

柱色谱-高速逆流色谱法分离纯化虎杖中大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷

赵东梅, 王 威*, 刘 坤, 邵延琳, 刘 洋, 刘小红, 高 华, 高 琪

青岛大学药学院, 山东 青岛 266021

摘 要: **目的** 建立从虎杖药材中高效制备分离大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(EG)的方法。**方法** 采用大孔吸附树脂柱色谱和 ODS 柱色谱分离目标组分, 高速逆流色谱(HSCCC)纯化目标化合物, 质谱和核磁共振波谱数据鉴定结构, HPLC 不加校正因子的主成分自身对照法检测纯度。**结果** 优化确定以二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水(8:1:6:5)为 HSCCC 溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 纯化制备了符合定量测定用要求的 EG 对照品, HPLC 法检测质量分数大于 98%。**结论** 方法适于从虎杖药材中大量制备高纯度 EG, 为含有该成分的天然产物及其制剂质量评价提供对照物质。

关键词: 虎杖; 大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷; 高速逆流色谱; 分离纯化; 大孔吸附树脂; HPLC

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)12-2118-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.017

Separation and purification of emodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* by column and high-speed counter-current chromatography

ZHAO Dong-mei, WANG Wei, LIU Kun, SHAO Yan-lin, LIU Yang, LIU Xiao-hong, GAO Hua, GAO Qi

School of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao 266021, China

Abstract: Objective To develop an effective and rapid method for the preparation of emodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside (EG) reference substance from *Cuspidati Rhizoma et Radix* (PCRR). **Methods** The target fraction was isolated by macroporous resin column chromatography and ODS column chromatography, and then the target compound was purified by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). The structure was identified by ESI-MS and NMR spectral techniques, and its purity was determined by HPLC analysis using the main component self-comparison with no correction factor method. **Results** A solvent system that consisted of dichloromethane-ethyl acetate-methanol-water (8:1:6:5) was applied to the separation based on assessment using HPLC partition coefficient method. The upper phase was used as the stationary phase, while the lower phase was used as the mobile phase. The reference substance of EG was prepared, and its purity was up to 98% in line with the standard of quantitative analysis. **Conclusion** The method is suitable for the preparation of EG from PCRR, which provides a basis for the quality control of natural product and their preparations.

Key words: *Cuspidati Rhizoma et Radix*; emodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside; high-speed counter-current chromatography; separation and purification; macroporous resin; HPLC

大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(EG)属蒽醌苷类化合物, 已从巴天酸模^[1]、藏边大黄^[2]、何首乌^[3]、番泻叶^[4]、板蓝根^[5]、夜交藤^[6]、虎杖^[7-8]等植物中分离鉴定。现代药理学研究表明, EG 具有抗炎^[9]、抗菌、抗病毒^[10]、改善睡眠^[6]、提高智力^[11]、神经保护和雌激素样作用^[12-13]等生物活性。本课题组前期研究发现 EG 潜在抑制尿酸生成的关键酶黄嘌呤

氧化酶活性, 已申请中国发明专利^[14]。目前商品化的 EG 对照品难以获得, 《中国药典》2015 年版对大黄、虎杖、何首乌等药材定量测定项下仍采用水解后测定苷元大黄素的方法。因此有必要建立一种高效制备 EG 的方法, 为含有该成分的天然产物及其制剂的质量评价提供物质基础。

高速逆流色谱(HSCCC)是一种无固相载体的

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 山东省重点研发计划(2015GSF119001)

作者简介: 赵东梅(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然活性物质分析。

*通信作者 王 威(1972—), 男, 教授, 博士研究生导师。Tel: (0532)82991172 E-mail: qddxwangwei@qdu.edu.cn, w.w.wangwei@263.net

连续液-液分配色谱技术,目前广泛用于天然活性成分的分离制备^[15-18]。不但分离效率高而且制备量大,同时消除了传统色谱技术固态载体导致的样品不可逆吸附、对样品的污染、变性、失活等影响^[19]。本研究采用大孔树脂柱和 ODS 柱色谱分离虎杖提取物中的目标组分, HSCCC 纯化制备了符合定量测定用的 EG。

1 仪器与材料

TBE-300C 型高速逆流色谱仪,上海同田生化技术有限公司;Agilent 1260 型高效液相色谱仪配备 G1311C 四元输液泵, G1314F 紫外检测器, G1329B 自动进样器, G1316A 柱温箱, Chemstation 色谱工作站,美国安捷伦公司; LC-20AT 输液泵, SPD-M20A 二极管阵列检测器, LC solution 色谱工作站,日本岛津制作所; Bruker AV-500 核磁共振波谱仪; Micro TOFQ 飞行时间质谱仪,德国布鲁克光谱仪器公司; BT 125D 分析天平,德国赛多利斯公司。分析型色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈、Extend-C₁₈、Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 美国安捷伦公司。

HPD100 大孔吸附树脂, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 十八烷基键合硅胶 (S-50 μm), 日本 YMC 科学株式会社; 氘代 DMSO, 日本和光纯药工业株式会社; 色谱纯乙腈, 美国天地有限公司; 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

虎杖药材购于安徽亳州市永刚饮片有限公司, 批号 121221, 经大连大学冯宝民教授鉴定为蓼科虎杖属植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根, 标本存放于青岛大学药学院, 样品编号: QY-2012-PC-01。

2 方法与结果

2.1 HPLC 分析条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 15%~20%乙腈; 20~35 min, 20%~30%乙腈; 35~55 min, 30%~50%乙腈; 55~80 min, 50%~60%乙腈; 80~85 min, 60%~100%乙腈; 85~90 min, 100%乙腈; 检测波长为 280 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。

2.2 虎杖药材的提取^[20]

取虎杖药材 1 kg, 加入 6 倍量 80%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 提取液合并, 减压回收乙醇得乙醇提取物 282 g, HPLC 图见图 1-A, 峰面积归一化

法计算乙醇提取物中 EG 质量分数为 37.77%。

2.3 柱色谱分离

取虎杖乙醇提取物 280 g 加水溶解, 经 HPD100 大孔树脂柱色谱 (柱径 10 cm, 填充高度 40 cm) 依次用水和 30%乙醇洗脱至洗脱液近无色, 弃去洗脱液, 再用 50%乙醇洗脱至洗脱液近无色, 收集洗脱液, 减压回收乙醇得 50%乙醇洗脱部位 76 g, HPLC 图见图 1-B, 峰面积归一化法计算 50%乙醇洗脱部位中 EG 质量分数为 61.47%。取 50%乙醇洗脱部位 50 g, 经 ODS 柱色谱 (柱径 5 cm, 填充高度 30 cm), 以甲醇-水 (5:5) 洗脱, 每 50 mL 为 1 馏份, 经 TLC 检识合并 69~82 号馏份, 获得目标组分 7.65 g, HPLC 图见图 2, 峰面积归一化法计算目标组分中 EG 质量分数为 75.82%。

2.4 HSCCC 溶剂系统的选择

采用 HPLC 法测定目标组分中各色谱峰在不同组成和比例溶剂系统中的分配系数 (*K*), 取目标组

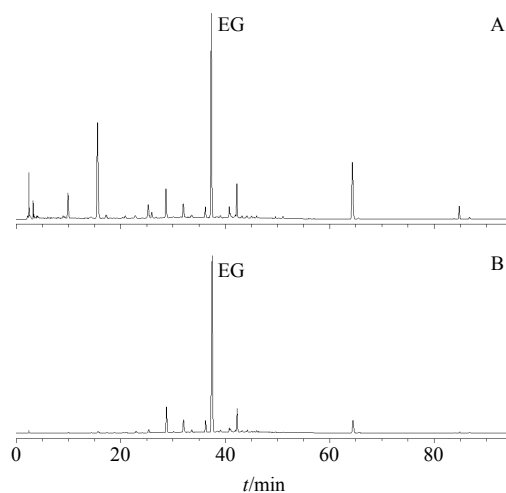
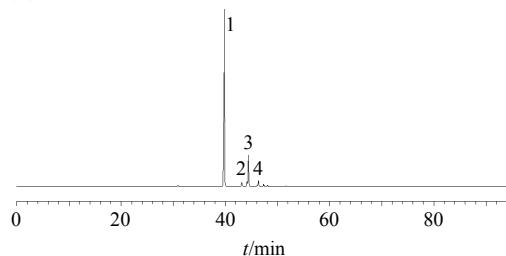


图 1 虎杖乙醇提取物 (A) 和 50%乙醇洗脱部位 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of ethanol extract (A) and 50% ethanol eluted part (B) of PCRR



1-EG 2~4-未知杂质
1-EG 2~4-unknown impurities

图 2 目标组分 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of target fraction

分 5 mg, 加入预先达到分配平衡的 2 相溶剂各 2 mL 使溶解, 剧烈振荡使充分混合, 待达到 2 相分配平衡后, 分别精确取上相和下相溶液各 1 mL, 蒸干, 加甲醇 2 mL 使溶解, HPLC 分析, 各色谱峰在上相溶液中的峰面积值记作 A_1 , 在下相溶液中的峰面积值记作 A_2 , 计算在不同溶剂系统中的 K ($K=A_1/A_2$, 其中 K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 分别代表 EG 和 2~4 号杂质

组分的分配系数)。不同溶剂系统的 K 值和相邻色谱峰之间的分离度见表 1, 溶剂系统 2 对 EG 色谱峰与相邻色谱峰的分离度为 2.14, 满足基线分离要求, 且与溶剂系统 3 和 4 比较, EG 色谱峰 K 值最小, 出峰时间短, 节省分离时间, 故选择二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:1:6:5) 作为溶剂系统进行制备分离。

表 1 不同溶剂系统的 K 值和分离度Table 1 K values and resolution of different solvent systems

编号	溶剂系统	K_1	分离度 ₁₋₂	K_2	分离度 ₂₋₃	K_3	分离度 ₃₋₄	K_4
1	正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (1:1:1:1)	0.01	—	0.02	—	0.03	—	0.01
2	二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:1:6:5)	2.20	2.14	1.03	2.10	0.49	1.29	0.38
3	二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:1:5:6)	3.46	4.32	0.80	1.86	0.43	1.02	0.44
4	二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (8.5:0.5:6:5)	2.21	3.45	0.64	1.39	0.46	1.37	0.63

2.5 HSCCC 分离制备

按二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:1:6:5) 配制溶剂体系, 充分混匀后静置分层, 平衡后分出两相, 超声脱气 30 min。上相作固定相, 下相作流动相。开启恒温水浴循环器设置温度为 25 °C, 将上相以 40 mL/min 的体积流量泵入分离管内, 当固定相充满整个管道后, 开启主机, 调节主机转速为 850 r/min, 待转速稳定后以 5 mL/min 的体积流量泵入下相, 有下相流出时体系平衡。取目标组分 100 mg, 加上相和下相各 10 mL 使溶解 (质量浓度 5 mg/mL), 进样。紫外检测波长为 280 nm, 手动收集 107~128 min 流出液 (图 3), 减压干燥得黄色粉末 32 mg。

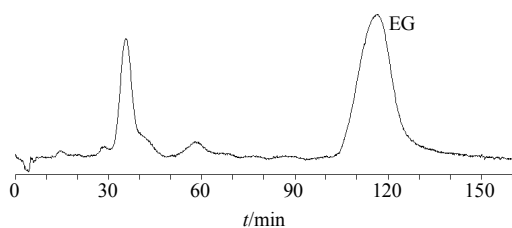


图 3 目标组分 HSCCC 色谱图

Fig. 3 HSCCC of target fraction

2.6 结构鉴定

黄色粉末 (甲醇), mp 237~238 °C, ESI-MS m/z : 431 $[M-H]^-$. 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 13.22 (1H, s, 1-OH), 7.43 (1H, brs, H-4), 7.26 (1H, brs, H-5), 7.13 (1H, br s, H-2), 6.99 (1H, brs, H-7), 5.04 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 3.73 (1H, brd, $J=11.4$

Hz, H-6'a), 3.54 (1H, dd, $J=11.6, 5.0$ Hz, H-6'b), 3.23~3.46 (4H, m, H-2'~5'), 2.39 (3H, s, -CH₃); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 186.2 (C-9), 182.2 (C-10), 165.1 (C-6), 161.7 (C-8), 161.2 (C-1), 146.7 (C-3), 136.4 (C-10a), 132.1 (C-4a), 124.1 (C-2), 119.1 (C-4), 114.5 (C-8a), 112.8 (C-9a), 108.8 (C-5), 108.6 (C-7), 101.0 (C-1'), 77.3 (C-3'), 76.3 (C-5'), 73.3 (C-2'), 69.4 (C-4'), 60.6 (C-6'), 21.3 (-CH₃). 以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定该化合物为 EG。

2.7 不加校正因子的主成分自身对照法的纯度测定^[22-23]

2.7.1 供试品溶液的制备 精密称取制得的 EG 适量, 加甲醇制成 1.10 mg/mL 的溶液。

2.7.2 自身对照溶液的制备 精密吸取供试品溶液 0.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.7.3 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈, 柱温为 25 °C, 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱条件为 0~20 min, 15%~30%乙腈; 20~80 min, 30%乙腈; 检测波长为 280 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L。

2.7.4 测定方法与结果 精密吸取自身对照溶液 10 μ L 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 计算主色谱峰峰面积的 RSD 为 0.90%。分别精密吸取供试品溶液和自身对照溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录主色谱峰保留时间 2 倍以上的色谱图 (图 4), 测定供试品溶液各杂质峰面积和自身对照溶液主色谱峰面积, 以各杂质峰面积之和与主色谱峰面积比值

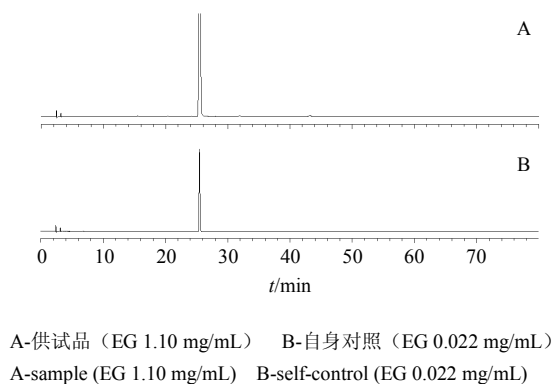


图 4 纯度检查的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of purity test

计算杂质的量。结果表明, EG 质量分数为 99.94% ($n=3$)。

3 讨论

基于前期研究发现虎杖药材中 EG 的量较高, 因此选择虎杖作为研究对象制备 EG 对照品。虎杖中含有蒽醌类、黄酮类和萜类等多种不同结构类型的化合物, 为提高目标对照品的纯度, 构建了大孔吸附树脂和 ODS 柱色谱分离目标组分策略, 经大孔吸附树脂柱色谱不同体积分数乙醇洗脱, EG 主要集中在 50%乙醇洗脱部位, 用水和 30%乙醇洗脱去除了提取物中大极性化合物, 使 EG 得到富集。50%乙醇洗脱部位经操作方便周期短的 ODS 柱色谱进一步分离得到仅含 4 个主色谱峰的分选组分。

溶剂系统的选择是 HSCCC 分离中的关键环节, 通常通过测定待分离样品中各色谱峰在溶剂系统中的 K 值和相邻色谱峰的分选度来判断溶剂系统是否适合目标组分的分选。对于 HSCCC 分选, 待分离样品中各色谱峰在 2 相溶剂系统中的 K 值范围为 0.2~5^[24-25], 理想的相邻色谱峰的分选度应该大于 1.5 ($\alpha=K_2/K_1$, $K_2>K_1$)^[25-26]。溶剂系统 1 待分离样品中各色谱峰的 K 值偏小, 在固定相中保留时间短, 难以分选; 溶剂系统 2~4 待分离样品中各色谱峰的 K 值均符合 K 值范围, 溶剂系统 2 的 K 值最小, EG 色谱峰出峰时间短, 节省分选时间; 溶剂系统 2~4 的 EG 色谱峰与相邻色谱峰的分选度均满足基线分选要求。考虑分选时间和分选效果, 选择二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:1:6:5) 作为溶剂系统进行制备分选。

曾采用制备液相色谱分选但效果不太理想, 柱色谱结合 HSCCC 分选得到的 EG 经 HPLC-DAD 分析为 1 个主色谱峰, 改变流动相梯度洗脱条件和色

谱柱测定均未出现异常峰, HPLC 不加校正因子的主成分自身对照法测定纯度符合中药对照品的要求。

参考文献

- [1] 高黎明, 魏小梅, 郑尚珍, 等. 巴天酸模中化学成分的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 207-209.
- [2] 刘 兵, 杨 静, 王 曙. 藏边大黄的化学成分研究 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22(1): 33-35.
- [3] 王文静, 张维明, 董小玲, 等. 滇产何首乌化学成分的研究 [J]. 云南中医学院学报, 2005, 28(1): 10-12.
- [4] 郭秋萍, 王祝举, 付梅红, 等. 番泻叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 2007, 30(10): 1250-1252.
- [5] 刘云海, 吴晓云, 方建国, 等. 板蓝根化学成分研究 (V) [J]. 中南药学, 2003, 1(5): 302-305.
- [6] 汲广全, 杨 娟, 吴兰芳. 夜交藤改善睡眠成分大黄酒葡萄糖苷的提取纯化工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2188-2190.
- [7] 肖 凯, 宣利江, 徐亚明, 等. 虎杖的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(1): 12-14.
- [8] 时圣明, 潘明佳, 王文倩, 等. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 317-321.
- [9] Kim S H, Jang S D, Lee K Y L, et al. Chemical constituents isolated from *Polygala japonica* leaves and their inhibitory effect on nitric oxide production *in vitro* [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2008, 24(1): 230-233.
- [10] Lin H W, Sun M X, Wang Y H, et al. Anti-HIV activities of the compounds isolated from *Polygonum cuspidatum* and *Polygonum multiflorum* [J]. *Planta Med*, 2010, 76(9): 889-892.
- [11] 陈万生, 徐江平, 李 力, 等. 大黄素-8- O - β -D-吡喃葡萄糖苷的促智活性及其机制 [J]. 中草药, 2001, 32(1): 39-41.
- [12] Xiang L, Lei F, Xing D M, et al. Neuron protective constituents from *Rheum nanum* and *Rheum subanceolatum* [J]. *Tsinghua Sci Technol*, 2005, 10(4): 426-429.
- [13] Matsuda H, Shimoda H, Morikawa T, et al. Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): Structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(14): 1839-1842.
- [14] 青岛大学. 虎杖抗高尿酸血症有效成分群及其制备方法和应用: 中国, 201510113658.8 [P]. 2015-06-24.
- [15] Chen L, Xin X L, Lan R, et al. Isolation of cyanidin 3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography [J]. *Food Chem*, 2014, 152: 386-390.

- [16] 韩利文, 陈锡强, 袁延强, 等. 高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 241-246.
- [17] Yue H L, Zhao X H, Wang Q L, *et al.* Separation and purification of water-soluble iridoid glucosides by high speed counter-current chromatography combined with macroporous resin column separation [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 936: 57-62.
- [18] Zhang X X, Ito Y, Liang J R, *et al.* Preparative isolation and purification of five steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detector [J]. *J Pharm Biomed*, 2013, 84: 117-123.
- [19] 胡 瑕, 谢红旗, 罗 巍, 等. 高速逆流色谱法分离制备蛹虫草发酵液中虫草素 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 557-561.
- [20] 时莉梅. 虎杖中总蒽醌提取工艺比较 [J]. 江苏药学与临床研究, 1996, 4(3): 15-16.
- [21] 高亮亮, 徐旭东, 南海江, 等. 唐古特大黄化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 443-446.
- [22] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [23] 金灯萍, 彭国平, 陆晓峰. 川芎中藁本内酯对照品的制备 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 64-65.
- [24] Xie Q Q, Wei Y, Zhang G L. Separation of flavonol glycosides from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by high-speed counter-current chromatography [J]. *Sep Purif Technol*, 2010, 72(2): 229-233.
- [25] Chen T, Liu Y L, Zou D L, *et al.* Application of an efficient strategy based on liquid-liquid extraction, high-speed counter-current chromatography, and preparative HPLC for the rapid enrichment, separation, and purification of four anthraquinones from *Rheum tanguticum* [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(1/2): 165-170.
- [26] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1065(2): 145-168.