维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0489-04

制备高效液相色谱法从茅莓全草中分离悬钩子皂苷 R_1

任凌燕,李惠芝,王继生,邱宗荫,周成林,徐 霞

(重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:分离纯化茅莓全草中的一种皂苷类成分—悬钩子皂苷 R_1。方法:采用大孔吸附树脂与制备型反相高效液相色谱组合分离技术,将茅莓水提醇沉后的粗制品经大孔吸附树脂柱色谱预分离后,再用 100~200 目硅胶柱色谱分离,用氯仿-甲醇-水-冰醋酸(40:10:1:0.4%)洗脱,收集样品进行制备型 RP-HPLC 纯化精制。结果:产品经熔点、MS、IR、NMR、UV 和 HPLC 图谱鉴定,并与文献比较,证明为悬钩子皂苷 R_1,其纯度 >98%。结论:该方法较为简单可行,重复性好,采用的溶剂系统价廉易得、沸点低、易于回收;悬钩子皂苷 R_1 产品可用做分析方法的对照品。

【关键词】茅莓;悬钩子皂苷 R_1;制备高效液相色谱

【中国图书分类法分类号】R284.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-21

Preparation of suavissimoside R_1 from herb rubi parvifolii by preparative HPLC

REN Lingyan, et al

(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To develop a method for the isolation and purification of suavissimoside R_1 from Herb Rubi Parvifolii. ***Methods***: Macroporous adsorption resin and preparative RP-HPLC, the water extract sedimentated by ethanol was pre-isolated by adsorption resin, and then fractionated by column chromatography on silica gel (100~200 mesh) using chloroform-methanol-water-acetic acid(40:10:1:0.4%). The collected fraction was purified for suavissimoside R_1 by preparative RP-HPLC were combined as pre-pareation method. ***Results***: Suavissimoside R_1 was identified by mass spectrometry (MS), infrared spectrometry (IR), ultraviolet spectrometry (UV), nuclear magnetic resonance (NMR) and high performance liquid chromatography (HPLC), and compared with the relevant literature. The final purity of the compound was more than 98%. ***Conclusion***: The developed method is simple, and reproducible. The solvent is cheap, low in boiling point and easily recovered. The product of suavissimoside R_1 can be used as reference substance for analysis.

【Key words】Herb rubi parvifolii; Suavissimoside R_1; Preparative HPLC

茅莓(*Rubus parvifolius L.*)为蔷薇科悬钩子属植物,具有清热凉血、止血、散结止痛、利尿消肿等功效[1]。文献报道茅莓根中含有悬钩子皂苷 R_1、苦莓苷 F_1 等多个皂苷类化合物[2,3]。本课题组研究发现,以茅莓全草为原料提取得到的茅莓总皂苷具有治疗脑缺血的作用[4]。而进一步研究茅莓中各种皂苷类化合物的药理活性作用及其在体内的代谢情况,以及开发茅莓类新药和常规分析检测,都需要高纯度的皂苷类单体。为此,本文采用制备型 RP-HPLC 色谱方法从茅莓全草中分离获得悬钩子皂苷 R_1 单体。

1 仪器与试剂

LC-6AD 半制备型高效液相色谱仪、SPD-10Avp 紫外-可见检测器、Class-VP 色谱工作站 (日本岛津);SHIMADZU UV-2401PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津);FTIR-8700 型付立叶红外分光光度计(日本岛津)、综合热分析仪(型号:NETZSCH STA449c,德国耐弛公司);BioTOF Q 质谱仪(瑞士 Bruker 公司);600MHz 核磁共振波谱仪 (型号:Bruker AV600)(瑞士 Bruker 公司)。

茅莓药材采集于重庆市璧山县,经重庆市中药研究院生药室李泉森副研究员鉴定为蔷薇科悬钩子属植物茅莓

作者介绍:任凌燕(1978-),女,硕士,主要研究方向:从事中药的研究与开发。

基金项目:重庆市重大科技专项课题资助项目[渝科发计字(2004)27号]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Rubus parvifolius L. 的干燥全草；D101 型大孔吸附树脂（天津农药股份有限公司树脂分公司）；柱色谱用硅胶（100目~200目、300目~400目；青岛海洋化工厂）；薄层色谱硅胶 GF_{254}（青岛海洋化工厂）；其余所有试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 分析色谱 色谱柱：Kromasil C_{18}（250mm×4.6mm，5μm）；流动相：甲醇-HAc 水溶液（pH=3.3）（52:48）；流速：1.0ml/min；检测波长：208nm；柱温：室温；进样量：20μl。

2.1.2 制备色谱 色谱柱：SHIMADZU C_{18}（250mm×20mm，15μm）；流动相：甲醇-HAc 水溶液（pH=3.3）（52:48）；流速：9ml/min；检测波长：208nm；柱温：室温；进样量：1ml。

2.2 粗提取物的制备

将茅莓全草 2kg，加 10 倍水煎煮 2 次，每次 1h。滤过，合并滤液，浓缩至一定体积，加乙醇至含醇量达 50%，搅拌后静置过夜。滤过，减压回收乙醇至无醇味。水溶液上已处理好的大孔吸附树脂 D101 柱（分别用酸、碱冲洗后，用蒸馏水洗至流出液呈中性为止），吸附 1h 后，依次用蒸馏水、40%乙醇进行洗脱，收集 40%乙醇洗脱溶液。减压蒸干后，得总皂苷浸膏 2.5g。再将此浸膏以约 2g 硅胶拌样，采用 125g 硅胶湿法装柱，干法上样，进行硅胶柱色谱分离，以氯仿-甲醇-水-冰醋酸（40:10:1:0.4%）为洗脱剂，TLC 监测（10%硫酸乙醇溶液为显色剂，展开剂同洗脱剂），收集比移值 R_f 约为 0.27 的流份，合并此比移值下的相同流份，减压蒸干后，同法上样，继续反复用硅胶柱层析洗脱，最后得黄白色粉末约 150mg（目标化合物粗品）。

2.3 制备色谱分离

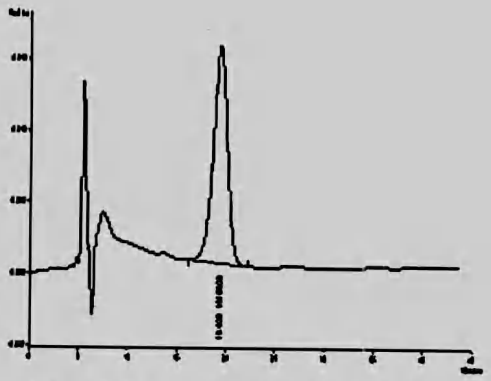


图 1 悬钩子皂苷 R1 HPLC 制备色谱图

将上述粗品用 100ml 甲醇溶解，每次进样 1ml，收集保留时间约为 18~22min 的组分，见图 1。合并所有收集的流出液，减压蒸去有机溶剂（40℃以下）后置冷冻干燥箱内冷冻干燥 24h，最后得到白色絮状物 25mg（目标化合物）。

2.4 样品纯度检测及结构鉴定

2.4.1 晶形确认 取少许冷冻干燥絮状物于表面皿中，加少量无水乙醇溶解，常温下放置 3 天，无色针状结晶析出。

2.4.2 Molish 反应和 Liebermann-Burchard 反应 结果均呈阳性，证明其为三萜类皂苷类化合物。

2.4.3 熔点测定 无明显的熔点，分解点 259~262℃。

2.4.4 薄层色谱检测 采用两种展开体系进行检测，薄层板为自制的 CMC-Na 硅胶 GF_{254} 板。展开剂为氯仿-甲醇-水-冰醋酸（40:10:1:0.4%）时，R_f 约为 0.27；展开剂为正丁醇-乙酸乙酯-水-冰醋酸（30:20:6:1）时，R_f 约为 0.88。展开后，采用 10%硫酸乙醇溶液显色后，至 105℃下烘烤 5min，可见光下见蓝色斑点，无其它杂质点。

2.4.5 紫外检测 目标化合物经紫外光谱扫描，结果表明只在紫外末端略有强吸收，最大吸收波长为 207.8nm。

2.4.6 HPLC 检测 目标化合物经分析型高效液相色谱检测，经面积归一化法计算，其纯度大于 98%，见图 2。

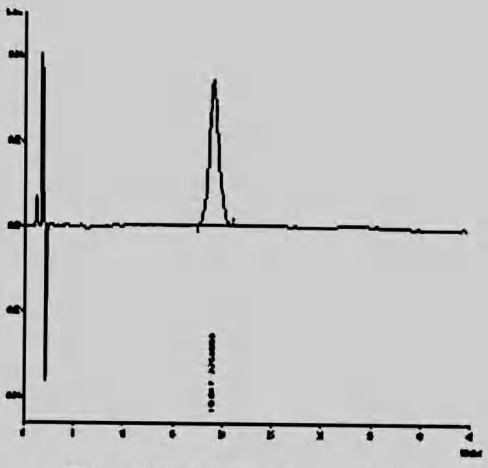


图 2 悬钩子皂苷 R1 HPLC 色谱图

2.4.7 结构鉴定 $IR\nu^{KBr}_{max}cm^{-1}$：3414、2928、1720、1454、1074、1032，见图 3。

ESI-MS（m/z）：703.4$[M+Na]^+$、719.4$[M+K]^+$，见图 4。

^1H -NMR（C_5D_5N，600MHz）δ：1.16，1.23，1.39，

维普资讯 http://www.cqvip.com

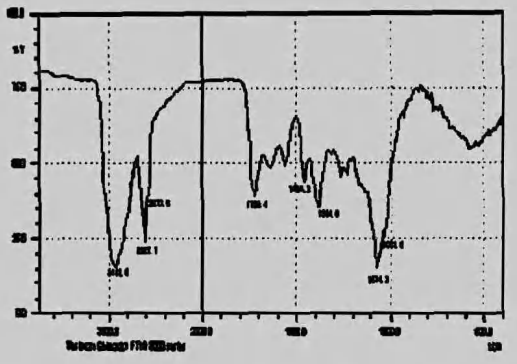


图 3 悬钩子皂苷 R1 的红外吸收光谱图

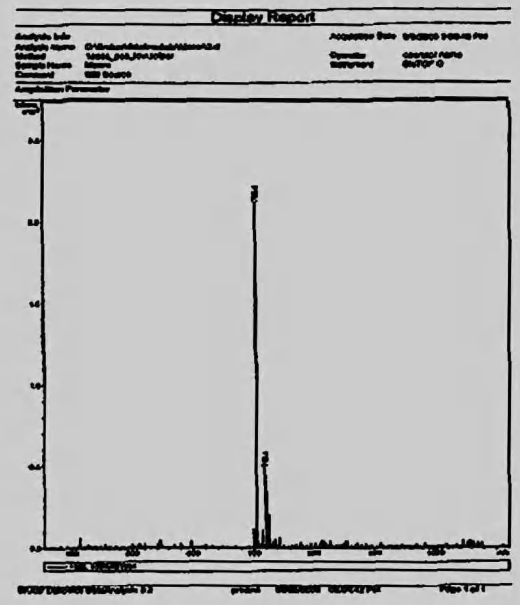


图 4 悬钩子皂苷 R1 的质谱图

1.64，1.74（各 3H，s，5×CH_3），1.07（3H，d，J=6.5Hz，CH_3CH），2.93（1H，s，H-18），4.21~4.47（6H，H-2'，3'，4'，5'，6'），5.55（1H，brs，H-12），6.26（1H，d，J=8.2Hz，H-1'），1.08（H-30），见图 5。

^{13}C-NMR（C_5D_5N，600MHz）δ：48.3（C-1），68.4（C-2），80.8（C-3），54.8（C-4），52.0（C-5），21.2（C-6），33.0（C-7），40.4（C-8），47.9（C-9），38.5（C-10），24.3（C-11）.127.9（C-12），139.1（C-13），41.9（C-14），28.9（C-15），26.5（C-16），48.0（C-17），54.2（C-18），72.4（C-19），41.9（C-20），26.7（C-21），37.5（C-22），179.7（C-23），13.2（C-24），17.1（C-25），17.2（C-26），24.6（C-27），176.7（C-28），28.5（C-29），16.6（C-30），95.6（C-1'），73.8（C-2'），78.7（C-3'），71.0（C-4'），79.1（C-5'），62.1（C-6'），见图 6。

经以上光谱检测，其检测数据与与文献报道[5]的悬钩子皂苷 R_1 的测定结果一致，确定该化合物为悬钩子皂苷 R_1，其分子量：680，分子式：$C_{36}H_{58}O_{12}$。经 HPLC 测定其纯度达到 98%以上，可用作分析的对照品。

3 讨 论

本实验在采用高效液相色谱制备前，把提取的样品进行了大孔吸附树脂及硅胶柱色谱预处理，以去除样品中大量的杂质，利于目标组分的分离和富集，防止对色谱柱污染。

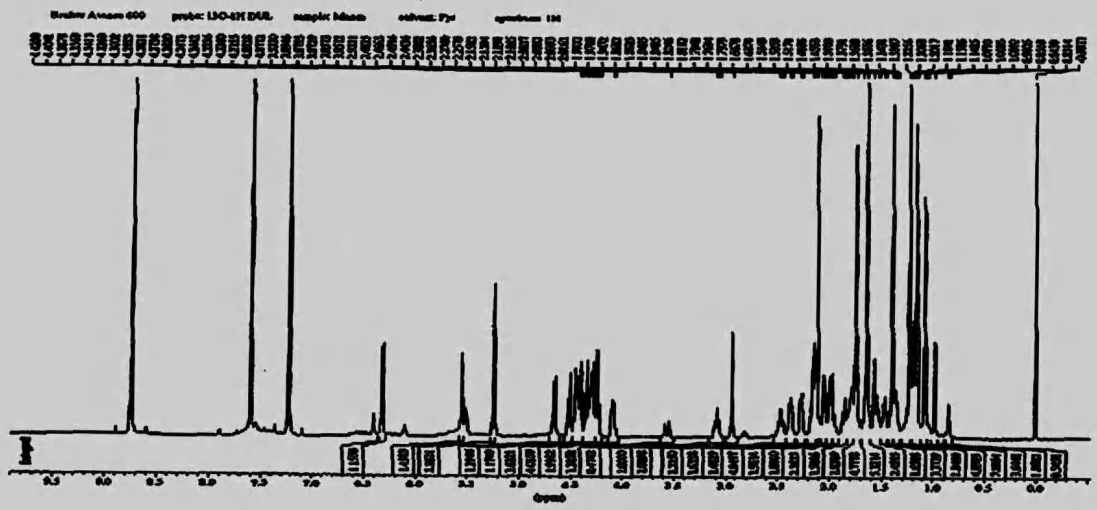


图 5 悬钩子皂苷 R1 的 1H-NMR 谱图

维普资讯 http://www.cqvip.com

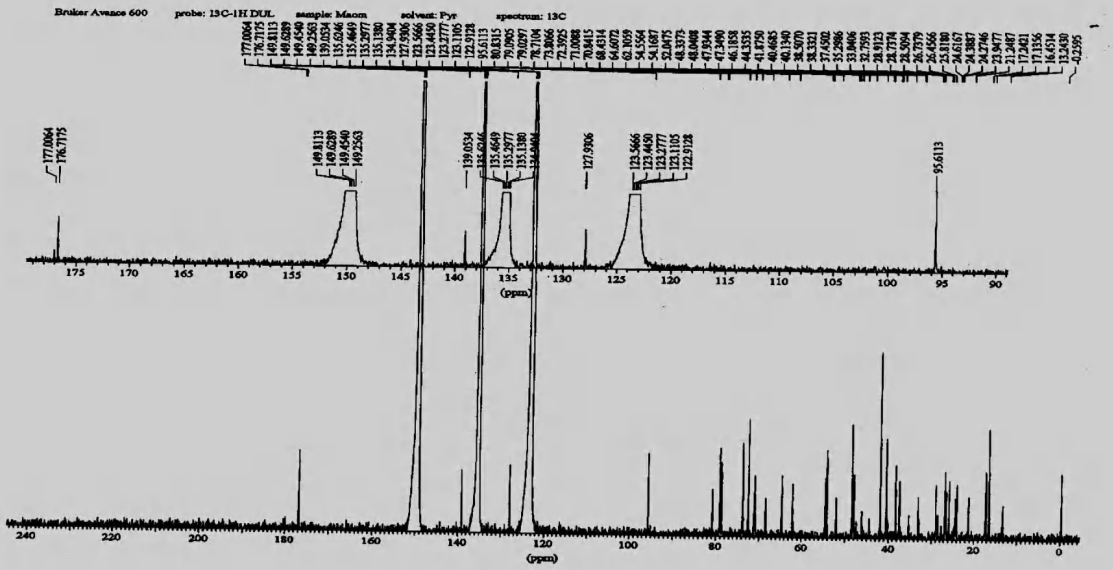


图 6　悬钩子皂苷 R1 的 13C-NMR 谱图

在高效液相制备色谱分离纯化过程中，需要使用大量的流动相作为洗脱溶剂。选择制备色谱的流动相在考虑分离效率时，应该尽量依照组成简单、成本低廉及易回收处理的原则来选择，本研究首先选择甲醇-水体系作为流动相。而制备型色谱条件常是在分析型色谱条件基础上的适当放大，因此分析型 RP-HPLC 的参数在制备色谱中有重要参考价值。

经优化，悬钩子皂苷 R_1 的 HPLC 分析条件中，流动相选择甲醇-水（52:48，冰醋酸调节 pH=3.3）。该流动相粘度适中，加入少量的冰醋酸调节溶液 pH 值，有利于增加溶质分子在反相键合相上的保留时间，提高分离度和色谱的重现性。

在分析型色谱条件基础上对制备型色谱的流动相组成和流速进行研究，结果表明：当选择流动相为甲醇-HAc 水溶液（pH=3.3）（52:48）；流速为 9ml/min；进样量为 1ml/min 时，目标组分主峰保留时间约 20min，整个制备分离在 30min 内完成。

（通讯作者：李惠芝，重庆医科大学教授，联系电话：023-68485727、68806278）

（第一作者现工作单位：重庆科技学院，联系电话：023-66350839）

参 考 文 献

[1] 江苏新医学院.中药大辞典(下)[M].第 2 版，上海：上海科学技术出版社，1997.2699.

[2] 王先荣，杜安全.中药茅莓化学成分的研究[J].中国中药杂志，1994；19(8)：485-486.

[3] 都述虎，冯　芳，刘文英，等.茅莓化学成分的分离鉴定[J].中国天然药物，2005；3(1)：17-20.

[4] 王继生，邱宗荫，夏永鹏，等.茅莓总皂苷对大鼠局灶性脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2，Bax 表达的影响[J].中国药理学通报，2006；22(2)：224-228.

[5] Feng G，Feng-huai C，Tanaka T，et al.19a-hydroxyursane-type triterpene glucosyl esters from the roots Rubus suavissimus S.Lee[J]. Chem Pharm Bull，1985；33(1)：37-40.