

方药纵横

引用:毛婷,毛乐,张屏,等.硝酸银硅胶色谱法制备蒙药土木香中土木香内酯和异土木香内酯[J].现代中医药,2024,44(3):94-98.

硝酸银硅胶色谱法制备蒙药土木香中 土木香内酯和异土木香内酯^{*}

毛婷¹ 毛乐² 张屏³ 张勇^{4**}

- (1. 内蒙古包钢医院,内蒙古 包头 014010;
2. 内蒙古科技大学包头医学院第三附属医院,内蒙古 包头 014010;
3. 内蒙古医科大学,内蒙古 呼和浩特 010110;
4. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院,内蒙古 包头 014010)

摘要:目的 探讨蒙药土木香中土木香内酯及异土木香内酯的制备方法。方法 采用硝酸银硅胶色谱法进行制备。结果 得到两个色泽优良、克数较大的结晶化合物,根据其理化性质及波谱技术鉴定为土木香内酯和异土木香内酯。结论 硝酸银硅胶色谱法对土木香内酯及异土木香内酯能实现满意分离,且产量大、纯度高、操作简单,是一种高效快速的制备方法,为土木香内酯及异土木香内酯的广泛应用提供精准可靠的参考资料。

关键词:硝酸银硅胶色谱法;土木香内酯;异土木香内酯

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2024)03-0094-05

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2024.03.018

Preparation of Tu Mu Xiang lactone and Iso Tu Mu Xiang lactone in Mongolian Medicine Tu Mu Xiang by Silver Nitrate Silica Gel Chromatography

MAO Ting¹ MAO Le² ZHANG Ping³ ZHANG Yong⁴

- (1. Inner Mongolia Baogang Hospital, Inner Mongolia Baotou 014010, China; 2. Third Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Inner Mongolia Baotou 014010, China;
3. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 4. First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Inner Mongolia Baotou 014010, China)

Abstract: **Objective** To explore the preparation methods of Tu Mu Xiang lactone and Iso Tu Mu Xiang lactone in Mongolian medicine. **Methods** The method was prepared using silver nitrate silica gel chromatography. **Results** As a result, two crystalline compounds with excellent color and large weight were obtained, and identified as Tu Mu Xiang lactone and Iso Tu Mu Xiang lactone based on their physical and chemical properties and spectroscopic techniques. **Conclusion** Silver nitrate silica gel chromatography can achieve satisfactory separation of Tu Mu Xiang lactone and Iso Tu Mu Xiang lactone, with high yield, high purity, and simple operation. It is an efficient and rapid preparation method,

* 基金项目:国家自然科学基金地区项目(81460651)

** 通讯作者:张勇,主治医师。E-mail:943328214@qq.com

providing accurate and reliable reference materials for the widespread application of Tu Mu Xiang lactone and Iso Tu Mu Xiang lactone.

Key words: Silver nitrate silica gel chromatography; Tu Tu Xiang lactone; Iso Tu Mu Xiang lactone

蒙药土木香为菊科旋覆花属植物土木香(*Inula Helenium* L.)的干燥根,是民族特色药材,在蒙医临床中占有重要地位。研究表明土木香内酯和异土木香内酯是其主要活性成分^[1-2],含量较多且具多重生物学活性,在抗菌、抗炎、抗肿瘤、保肝、镇痛、驱虫及降糖等^[3-7]多方面疗效显著。硝酸银硅胶色谱法,可有效分离挥发油、萜类、脂肪酸及甾体类等化合物,利用双键数量及位置不同与 Ag⁺形成配合物的牢固程度不同,从而改变在硝酸银-硅胶上的分配系数^[8-13]。PANKAJ P 等^[14]采用硝酸银浸渍硅胶中压液相色谱法,分离得到 α -檀香烯、 β -檀香烯、(Z)- α -檀香醇、(Z)- β -檀香醇,纯度均大于 96%。黄汉昌等^[15]采用硝酸银硅胶柱层析法将香茅次油中 β -榄香烯成功分离,含量达 98.0% 以上,回收率达 60%。周长远等^[16]采用硝酸银硅胶柱从姜油树脂中分离出 β -倍半水芹烯,收率可达 84.05%。张卫民等^[17]采用 10% 硝酸银硅胶柱层析法分离核桃油中的亚麻酸,纯度达到 95.9%。刘国宇等^[18]采用氧化铝-硝酸银联合硝酸银-硅胶络合柱层析法对土木香丙酮提取物分离纯化,得到 16 g 土木香内酯和 20 g 异土木香内酯。基于前期相关文献研究,故寻找一种高效快速的制备方法以期得到较大量土木香内酯和异土木香内酯,具有极其重要的研究意义。

1 仪器及材料

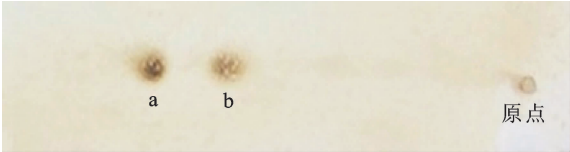
1.1 仪器 308 万能粉碎机(南京腾阳干燥设备厂);BFM-6A 超微粉碎机(济南贝力粉体技术有限公司);Bruker AVANCE III 500 MHz 超导核磁共振仪(瑞士布鲁克公司);气相色谱仪(型号:岛津 GC-2014C,产地:苏州);Hei-VAP Precision 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);D₂F-6050 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 材料 土木香(*Inula Helenium* L.,济南人和中药饮片公司),由内蒙古医科大学生药教研室主任包保全教授鉴定;标准品土木香内酯(批号 LPT2014005)及异土木香内酯(批号 LPT2014011)均购于沈阳泷浦科技有限公司,纯度均大于 98%;

薄层硅胶 G;柱层析硅胶(200 ~ 300 目);甲醇(色谱纯);环己烷(分析纯);乙酸乙酯(分析纯)。

2 方法

2.1 硝酸银薄层制备 参照文献^[19-21]及不同浓度 0.25%、5%、10% 硝酸银薄层实验,将薄层硅胶 G 与不同浓度硝酸银水溶液按比例混合,同一方向研磨混匀,按薄层板制法,暗室阴干,105℃ 真空干燥箱中活化 30 min,颜色变浅棕色取出,放冷至室温,干燥避光保存。展开剂为环己烷-乙酸乙酯(3:1),显色剂为 2% 香草醛-浓硫酸,结果见图 1。



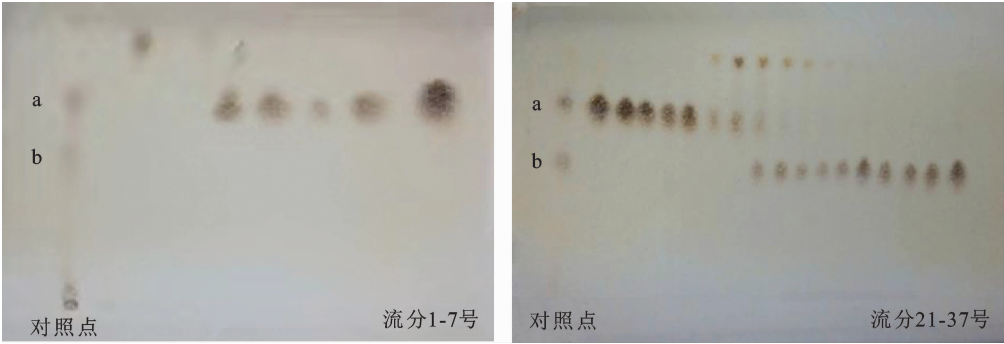
原点:土木香内酯和异土木香内酯混合对照品,

a:土木香内酯 b:异土木香内酯

图 1 10% 硝酸银 TLC 图

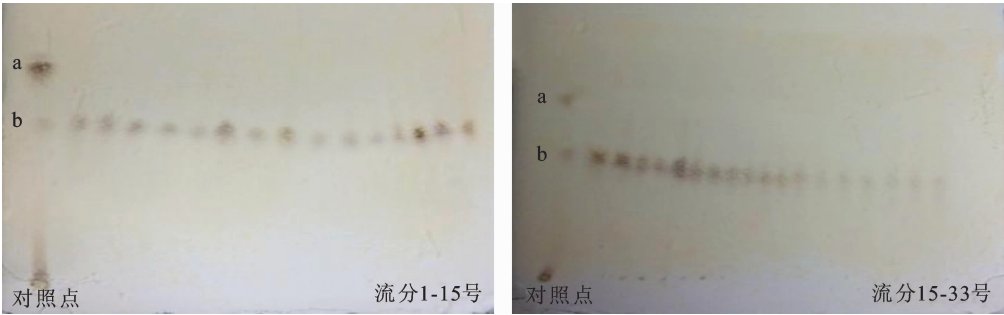
2.2 硝酸银硅胶柱制备 50 g 硝酸银溶于 100 mL 超纯水中,加甲醇配成甲醇水溶液 1000 mL,500 g 硅胶缓慢溶于其中,搅成匀浆,避光浸泡 24 h,之后旋转蒸发至粉末流动状(旋蒸口脱脂棉干燥,避光操作),银化硅胶置于 120℃ 真空干燥箱中活化 20 h,避光放置室温,得银化硅胶。环己烷将银化硅胶搅成匀浆,排气泡,洗脱平衡硅胶柱 5 h。

2.3 制备及薄层检识 土木香超微粉 1.0 kg,8 倍乙酸乙酯提取 3 次,依次 2 h、1 h、0.5 h,合并过滤,减压浓缩与水(1:1)洗涤萃取,取乙酸乙酯层浓缩,冷冻干燥至浸膏 32.38 g。22 g 浸膏上样,8 倍柱体积环己烷-乙酸乙酯(15:1)和(5:1)洗脱,接收流分,旋蒸挥干。环己烷-乙酸乙酯(15:1)洗脱,接收流分 37 瓶,10% 硝酸银 TLC 鉴别,展开剂为环己烷-乙酸乙酯(3:1),显色剂为 2% 香草醛-浓硫酸,结果见图 2,合并样品,得到化合物 1(4.3 g),化合物 2(2.2 g);环己烷-乙酸乙酯(5:1)洗脱,得到流分 38 瓶,10% 硝酸银 TLC 鉴别,薄层条件同上,合并样品,得到化合物 2(2.5 g)。结果见图 3。



对照点:土木香内酯和异土木香内酯混合对照品,a:土木香内酯 b:异土木香内酯

图2 10% 硝酸银 TLC 图(环乙烷-乙酸乙酯 15:1 流分)



对照点:土木香内酯和异土木香内酯混合对照品,a:土木香内酯 b:异土木香内酯

图3 10% 硝酸银 TLC 图(环乙烷-乙酸乙酯 5:1 流分)

3 结果

化合物1 白色无定型粉末(CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{25.6} + 72.56$ (c 5.4, CHCl_3); HRMS: m/z 233. 1538 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for 232. 1536, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$); UV (MeOH)

λ_{max} (log ϵ) 210 (1. 13) nm; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 和 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) 见表 1, 以上波谱数据与文献^[2]中报道的土木香内酯一致, 故鉴定化合物 1 为土木香内酯, 化学结构式如图 4。

表1 化合物 1 和化合物 2 的¹H NMR 和¹³C NMR 数据(500 和 125 MHz,CDCl₃)

Position	δH_1	δC_1	δH_2	δC_2	文献
1	1. 80 (1H, m, H-1a)	16. 8	2. 20(1H, d, J =15. 5 Hz, H-1a)	41. 4	[22-24]
2	1. 60 (2H, m, H-2)	32. 8		22. 7	
3	1. 83 (1H, m, H-3a) 2. 45 (1H, m, H-3b)	42. 2	2. 34(1H, d, J =13 Hz, H-3)	36. 8	
4	2. 45 (1H, m, H-4)	37. 6		148. 9	
5		149. 1	2. 34(1H, d, J =12. 5 Hz, H-5)	46. 2	
6	5. 15(1H, d, J =3 Hz, H-6)	118. 8	1. 74(1H, dd, J =7 Hz, 13 Hz, H-6a) 1. 40(1H, dd, J =11 Hz, 18 Hz, 20. 5 Hz, H-6b)	27. 5	
7	3. 69 (1H, m, H-7)	39. 5	2. 98(1H, m, H-7)	40. 6	
8	4. 82(1H, m, H-8)	76. 5	4. 50(1H, ddd, J =1. 5 Hz, 5 Hz, H-8)	76. 8	
9	2. 11(1H, d, J =15. 5 Hz, H-9a) 1. 55(1H, m, H-9b)	42. 7	1. 25(1H, dd, J =4 Hz, 13. 5 Hz, H-9a)	42. 2	
10		32. 7		34. 3	
11		139. 9		142. 3	
12		170. 5		170. 6	
13	6. 20(1H, br. s, H-13a) 5. 63(1H, br. s, H-13b)	121. 6	6. 13(1H, s, H-13a) 5. 59(1H, s, H-13b)	120. 0	
14	1. 20(3H, s, H-14)	28. 6	0. 83(3H, s, H-14)	17. 7	
15	1. 09(3H, d, J =7 Hz, H-15)	22. 6	4. 77(1H, br. s, H-15a) 4. 44(1H, br. s, H-15b)	106. 6	

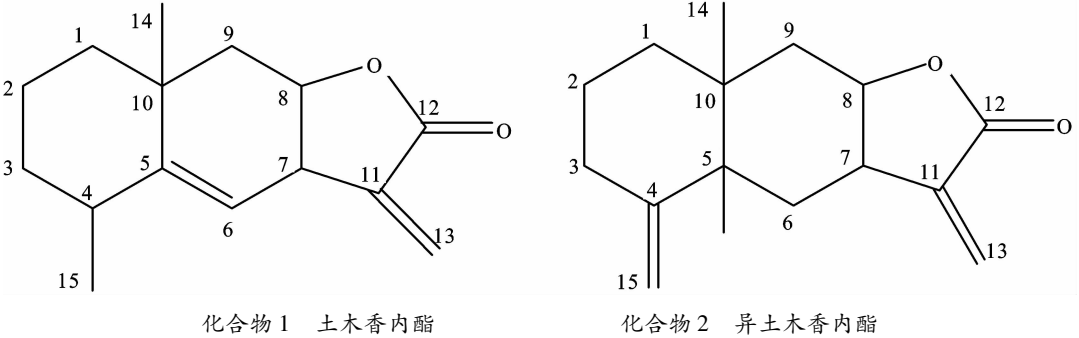


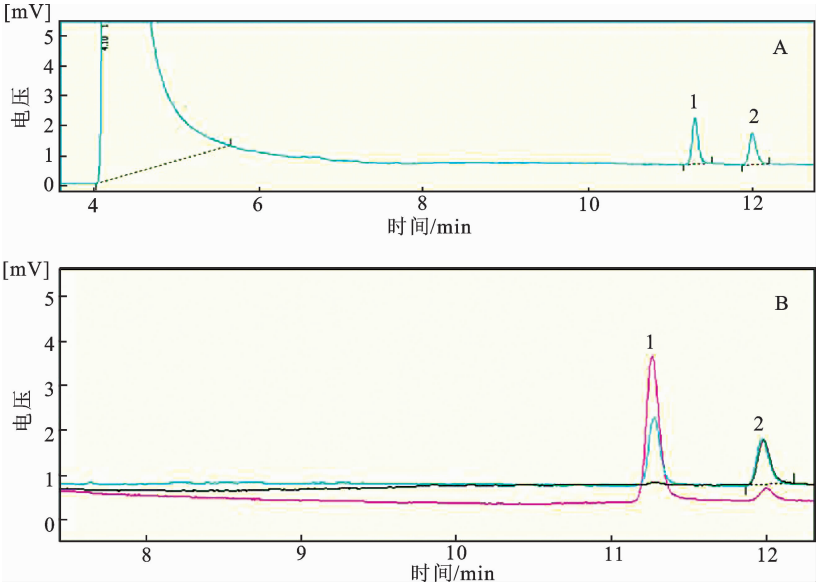
图 4 化合物 1 和化合物 2 化学结构式

化合物 2 白色无定型粉末(CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{25.5} +227.28$ (c 0.5, CHCl_3), HRMS: m/z 233. 1538 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for 233. 1536, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 212 (0. 66) nm; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 和 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) 见表 1, 以上波谱数据与文献^[2]中报道的异土木香内酯一致, 故鉴定化合物 2 为异土木香内酯, 化学结构式如图 4。

4 气相色谱分析

采用气相色谱法分析土木香内酯和异土木香

内酯质量^[25-28], 色谱条件: 挥发油测定毛细管柱, 加热速率为 10°C , 程序升温, 初始温度 230°C , 保持 5 min, 最终温度 280°C , 保持 10 min, 运行时间 20 min, 进样口温度为 300°C , 检测器温度 300°C , 进样量 $1\ \mu\text{L}$, 溶剂为乙酸乙酯。对照品溶液制备: 取土木香内酯和异土木香内酯对照品适量, 精密称定, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 约含 0.2 mg 的混合对照品溶液; 样品溶液制备同上, 气相色谱结果见图 5。



1. 土木香内酯; 2. 异土木香内酯

图 5 混合对照品 (A) 和样品 (B) 气相色谱图

5 讨论

采用硝酸银硅胶色谱法制备土木香内酯及异土木香内酯, 结果表明, 其在 10% 硝酸银薄层板上分离效果好, 经气相色谱分析, 保留时间与标准品几乎完全相同, 峰形好, 纯度高。土木香原材料 1.0 kg, 提取浸膏 22 g 上样, 最终得土木香内酯 4.3 g, 异土木香内酯 4.7 g, 按照原材料计算得率分别为 0. 43%、0. 47%, 故该法分离效果好、产量

大、纯度高、设备简单、操作方便、优点突出, 可高效快速分离制备土木香内酯和异土木香内酯, 是一种较理想的制备方法, 为其标准品的制备奠定基础, 同时为其它倍半萜内酯类化合物研究提供参考。硝酸银见光易分解, 故实验过程中均需避光操作。

参考文献

[1] 吴明. 土木香根化学成分研究与土木香倍半萜内酯的

- 结构修饰[D]. 石家庄:河北医科大学,2010.
- [2]赵永明. 土木香化学成分的研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2007.
- [3]风云. 土木香化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国民族医药杂志,2021,27(12):48-49.
- [4]ZHENG XQ, WU Z, XU J, et al. Bioactive sesquiterpenes from *Inula helenium* [J]. Bioorganic chemistry, 2021, 114:105066.
- [5]YANG CM, ZHANG LL, HUANG HK, et al. Alantolactone inhibits proliferation, metastasis and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/ β -catenin and MAPKs signaling pathway [J]. Genes&Diseases, 2022, 09(2):466-478.
- [6]YAN YY, ZHANG Q, ZHANG B, et al. Active ingredients of *Inula helenium* L. exhibits similar anti-cancer effects as isoalantolactone in pancreatic cancer cells [J]. Natural Product Research; Formerly Natural Product Letters, 2020, 34(17):2539-2544.
- [7]ZHANG B, ZENG JM, YAN YY. Ethyl acetate extract from *Inula helenium* L. inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells by regulating the STAT3/AKT pathway [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(4):5440-5448.
- [8]欧阳长庚, 卢文彪. 利用硝酸银处理的硅胶色谱方法分离和提纯中药有效成分的思考[J]. 广州中医药大学学报, 2004(4):319-322.
- [9]张新新, 杨洋, 刘胜家, 等. 藏木香中土木香内酯和异土木香内酯的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(2):116-119.
- [10]郭剑霞, 张谨华, 潘玉峰. 硝酸银-硅胶柱层析法分离纯化华山松籽油亚油酸[J]. 食品工业, 2020, 41(9):226-231.
- [11]王艳, 周长远, 杜爱玲. 硅胶—硝酸银硅胶柱层析分离纯化 β -倍半水芹烯[J]. 食品与机械, 2016, 32(5):165-167.
- [12]程媛媛, 杨传彬, 赵佳, 等. 硝酸银改性硅胶柱色谱法纯化川芎精油中的藁本内酯[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(5):552-555.
- [13]张良, 刘美玲, 董强, 等. 硝酸银硅胶柱分离纯化蛇鳕鱼油中的 EPA 和 DHA [J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12):63-68.
- [14]PANKAJ P DARAMWAR, PRABHAKAR LAL SRIVASTAVA, BALARAMAN Priyadarshini. Preparative separation of α - and β -santalenes and (Z)- α - and (Z)- β -santalols using silver nitrate-impregnated silica gel medium pressure liquid chromatography and analysis of sandalwood oil [J]. The Analyst, 2012, 137(19):4564-4570.
- [15]黄汉昌, 朱宏吉, 姜招峰. 银离子配位色谱法分离香茅次油中 β -榄香烯的研究[J]. 无机化学学报, 2009, 25(3):433-438.
- [16]周长远, 王艳, 杜爱玲. 姜油树脂中 β -倍半水芹烯的分离纯化[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3):225-228.
- [17]张卫民, 翟元春, 杨红军, 等. 硝酸银-硅胶柱层析法分离纯化核桃油中亚麻酸工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(10):229-232.
- [18]刘国宇, 李静, 王新莉, 等. 土木香中土木香内酯与异土木香内酯的分离鉴定[J]. 陕西农业科学, 2011, 57(4):9-10.
- [19]王战国, 赖先荣, 肖莹莹, 等. 川木香质量标准研究[J]. 成都中医药大学学报, 2006, 29(1):54-56.
- [20]胡春艳, 闫媛博, 鲍劲松, 等. 土木香薄层色谱鉴别方法的探讨[J]. 北方药学, 2009, 06(1):1-6.
- [21]马静, 宋毅, 王曙, 等. 藏木香的生药学研究及质量标准制订[J]. 中药材, 2017, 40(6):1384-1388.
- [22]ZHAO YM, ZHANG ML, SHI QW, et al. Study on the chemical components of the *Inula helenium* [J]. Natural Product Research, 2009, 21(4):616-618.
- [23]JIANG HL, CHEN J, JIN XJ, et al. Sesquiterpenoids alantolactone analogues and secoguaiene from the roots of *Inula helenium* [J]. Tetrahedron, 2011, 67(47):9193-9198.
- [24]ZHANG L, WANG MY, LI XB, et al. Extraction and purification of alantolactone and isoalantolactone from root of *Inula helenium* [J]. Natural Product Research, 2015, 27(1):126-133.
- [25]胡晓炜, 徐爱仁. 三种木香的气相色谱法鉴别与系统聚类分析[J]. 中国现代应用药学, 2005(3):249-252.
- [26]李婷婷, 黄晓婧, 王欣, 等. 冠心苏合丸的 GC 特征图谱研究[J]. 华西药学杂志, 2021, 36(5):535-538.
- [27]李瑾, 卜雕雕, 王媚, 等. 固相萃取净化-气相色谱质谱联用法快速测定金银花软胶囊浸膏中的农药残留[J]. 现代中医药, 2017, 37(3):75-78.
- [28]廖然, 谢伟. 气相色谱法测定解毒扶正胶囊中甲基正壬酮含量[J]. 现代中医药, 2015, 35(4):59-60.

(修回日期:2023-03-01 编辑:宋蓓)