制备型高效液相色谱法制备巴利森苷 B 对照品

聂昌平[1]，吴丹[2]，杨俊[1]，冉海霞[1]，杨青[1]，陈晶[1]，梁光平[1*]（1.遵义医药高等专科学校药学系，贵州 遵义 563006；2.遵义市第五人民医院，贵州 遵义 563000）

摘要：目的 制备用于含量测定的巴利森苷 B 对照品。**方法** 采用大孔吸附树脂柱和硅胶柱色谱结合制备型高效液相色谱分离获得巴利森苷 B，并通过紫外、红外、质谱、核磁共振波谱数据鉴定其结构，薄层色谱法和高效液相色谱法检测其纯度，最后在温度、光照等变化下考察其稳定性。**结果** 从天麻中分离制备了符合含量测定用要求的巴利森苷 B 对照品，HPLC 检测质量分数>99.0%。**结论** 本研究制备的巴利森苷 B 可作为对照品，用于含有该成分的天然产物及其制剂的质量评价和药效物质基础研究。

关键词：巴利森苷 B；天麻；制备型高效液相色谱法

中图分类号：R284.2　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2019)09-1055-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.09.005

引用本文：聂昌平, 吴丹, 杨俊, 等. 制备型高效液相色谱法制备巴利森苷 B 对照品[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1055-1058.

Preparation of Parishin B Reference Substance by Preparative HPLC

NIE Changping[1], WU Dan[2], YANG Jun[1], RAN Haixia[1], YANG Qing[1], CHEN Jing[1], LIANG Guangping[1*] (*1.Department of Pharmacy, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006, China; 2.Zunyi Fifth People's Hospital, Zunyi 563000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare parishin B reference substance for quantitative analysis. **METHODS** Parishin B was isolated and purified by macroporous resin column chromatography, silica gel column chromatography, and preparative HPLC. Its structure was identified by UV, IR, ESI-MS and NMR spectral techniques. The purity was determined by HPLC and TLC. Finally, the stability was investigated under different temperature and illumination. **RESULTS** The reference substance of parishin B was prepared for *Gastrodia elata* and its purity was >99.0% in line with the standard of quantitative analysis. **CONCLUSION** Parishin B prepared by this method can be used as reference substance to the quality control for natural product and their preparations, as well as the research of pharmacodynamic material basis.

KEYWORDS: parishin B; *Gastrodia elata*; preparative HPLC

天麻来源于兰科多年生草本植物天麻 *Gastrodia elata* B1.的块茎，广泛分布于我国大部分地区及日本、韩国，主产于云南、贵州、四川、陕西及河南等地，是一味常用而名贵的中药[1-2]。临床常用于头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等疾病的治疗[3-4]。此外，天麻还具有增智、健脑、延缓衰老的作用，对老年性痴呆症也有一定的疗效[5]。据中国药典 2015 年版可知，衡量天麻质量优劣的指标成分为天麻素、对羟基苯甲醇[6]。其中，对羟基苯甲醇为天麻素的苷元部分，评价天麻质量优劣的指标成分实质上只有天麻素一种[6-7]。关于天麻素药理作用的多项研究报道也表明[7-9]，天麻素并没有表现出与其传统药效相关的药理活性。由此可见，仅用天麻素及其苷元作为评价天麻药材质量的依据并不准确。

巴利森苷 B 是天麻的有效成分之一，具有镇静、镇痛、安眠和神经保护的作用[10]，结构见图 1。其结构式由 2 分子天麻素和 1 分子柠檬酸组成，在蒸煮加热过程中，易发生降解反应，从而使炮制后天麻素的含量增加。在不同产地及贮存条件下，巴利森苷 B 的含量约为 1.2~6.9 $mg \cdot g^{-1}$[10-11]。采用传统的提取分离方法难以从天麻中获得巴利森苷 B 纯品，且由于巴利森苷 B 对照品匮乏，以致围绕该成分研究天麻的报道较少。本试验旨在研究从天麻中提取、分离和纯化巴利森苷 B 的方法，成功制备了巴利森苷 B 对照品，为进一步研

基金项目：贵州省科技计划项目(黔科合 LH 字[2016]7418 号、[2017]7302 号、[2017]7310 号)；遵义医药高等专科学校博士科研启动经费项目(遵医专科合 BS2018001 号)；遵义医药高等专科学校项目(遵医专科合[2017]007 号、[2017]010 号)

作者简介：聂昌平，男，硕士，讲师　Tel: (0851)28925881　E-mail: 390840895@qq.com　***通信作者：**梁光平，男，博士，副教授　Tel: (0851)28777101　E-mail: guangping_liang@aliyun.com

究天麻奠定了物质基础。

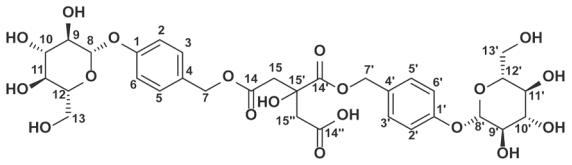


图 1　巴利森苷 B 的化学结构

Fig. 1　Chemical structure of parishin B

1　仪器与试药

FW100 型高速万能粉碎机(泰斯特仪器有限公司)；HZT-B5000 电子天平(福州华志科学仪器有限公司)；HH-4 数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器)；RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器)；SHB-IIIS 循环式多用真空泵(郑州长城科工有限公司)；101-1 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司)；1200 型高效液相色谱仪、1200 型制备液相色谱仪均来自美国 Agilent；COMOSIL 5C_{18}-MS-Ⅱ色谱柱(Waters 公司，5.0 cm×250 mm)；WRS-1B 型数字熔点仪(上海精密科学仪器有限公司)。

天麻购于贵阳药材公司，经贵州大学熊源新教授鉴定为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎。柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂，批号：20160512)；Diaion HP20 型大孔吸附树脂(日本三菱公司，批号：5H501)；GF254 硅胶板(青岛海洋化工厂分厂，批号：20080121)；乙腈(赛默飞世尔科技公司，批号：150942，色谱纯)，其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　提取分离

取天麻粉 2 kg 用 70%乙醇 20 L 回流提取 3 次，时间分别为 3，3，2 h，合并 3 次提取液，减压浓缩后加石油醚萃取脱脂，水层用 Diaion HP20 型大孔吸附树脂分离，乙醇-水梯度洗脱，收集 30%乙醇部分，再经硅胶柱层析分离，以(氯仿：甲醇(50∶1→1∶1)梯度洗脱，在氯仿：甲醇=3∶1 部分获得巴利森苷 B 粗品。

取适量巴利森苷 B 粗品用色谱甲醇溶解经制备型高效液相色谱分离纯化，流动相为乙腈：水=15∶85，收集液经冷冻干燥后的白色粉末状结晶即为巴利森苷 B 对照品。

2.2　结构鉴定

白色粉末，易溶于水及甲醇，难溶于乙醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮、三氯甲烷、石油醚，硫酸显色为紫红色，熔点 125~126 ℃。UV λ_{max} (AcCN-H_2O)：222.1 nm；IR(KI)：3 400，2 920，1 740，1 620，1 520，1 080，830，240 cm^{-1}；ESI-MS *m/z*：727[M-H]$^-$；^{1}H-NMR(CD_3OD，400 MHz) δ：7.25 (2H，d，*J*=8.6 Hz，H-2，6)，7.21(2H，d，*J*=8.6 Hz，H-2’，6’)，7.05(2H，d，*J*=8.6 Hz，H-3，5)，7.03 (2H，d，*J*=8.6 Hz，H-3’，5’)，5.01(2H，br.s，H-7a，7b)，4.99(2H，br.s，H-7’a，7’b)，4.88(1H，d，*J*=7.5 Hz，H-8)，4.86(1H，d，*J*=7.5 Hz，H-8’)，3.87(2H，dd，*J*=11.7，1.5 Hz，H-13a，13’a)，3.68 (2H，dd，*J*=11.7，4.8 Hz，H-13b，13’b)，2.95(1H，d，*J*=15.3 Hz，H-15a)，2.91(1H，d，*J*=15.3 Hz，H-15’’a)，2.79(1H，d，*J*=15.3 Hz，H-15b)，2.75(1H，d，*J*=15.3 Hz，H-15’’b)；^{13}C-NMR(CD_3OD，100 MHz) δ：173.6(C-14’)，170.9(C-14’’)，170.8(C-14)，158.4 (C-4，4’)，130.2(C-2，2’，6，6’)，130.1(C-1，1’)，116.9(C-3，3’，5，5’)，101.2(C-8，8’)，77.0(C-10，10’)，76.8(C-12，12’)，73.9(C-9，9’)，73.7(C-15’)，70.3(C-11，11’)，67.1(C-7)，66.4(C-7’)，61.6(C-13，13’)，43.5(C-15)，43.2(C-15’’)。以上波谱数据与文献[10]报道的基本一致，故确定所得化合物为巴利森苷 B。

2.3　纯度检查

2.3.1　薄层检视　取巴利森苷 B 对照品，加甲醇配制成 1 mg·mL^{-1} 对照品溶液，按薄层色谱法试验，取上述溶液 2，5，10，15，20，25 μL 点于同一硅胶 G 薄层板上，分别以氯仿：甲醇：冰醋酸=2∶1∶0.05、丙酮：甲醇：冰醋酸=6∶1∶0.02、乙酸乙酯：丙酮：甲醇：冰醋酸=4∶2∶1∶0.03 为展开剂展开，分别经紫外灯 254 nm 下观察、碘显色以及硫酸显色后观察。结果显示斑点清晰，除巴利森苷 B 显色单一斑点外没有其他斑点，自制的巴利森苷 B 对照品溶液随着浓度增加，仍呈现单一斑点且圆整性好，说明对照品纯度较高。结果见图 2。

2.3.2　HPLC 检测纯度

2.3.2.1　色谱条件　参考文献[10-11]的条件，以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，乙腈-水(15∶85)为流动相，检测波长为222 nm，理论塔板数按巴利森苷B峰计算>8 000，对称因子>0.9，说明采用上述方法制备的巴利森苷B具有较高纯度。

2.3.2.2　供试品溶液的制备　分别精密称取巴利

森苷B对照品适量，加甲醇制成1 mg·mL^{-1}溶液，即得。

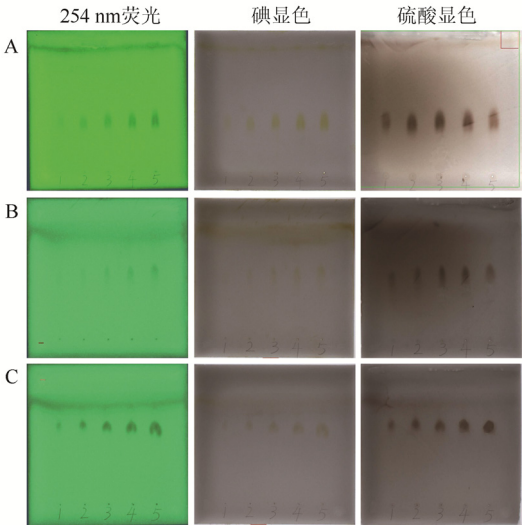


图 2　巴利森苷 B 不同展开剂及不同显色剂的薄层色谱图

A–展开剂为氯仿：甲醇：冰醋酸=2：1：0.05；B–展开剂为丙酮：甲醇：冰醋酸=6：1：0.02；C–展开剂为乙酸乙酯：丙酮：甲醇：冰醋酸=4：2：1：0.03。

Fig. 2　Thin layer chromatogram of different conditions of parishin B

A–developer is $CHCl_3$：MeOH：AcOH=2：1：0.05; B–developer is Acetone：MeOH：AcOH=6：1：0.02; C–developer is EtOAc：Acetone：MeOH：AcOH=4：2：1：0.03.

2.3.2.3　含量测定　分别精密吸取对照品的供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，测定，面积归一化法计算，巴利森苷 B 对照品的含量为 99.37%。色谱图见图 3。

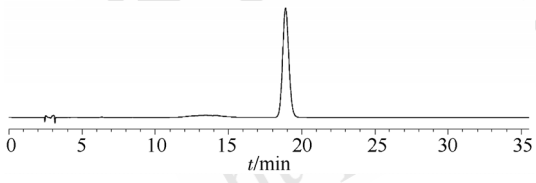


图 3　巴利森苷 B 的 HPLC 色谱图

Fig. 3　HPLC chromatogram of parishin B

2.4　稳定性考察

将巴利森苷 B 对照品置棕色玻璃瓶中，于温度、光照条件的干涉下，分别在 0，3，5，7，10 d 对其含量进行测定，结果见表 1。由于制备的对照品很容易吸潮结块，所以未对其湿度试验进行考察。

2.4.1　温度稳定性考察　根据前期工作经验得出，巴利森苷 B 对温度比较敏感，容易分解，所以考察条件选择为室温、冷藏、冷冻。巴利森苷 B 在室温下贮存 10 d，其含量变化不明显。结果见表 1。

表 1　不同温度下样品含量测定结果

Tab. 1　Results of determination under different temperature

时间/d	室温/%	冷藏/%	冷冻%
0	99.37	99.37	99.37
3	99.31	98.55	98.43
5	98.85	98.52	98.15
7	98.83	97.85	96.89
10	98.12	96.45	95.42

2.4.2　光照稳定性考察　为考察巴利森苷 B 在照度 4 500 lx、25 ℃条件下分别存放 0，3，5，7，10 d 后的纯度。采用上述含量测定的方法分别测得巴利森苷 B 的纯度依次为 99.37%、98.55%、98.35%、98.23%、98.10%。说明巴利森苷 B 在照度为 4 500 lx、25 ℃的条件下贮存 10 d，其含量仍可达到 98%以上。

3　讨论

巴利森苷 B 是天麻的有效成分和特征成分之一，是由柠檬酸分别与 2 分子天麻素通过酯键缩合形成的一种化合物，以游离天麻素、巴利森苷 B 和总天麻素(游离天麻素和结合天麻素总量)为指标能更全面地控制天麻药材的质量。但由于结构中含有 2 个羧酸酯结构，在水溶液或较高温度条件下容易发生裂解[12]，给巴利森苷 B 的制备带来极大的困难。本研究最初采用传统方法进行分离，结果发现普通硅胶对巴利森苷 B 的吸附性很差，获得巴利森苷 B 粗品极少，难以纯化得到纯品，进而采用大孔树脂进行分离纯化。

在预实验中，曾采用 AB-8、D-101、聚酰胺、NKA-9、Diaion HP20 等不同类型的大孔树脂进行分离纯化。结果表明，D-101、聚酰胺、NKA-9 3 种型号的大孔吸附树脂对巴利森苷 B 的吸附性很差；AB-8 大孔树脂吸附巴利森苷 B 以后的解吸附效果不好；Diaion HP20 型大孔吸附树脂对巴利森苷 B 的吸附与解吸附均较好，采用 20%乙醇基本可实现全部解吸附，而且该馏分含有的杂质较少。因此，选择 Diaion HP20 型大孔树脂进行巴利森苷 B 的分离纯化。但获得的巴利森苷 B 在经硅胶柱层析进一步精制时发现，其薄层色谱 R_f 值几乎相同位置含有一杂质，经多次正、反相硅胶柱层析和凝胶柱层析分离纯化后仍然无法分离，最后采用制备型高效液相色谱法才将其分离纯化。

此外，通过制备液相收集的巴利森苷 B 收集液，经减压浓缩后再次进行纯度检查，发现其纯度下降严重，且多次重复试验依然如此。导致该现象的原因可能是巴利森苷 B 的酯键结构在较高温度条件下发生了裂解[10]。为此，本研究最终采用冷冻干燥的方式获得了纯度>99.0%的巴利森苷 B。

综上，本研究制备的巴利森苷 B 对照品纯度符合国家标准，路线相对简单、可靠、易得，并通过研究确定了巴利森苷 B 在生产、储存、运输过程中的条件为干燥、密闭、室温。

REFERENCES

[1] WANG Y W, LI Z F, WANG Q, et al. Chemical constituents of *Gastrodia elata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(21): 2974-2976.

[2] CHEN J, XU H L, ZHEN C, et al. Research progress on extraction technology of gastrodin [J]. Guangzhou Chem Indust(广州化工), 2015, 43(15): 14-15.

[3] LI J J, LIU Z T, WANG X W, et al. Research status and prospect of *Rhizoma Gastrodiae* [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药杂志), 2014, 23(14): 16-17.

[4] LI H Y, SUN Z W, WANG S Q. Overview of pharmacological effects of gastrodin in nervous system [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2015, 35(11): 1047-1050.

[5] YANG C, LYU Z Y, WU R Y. The progress of chemical composition and pharmacological mechanism of *Gastrodia elata Blume* [J]. China Mod Doct(中国现代医生), 2012, 50(17): 27-28.

[6] 中国药典. 一部[S]. 2015: 58-59.

[7] QU S M, ZENG Z. Application and research progress of gastrodin in liver injury [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 298-300.

[8] 郭营营, 蒋石, 林青, 等. 天麻中对羟基苯甲醇抗血小板聚集的作用及机制研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 4-6.

[9] LI Z F, WANG Y W, WANG Q, et al. Chemical constituents from *Gastrodia elata* (Ⅱ) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(14): 1976-1979.

[10] TIAN Z P, XIAO H, FENG S H, et al. Analysis of degradation mechanism of parishin in *Gastrodiae Rhizoma* [J]. Chin J Exper Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(23): 18-21.

[11] LIU S T, SHAN M Q, GUO S C, et al. Determination of 6 active components in commercially available *Gastrodiae Rhizoma* by HPLC [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2016, 18(9): 1204-1208.

[12] CHAE S W, LEE A, LEE H W, et al. Three phenolic glycosides from *Gastrodia elata* [J]. J Appl Biol Chem, 2008, 51(2): 61-65.

收稿日期：2018-07-17

(本文责编：沈倩)

http://www.chinjmap.com