高速逆流色谱分离纯化白芍中芍药苷的研究

黄天辉[1,2]，周 俊[2]

(1. 复旦大学博士后化学流动站，上海 201203；2. 广西中烟工业公司技术中心，广西 柳州 545005)

摘 要：**目的** 建立了微波提取与高速逆流色谱纯化白芍中芍药苷的方法。**方法** 实验采用 90 %乙醇、微波功率 850 W 的条件下对白芍提取 25 min，提取物在正丁醇-醋酸乙酯-水(2∶3∶5)的溶剂体系下进行高速逆流色谱纯化，纯化物在高效液相色谱流动相甲醇-水(70∶30)；色谱柱 Shim-pack VP-ODS(150 mm×4.6 mm，3.5 μm)；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 230 nm。**结果** 200 mg 的白芍提取物，芍药苷质量分数 10.62 %，经逆流色谱分离制备得到 20.52 mg 质量分数为 98.8 %的芍药苷，芍药苷的回收率为 96.6 %。**结论** 高速逆流色谱是分离与纯化白芍中芍药苷的有效方法

关键词：白芍；芍药苷；高速逆流色谱；高效液相色谱

中图分类号：R284.2 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2670(2009)01-0067-02

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，主要有效成分为芍药苷。芍药苷具有抗炎、免疫调节、抗病毒、抗氧化、保肝护肝、心血管调节等作用[1]。白芍中芍药苷的传统提取工艺为水或者乙醇渗漉、回流提取，而微波辅助提取法将微波辐射与溶剂萃取结合起来，具有提取时间短、溶剂用量少、提取成本低等优点[2]。白芍中芍药苷的分离与纯化通常采用柱色谱法，样品在固定相的吸附导致回收率很低，而高速逆流色谱(HSCCC)属于液液分配色谱，清除了样品在固定相的不可逆的吸附，因此广泛应用于分离纯化天然产物中的有效成分[3,4]。本实验将微波提取方法与高效逆流色谱纯化方法相结合，为白芍中芍药苷的分离与纯化提供了一种有效方法。

1 仪器与材料

VIP272 微波萃取器(上海惠而浦家用电器有限公司)；Waters 510 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)；TB—300 高速逆流色谱仪(上海同田生化有限公司)。

白芍饮片购自上海康桥中药饮片有限公司，产地浙江，经笔者鉴定，符合《中国药典》2005 年版一部规定。芍药苷对照品(批号 110736-200320)购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备[2]：取粉碎后白芍饮片 50 g，用 90 %乙醇 600 mL，微波功率 850 W 提取 25 min，提取液滤过，滤液经减压浓缩后转入真空干燥器中，真空干燥得到 8.425 g 干浸膏，得率为 16.85 %。分别取适量的干浸膏用甲醇溶解，即得。

2.2 溶剂体系的选择：高速逆流色谱分离的困难性在于溶剂体系的选择。通常要求所选溶剂体系为互不相溶的两相液体且上下相体积比约为 1，分层时间小于 30 s，待分离组分的分配系数为 0.6～1.5。目前，可供选择的几个经典体系如正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水体系主要适合分离低或中等极性的物质，醋酸乙酯-正丁醇-水体系主要用一些极性比较大的化合物的分离。实验分别配制上述两个体系不同比例，取上、下相各 10 mL 于 50 mL 具塞量瓶中，加入干浸膏 20 mg，超声波震荡，转移至分液漏斗中，静置分层，分别吸取上、下两层溶液各 10 μL，另取芍药苷对照品溶液 10 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40∶5∶10∶0.2)为展开剂，展开，取出，晾干。喷上 5 %香草醛硫酸试液，加热至斑点显色清晰。薄层色谱的分析结果表明：溶剂体系为正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(7∶3∶5∶5、6∶4∶5∶5、5∶5∶4∶6、5∶5∶5∶5、5∶5∶6∶4、4∶5∶4∶5)时，芍药苷基本集中在下相甲醇与水的体系中，不符合溶剂体系选择的一般要求；溶剂体系为正丁醇-醋酸乙酯-水(2∶3∶5、1∶2∶3、3∶2∶5、2∶1∶3、3∶1∶5、4∶1∶5)时，芍药苷在上、下相溶剂体系都有不同程度出现，

①**收稿日期**：2008-04-16

基金项目：广西科学研究与技术开发基金资助项目(桂科攻 07129002)

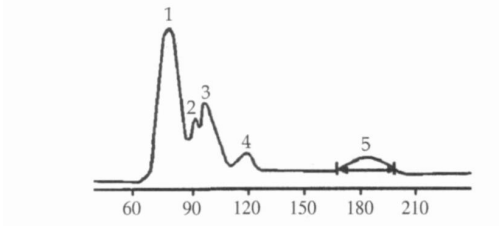
作者简介：黄天辉(1969—)，男，副教授，复旦大学在读博士后，主要从事中草药的研究与开发。

Tel：(0772)3160111 Fax：(0772)3160111 E-mail：hth169@yahoo.com.cn

其中以正丁醇-醋酸乙酯-水(2 ∶3 ∶5) 分配系数最接近 1,体系的分层时间为 12 s,上下相体积比为 1.09。通过薄层色谱对溶剂体系的试验,确定正丁醇-醋酸乙酯-水(2 ∶3 ∶5) 为高速逆流色谱分离白芍中芍药苷的溶剂体系。

2.3 高速逆流色谱分离条件:溶剂系统为正丁醇-醋酸乙酯-水(2 ∶3 ∶5),在分液漏斗中平衡 24 h 后,使用前分离成上相(固定相)和下相(流动相),分别脱气后备用。仪器的转速 950 r/min,流动相的流量 1.0 mL/min,紫外检测器波长 254 nm。

称取干浸膏 200 mg,用溶剂体系正丁醇-醋酸乙酯-水(2 ∶3 ∶5)的上下相各 10 mL 配制成样品溶液,选择 HSCCC 的转速 950 r/min,流量 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm。按 HSCCC 的操作程序进样,样品经过 HSCCC 分离后,按色谱峰收集流份,分别进行浓缩、干燥。其中得到 5 号峰的流份质量为 20.5 mg。结果见图 1。



t/min

图 1 白芍提取物的高速逆流色谱

Fig. 1 Chromatogram of *P. lactiflora* **extracts by HSCCC separation**

2.4 高效液相色谱分析

2.4.1 色谱条件:色谱柱 Shim-pack VP-ODS(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm);流动相为甲醇-水(70 ∶30);体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 230 nm。

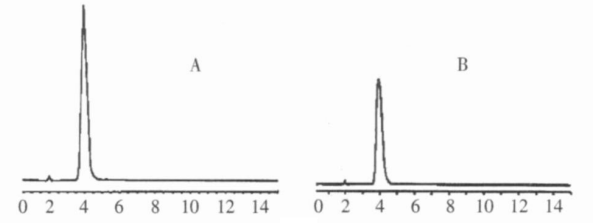
2.4.2 对照品溶液的制备:取干浸膏适量加甲醇溶解,作为供试品溶液。另取芍药苷对照品,加甲醇制成 1 mg/mL 溶液,作为对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备:按照高速逆流色谱图,分别收集各个流份,蒸干,加入甲醇定容,滤过即得纯化后的供试品溶液。

2.4.4 干浸膏中芍药苷的测定:按 HPLC 色谱分析条件进样,根据保留时间定性,峰面积外标法定量,计算干浸膏中芍药苷的质量分数为 10.62 %。

2.5 薄层色谱的初步判断:取供试品溶液和芍药苷对照品溶液,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40 ∶5 ∶10 ∶0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷上 5 %香草醛硫酸试液,加热至斑点显色清晰。薄层色谱分析表明 5 号峰的流份为单一斑点,其 Rf 值等同芍药苷对照品,初步判断 5 号峰的流份为芍药苷。

2.6 分离样品的测定结果:取上述 5 号峰的供试品溶液和芍药苷对照品溶液。按照 HPLC 的色谱条件,分别进一定体积芍药苷对照品溶液和供试品溶液,根据保留时间定性,峰面积外标法定量,分别计算芍药苷质量分数,见图 2。结果表明 5 号分离峰为单一峰,其保留时间等同芍药苷对照品,因此判断 5 号峰的流份为芍药苷,芍药苷的质量分数为 98.8 %。



t/min

图 2 芍药苷对照品(A)和高速逆流色谱 5 号峰(B)的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of paeoniflorin reference substance (A) and HSCCC peak No. 5 fraction (B)

3 结论

实验表明:提取白芍中芍药苷所采用的微波提取法具有提取时间短与溶剂用量少的特点。对芍药苷的纯化所采用的高速逆流色谱法是一种有效的方法。

参考文献:

[1] 刘鹰翔,马玉卓. 白芍的化学成分与药理研究进展[J]. 中草药,1995,26(8):437-440.

[2] 黄天辉,沈平孃,沈永嘉. 微波辅助提取白芍的工艺研究[J]. 中草药,2006,37(6):878-880.

[3] Huang T H, Shen P N, Shen Y J. Preparative separation and purification of deoxyschisandrin and γ-schisandrin from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066(1-2):239-242.

[4] Huang T H, Shen P N, Shen Y J. Preparative separation and purification of schisandrin and schisantherin from *Schisandra chinensis* (Turcz) Baill by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2005, 28(15):2383-2390.