

龙胆苦苷分离方法研究

吉惠杰,杨英杰,杨艳俊,程振玉,赵文卓

(吉林化工学院 化学与制药工程学院,吉林 吉林 132022)

摘要:利用柱层析色谱法对龙胆草提取物进行分离,研究洗脱剂、洗脱剂比例等因素对龙胆草分离效果的影响。结果表明:龙胆苦苷的最适洗脱剂为氯仿-甲醇体系,氯仿:甲醇:水的最佳比例为65:35:10。

关键词:龙胆草;柱层析;分离

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)12-0133-02

龙胆(*Gentiana scabra* Bge.)又称胆草,为龙胆科龙胆属植物^[1],主要有效成分为龙胆苦苷^[2],其主要集中在龙胆根和茎中,其含量因龙胆的品种、株龄、生长地区和采挖季节而异,干根含量为1%~3%,鲜根含量为7%~10%。现代药理研究证明,龙胆苦苷具有显著的肝脏保护、抗炎、抗病原微生物、中枢兴奋及健胃利胆等作用^[3-4]。随着人们对龙胆草的认识、开发与利用,世界龙胆苦苷的年需用量日渐紧缺,已满足不了人们的用药需求,而我国龙胆资源丰富,开发、研究一条适合于大规模生产的现代化先进工艺,对经济发展和中草药的现代化道路十分必要。研究利用柱层析技术对龙胆草提取物的有效成分进行分离,以期龙胆草规模化生产提供理论借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品为龙胆全草(抚松县北岗长白山特产专业合作社)和龙胆苦苷(HPLC \geq 98%标准品,大连美仑生物技术有限公司),薄层层析用硅胶G型(青岛海洋化工 Merck 公司),氯仿(天津大茂化学试剂厂),石油醚、乙酸乙酯(北方天医化学试剂厂),甲醇(天津北方天医化工厂);所用试剂均为分析纯。

供试仪器有 RE52-3 型旋转蒸发仪(上海沪西分析仪器厂)、CS101-1AB 型电热鼓风干燥箱(重庆实验设备厂)、SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、2F-I 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂)和 YXS 型数显恒温水浴(山东鄞城华鲁仪器分析公司)。

1.2 方法

1.2.1 柱层析硅胶预处理 向 200~300 目的柱层析硅胶中加入氯仿:甲醇:水=65:35:10 的混合溶剂,搅拌至无气泡后倒入玻璃层析柱中,沉降,得到硅胶层析柱。

1.2.2 龙胆草粗提物萃取 将龙胆草粗提物装入分液漏斗中,加入氯仿(比例 1:1),摇匀,静置分层,分出上层,下层用氯仿进行多次萃取,待下层粗提物颜色极浅,停止萃取,将氯仿层提取液合并,浓缩,回收氯仿。

1.2.3 根部醇提法—氯仿层萃取物的分离 将龙胆苦苷粗提物用乙醇溶解,加入 3 倍粗提物 200~300 目硅胶,拌匀,挥去溶剂晾干,粉碎过 200 目筛,加入到含有粗提物 30 倍柱层析硅胶的硅胶层析柱上,采用氯仿:甲醇:水=65:35:10 混合溶剂做洗脱剂洗脱。以龙胆苦苷纯品做对照,采用薄层层析法跟踪检测,待龙胆苦苷呈现单一斑点时收集洗脱液,直至洗脱液中再次出现其它斑点时停止收集。将收集的洗脱液挥干溶剂,得到纯化的龙胆苦苷(见图 1)。

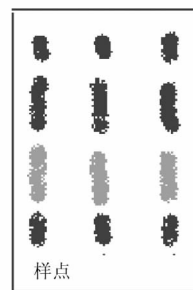


图 1 TLC 分析结果

Fig. 1 TLC analysis result

1.2.4 洗脱剂对分离效果的影响 分别选择石油醚-乙酸乙酯体系、氯仿-甲醇体系和乙酸乙酯-甲醇体系进行洗脱,氯仿-甲醇体系洗脱剂比例分别为氯仿:甲醇:水=85:15:10、氯仿:甲醇:水=65:35:10、氯仿:甲醇:水=50:50:10。

收稿日期:2014-03-13

第一作者简介:吉惠杰(1973-),女,吉林省吉林市人,学士,实验师,从事精细有机合成与应用方面的研究。E-mail:jihuijie70@126.com。

通讯作者:杨英杰(1955-),学士,教授,硕士生导师,从事精细有机合成与应用方面的研究。E-mail:1052060008@qq.com。

2 结果与分析

2.1 洗脱剂选择对分离效果的影响

选择洗脱剂,应遵循从极性小到极性大的原则选择。洗脱剂极性偏小(见图 2a)和极性偏大(见图 2b)分离的效果都不好。石油醚层洗脱样选择氯仿:

甲醇:水=65:35:10 中展开(见图 2c)。龙胆草氯仿层粗提物的一次柱最佳洗脱剂比例为氯仿:甲醇:水=65:35:10,共得到 144 个样品,二次柱最佳洗脱剂比例为氯仿:甲醇:水=65:45:10,共得到 147 个样品。通过 TLC 法,初步判断样品(1-83/113)和(1-2-42/48)含龙胆苦苷。

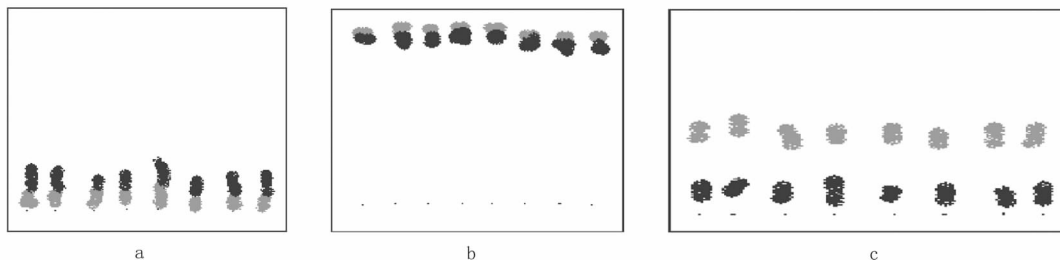


图 2 TLC 分析结果

Fig. 2 TLC analysis result

2.2 洗脱剂比例对分离效果的影响

在上洗脱剂之前,应对分离物进行 TLC 分析,找到最佳洗脱剂比例,然后依据最佳比例将洗脱剂极性分为 3 块:小于最佳比例、等于最佳比

例、大于最佳比例。上洗脱剂从小极性开始,当洗脱液颜色无色时,调解极性。该试验最佳洗脱剂性为一次柱:氯仿,甲醇—水(65:35:10),二次柱:氯仿,甲醇—水(65:40:10),TLC 分析见图 3。

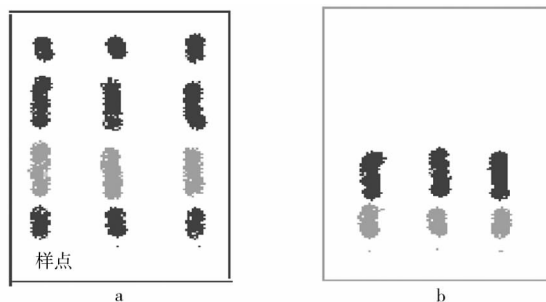


图 3 TLC 分析结果

Fig. 3 TLC analysis result

3 结论与讨论

研究利用柱色谱技术分离龙胆草有效成分,选择氯仿、甲醇作洗脱剂,最佳洗脱剂比例为氯仿:甲醇:水(65:35:10)、(65:45:10)得到一次柱 144 个洗脱样品,二次柱 147 个洗脱样品,判断样品(1-83/113),(1-2-42/48)中含有龙胆苦苷。

柱层析分离^[5-8]是一个反复洗脱的过程,可能将极性大的也洗脱下来,将不同极性成分混杂。所以接受洗脱液不宜太多,多换接收瓶。用 TLC 法分析样品成分。在调换洗脱剂极性时,由于层析柱内还存有小极性的洗脱剂,可以等一段时间再换接受瓶,否则不同极性洗脱物间有交叉。另外,在回收洗脱样时,应用专用的回收瓶;回收时,要对接样瓶和回收瓶用洗脱剂少量多次洗涤,防止样品损失;点薄层色谱板样点圆小,间距适当,分离效果好;展开剂应在点板前配,配完后,振荡

摇匀,活化 10 min 左右。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典,一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005,64.
- [2] 杨树彬,王承. 龙胆化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医学报,2005,33(6):54-56.
- [3] 刘涛,才谦,付玉芹,等. 中药龙胆的研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2004(1):85-86.
- [4] 金香子,徐明. 龙胆草提取物抗炎、镇痛、耐缺氧及抗疲劳作用的研究[J]. 时珍国医国药,2005,16(9):842-843.
- [5] 傅正生,薛华丽. 薄层色谱法和柱层析法分离兰州红心萝卜色素的研究[J]. 食品科学,2004,25(6):49-50.
- [6] 钟芳晓,李岩. 干柱法在中草药化学成分分离中的应用创新[J]. 时珍国医国药,2006,17(6):1009.
- [7] 胡森,钱国平,苏宝根,等. 硅胶柱层析纯化青蒿素[J]. 华西药杂志,2005,20(4):283-285.
- [8] 吴波,谭文界. 柱层析法分离精制辣椒红色素[J]. 现代食品与药品杂志,2006,16(2):1-2.