

半制备高效液相色谱法分离 纯化川木通中齐墩果酸

杨胜丹¹, 余林春², 付大友³

(1. 四川天正化工有限责任公司, 四川 成都 610218 2. 四川省天然气化工研究院,
四川 成都 610212 3. 四川理工学院 材料与化学工程学院, 四川 自贡 643000)

摘 要: 采用半制备高效液相色谱法对川木通中有效成分齐墩果酸进行分离纯化, 纯化齐墩果酸的制备色谱条件: 半制备型色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (9.4 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-水 = 87:13, 流速 3 mL/min, 柱温室温, 检测器 VWD 检测器, 波长 210 nm, 进样量 20 μL。对制备出的馏分进行定性分析。该法具有纯化效果好、操作高效、快速的特点。

关键词: 川木通; 齐墩果酸; 分离; 纯化; 半制备高效液相色谱法

中图分类号: O 657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3206(2011)01-0173-03

Isolation and purification of oleanolic acid in *caulis clematidis amandii* by semipreparative HPLC

YANG Sheng-dan¹, YU Lin-chun², FU Da-you³

(1. Sichuan TianZheng Chemical Co., Ltd., Chengdu 610218, China 2. Sichuan Chemical
Academy of Natural Gas Chengdu 610212, China 3. Material and Chemical Engineering
College, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract Semipreparative HPLC was used to isolate and purify the active constituent of oleanolic acid from *caulis clematidis amandii*. The preparative chromatography conditions for the preparation of oleanolic acid were established: semipreparative column of ZORBAX SB-C₁₈ (9.4 mm × 150 mm, 5 μm), and mobile phase was acetonitrile-water (87:13), flow rate was 3 mL/min, wavelength was 210 nm, column temperature was room temperature, injection volume was 20 μL. The prepared fractions were analyzed qualitatively. This method has the characteristics of purify effective, efficient operation, and quickly to purify oleanolic acid in *caulis clematidis amandii*.

Key words *caulis clematidis amandii*; oleanolic acid; separation; purify; semipreparative HPLC

川木通为临床常用中药,《中国药典》2005版收载为毛茛科铁线莲属植物小木通 *Clematis amandii* Franch 或绣球藤 *C. Montana buch-Ham* 的干燥根茎。其性寒,味淡苦,入心、肺、小肠、膀胱经,具有利尿通淋,通经下乳之功效,临床常用于治疗水肿、淋病、小便不通、关节痹痛、经闭乳少等症^[1]。齐墩果酸为五环三萜类化合物,是川木通中有效成分之一,通常以游离酸或结成苷的形式存在,具有多种生物活性,是治疗急性黄疸型肝炎和慢性病毒性肝炎比较理想的药物,具有消炎、降血脂、降血糖等功能^[2]。

制备型高效液相色谱 (HPLC) 是在传统的分析型 HPLC 的基础上发展起来的一种高效分离纯化技术,具有产品纯度高、产率高、分离速度快等优点。

本文采用半制备液相色谱分离纯化川木通中齐墩果酸对制备条件进行优化,考察了流动相比例、流速等因素,研究确定半制备液相色谱法制备齐墩果酸适宜的制备条件,为日后对齐墩果酸含量高的中药材制备纯品齐墩果酸作参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

川木通饮片,市售;齐墩果酸对照品 (昆明科祥

收稿日期: 2010-09-30 修改稿日期: 2010-10-18

作者简介: 杨胜丹 (1984-), 女, 四川都江堰人, 硕士研究生, 主要从事分析化学方法的研究与应用方面的研究。电话: 15928581856 E-mail: ysdwork@163.com

生物科技有限公司, 批号 081202, 含量大于 98%); 甲醇、乙腈均为色谱纯; 乙醇、盐酸、氯仿均为分析纯; 纯净水。

Agilent 1200 半制备/分析型高效液相色谱仪 [四元梯度泵], VWD 检测器, Agilent 1200 色谱工作站; AR1140 电子天平; CW-2000 型超声微波协同萃取仪; RE-2000 型旋转蒸发仪; 美的 PJJ7F-F(Q) 型微波炉; F120 型中药粉碎机; DHG-9075A 电热鼓风干燥箱; SHB-III 循环水式多用真空泵。

1.2 实验方法

1.2.1 样品溶液的制备^[4] 取川木通药材粉末 (过 80 目筛) 5 g 精密称定, 加入微波专用提取罐中, 加 90% 乙醇 45 mL, 60 W 微波提取 5 min, 放冷后过滤。滤液减压浓缩至干, 加 2 mol/L 的盐酸 20 mL 进行微波低火水解 5 min, 水解液用氯仿萃取 2 次 (20 mL, 15 mL), 合并萃取液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL 容量瓶中。重复以上操作 10 次, 收集到 50 mL 的样品溶液, 浓缩约至 25 mL, 备用。

1.2.2 分析型液相色谱条件 分析型色谱柱: Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 = 87:13, 流速 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, VWD 检测器, 波长 210 nm, 进样量 10 μL。

1.2.3 半制备液相色谱条件 半制备型色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (9.4 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 = 87:13, 流速 3 mL/min, 柱温室温, VWD 检测器, 波长 210 nm, 进样量 20 μL。收集 9.6 min 馏分。

2 结果与讨论

2.1 制备条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 通过对样品紫外全光谱扫描, 确定齐墩果酸在 205 nm 处有最大吸收波长, 考虑到甲醇在紫外的吸收情况, 本实验选用 210 nm 作为检测波长。

2.1.2 流动相体系及配比的选择 实验选用乙腈-水作为半制备液相色谱的流动相配比。实验表明, 乙腈-水 (87:13) 时, 分离效果好, 所有组分出峰情况与分析型液相色谱相似, 便于进行对照。故选用乙腈-水 (87:13) 作为半制备液相色谱的流动相。

2.1.3 流动相流速的选择 考察了流速分别为 2, 3, 4 mL/min 时, 齐墩果酸对照品溶液的出峰情况。结果表明, 增加流速使得齐墩果酸出峰时间缩短, 但溶剂使用量也增大。考虑到在半制备型高效液相色谱中, 流速增加时, 因固定相内扩散阻力起到控制作

用, 溶质组分在固定相和流动相两相之间的分配偏离分配平衡的幅度增加, 使得分离能力降低, 色谱峰扩展加剧, 因而溶质稀释程度增加, 流动相消耗增大, 也增加了经济负担。综合各种因素, 实验选择 2, 3 mL/min 的流速对样品溶液的分离效果进行考察。结果表明, 流速 2 mL/min 时样品溶液全部出峰完约 41 min; 流速 3 mL/min 时样品溶液全部出峰完约 28 min。在进行制备时流速 2 mL/min 的循环周期长, 且制备一次时, 两种流速所用的溶剂量相差不多, 因此选用 3 mL/min 的流速进行分离制备, 且分离效果好。

2.1.4 柱温及进样量的选择 使用制备用的色谱柱时, 半制备液相不能控温, 因此实验时的柱温为室温 (22~25 °C)。考虑到进样量过大, 柱子的分离效能会下降, 所以选用进样量为 20 μL。

2.1.5 制备色谱条件最终的确定 具体制备色谱条件如下: 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (9.4 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 = 87:13, 流速 3 mL/min, 柱温室温 (22~25 °C); 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL。

样品溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按上述最终制备条件进样, 半制备液相色谱图见图 1。收集 9.6 min 馏分 I。

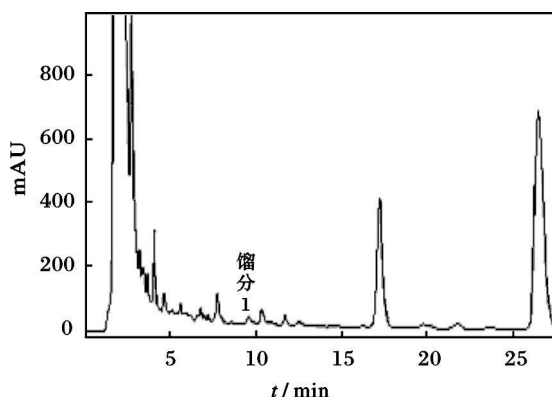


图 1 样品溶液的半制备液相色谱图

Fig 1 Chromatography of sample solution by semipreparative HPLC

2.2 定性分析

2.2.1 质谱定性^[5] 用质谱对样品溶液中齐墩果酸进行定性, 质谱离子源采用电喷雾离子源, 以正模式方式扫描, 从扫描质谱图中获得样品中齐墩果酸的分子离子峰位 $[M + Na]^+$ m/z 480.4 可确定样品中存在齐墩果酸。

2.2.2 HPLC 定性 将收集的齐墩果酸馏分、齐墩果酸对照品溶液和样品溶液在 HPLC 分析条件下进样分析, 见图 2~图 4。

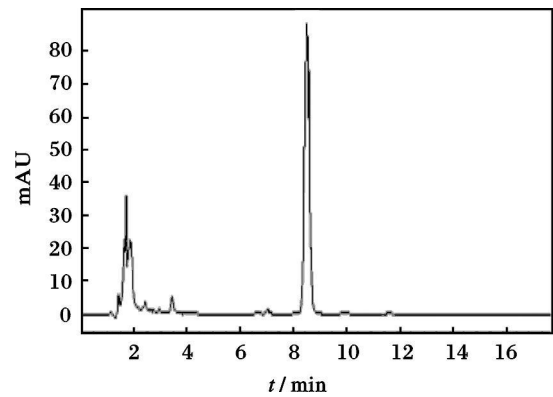


图 2 对照品溶液 HPLC 色谱图
Fig 2 HPLC chromatogram of oleanolic acid sample solution

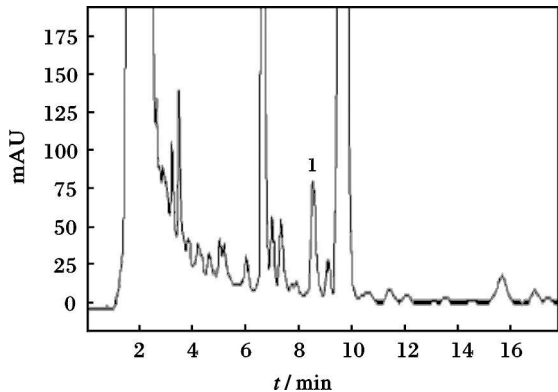


图 3 样品溶液 HPLC 色谱图
Fig 3 HPLC chromatography of sample solution

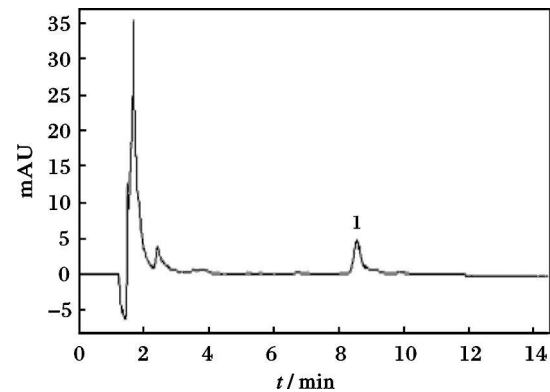


图 4 半制备液相色谱纯化后的齐墩果酸馏分
(馏分 I) HPLC 色谱图
Fig 4 HPLC chromatogram of oleanolic acid fraction
(fraction I) after purification by semi-preparative HPLC

由图 2~图 4 可知, 齐墩果酸峰保留时间一致, 说明所收集的馏分就是齐墩果酸。

由于时间关系, 本文只对齐墩果酸馏分进行定性分析, 定量分析有待进一步研究。

3 结论

(1) 用半制备高效液相色谱法, 以乙腈-水为流动相, 从川木通样品溶液中分离纯化齐墩果酸, 纯化齐墩果酸的半制备色谱条件为: 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (9 4 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 = 87: 13 流速 3 mL/min, 柱温室温 (22~ 25 ℃), 检测器 VWD 检测器, 波长 210 nm, 进样量 20 μL。

(2) 半制备高效液相色谱法纯化川木通中齐墩果酸具有分离条件简单、纯化效果好、操作高效、快速的特点。

参考文献:

[1] 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种和质量研究 (第三册) [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996 47-49

[2] 田丽婷. 齐墩果酸药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2002 27(12): 884-886

[3] 王永禄, 王丽瑶. 制备型高效液相色谱法及其在中药研究中的应用 [J]. 中医药通报, 2006 5(3): 60-63

[4] 杨胜丹, 付大友, 谭文渊, 等. 超声-微波协同萃取川木通中齐墩果酸的工艺研究 [J]. 应用化工, 2010 32(2): 120-122

[5] 杨胜丹, 王蓉, 付大友, 等. 微波辅助萃取-HPLC-MS 测定川木通中齐墩果酸的含量 [J]. 安徽农业科学, 2010 38(13): 6929-6931.

(上接第 163 页)

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版 (二部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005 711-713

[2] 杨彩琴, 王静, 林玉龙, 等. 氟康唑脂质体的制备工艺研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(14): 1111-1114

[3] 王雪明, 冯端浩, 李俊山. HPLC 测定酮康唑脂质体凝胶的含量 [J]. 华西药学杂志, 2003, 18(6): 455-456

[4] 湛章和, 谢云, 肖学成, 等. 高效液相色谱法测定硝酸咪康唑凝胶的含量 [J]. 医药导报, 2001, 20(8): 517-518

[5] 唐素芳, 左文坚. RP-HPLC 测定注射用卡莫司汀脂质体的药物含量及包封率 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(14): 553-555

[6] 董迪, 刘红梅, 宋笑丹, 等. 反相高效液相色谱法测定伊曲康唑脂质体药物含量及包封率 [J]. 药物分析杂志, 2007 27(9): 1453-1455