

芫花酯甲的快速 TLC 纯化技术与鉴定

王玲¹, 李尧尧², 孙婷婷², 刘延泽^{3*}

(1. 河南中医学院药学院, 郑州 450008; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 制备高纯度、低成本的芫花酯甲对照品。方法: 采用硅胶柱-制备 TLC 制备芫花酯甲单体, 通过 HPLC 分析纯度, NMR 确定结构。结果: 硅胶柱-制备 TLC 比制备液相成本低, 未发现可见杂质斑点, 所得单体纯度较好。结论: 该方法解决了本品在分离纯化方面高消耗低产出的难题, 为芫花萜类化合物的研究与开发提供参考。

[关键词] 芫花酯甲; 制备 TLC; 纯化技术

[中图分类号] R284.2, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0041-03

[doi] 10.11653/syfy2013150041

Rapid TLC Purification and Identification of Yuanhuacine

WANG Ling¹, LI Rao-rao², SUN Ting-ting², LIU Yan-ze^{3*}

(1. College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare yuanhuacine reference with high purity and low cost. **Method:** Yuanhuacine was obtained by Silica gel column-preparative TLC method. Purity of yuanhuacine was determined by RP-HPLC and structure was identified by NMR. **Result:** Cost of silica gel column-preparative TLC method was lower than preparative HPLC, no visible impurity spot, purity of prepared yuanhuacine was good. **Conclusion:** Problem of high cost, low yield of yuanhuacine in preparation could be resolved by this method, it provided a reference for research and development of terpenoids in *Daphne genkwa*.

[Key words] yuanhuacine; preparative TLC; purification technology

芫花酯甲是一种细胞毒成分^[1], 为应百平等^[2]从芫花根中分离得到, 具有强烈的皮肤刺激性, 资源短缺、人工合成尚未能实现。随现代细胞及基因技术的发展, 芫花酯甲及其类似物的研究再次受到瞩目, 尤其是其强抗 DNA Topo I 活性, 被纳入了抗癌药物研究, 利用 HPLC 制备该化合物^[3]。亦有从芫

花叶中利用硅胶柱色谱等分离得到芫花酯甲^[4-5], 但均存在过程复杂、代价昂贵的缺点。本实验拟采用硅胶柱-制备 TLC 制备高纯度的芫花酯甲, 为降低该成分的提取分离成本提供实验依据。

1 材料

Waters 1575 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 360 型核磁共振仪(美国 Varrian 公司)。水为纯净水, 氘代试剂为 CDCl₃, 试剂均为分析纯。芫花叶采自河南新县, 由河南羚锐制药股份有限公司熊维政主任药师鉴定为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 提取分离 取芫花叶用 95% 乙醇回流提取 2 次, 提取液浓缩至一定浓度, 放置出现黑色沉淀。用

[收稿日期] 20121128(009)

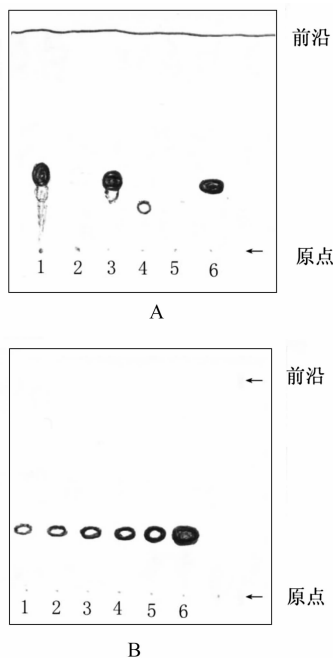
[基金项目] 北京自然科学基金项目(7112097)

[第一作者] 王玲, 大专, 实验师, 从事中草药化学实验研究与管理, Tel: 0371-65962746, E-mail: 465533397@qq.com

[通讯作者] * 刘延泽, 博士, 教授, 从事中草药化学成分与新药发现技术研究, Tel: 010-57833035, E-mail: yzliu@implad.ac.cn

无水乙醇加热溶解, 分次加入活性炭回流 30 min, 活性炭用量以液体变为淡黄色为准。滤过, 滤液浓缩至干后拌入硅胶中进行硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, TLC 检测, 收集含有芫花酯甲的组分, 回收溶剂, 即得芫花酯甲粗品。

2.2 硅胶柱-制备 TLC 纯化 取上述芫花酯甲粗品 200 mg, 溶解于适量二氯甲烷-甲醇(98:2)混合溶剂中, 拌入硅胶进行快速洗脱干柱色谱, 用混合溶剂洗脱, 收集洗脱液, 进行 TLC 检测, 合并含酯甲成分。由于在 TLC 和 HPLC 中仍可检测到少量杂质, 故进一步用制备 TLC 精制, 展开剂二氯甲烷-甲醇(98:2)。将刮取的芫花酯甲色谱带用甲醇洗脱, 洗脱液浓缩至干, 即得芫花酯甲纯品 81 mg。柱色谱组分、分离前粗品及纯化后芫花酯甲 TLC 见图 1。



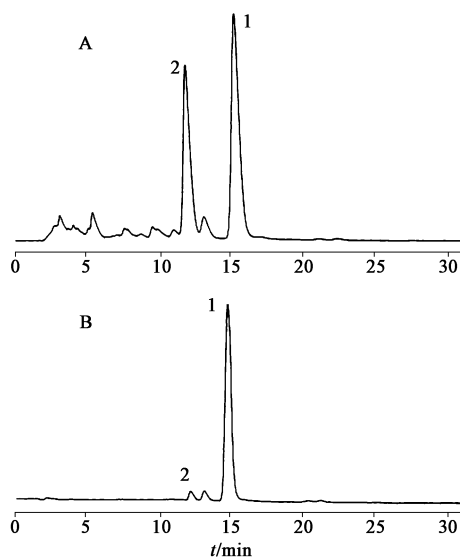
A1. 上柱样品; A2. Fr 1 ~ 14; A3. Fr 15 ~ 22;
A4. Fr 23 ~ 24; A5. Fr 25-; A6. 纯化后样品;
B1 ~ B6. 纯化后质量浓度依次递增的点样量

图 1 芫花酯甲 TLC

由图 1 可知, 硅胶洗脱干柱色谱去除了大部分极性杂质, 得到了极性较强的一个单点组分, 由于量较少, 未做进一步鉴定。加大点样量进行检测, 未发现可见杂质斑点。通过调整溶剂系统进行重结晶, 芫花酯甲纯度将会进一步提高。

2.3 HPLC 分析

2.3.1 色谱条件 YMC ODS C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-0.5% 乙酸(85:15)等度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温室温, 检测波长 232 nm, 进样量 20 μ L, 见图 2。



A. 纯化前样品, B. 纯化后样品; 1. 芫花酯甲; 2. 芫花酯癸^[5]

图 2 硅胶柱-制备 TLC 纯化前后芫花酯甲的 HPLC

经面积归一化计算, 芫花酯甲纯度 97.52%。由于芫花酯癸的原酸酯链上比芫花酯甲多一个共轭双键(图 3), 显示有更强的紫外吸收, 故在样品中实际含量应比同样波长检测出的比例要小。

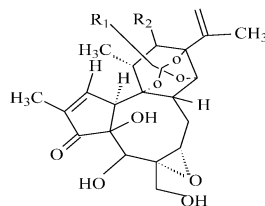


图 3 芫花酯甲 ($R_1 = -(CH=CH)_2-(CH_2)_4-CH_3$;
 $R_2 = -OCOC_6H_5$) 和芫花酯癸 ($R_1 = -(CH=CH)_3-(CH_2)_2-CH_3$;
 $R_2 = -OCOC_6H_5$) 的结构式

2.4 NMR 分析 为进一步确定纯化的芫花酯甲结构和纯度, 又检测了其¹H NMR 和¹³C NMR 谱(图 4), 最终确定为芫花酯甲纯品^[3]。

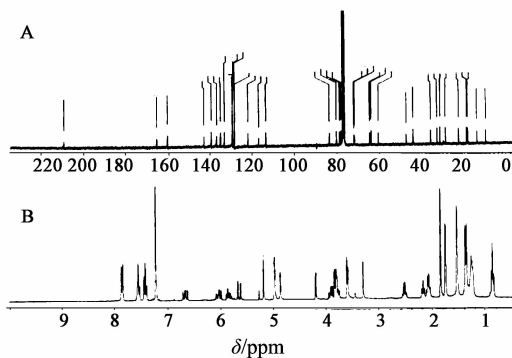


图 4 纯化芫花酯甲的¹H NMR(A)和¹³C NMR(B)

焦栀子炮制前后熊果酸含量变化

杨海玲¹, 覃葆^{1*}, 李琴², 黄华艳¹, 吴尤娇¹, 徐信¹, 詹祖勇¹

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001;

2. 广西玉林制药集团有限责任公司, 广西 玉林 537001)

[摘要] 目的: 考察焦栀子炮制前后熊果酸含量变化。方法: 采用 Inersil ODS-2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(90:10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C。结果: 焦栀子炮制前后熊果酸含量大小顺序为生品(中)(1.03 mg·g⁻¹) > 生品(小)(0.68 mg·g⁻¹) > 生品(大)(0.57 mg·g⁻¹) > 炒焦(0.12 mg·g⁻¹) > 炒焦(轻)(0.11 mg·g⁻¹) > 炒焦(重)(0.09 mg·g⁻¹)。结论: 加热温度与时间对栀子中熊果酸含量有一定影响, 炒焦后熊果酸含量降低。

[关键词] 栀子; 炒焦; 熊果酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.3, R284.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-9903(2013)15-0043-03

[doi] 10.11653/syfy2013150043

Comparison of Ursolic Acid Content in Fructus Gardeniae Praeparatus before and after Processing

YANG Hai-ling¹, QIN Bao^{1*}, LI Qin², HUANG Hua-yan¹, WU You-jiao¹, XU Xin¹, ZHAN Zu-yong¹

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Yulin Pharmaceutical Co. Ltd, Yulin 537001, China)

[Abstract] **Objective:** To compare ursolic acid content in Fructus Gardeniae Praeparatus before and after

[收稿日期] 20121218(015)

[基金项目] 国家科技特派员项目(2009GJE10028)

[第一作者] 杨海玲, 讲师, 硕士, 从事中药炮制教学与质量控制研究, Tel: 15977184822, E-mail: gxyanghl2005@126.com

[通讯作者] * 覃葆, 教授, 从事中药炮制与新药研究, Tel: 13481151916, E-mail: bbythemoon@yahoo.com.cn

3 讨论

芫花酯甲为亲脂性二萜原酸酯类化合物, 具有强烈的皮肤刺激性, 提取、精制过程中要特别小心避免皮肤直接接触或通过蒸汽吸入。硅胶柱色谱是一种有效的初步分离技术, 尤其适合于大规模制备。制备 TLC 操作十分简便, 掌握适当, 适合于制备纯度较高的数毫克至数克级别的纯品。通过进一步重结晶可制备出更高纯度的芫花酯甲。

[参考文献]

- [1] 鞠秀兰. 芫花及其主要有效成分芫花酯甲抗癌活性研究进展[J]. 科技创新导报, 2010, 7(15): 16.
- [2] 应百平, 王成瑞, 周炳南, 等. 芫花根有效成分的研究 I. 芫花酯甲的分离与结构[J]. 化学学报, 1977, 35(22): 105.

- [3] ZHAN Z J, FAN C Q, DING J, et al. Novel diterpenoids with potent inhibitory activity against endothelium cell HMEC and cytotoxic activities from a well-known TCM plant *Daphne genkwa* [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(3): 645.
- [4] 李姚姚, 刘延泽. RP-HPLC 法测定芫花叶中 3 种黄酮苷的含量[J]. 中草药, 2004, 35(7): 822.
- [5] 邓仕任, 夏林波, 董倩, 等. 芫花药材的 HPLC 指纹图谱及 ESI-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 32.
- [6] ZHANG S, ZHANG F, LI X, et al. Evaluation of *Daphne genkwa* diterpenes; fingerprint and quantitative analysis by high performance liquid chromatography [J]. Phytochem Analysis, 2007, 18(2): 91.

[责任编辑 仝燕]