

硝酸银改性硅胶柱色谱法纯化川芎精油中的藁本内酯

程媛媛, 杨传彬, 赵佳, 荣建辉* (香港大学李嘉诚医学院中医药学院, 中国 香港)

摘要: 目的 采用硝酸银改性硅胶分离纯化中药川芎精油的活性化合物藁本内酯。方法 传统硅胶层析柱中加入 2% 的硝酸银制备一种新型硝酸银改性硅胶层析柱, 用石油醚-乙酸乙酯(98.5:1.5)进行洗脱, 采用 TLC 和 UV 检测鉴别, 将分离制得的藁本内酯用 GC-MS 进行结构鉴定, 并用 HPLC 峰面积归一法进行纯度检查。结果 从川芎精油中分离得到纯度为 98.87% 的藁本内酯, 可以作为对照品使用。结论 本研究在充分考虑化合物结构特性的基础上, 建立了一种流程简单、成本低, 藁本内酯纯度高的纯化工工艺, 可适用于现代化工业生产。

关键词: 藁本内酯; 硝酸银改良硅胶层析柱; 分离纯化; 气相色谱-质谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)05-0552-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.009

Purification of Z-Ligustilide by AgNO₃-Impregnated Silica Gel

CHENG Yuanyuan, YANG Chuanbin, ZHAO Jia, RONG Jianhui* (School of Chinese Medicine, Li Ka Shing Faculty of Medicine, the University of Hong Kong, Hongkong, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the application of AgNO₃-impregnated silica gel in a format of column chromatography for the isolation and purification of Z-ligustilide from the essential oil of *Ligusticum chuanxiong* Hort.. **METHODS** AgNO₃(2%) was impregnated to the common silica gel to generate a new column chromatographic media. The essential oil was eluted with the mobile phase (petroleum ether: acetoacetate=98.5:1.5), and detected by TLC and UV-Vis spectrometer. The product Z-ligustilide was characterized by GC-MS and HPLC techniques. **RESULTS** Z-Ligustilide with the purity of 98.87% was effectively purified. **CONCLUSION** The present study describes a method for rapid isolation of highly pure Z-ligustilide at low cost, allowing future scale-up for modern industrial production.

KEY WORDS: Z-ligustilide; AgNO₃-silica gel; isolation and purification; GC-MS; HPLC

川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)是伞形科植物川芎的干燥根茎, 是临床常用中药之一, 具有活血行气, 祛风止痛之功效。现代药理研究表明川芎精油能够扩张血管, 改善微循环, 增加血流量, 在预防和治疗脑梗死后的脑缺血方面疗效显著高于低分子右旋糖酐^[1-2]。同时, 川芎精油可通过抑制大鼠下丘脑 COX-2 的表达来减少 PGE-2 的产生, 使中枢体温调定点下调而达解热之效^[3-4]。藁本内酯是川芎精油中最主要的活性成分, 能显著改善缺血再灌注大鼠神经功能, 可通过抑制 ROS 产生和下调 MAPK, NF-κB, AP-1 信号通路的方式起到抗炎的作用^[5]; 通过 PI3K 和 Nrf2 通路对缺氧缺糖造成的神经损伤起到保护作用^[6-7]。藁本内酯的结构见图 1。研究表明, 藁本内酯在对抗肿瘤细胞时可剂量依赖性增加葡萄糖吸收, 显著降低血糖值^[8]。此外, 藁本内酯还具有抗抑郁和皮肤抗皱的作用, 可用于治疗眼睛疲劳, 提高机体

免疫调节等功能^[9]。据文献报道, 对川芎精油进行 GC-MS 分析, 发现其含有约 80 种化学成分, 如水芹烯、松烯、丁烯基酞内酯、藁本内酯、川芎内酯 A 等^[10]。同时, 川芎精油中的藁本内酯和川芎内酯 A, 以及丁烯基酞内酯的结构相似, 造成了利用传统硅胶柱分离高纯度藁本内酯的困难。

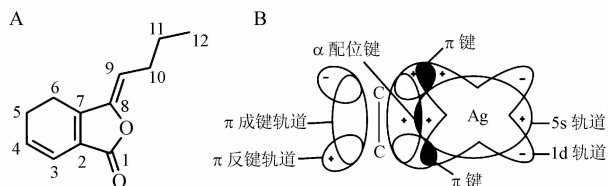


图 1 藁本内酯化学结构式及银离子络合法分离原理

A-藁本内酯的化学结构式; B-银离子与碳碳双键的络合示意图

Fig 1 The chemical structure of Z-ligustilide and schematic of complexation between Ag⁺ and C=C double bond

A-chemical structure of Z-ligustilide; B-the schematic of complexation between Ag⁺ and C=C double bond

银离子络合法是基于银离子与不饱和有机物

碳碳双键络合反应的分离方法^[11-13]。有文献报道利用硝酸银处理过的硅胶色谱法可以较为满意的从部分中药中提取分离出活性成分,如黄汉昌等^[14]采用银离子配位色谱法成功分离出香茅次油中 β -榄香烯;陈晓等^[15]利用银离子络合萃取法分离纯化出烟叶中的茄尼醇;陈文利等^[16]采用银离子络合萃取法纯化出低脂中的花生四烯酸。此外,肖崇厚等^[17]依据银离子络合原理成功从月桂油中将结构类似的二萜成分分离。在此基础上,本研究充分考虑到藁本内酯及其类似物的结构特征,针对性建立了一种用硝酸银改性硅胶分离纯化中药川芎精油的活性化合物藁本内酯的方法,流程见图2。

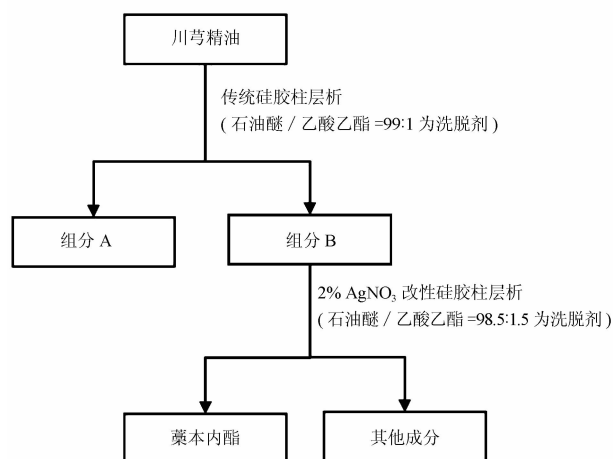


图2 川芎精油中藁本内酯纯化流程图

Fig 2 Scheme for the purification of Z-ligustilide from *Ligusticum chuanxiong* Hort. essential oil

1 仪器和方法

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,包括 Waters 626 Model LC 泵, Waters 996 紫外检测器, Waters 600S Model 系统控制器和色谱工作站); Agilent 气相色谱与质谱联用仪(美国 Agilent 公司,包括 Agilent 6890N 气相色谱仪, Agilent 7653 连续进样器, Agilent 5973 质谱检测仪和 Agilent ChemStation 色谱工作站); Lambda 35 紫外可见光检测器(美国 Perkin Elmer)。

川芎精油(江西省吉安市青原区振兴香料油提炼厂,批号:20070903);石油醚(30~60℃),乙酸乙酯,氯仿均为分析纯,购自 DUKSAN;薄层色谱用硅胶(Advanced Technology & Industrial Co., Ltd.)及硅胶 GF254 薄层板(Sigma-Aldrich)。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化 首先用 150 g 硅胶(200~300 目)装柱,并将 10 mL 川芎精油沿壁滴加到层析柱中,用石油醚-乙酸乙酯(99:1)为洗脱剂进行洗脱,藁本内酯由于有超强共扼结构不仅在 254 nm 下有吸收,而且在 365 nm 下有明显的特征吸收,故在这 2 个波长下检测 TLC 斑点,把无斑点的洗脱液合并为组分 A,有斑点的洗脱液合并为组分 B。然后把 2%硝酸银均匀混入到硅胶粉末中,于 120℃烘箱内烘烤 6 h 得到新型硝酸银改性硅胶,取出后浸泡湿法装柱。将组分 B 沿壁滴加到新型硝酸银改性硅胶层析柱中,用石油醚-乙酸乙酯(98.5:1.5)为洗脱剂进行洗脱。

1.2.2 高效液相色谱条件 采用色谱柱 Packed Column 5 C₁₈-PAQ (4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:甲醇-水(56.0:44.0);检测波长:365 nm 和 254 nm;柱温:30℃;流速:1.0 mL·min⁻¹,取提取得到的藁本内酯,配制成约 0.80 mg·mL⁻¹的甲醇溶液进行测定。

1.2.3 气相色谱-质谱联用条件 采用 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 m×0.25 mm, 0.25 μm),载气为 He,使用程序升温:50℃保持 3 min 后,以 8℃·min⁻¹的速度升高至 180℃,再以 4℃·min⁻¹的速度升高至 240℃。进样口温度为 270℃。离子源温度为 200℃,电子轰击电离能量是 70 eV。取分离纯化的藁本内酯,配制成约 0.50 mg·mL⁻¹的甲醇溶液,取 1 μL 进行 GC-MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 藁本内酯分离纯化结果

按“1.2.1”项下方法,采用 2 种方式对洗脱组分结果进行检视。利用 TLC 观察各组分在 254 nm 和 365 nm 下斑点情况,见图 3A。从 TLC 上可以看到藁本内酯与其干扰物基本达到了基线分离。采用紫外可见光检测器检测各组分在 254 nm 和 365 nm 下的吸光度 OD 值,结果与 TLC 检测一致,结果见图 3B。依据上述分析,将相应的组分浓缩得到无色至淡黄色,带酯香味的油状物。将油状物转移至棕色瓶中,加入氯仿,于-20℃冰箱中保存。

2.2 藁本内酯的杂质检查

TLC 鉴定:取适量上述“2.1”项下分离纯化的藁本内酯,加甲醇溶解成 1 mg·mL⁻¹的溶液,吸

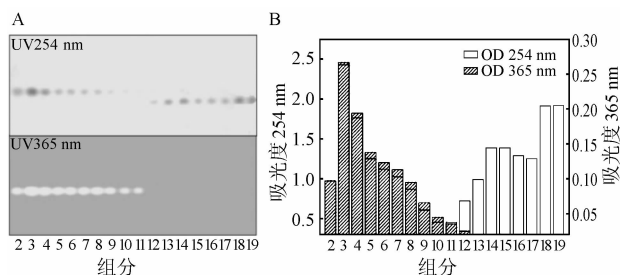


图3 组分B经硝酸银改性硅胶后,各部分在UV 254 nm和365 nm检视结果

A-TLC; B-紫外可见分光光度下OD值; 2~11-藁本内酯; 12~19-干扰物

Fig 3 Fraction B which was separated on a silver nitrate-impregnated silica gel column were monitored under UV 254 nm and UV 365 nm

A-TLC; B-OD of UV-Vis spectrometer; 2~11-Z-ligustilide; 12~19-disruptors

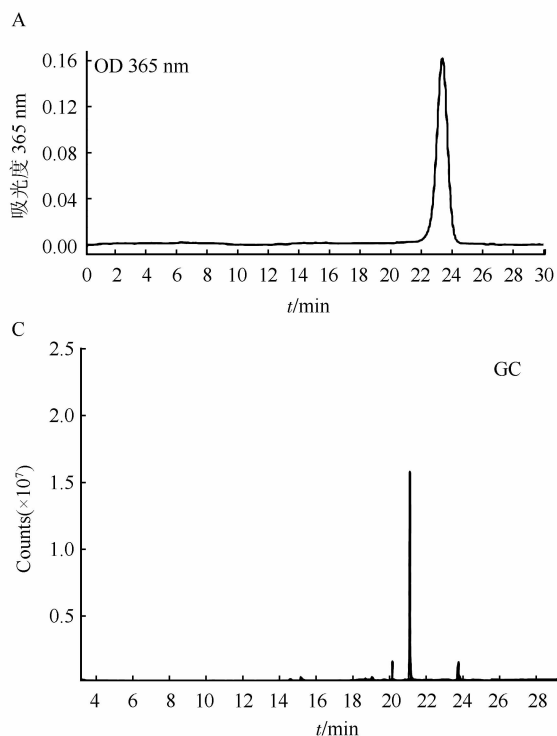


图4 藁本内酯的HPLC及GC-MS谱图

A-藁本内酯的HPLC谱图; B-藁本内酯MS裂解途径; C, D-藁本内酯的GC-MS谱图

Fig 4 HPLC profile and GC-MS analyses of purified Z-ligustilide.

A-HPLC profile of purified Z-ligustilide; B-MS fragmentation pathway of Z-ligustilide; C, D-GC-MS analyses of purified Z-ligustilide

3 讨论

藁本内酯作为传统中药川芎的主要成分,受到国内外药理学家青睐,因此对其药理学方面的研究也相对比较广泛和丰富。然而由于藁本内酯自身稳定性较差,容易受外界环境的影响,结构发生变化,至今尚未见到关于藁本内酯全合成方面的报道,因此对于藁本内酯的快速有效的分离纯化方法,以及有效的贮存方法显得至关重要。

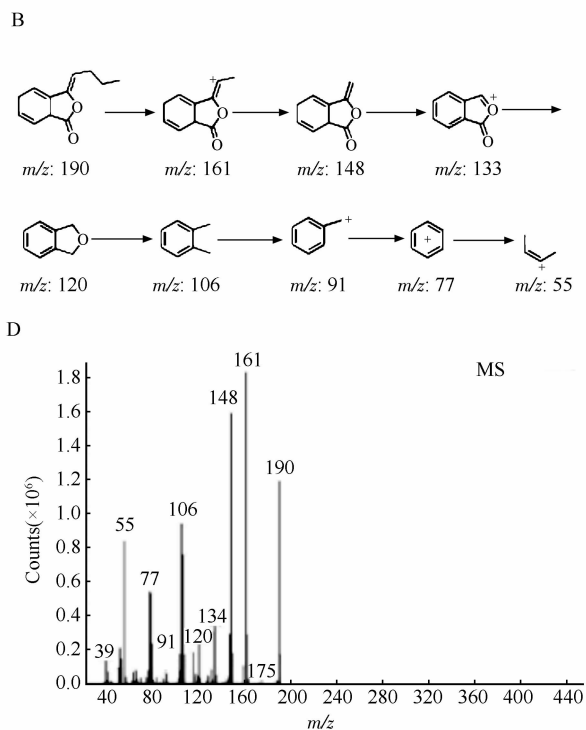
取约5 μ L点样在硅胶GF₂₅₄板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(2:1)为展开剂展开,晾干,在紫外灯254 nm和365 nm下检视。结果显示为一个斑点且R_f值与文献[18]报道一致。

2.3 HPLC测定藁本内酯纯度

按“1.2.2”项下色谱条件,检测纯化的藁本内酯纯度。总采集时间为30 min,藁本内酯在约为23.4 min出峰,色谱图见图4A。以面积归一化法计算得到藁本内酯含量为98.87%。

2.4 藁本内酯的结构鉴定

采用GC-MS,依据MS裂解规律确定化合物结构,见图4B。采集时间为31 min(藁本内酯出峰时间约为21.1 min),结果见图4。



本研究所建立的硝酸银改良的硅胶层析柱能够快速有效的分离出高纯度的藁本内酯,缩短了分离时间,实现了现提取现用于药理学研究,防止其在贮存过程结构转化。同时依据文献报道将藁本内酯贮存到氯仿溶液中,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱内,可以延长其贮存时间^[19]。此外,本研究还对不同比例硝酸银硅胶柱层析的洗脱剂用量和洗脱时间做了相应的实验记录,发现2%硝酸银的硅胶柱层

析所用的洗脱剂最少,洗脱时间适中。本研究所建立的方法工艺流程简单,成本低,所得藁本内酯纯度高,适用于现代化工业生产。

REFERENCES

- [1] LIU Z, SHI Y M, CHEN D R. The effect of Chuanxiong on β -TG, PF₄, TXB₂ and 6-keto-PGF 1 α levels of experimental cerebral ischemia in rabbits [J]. J Integr Trad West Med(中西医结合杂志), 1990, 10(9): 543-544.
- [2] CHEN D R, SHI Y M, TIAN G Q, et al. Comparative study of Chuanxiong and dextran 40 in the treatment of acute cerebral infarction [J]. Chin J Integr Trade West Med(中药中西医结合杂志), 1992, 12(2): 71-73.
- [3] YANG J R, SONG J, HU R, et al. The antipyretic effect of the essential oil *Ligusticum chuanxiong* Hort. on Brewer's Yeast-induced fever and hypothalamic content of PGE₂ in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2008, 24(4): 34-36.
- [4] YANG J R, SONG J, HU R, et al Effect of essential oil of *Ligusticum chuanxiong* Hort. on the expressions of COX-2 in hypothalamus of fever rat [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2009, 20(2): 315-316.
- [5] SU Y W, CHIOU W F, CHAO S H. Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW264. 7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(9): 1166-1172.
- [6] QI H, HAN Y, RONG J. Potential roles of PI3K/Akt and Nrf2-Keap1 pathways in regulating hormesis of Z-ligustilide in PC12 cells against oxygen and glucose deprivation [J]. Neuropharmacology, 2012, 62(4):1659-1670.
- [7] QI H, ZHAO J, HAN Y, et al. Z-ligustilide potentiates the cytotoxicity of dopamine in rat dopaminergic PC12 cells [J]. Neurotox Res, 2012, 22(4): 345-354.
- [8] D'ORAZIO D, SAIZIEU A D, SCHUELER G. Use of phthalide derivatives for the treatment and prevention of diabetes mellitus: US, US2007/0082947 A1 [P]. 2007-04-12.
- [9] ZUO A H, WANG L, XIAO H B. Research progress studies on pharmacology and pharmacokinetics of ligustilid [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2012, 37(22): 3350-3353.
- [10] HUANG Y Z, FU F D. Studies on the chemical components of leaf essential oils from *Ligusticum sinense* Cv. Chuangxiong [J]. Acta Botanica Yunnanica(云南植物研究), 1988, 10(2), 227-230.
- [11] Beijing Normal University, Huazhong Normal University, Nanjing Normal University, et al. Inorganic Chemistry(无机化学) [M]. 4th Ed. Beijing: Higher Education Press(高等教育出版社), 2002: 333-338.
- [12] CHEN J, QIU R, CHEN S L, et al. Complexation extraction with silver ion and its application in the separation of active components from esterified fish oil [J]. J Jiangsu Univ Sci Technol(Nat Sci)(江苏科技大学学报: 自然科学版), 2000, 21(6): 18-22.
- [13] OUYANG C G, LU W B. Application of AgNO₃-processed silica gel chromatography in isolation and purification of active components of herbal medicine [J]. Guangzhou Univ Chin Med(广州中医药大学学报), 2004, 21(4): 319-322.
- [14] HUANG H C, ZHU H J, JIANG Z F. Isolation of β -elemene from citronella oil by silver ion coordination chromatography [J]. Chin J Inorg Chem(无机化学学报), 2009, 25(3): 433-438.
- [15] CHEN X, ZHAO X Y, WANG W, et al. Separation and purification of solanesol from tobacco using silver ion complexation [J]. J Hubei Univ Sci Technol(Med Sci)(湖北科技大学学报: 医药科学版), 2012, 26(5): 369-371.
- [16] CHEN W L, YU L J, OUYANG Y D, et al. Separation of arachidonic acid from lipid using silver ion complexation [J]. J Wuhan Institute Technol(武汉职业技术学院学报), 2003, 25(2): 16-17, 22.
- [17] XIAO C H, YANG S S, HONG X K. Chinese Medicine Chemistry(中药化学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press(上海科技出版社), 1998: 435.
- [18] SHI L F, DENG Y Z, WU B S. Studies on chemical constituents and their stability of the essential oil from dry rhizome of *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 1995, 15(3): 26-30.
- [19] ZHANG L, LIU Y P, LI H Y, LI W, FAN J X. Ligustilide separation and study on chuanxiong quality standards. //Proceedings of 2008 academic annual meeting of chinese pharmaceutical association & the 8th congress of chinese pharmacist week(2008 年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集), 2008 [C]. 1723-1727.

收稿日期: 2013-08-07

HPLC 测定贝母中尿嘧啶和 3 种核苷的含量及其在品种鉴定中的应用

贺美艳¹, 陈俊¹, 张小龙^{2,3*} (1.三金集团湖南三金制药有限责任公司, 湖南 常德 415001; 2.江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001; 3.中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘要: 目的 建立测定浙贝、川贝、平贝和新疆贝母中尿嘧啶、尿苷、鸟苷、腺苷含量和鉴定该 4 种药材品种的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Alltima C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水溶液; 梯度洗脱, 洗脱条件为 0.0 min→5.0 min→10.0 min→20.0 min→30.0 min→40.0 min, 甲醇: 1%→1%→5%→12%→24%→31%; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 260 nm; 柱温为 25 $^{\circ}$ C。进样体积为 20 μ L。结果 尿嘧啶和 3 种核苷均达到基线分离, 线性良好, 4 种贝母中指

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项(2009ZX09501-015)

作者简介: 贺美艳, 女, 工程师 Tel: 18075625668 E-mail: hemeiyan1111@163.com *通信作者: 张小龙, 男, 博士, 工程师 Tel: 15881031836 E-mail: zh.x.long@163.com