

文章编号:1002-1124(2005)09-0007-02

## 制备色谱法制备京尼平甾酸\*

邹登峰<sup>1</sup>,何翠微<sup>1</sup>,朱华<sup>2</sup>,谢爱泽<sup>2</sup>,傅鹏<sup>1</sup>

(1. 广西中医学院, 广西南宁 530001; 2. 桂林医学院, 广西桂林 541004)

**摘要:**本文建立了从两种药材中快速分离制备京尼平甾酸的高效液相色谱方法。药材水提取物用硅胶柱层析法纯化后,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-PDA 和 LC-MS 法定性定量分析,得到高纯京尼平甾酸单体,方法简便、快速、成本低。

**关键词:**制备色谱;京尼平甾酸

**中图分类号:**O658 **文献标识码:**A

## Preparation of GPA by preparation chromatography\*

ZOU Deng-feng<sup>1</sup>, HE Cui-wei<sup>1</sup>, ZHU Hua<sup>2</sup>, XIE Ai-ze<sup>2</sup>, FU Peng<sup>1</sup>

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China; 2. Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

**Abstract:** A method for preparation of geniposidic acid by Preparation Chromatography was established in this article. The crude extract was obtained after plant was extracted with water and the extract was purified by silica gel column. Then flash preparation liquid chromatography was used to isolate GPA according to the chromatogram. The structure was identified by HPLC-PDA and LC-MS. This method was sample, fast and low cost.

**Key words:** flash preparation chromatography; geniposidic acid

京尼平甾酸是杜仲和车前子中主要的生物活性物质之一。杜仲和车前子是我国传统的名贵药材,《神农本草经》和《本草纲目》都记载具多种药理作用<sup>[1-4]</sup>。京尼平甾酸市场需求量大,价格昂贵,然而,要得到纯度较高的京尼平甾酸(>80%)并非易事。为此,本文对京尼平甾酸的柱层析-快速制备液相色谱分离纯化工艺进行了研究,得到了较理想的分离纯化工艺。方法快速,只需20min,产品纯度高达98.69%,易于实现工业制备。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂和材料

分析型高效液相色谱仪(SHIMADZU 2010A), SPD-PDA检测器;ODS-C<sub>18</sub>色谱柱(250mm×4.6mm);制备型高效液相色谱仪(自主装配:Pure 2811C<sub>18</sub>柱,天津茂名高新技术有限公司);882313型紫外检测仪;LM17型记录仪;LCQ型电喷雾质谱(全扫描 Finnigan 公司)。

甲醇(色谱纯);分析型高效液相色谱所用水为石英亚沸水;氯仿,石油醚,乙酸乙酯,正丁醇等均为分析纯;GPA标准品(98%),(日本和光纯药工业株式会

社);层析用硅胶(100~200目,青岛海洋化工厂);杜仲原料(湖南张家界);车前子(湖南长沙三九药店)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 色谱条件

制备色谱系统 色谱柱:Pure 2811C<sub>18</sub>, 250mm×8mm, 粒径, 20~40μm; 流动相: 甲醇:水:乙酸=40:60:0.5(v/v); 检测波长 254nm; 进样体积 2.5mL; 进样量 100mg; 柱温为室温。

分析色谱系统 色谱柱为 ODS-C<sub>18</sub>(150mm×4.6mm, 5μm, 日本岛津); 流动相为 甲醇:水:乙酸=20:79.5:0.5(v/v), 流速 1.0ml·min<sup>-1</sup>, 检测波长 237nm, 柱温 25℃, 进样量 10.0μL, 同时进行 PDA 检测, 波长扫描范围 190~600nm。

柱色谱系统 使用 68cm×25mm 的开口玻璃柱(自制), 经预处理活化过的硅胶(100~200目, 青岛海洋化工厂), 作为固定相, 干法装柱用氯仿:甲醇=10:1 和 8:1 洗脱, 收集 8:1 洗脱液, 去除溶剂后甲醇溶解进行制备色谱分离。

1.2.2 样品的处理 干燥药材粗粉 10g 于提取器中, 加入 100mL 水, 在 60℃ 恒温水浴锅中提取 1h, 提取次数为 3 次, 过滤, 合并滤液。滤液减压蒸馏至近干, 40mL 甲醇溶解后进行硅胶柱色谱纯化。纯化后的溶液按 1.2.1 制备色谱方法进行分离。

1.2.3 结构鉴定 LC-ESI-MS: 流动相与 HPLC 流动相相同, 检测波长为 237nm, 质量扫描范围: 150~800m·z<sup>-1</sup>, 分辨率 13000 m·z<sup>-1</sup>/sca, skimmer: -40volt,

收稿日期:2005-07-04

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划项目(90209047);湖南省科研计划项目(02JZY3029)

作者简介:朱华(1959-),男,广西南宁人,博士,教授,博士生导师。

cut off :50m z<sup>-1</sup>; UV:HPLC - PDA 扫描, 波长扫描范围 190~600nm。并与标准品对照。

1.2.4 纯度测定 采用外标法定量, 京尼平甙酸的进样量在 4.0~16.0μg·mL<sup>-1</sup>时进样量  $X$  (μg·mL<sup>-1</sup>)与峰面积  $Y$  之间呈良好的线性关系。相关线性方程为  $Y_{GPA} = 23114 + 27273.775X$ ,  $r = 0.9989$ 。

## 2 结果和讨论

### 2.1 流动相的选择

有文献报道采用梯度洗脱法<sup>[5]</sup>, 采用含酸流动相可将京尼平甙酸和桃叶珊瑚甙分离, 而我们在实验中得到了与之相背的结论: 在反相 C<sub>18</sub>柱上, 京尼平甙酸需要加入酸性流动相才能洗脱下来, 而酸性流动相很难洗脱下桃叶珊瑚甙(约需 3h)。其原因为京尼平甙酸为, 不饱和羧酸, 其酸性与乙酸相近(pK<sub>a</sub>: 乙酸, 4.76; 丙烯酸, 4.26; 京尼平甙酸与丙烯酸羧基周围结构相近), 而桃叶珊瑚甙几乎没有酸性, 在反向液相色谱柱上, 被分离物的酸碱性对色谱分离影响很大。本文依据分析型高效液相色谱条件和分离结果, 采用等度洗脱, 试验了流动相甲醇:水:乙酸 = 20:80:0.5, 30:70:0.5, 40:60:0.5, 50:50:0.5 (v/v)。

发现流动相中甲醇含量对京尼平甙酸与其它杂质的分离影响巨大。当流动相中甲醇含量大于 50%时, 京尼平甙酸与其前面的色谱峰达不到分离, 而当流动相中甲醇含量小于 30%时, 京尼平甙酸的出峰时间较长, 在达到一定分离度的基础上, 采用甲醇:水:乙酸 = 40:60:0.5(v/v)的流动相, 制备色谱图见图 1、2。

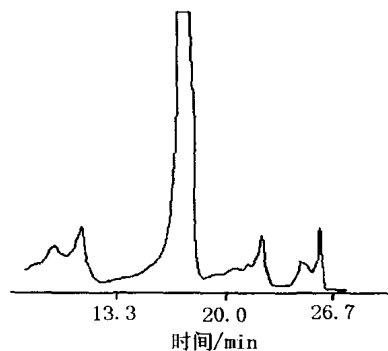


图1 杜仲样品制备色谱图

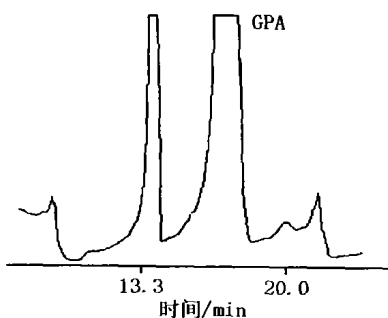


图2 车前子样品制备色谱图

### 2.2 流速及进样量的确定

流动相流速对京尼平甙酸与其它杂质的分离影响很大, 实验表明最佳流速为 2.5mL·min<sup>-1</sup>左右; 保持进样体积不变, 随进样量增大, 分离度降低, 实验确定进样量为 100mg。

### 2.3 定性鉴定

2.3.1 PDA 检测 通过 HPLC 附带的 PDA 扫描, 获得供试品溶液的紫外光谱, max(nm) 为 237nm, 与对照品溶液的紫外光谱图一致。

2.3.2 LC-ESI-MS 供试品溶液的正离子 ESI-MS 图谱中, 在 375.3、397.2 和 413.3nm 处有强的离子峰。用正离子源为离子化方式对供试品进行分析, 由于该方法易形成 [M + Na]<sup>+</sup> 和 [M + K]<sup>+</sup> 的离子峰, 而此两者的质量数相差 16<sup>[6]</sup>, 根据一组相近的质量数相差 16 的离子峰可以推断出供试品中主要成分的分子量为 374.3, 与标准品一致。

$397.2 - 375.3 = 21.9 (M_{Na^+})$ ;  $413.3 - 375.3 = 38 (M_{K^+})$ ;  $413.3 - 397.2 = 16.1 (M_{Na} - M_{K})$

2.3.3 HPLC 与对照品共注射进行 RP-HPLC 实验, 发现峰高增加, 保留时间一致。

### 2.4 定量分析

将收集到的洗脱液减压蒸馏后, 冷冻干燥得白色粉末, 采用分析型高效液相色谱, 保留时间定性, 外标法定量, 测得其中京尼平甙酸含量为 98.69%。

## 3 结论

采用柱层析-快速制备液相色谱法从杜仲皮和车前子中制备高纯京尼平甙酸(GPA)单体, 方法快速, 时间短, 只需不到 20min, 产品纯度高达 98.69%, 仪器要求不高, 可完全自主装配, 直接可用于产品制备。

### 参 考 文 献

- [1] Sun XY, Sun FPY. Shennong Bencao Jing. [M]. Taiyuan: Shanxi Science and Technology Publishing House, 1991. 41 - 42.
- [2] Li SZ. Bencao Gangmu. Beijing: The People's Health Publishing House, 1987. 1986 - 7.
- [3] 杨峻山, 张聿梅. 杜仲研究的现状与展望[J]. 自然资源学报, 1997, 12(1): 60 - 67.
- [4] 赵军太, 张诚. 杜仲不同部位的化学成分研究与应用[J]. 实用医技杂志, 2003, 10(9): 1025 - 1026.
- [5] 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.
- [6] 陈貌连, 宋凤瑞, 郭全明, 等. 刺五加叶中黄酮类化合物的结构鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 805 - 808.