



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103923191 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201410174961. 4

(22) 申请日 2014. 04. 28

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 谭宁华 赵丽梅 宋卫武

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

C07K 7/64(2006. 01)

C07K 1/16(2006. 01)

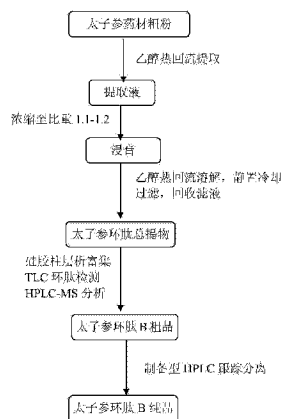
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

太子参环肽 B 标准品的制备方法

(57) 摘要

提供标准品太子参环肽 B 的制备方法, 从中药太子参中提取分离纯化标准品太子参环肽 B, 太子参干药材粉碎后用工业乙醇热回流提取, 浸膏经乙醇前处理后, 用硅胶柱层析进行太子参环肽 B 的富集, 洗脱溶剂为氯仿-甲醇系统, 最后经制备型高效液相色谱制备得到纯度在 98% 以上的太子参环肽 B。本发明的方法能快速分离得到太子参环肽 B, 样品损失少, 成本较低, 操作方便, 可控性和重现性好, 溶剂可以反复回收利用, 适用于工业生产。



1. 太子参环肽 B 标准品的制备方法,包括以下步骤:

(1) 提取:太子参药材晒干,粉碎至粒径 20-80 目,加入太子参药材 4-10 倍体积的 95% 工业乙醇进行热回流提取,合并提取液、浓缩至比重为 1.1-1.2 的浸膏;

(2) 前处理:向浸膏中加入 5-15 倍体积的 95% 工业乙醇热回流溶解 1-3h,冷却静置 8-24h,过滤浓缩滤液,得到太子参环肽总提物;

(3) 富集:将上述太子参环肽总提物用少量甲醇溶解,拌入拌样用柱层析硅胶,干燥,加载于分离用层析硅胶柱床顶端,用氯仿-甲醇溶剂梯度洗脱,收集流出液, TLC 检测环肽成分,合并所有环肽部分,回收溶剂,干燥得到太子参环肽 B 粗品, HPLC-MS 分析,快速锁定目标产物;

(4) 分离纯化:取上述富集产物,甲醇溶解过滤,用制备型高效液相色谱进行跟踪分离纯化,流动相为乙腈-水溶液,根据 HPLC-MS 分析结果,收集太子参环肽 B 色谱峰流出液,回收溶剂,干燥得到纯度 98% 以上的太子参环肽 B 纯品。

2. 按照权利要求 1 所述的太子参环肽 B 标准品的制备方法,其特征在于所述的步骤(1)中太子参为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根。

3. 按照权利要求 1 所述的太子参环肽 B 标准品的制备方法,其特征在于所述的步骤(1)中热回流提取所用溶剂为原料 4-10 倍体积的 95% 工业乙醇,提取时间 2-4h,温度 75-85°C,每次过滤后将残渣重复提取过程 2-3 次,合并提取液,减压浓缩至比重 1.1-1.2。

4. 按照权利要求 1 所述的太子参环肽 B 标准品的制备方法,其特征在于所述的步骤(2)中前处理所用溶剂为浸膏 5-15 倍体积的 95% 工业乙醇,热回流溶解时间为 1-3h,温度 75-85°C,冷却静置时间为 8-24h。

5. 按照权利要求 1 所述的太子参环肽 B 标准品的制备方法,其特征在于所述的步骤(3)中富集目标产物所用层析柱为硅胶柱,装柱方法为湿法装柱,所用装柱硅胶为 200-300 目柱层析硅胶,用量为太子参环肽总提物的 15-40 倍重量,上样方法为干法上样,拌样用硅胶为 100-200 目柱层析硅胶,用量为太子参环肽总提物的 1-1.5 倍重量,洗脱溶剂为氯仿-甲醇溶剂梯度洗脱:20-40:1 (6-14BV), 6-12:1 (6-14BV)。

6. 按照权利要求 1 所述的太子参环肽 B 标准品的制备方法,其特征在于所述的步骤(3)中 TLC 检测环肽所用薄层板为硅胶 G 板,样品点于硅胶 G 板上,用 8:2-9:1 的氯仿-甲醇展开,挥掉溶剂后,在 100-120°C 用 4-8N HCl 溶液水解 30-60min 后,再喷洒 2%-5% 茚三酮乙醇溶液显色剂,加热后显桔黄色至橙红色斑点。

7. 按照权利要求 1 所述的太子参环肽 B 标准品的制备方法,其特征在于所述的步骤(3)中 HPLC-MS 分析方法:HPLC 色谱条件为:色谱柱:C18 柱,柱温:室温,流动相:乙腈-水,乙腈在流动相中的比例为:0-20min, 20%-32%; 20-40min, 32%; 40-50min, 32%-45%, 流速:1.0ml/min,检测:DAD 检测器,检测波长:203nm;质谱条件为:电离方式为电喷雾离子源正离子模式,喷雾电压 3kV,椎孔电压 42V,离子源为 450°C,雾化气流速 650L/Hr,辅助气流量 50L/Hr,碰撞能量 38V,0.2 秒内的质量扫描范围为 m/z100-1000。

8. 按照权利要求 1 所述的太子参环肽 B 标准品的制备方法,其特征在于所述的步骤(4)中制备型高效液相色谱分离纯化所用色谱柱为:C18 柱,流动相为乙腈-水体系,乙腈在流动相中的比例为 0-20min:15-32%, 20-40min:32%,检测波长 203nm。

太子参环肽 B 标准品的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及一种以中药太子参为原料制备标准品太子参环肽 B 的提取分离纯化方法。

背景技术

[0002] 太子参(Pseudostellariae Radix, 'Tai Zi Shen')是石竹科植物孩儿参 Pseudostellaria heterophylla(Miq.)Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根,别名异叶假繁缕,是常用中药。现市售太子参主要来自安徽、贵州、福建、江苏、山东等种植基地。味甘、微苦,平,归脾、肺经,具有益气健脾、生津润肺等功效,用于脾虚体倦,食欲不振,病后虚弱,气阴不足,自汗口渴,肺燥干咳,为补气中药中的一味清补之品,特别适合作为少儿、老年人、久病恢复病人的滋补佳品。现代药理研究表明,太子参具有增强免疫、抗疲劳、抗应激、抗氧化、抗衰老、抗真菌等多种药理活性,而且在治疗白细胞减少症、心绞痛、肺炎、淋巴结核、糖尿病、继发性再生障碍性贫血等症方面取得了突破。

[0003] 目前已报道从太子参中分离得到的化合物类型有环肽、皂苷、氨基酸、糖、油脂、挥发性物质、磷脂及脂肪酸等,其成分与功效之间的关系至今尚不够明确。很多学者认为环肽类成分是太子参的特征性成分,1993 年谭宁华等首先从太子参中发现了 2 个新环肽类成分太子参环肽 A 和 B (Heterophyllin A,B),现已从太子参中分离报道 10 多个环肽类成分,2010 年版《中华人民共和国药典》新增加了太子参环肽 B 含量测定指标,建立了其 HPLC 含量测定方法,用于太子参药材的质量控制。

[0004] 有关标准品太子参环肽 B 的制备工艺的国内外报道较少,现有技术中未见有可应用于工业生产的太子参环肽 B 的制备方法。因此,有必要寻找一种简便、安全、经济高效、可应用于工业化生产的太子参环肽 B 的制备方法。

发明内容:

[0005] 本发明的目的旨在针对现有技术的上述不足,提供一种简单快速、样品损失少、成本低、可控性和重现性好、适用于工业化生产的太子参环肽 B 标准品的制备方法,建立一种通过多种现代分离分析技术手段相结合的方法。

[0006] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 太子参环肽 B 标准品的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1)提取:太子参药材晒干,粉碎至粒径 20-80 目,加入 4-10 倍体积的 95% 工业乙醇进行热回流提取,热回流温度 75-85℃,提取时间 2-4h,每次过滤后将残渣重复提取过程 2-3 次,合并提取液,减压浓缩至比重 1.1-1.2;

[0009] (2)前处理:向浸膏中加入 5-15 倍体积的 95% 工业乙醇于 75-85℃ 热回流溶解 1-3h,冷却静置 8-24h,过滤浓缩滤液,得到太子参环肽总提物;

[0010] (3)富集:将上述太子参环肽总提物用少量甲醇溶解,拌入拌样用柱层析硅胶,干燥,加载于分离用层析硅胶柱床顶端,用氯仿-甲醇溶剂梯度洗脱,收集流出液,TLC 检测环

肽成分,合并所有含环肽部分,回收溶剂,干燥得到太子参环肽 B 粗品,HPLC-MS 分析,快速锁定目标产物;

[0011] (4) 分离纯化:取上述富集产物,甲醇溶解过滤,用制备型高效液相色谱进行跟踪分离纯化,流动相为乙腈-水溶液,根据 HPLC-MS 分析结果,收集太子参环肽 B 色谱峰流出液,回收溶剂,干燥得到纯度 98% 以上的太子参环肽 B 纯品。

[0012] 上述步骤(1)中的太子参为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla*(Miq.)Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根。

[0013] 上述步骤(1)中热回流提取所用溶剂为原药材 4-10 倍体积的 95% 工业乙醇,提取时间 2-4h,温度 75-85℃,每次过滤后将残渣重复提取过程 2-3 次,合并提取液,减压浓缩至比重 1.1-1.2。

[0014] 上述步骤(2)中前处理所用溶剂为浸膏 5-15 倍体积的 95% 工业乙醇,热回流溶解时间为 1-3h,温度 75-85℃,冷却静置时间为 8-24h。

[0015] 上述步骤(3)中所用拌样用柱层析硅胶为 100-200 目,用量为太子参环肽总提物重量的 1-1.5 倍,分离用柱层析硅胶为 200-300 目,用量为太子参环肽总提物的 15-40 倍。

[0016] 上述步骤(3)中所用洗脱溶剂为氯仿-甲醇溶剂系统,梯度或等度洗脱:20-40:1(6-14BV),6-12:1(6-14BV)。

[0017] 上述步骤(3)中所用 TLC 环肽检测方法:薄层板为硅胶 G 板,样品点于硅胶 G 板上,用氯仿-甲醇(8:2-9:1)展开,挥掉溶剂后,在 100-120℃用 4-8NHCl 溶液水解 30-60min 后,再喷洒 2%-5% 茚三酮乙醇溶液显色剂,加热后显桔黄色至橙红色斑点。

[0018] 上述步骤(3)中所述 HPLC-MS 检测分析太子参环肽 B 的方法,HPLC 色谱条件为:色谱柱:C18 柱,柱温:室温,流动相:乙腈-水,乙腈在流动相中的比例为:0-20min,20%-32%;20-40min,32%;40-50min,32%-45%,流速:1.0ml/min,检测:DAD 检测器,检测波长:203nm。质谱条件为:电离方式为电喷雾离子源(ESI)正离子模式,喷雾电压 3kV,椎孔电压 42V,离子源为 450℃,雾化气流速 650L/Hr,辅助气流量 50L/Hr,碰撞能量 38V,0.2 秒内的质量扫描范围为 m/z100-1000。

[0019] 上述步骤(4)中制备型液相色谱色谱柱为:C18 柱,流动相为乙腈-水体系,乙腈在流动相中的比例为 0-20min:15-32%,20-40min:32%,检测波长 203nm。

[0020] 与现有技术相比,本发明的优益性和显著优点在于:

[0021] (1) 采用工业乙醇提取,减少了太子参中糖类、苷类等大极性物质的溶出,促进了环肽类成分的溶出,提取率高,且毒性低。

[0022] (2) 采用乙醇热回流溶解对提取浸膏进行前处理,可快速除掉大部分糖类、苷类等大极性物质,与传统有机溶剂萃取相比,具有操作简单、溶剂用量少、稳定性好等优点。

[0023] (3) 用制备型 HPLC 分离前,先用硅胶柱层析方法对太子参环肽进行富集,可除掉大部分杂质,避免干扰,使上样量得到很大提高,并减少对色谱柱的污染。

[0024] (4) 将 HPLC-MS 连用技术与制备型 HPLC 相结合,实现了太子参环肽 B 的快速识别和高通量快速制备,大大简化了物质分离纯化步骤,快速、高效,适合工业化生产。

附图说明:

[0025] 图 1 为太子参环肽 B 制备工艺流程图;

[0026] 图 2 为太子参环肽 B 化学结构；

[0027] 图 3 为硅胶富集得到太子参环肽 B 粗品的 HPLC 液相色谱图(A) 和 HPLC-MS 总离子流图(B)。

具体实施方式：

[0028] 下面结合附图，用本发明的具体实例来进一步阐述本发明的实质性内容，但是本发明的保护范围并不限于这些实例，根据本发明的实质对本发明进行的改进都属于本发明的范围。

[0029] 实施例 1：

[0030] (1) 取太子参药材原料 500g，粉碎至粒径 60 目后，加入 6 倍体积的 95% 工业乙醇后，于 80℃ 进行热回流提取，提取时间 3h，提取后将提取液抽滤出来，再重复以上过程 2 次，合并三次提取液，减压浓缩至比重 1.15，得到乙醇浸膏 65.00g，太子参环肽 B 的含量为 0.23%。向浸膏中加入 10 倍体积的 95% 工业乙醇热回流溶解 2h，冷却静置 10h，过滤，收集滤液，浓缩回收溶剂得到太子参总环肽提取物 16.50g，太子参环肽 B 的含量为 0.86%，富集率为 93.09%。

[0031] (2) 硅胶柱层析富集太子参环肽 B：上述太子参总环肽提取物用少量甲醇溶解后与等量 100-200 目硅胶拌样，挥干溶剂后，称取 30 倍量 200-300 目硅胶，湿法装柱，径高比 (1:9)，干法上样，用氯仿-甲醇梯度洗脱：25:1 (9BV)，10:1 (10BV) 收集洗脱液，每 1/2BV 收集一份，TLC 检测环肽，合并所有含环肽部分，回收溶剂干燥得到太子环肽 B 粗品 1.15g，HPLC、HPLC-MS 分析检测，太子参环肽 B 含量为 11.12%，富集率为 83.14%。

[0032] (3) 制备型高效液相色谱分离纯化太子参环肽 B：色谱柱为 SunFier prep C18 (5 μm, 19mm×250mm)，流动相为乙腈-水体系，乙腈在流动相中的比例为 15%(0min)-32%(20min)-32%(40min)；流速：10ml/min；检测波长：203nm，收集太子参环肽 B 色谱峰流出液，减压回收溶剂得到太子参环肽 B 116mg，纯度在 98% 以上，富集率为 91.07%。

[0033] 实施例 2：

[0034] (1) 取太子参药材原料 500g，粉碎至粒径 80 目后，加入 5 倍体积 95% 工业乙醇后，于 85℃ 进行热回流提取，提取时间 3h，提取后将提取液抽滤出来，再重复以上过程 2 次，合并三次提取液，减压浓缩至比重 1.2，得到乙醇浸膏 64.50g，太子参环肽 B 的含量为 0.24%。向浸膏中加入 9 倍体积 95% 工业乙醇热回流溶解 2h，冷却静置 10h，过滤，收集滤液，浓缩回收溶剂得到太子参总环肽提取物 17.50g，太子参环肽 B 的含量为 0.84%，富集率为 93.44%。

[0035] (2) 硅胶柱层析富集太子参环肽 B：上述太子参总环肽提取物用少量甲醇溶解后与等量 100-200 目硅胶拌样，挥干溶剂后，称取 25 倍量 200-300 目硅胶，湿法装柱，径高比 (1:8)，干法上样，用氯仿-甲醇梯度洗脱：30:1 (9BV)，9:1 (10BV) 收集洗脱液，每 1/2BV 收集一份，TLC 检测环肽，合并所有含环肽部分，回收溶剂干燥得到太子环肽 B 粗品 1.08g，HPLC、HPLC-MS 分析检测，太子参环肽 B 含量为 10.05%，富集率为 75.93%。

[0036] (3) 制备型高效液相色谱分离纯化太子参环肽 B：色谱柱为 SunFier prep C18 (5 μm, 19mm×250mm)，流动相为乙腈-水体系，乙腈在流动相中的比例为 15%(0min)-32%(20min)-32%(40min)；流速：10ml/min；检测波长：203nm，收集太子参环肽 B 色谱峰流出液，减压回收溶剂得到太子参环肽 B 99mg，纯度在 98% 以上，富集率为 92.01%。

[0037] 实施例 3 :

[0038] (1)取太子参药材原料 500g,粉碎至粒径 40 目后,加入 7 倍体积 95% 工业乙醇后,于 85℃进行热回流提取,提取时间 3h,提取后将提取液抽滤出来,再重复以上过程 2 次,合并三次提取液,减压浓缩至比重 1.15,得到乙醇浸膏 66.00g,太子参环肽 B 的含量为 0.23%。向浸膏中加入 11 倍体积 95% 工业乙醇热回流溶解 1.5h,冷却静置 12h,过滤,收集滤液,浓缩回收溶剂得到太子参总环肽提取物 17.00g,太子参环肽 B 的含量为 0.83%,富集率为 93.25%。

[0039] (2)硅胶柱层析富集太子参环肽 B:上述太子参总环肽提取物用少量甲醇溶解后与等量 100-200 目硅胶拌样,挥干溶剂后,称取 25 倍量 200-300 目硅胶,湿法装柱,径高比(1:8),干法上样,用氯仿-甲醇梯度洗脱:30:1(10BV),9:1(10BV)收集洗脱液,每 1/2BV 收集一份,TLC 检测环肽,合并所有含环肽部分,回收溶剂干燥得到太子环肽 B 粗品 1.05g,HPLC、HPLC-MS 分析检测,太子参环肽 B 含量为 10.78%,富集率为 76.43%。

[0040] (3)制备型高效液相色谱分离纯化太子参环肽 B:色谱柱为 SunFier prep C18(5 μm,19mm×250mm),流动相为乙腈-水体系,乙腈在流动相中的比例为 15%(0min)-32%(20min)-32%(40min);流速:10ml/min;检测波长:203nm,收集太子参环肽 B 色谱峰流出液,减压回收溶剂得到太子参环肽 B 107mg,纯度在 98% 以上,富集率为 89.54%。

[0041] 实施例 4 :

[0042] (1)取太子参药材原料 4kg,粉碎至粒径 60 目后,加入 6 倍体积 95% 工业乙醇后,于 85℃进行热回流提取,提取时间 3h,提取后将提取液抽滤出来,再重复以上过程 2 次,合并三次提取液,减压浓缩至比重 1.2,得到乙醇浸膏 544.00g,太子参环肽 B 的含量为 0.22%。向浸膏中加入 10 倍体积 95% 工业乙醇热回流溶解 2h,冷却静置 10h,过滤,收集滤液,浓缩回收溶剂得到太子参总环肽提取物 139.40g,太子参环肽 B 的含量为 0.83%,富集率为 94.83%。

[0043] (2)硅胶柱层析富集太子参环肽 B:上述太子参总环肽提取物用少量甲醇溶解后与等量 100-200 目硅胶拌样,挥干溶剂后,称取 30 倍量 200-300 目硅胶,湿法装柱,径高比(1:10),干法上样,用氯仿-甲醇梯度洗脱:30:1(10BV),10:1(10BV)收集洗脱液,每 1/2BV 收集一份,TLC 检测环肽,合并所有含环肽部分,回收溶剂干燥得到太子环肽 B 粗品 8.80g,HPLC、HPLC-MS 分析检测,太子参环肽 B 含量为 9.06%,富集率为 68.89%。

[0044] (3)制备型高效液相色谱分离纯化太子参环肽 B:色谱柱为 SunFier prep C18(5 μm,19mm×250mm),流动相为乙腈-水体系,乙腈在流动相中的比例为 15%(0min)-32%(20min)-32%(40min);流速:10ml/min;检测波长:203nm,收集太子参环肽 B 色谱峰流出液,减压回收溶剂得到太子参环肽 B 717mg,纯度在 98% 以上,富集率为 90.35%。

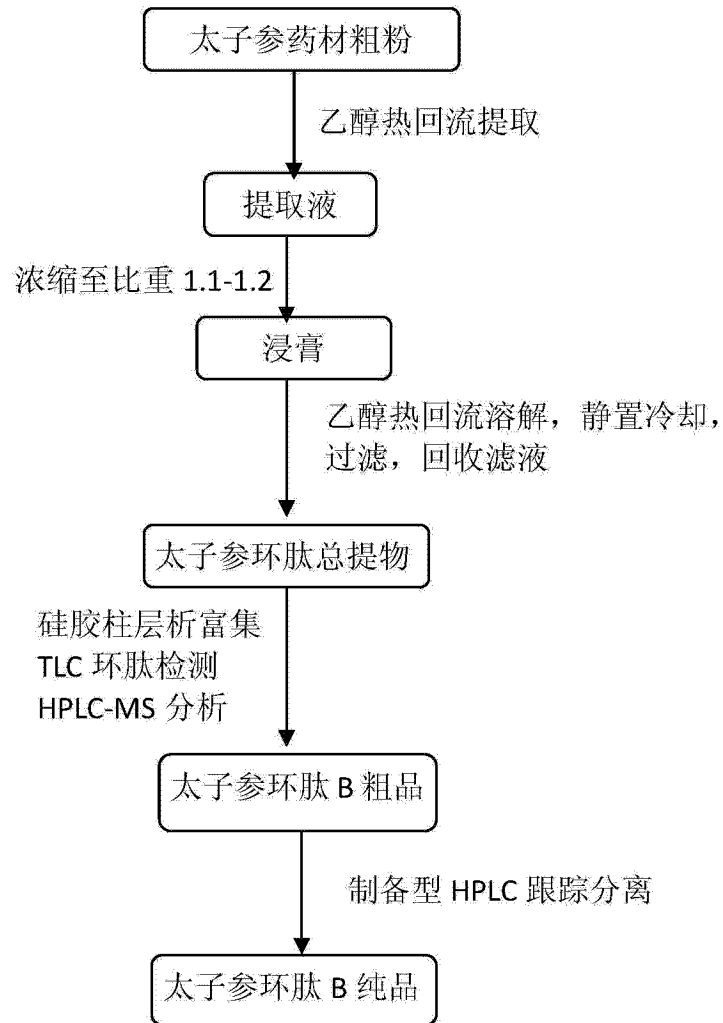


图 1

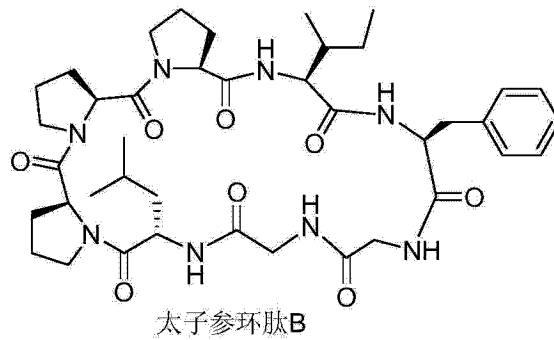


图 2

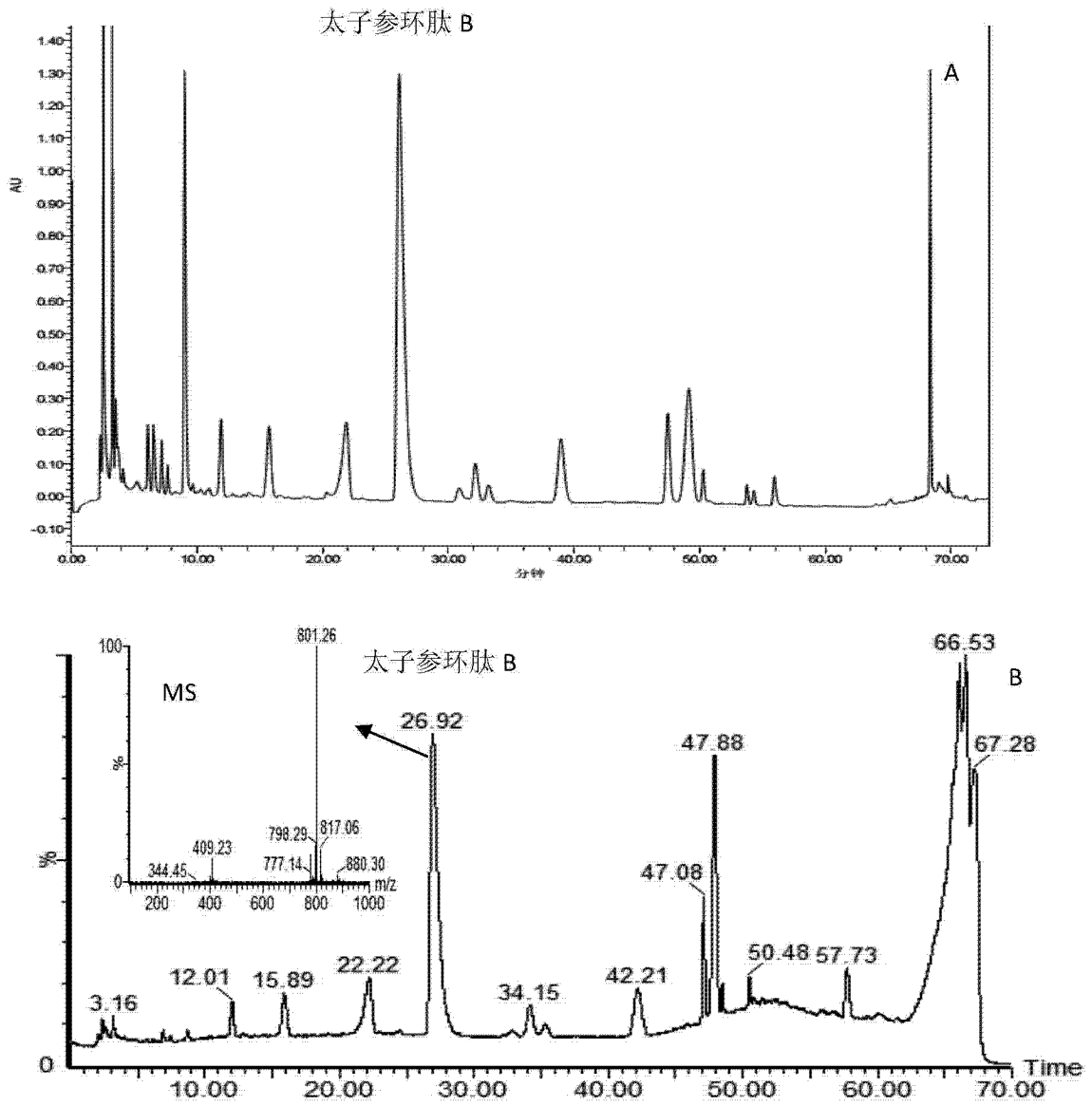


图 3