



高效液相色谱法制备连翘酯苷对照品

中药连翘(Fructus Forsythiae)为木犀科(Olea- ceae)植物连翘的干燥果实,具有清热解毒消肿散结的功效[1]。现代药理学研究表明,连翘中含有的主成分连翘酯苷(Forsythiaside)具有极强的抗菌及抗病毒活性[2][3][4]。在连翘及其制剂的质量检测和物质基础研究、工艺筛选等工作中经常要用到连翘酯苷对照品,而目前市场尚无连翘酯苷对照品出售,研究工作中需自行制备。应用高效液相色谱法制备连翘酯苷对照品,目前国内尚无文献报道。由于连翘酯苷为咖啡酸的衍生物,分子结构中含有酯键和糖苷键,在酸、碱和高温条件下不稳定[5],因此工艺过程稍有不妥,就有可能造成连翘酯苷的分解。用传统的制备薄层和常规的分方法分离制备连翘酯苷单体[6]费时费力,且难于得到纯度较高的标准物质。

本研究采用RP-HPLC制备色谱方法从连翘药材中分离制备连翘酯苷单体,所得目标产物连翘酯苷纯度达到98%以上。该方法上样量大、操作简单、重现性好,可用于连翘酯苷的大量制备,为连翘及其制剂的质量检测提供连翘酯苷对照品,满足常规分析检测和新药研究的需求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

法国GILSON Lab-Prep自动制备高效液相色谱仪:118紫外/可见光检测器,306高压泵(洗脱泵),306自动进样泵,206馏分收集器;美国惠普HP-1100高效液相色谱仪:四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DNA)。AAA R-201旋转蒸发仪(上海申科机械研究所),LABCONCO冷冻干燥仪。

甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

连翘药材为市售青连翘,经本校方剂教研室鉴定为连翘的干燥果实。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

1.2.1.1 分析色谱条件 分析色谱柱:Zorbax Rx-C18柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(V:V=35:65);流速:0.6 ml/min;检测波长:324 nm;柱温:室温;进样量:10 μl。

1.2.1.2 制备色谱条件 制备色谱柱:Zorbax Rx-C 18柱(21.2 mm×250 mm, 7 μm);流动相:甲醇-水(V:V=40:60);流速:12 ml/min;检测波长:324 nm;柱温:室温;进样量:4.0 ml;馏分收集器:峰-时自动收集模式。

1.2.3 连翘酯苷样品溶液制备 连翘药材经水提醇沉后,旋转蒸发浓缩至一定浓度,通过聚酰胺柱,以水-乙醇作洗脱剂,乙醇从30%逐渐增至70%进行梯度洗脱。收集洗脱液,用聚酰胺薄膜层析检测洗脱液中的组分。连翘酯苷在紫外灯下显强荧光,收集含连翘酯苷的部分,旋转蒸发浓缩至适量体积,用微孔滤膜过滤后作为制备色谱样品溶液。

2 结果

2.1 连翘酯苷的HPLC分析

将连翘酯苷样品溶液按1.2.1.1项进行HPLC分析，结果该样品溶液内含连翘酯苷约为80%。该样品溶液分析色谱图见图1。

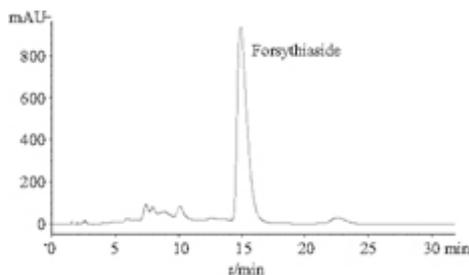


图1 连翘酯苷样品溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of the forsythiaside solution

将分析色谱条件按比例扩大并经适当调整到制备色谱条件。

2.2 制备色谱分离与馏分收集

将连翘酯苷样品溶液按1.2.1.2项进行HPLC分离。每次进样4 ml，收集14~16 min的馏出液，旋转蒸发挥去部分溶剂，冷冻干燥后得淡黄色粉末，此为制备目标产物连翘酯苷。制备色谱图见图2。

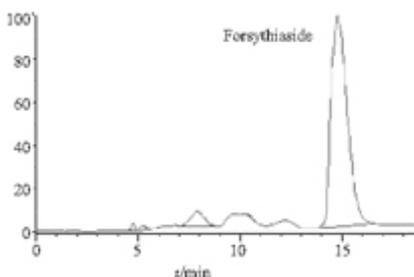


图2 连翘酯苷样品制备分离色谱图

Fig.2 RP-HPLC of the separation of forsythiaside

2.5 纯度检测

将制备所得目标产物连翘酯苷用流动相溶解，按2.1.1项下进行HPLC分析检测，结果见图3。用面积归一化法计算，确定产品纯度为98%。

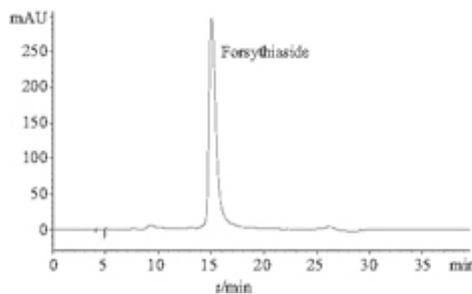


图4 连翘酯苷色谱检测图

Fig.4 HPLC analysis of the purity of the prepared forsythiaside

本研究通过反相高效液相色谱制备的连翘酯苷单体经熔点、旋光度、紫外光谱、质谱(HPLC/MS/MS)等共同检测,并同文献数据对照,确定为连翘酯苷,纯度达到98%,符合标准物质的质量要求,可作为含量测定用对照品。

总结本实验成功因素,我们认为有以下经验:

(1)分析检测连翘酯苷时选择了324 nm,因为该波长为连翘酯苷的吸收峰,且其他物质的吸收较弱,干扰较少,结果较为准确。

(2)由于分析色谱柱和制备色谱柱所使用色谱填料相同,所以可以用分析色谱柱先摸索分离条件、流动相比例、流速、进样量等,然后再按比例扩大到制备色谱。

(3)制备色谱进样量是一个很关键的指标,既要考虑到制备目标产物的纯度,又要尽量地提高产率,同时还要兼顾色谱柱的负荷能力。若进样量不当,可能导致色谱柱性能迅速下降;也可能导致制备的目标产物纯度达不到要求。

(4)制备色谱进样方式: GILSON Lab-Prep自动制备高效液相色谱仪配备有进样环和进样泵。为了避免样品在制备色谱柱进口处超载,应尽量使用较大样品体积而浓度较稀的样品溶液,同时也为了方便自动制备,选择用进样泵进样。

(5)由于制备色谱成本较高,在准备制备色谱样品时,宜采用前处理的方法,选定某一目标产物,制取该成分含量较高的样品溶液,这样可以减少制备柱的污染,延长色谱柱的使用寿命,并且相对增加了一个分离单元的纯品制备量,降低了制备成本。

(6)通过制备色谱收集的馏分含有连翘酯苷单体和大量的溶剂(甲醇-水),必须将大量的溶剂除去,才能得到连翘酯苷单体。我们曾经考察了连翘酯苷的稳定性,发现加热温度过高或加热时间过长均会使连翘酯苷发生分解,所以本实验控制溶剂减压蒸发时水浴温度在50℃以下,浓缩至适当体积,再进行冷冻干燥后得到连翘酯苷单体。

综上所述,本文介绍了研究了从连翘药材中提取连翘酯苷粗品,并通过反相高效液相色谱制备连翘酯苷对照品的完整方法。该方法简便易行,研究结果解决了连翘药材与含连翘中药复方制剂检测时所需对照品的问题,加强了连翘及含连翘复方制剂的质量控制。

参考文献:

- [1]中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京化学工业出版社, 2000.
- [2]张炜, 张汉明, 郭美丽, 等. 连翘的药理学研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(1): 7-10.
- [3]张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(10): 657-60.
- [4]胡克杰, 徐凯建. 连翘酯苷体外抗病毒作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2001, 8(2): 89.
- [5]张立伟, 杨频. 连翘酯苷稳定性研究[J]. 中成药, 2003, 25(5): 353-6.
- [6]梁文藻, 傅小勇, 涂国土. 连翘成分分析 IV. 连翘酯苷的分离、鉴定和测定[J]. 药物分析杂志, 1986, 6(5): 263-5.