° 收集衍射点 9574 个, 其中独立衍射点 3378 个。结构解析分别使用 SHELXS-97 程序和 SHELXL-97 程序完成, 晶体结构用直接法解出, 并运用全矩阵最小二乘法 F^2 进行精修至收敛。

结果显示: 化合物 1 无色针晶 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$); 分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 分子量为 390.38, 分子结构见图 2; 1 晶体的晶型为斜方晶系, 空间群为 $P2(1)2(1)2(1)$, 晶胞参数 $a = 0.4855(2)$ nm, $b = 1.9522(9)$ nm, $c = 2.0063(9)$ nm, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ 。1 的晶体分子结构中包含了一个苯环, 两个甲氧基, 一个丙烯基, 一个葡萄糖和一分子结晶水。基于 1 结构中昔元部分苯环和双键的位置以及无手型碳的原因, 确定昔元部分为单一构型, 而与昔元相连的糖上的手型碳 C12、C13、C14、C15 和 C16 的构型经 X-单晶衍射分析分别为 R、S、R、R 和 S 型, 该结构数据与已报道的晶体结构数据一致, 根据测定数据和已报道数据, 因此确证 1 为紫丁香苷, 且为 α -D 型葡萄糖苷^[14]。

3 讨论

3.1 紫丁香苷的分离纯化

紫丁香苷对一些疾病的治疗报道已经较多, 它的分离纯化已有较多报道, 之前的报道的纯化方法多为大孔吸附树脂法, 在报道中该方法得到的紫丁香苷纯度低, 而在临床应用上对于它的纯度要求较

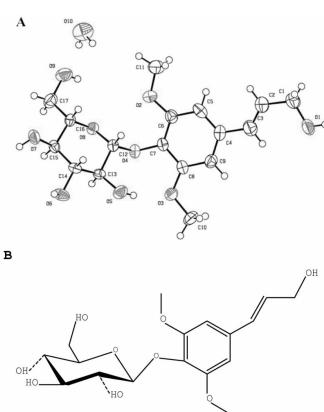


图 2 1 的晶体分子结构椭球图(A)及平面化学结构(B)

Fig. 2 Crystal molecular structure (A) and chemical structure (B) of 1

高。本文建立的紫丁香苷纯化工艺的特点主要体现在: 1)结合了之前大孔吸附树脂分离富集得到高含量的紫丁香苷粗品的优点, 再在此基础上通过制备液相得到了高纯度紫丁香苷 (>98%); 2)本文中所用的制备液相纯化方法, 已经可以满足实验室中试实验的要求, 为进一步大量生产可以提供借鉴; 3)本文建立的制备型高效液相纯化法, 为在线检测, 与非在线方法相比, 具有易于检测, 灵敏度好, 可重复性好, 容易操作的优点; 4)本文试验中使用的分离填料(大孔吸附树脂和 C₁₈)都可反复利用, 而且 C₁₈ 填料在分离纯化方面, 被制备的目标物损失少, 收率高。而在样品色谱条件方面, 曾考察了甲醇-水和乙腈-水对 1 粗提物的分离效果, 结果显示无明显差异, 因此选择甲醇-水, 在生产方面节约了成本。因流动相中甲醇含量过高则目标物保留时间变小, 分离效果变差, 上样量变小; 甲醇含量过小则目标物保留时间变大, 效率变低, 以 20% 甲醇时分离效果最佳, 故选用; 5)制备型液相在国内药物或其前体的纯化和生产方面已经得到了广泛的应用, 本实验也是结合制备液相在分离纯化方面的优势, 旨在为紫丁香的临床制备生产提供借鉴。

3.2 结构确定的方法选择

用核磁共振的方法确定结构, 不仅要测氢谱, 还要测定碳谱, 对于结构的确定较为繁琐, 本试验利用 1 在乙醇和水的混合溶液中可较快结晶的特点且晶型质量较好, 选用了 X-单晶衍射的方法快速的测定, 不仅获得了 1 的晶体结构信息, 并通过晶体结构获得更多的分子结构信息, 准确地确证 1 的为紫丁

香苷,提高了效率。

3.3 从线性放大到非线性放大

制备型 HPLC 不同于分析型 HPLC,更偏重于分离制备,追求的是高产量,一般要超载。对于分析型 HPLC 一般用线性色谱理论来描述,而对于制备型 HPLC 一般用非线性色谱理论来描述。但本试验中用线性色谱理论计算了从分析型色谱柱过渡到 DAC-HB50 动态轴向压缩制备柱的载样量,其基本的假设是保持制备液相系统的化学性质和传质过程保持不变,其上样量乘以线性放大系数,从而确定出 DAC-HB50 动态轴向压缩制备柱的初始上样量,再在此基础上探索最大上样量。

参考文献

- 1 Bi FJ (毕福钧),Zhong SH (钟顺好),Chen G (陈蒿),et al. Simultaneous determination of syringin and pedunculoside in *Ilex rotunda* Thunb by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2010,41:1386-1388.
- 2 Ríos JL,Giner RM,Prieto JM. New findings on the bioactivity of lignans. *Stud Nat Prod Chem*,2002,26:183-292.
- 3 Dong Y (董杨),Liu SM (刘树民),An LF (安丽凤),et al. The effect of Eleutheroside B on ERK1/2 of MPP⁺-induced PC12 cells. *J Molecul Diagnostics Therapy* (分子诊断与治疗杂志),2011,3:155-158.
- 4 Song YY (宋媛媛). Anti-inflammatory and immunomodulatory actions of syringin and its mechanism. Yangzhou: Yangzhou University (扬州大学),MSc. 2011.
- 5 Wang Z (汪琢),Jiang SG (姜守刚),Zhu YG (祖元刚),et al. Extraction and separation of syringin in *Eleutherococcus senticosus* and its antitumor effect study. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药),2010,21:752-753.
- 6 Fan RQ (樊如强),Jin XR (金学英),Hu R (胡荣),et al. Study on separation and purification of syringin,aleuteroside E and isofraxidin from *Acanthopanax Senticosus* by macroporous resin. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学),2014,31:302-307.
- 7 Cao AL (曹爱兰),Shi WJ (史文静),Zhang Q (张俏),et al. Optimization of separation and purification technology of syringin in *Acanthopanax obouatus* with macroporous absorption resin. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志),2013,19:62-64.
- 8 Liu C (刘聪),Jin CC (金川粲),Liu T (刘甜). The research of syringoside content determination method and extraction process from *syringa* leaves. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药),2013,22:24.
- 9 Liu YM (刘彦民),Yang YZ (杨燕子),Luo DQ (罗定强),et al. Determination of syringin in nine species of medicinal materials by HPLC. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志),2008,23:286-288.
- 10 Sie ST,van den Hoed N. Preparation and performance of high-efficiency columns for liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*,1969,7:257-266.
- 11 DeStefano JJ,Beachell HC. Performance of larger diameter columns for high speed liquid-solid chromatography. *J Chromatogr Sci*,1972,10:654-662.
- 12 Knox JH,Pareher JF. Effect of column to particle diameter ratio on dispersion of unsorbed solutes in chromatography. *Anal Chem*,1969,41:1599-1606.
- 13 Zhu LQ (祝立群). Linear amplification -effective technology of preparation liquid chromatography. *Mod Sci Instru* (现代科学仪器),2001,5:72-73.
- 14 Yin RJ,Wang XB,Kong LY. Syringin monohydrate. *Acta Crystallogr,Sect E*,2006, 62:5728-5730.