

高速逆流色谱分离纯化草豆蔻中山姜素和小豆蔻明

李爱峰¹, 李晓鹏², 孙爱玲¹, 柳仁民¹, 吕慧³

1. 聊城大学化学化工学院, 山东 聊城 252059

2. 聊城大学材料科学与工程学院, 山东 聊城 252059

3. 聊城高级财经职业学校, 山东 聊城 252059

摘要: **目的** 建立高速逆流色谱分离纯化草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的方法。**方法** 使用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(5:5:7:3)为两相溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 体积流量 2.0 mL/min, 转速 800 r/min, 温度 25 ℃, 固定相的保留率为 50%, 检测波长 300 nm, 对草豆蔻粗提物进行分离。**结果** 从 100 mg 草豆蔻粗提物中一步分离纯化得到 17.2 mg 山姜素和 25.1 mg 小豆蔻明。经 HPLC 分析, 质量分数分别为 98.1%、99.2%, 其化学结构由 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定。**结论** 与传统的、存在不可逆吸附现象的柱色谱法相比, 高速逆流色谱分离纯化草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的方法具有简单、高效、回收率高等优点。

关键词: 高速逆流色谱; 草豆蔻; 山姜素; 小豆蔻明; HPLC

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0687-04

Isolation and purification of alpinetin and cardamomin from *Alpinia katsumadai* by high speed counter-current chromatography

LI Ai-feng¹, LI Xiao-peng², SUN Ai-ling¹, LIU Ren-min¹, LV Hui³

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

2. College of Material Science and Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

3. Liaocheng Senior Financial Vocational School, Liaocheng 252059, China

Abstract: **Objective** The aim of the study was to establish a high speed counter-current chromatography (HSCCC) method for the isolation and purification of alpinetin and cardamomin from *Alpinia katsumadai*. **Methods** Two-phase solvent system composed of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water (5:5:7:3) was used. The flow rate of the mobile phase was 2.0 mL/min, the revolution speed was 800 r/min, the separation temperature was controlled at 25 ℃, the reservation ratio of the stationary phase was 50%, and the detection wavelength was 300 nm. **Results** Alpinetin (17.2 mg) and cardamomin (25.1 mg) could be obtained from 100 mg of the crude extract in one-step separation by the method. The purities of them were 98.1% and 99.2%, respectively, as determined by HPLC and their chemical structures were identified by ¹H-NMR and ¹³C-NMR. **Conclusion** The traditional method, column elution, could not eliminate irreversible adsorption, while the HSCCC method used for the isolation and purification of alpinetin and cardamomin from *A. katsumadai* has many advantages, such as facility, high efficiency, and high recovery as well.

Key words: high speed counter-current chromatography (HSCCC); *Alpinia katsumadai* Hayata; alpinetin; cardamomin; HPLC

草豆蔻为姜科植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata 的干燥成熟种子团, 是《中国药典》2010 版一部收录的常用中药之一, 具有燥湿健脾、温胃止呕的功效, 临床主要用于心腹冷痛、寒湿吐泻等症的治疗^[1]。药理实验表明包括山姜素和小豆蔻明在内的黄酮类化合物为草豆蔻的主要有效成分, 具有健胃止吐、抑制血小板凝集、抗肿瘤、抗炎、抑菌、

抗病毒、抗氧化等多种功能^[2-3]。近年来对于草豆蔻中黄酮类化合物的研究非常活跃。因此, 建立相关成分的高效分离纯化方法具有十分重要的意义。

高速逆流色谱(HSCCC)是一种不用任何固态载体的液液分配色谱技术, 它不仅克服了固态载体对于样品的不可逆吸附、变性等缺点, 而且可以在短时间内实现高效制备性分离, 因而在中药活性成

收稿日期: 2010-08-06

基金项目: 聊城大学科研基金资助项目(X091008)

作者简介: 李爱峰(1978—), 女, 山东聊城人, 硕士, 讲师, 研究方向为分离科学。Tel: 15552180200 E-mail: liaifeng@lcu.edu.cn

分的分离与纯化方面得到了广泛的应用^[4-10]。本实验采用 HSCCC 从草豆蔻中分离纯化得到山姜素和小豆蔻明,经 HPLC 面积归一化法分析,质量分数分别为 98.1%、99.2%。

1 仪器与试剂

TBE—300A 高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司); TriSep—2010GVpCEC 泵及检测系统(美国通微分析技术股份有限公司); HX—1050 恒温循环器(北京博医康实验仪器有限公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); Spherigel ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 大连江申分离科学技术公司); Mercury plus 400 核磁共振仪(美国瓦里安公司); FZ102 型微型植物粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司); RE—3000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

乙醇、醋酸乙酯、正己烷、甲醇等均为分析纯(天津市化学试剂三厂); HPLC 分析用甲醇为色谱纯; 实验用水为二次蒸馏水。

草豆蔻药材购于聊城市利民大药店,经山东中医药大学张永清教授鉴定为正品药材。

2 方法

2.1 粗提物的制备

称取于 40℃ 恒定质量的草豆蔻药材 200 g,粉碎至 30 目,用 1 500 mL 95%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩得浸膏 6.4 g。浸膏加热水溶解后用 2 倍体积的醋酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,经旋转蒸发、真空干燥后得 3.5 g 干燥粉末,低温避光保存,备用。

2.2 样品 HPLC 分析

使用 ODS C₁₈ 柱,甲醇-水为流动相进行梯度洗脱(25 min 内,甲醇的比例由 60%线性变化至 90%),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 300 nm,在室温下对上述粗提物进行分析,得到 2 个明显的色谱峰,见图 1。

2.3 分配系数的测定

用 HPLC 测定样品在不同溶剂体系中的分配系数。称取草豆蔻粗提物约 1 mg 置具塞试管中,用预先达到分配平衡的两相溶剂体系的下相将其完全溶解, HPLC 法进行检测(色谱条件同“2.2”项),峰面积记为 A_1 。然后加入等体积的上相,剧烈振荡使其充分混合,待达到分配平衡后,再取下相用 HPLC 法检测,峰面积记为 A_2 ,分配系数 K 则按照公式 $K=(A_1-A_2)/A_2$ 进行计算。按照 $0.5 < K < 5.0$

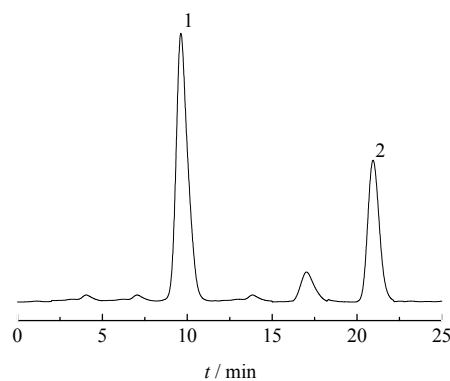


图 1 草豆蔻粗提物的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of crude extract from *A. katsumadai*

的经验规则选择合适的两相溶剂系统。

2.4 两相溶剂系统及样品溶液的制备

所用溶剂系统为正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(5:5:7:3),按照比例分别将各种溶剂加入到分液漏斗中,剧烈振荡使溶剂充分混合,达到分配平衡后,将两相分离,使用前将两相分别超声脱气 30 min。

取约 100 mg 草豆蔻粗提物,精密称定,用 5 mL 上相溶液将其溶解,滤过,滤液作为样品溶液以备 HSCCC 进样。

2.5 HSCCC 分离过程

用 TriSep-2010GVpCEC 系统将正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(5:5:7:3)的上相(固定相)和下相(流动相)以 1:1 的体积比同时泵入 HSCCC 螺旋管。当螺旋管完全充满后,仅以 2.0 mL/min 的流量泵入流动相,同时调节螺旋管的转速为 800 r/min。大约 30 min 后达到动力学平衡,通过进样阀将样品溶液注入到螺旋管中。分离过程中温度控制在 25℃,柱后流出物经紫外检测器在 300 nm 波长下检测。进样 30 min 后开始采集数据,根据色谱图手动收集各个组分。

3 结果与讨论

3.1 HPLC 分析条件的优化

本实验使用 Spherigel ODS C₁₈ 柱,考察了不同比例的甲醇-水作为流动相对分离效果的影响,结果表明在等度洗脱模式下,甲醇的比例为 70% 时,山姜素出峰太晚,峰展宽严重;甲醇比例为 80% 时,小豆蔻明与其前面的杂质组分不能得到分

离；采用甲醇-水进行梯度洗脱（0~25 min，甲醇 60%~90%），体积流量 1.0 mL/min 时，两种目标组分可以获得良好分离。

3.2 HSCCC 分离条件的优化

选择两相溶剂系统就是同时选择了色谱分离的固定相和流动相，这是应用 HSCCC 分离是否成功的关键所在。溶剂系统合适与否主要是用目标化合物在其中的分配系数来衡量的，一般要使得各个组分的 K 值均满足 $0.5 < K < 5.0$ ，并且不同组分的 K 值要有足够的差异；此外为了保证固定相有较好的保留率，两相的分相时间要小于 30 s。

由于溶剂系统的选择没有成熟的理论可循，大都根据实际经验摸索，鉴于山姜素和小豆蔻明的极性较小，因此首先选择了弱极性的正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水溶剂系统开始尝试，测定了目标化合物在该溶剂系统中的分配系数（表 1）。实验结果表明当正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水的体积比为 5 : 5 : 5 : 5 时，目标化合物的分配系数太大，说明目标化合物主要分布在有机相。为了使分配系数减小，必须设法增强有机相的极性，同时减弱水相的极性，即减小两相的极性差异。由于甲醇在有机相和水相中均有较好的溶解性，因此改变溶剂系统中甲醇的比例会改变两相的极性差异。结果表明随着甲醇比例的增大，分配系数显著减小，当正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水的体积比为 5 : 5 : 7 : 3 时，目标化合物的分配系数较为合适，如果继续增大甲醇的比例，分配系数变得太小，两组分不能得到分离，而且两相极性差异太小会促进两相的互溶，导致体系的分相时间过长，这不利于固定相在螺旋管内的保留，因而对于分离也是不利的。

本实验结果表明使用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水（5 : 5 : 7 : 3）作为两相溶剂系统，当流动相的

表 1 山姜素和小豆蔻明在正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水溶剂系统中的分配系数

正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水	分配系数	
	小豆蔻明	山姜素
5 : 5 : 5 : 5	6.56	30.25
5 : 5 : 6 : 4	1.99	14.51
5 : 5 : 7 : 3	0.55	3.50
5 : 5 : 8 : 2	0.13	0.51

流量为 2.0 mL/min、螺旋管的转速为 800 r/min、分离温度为 25 ℃ 时，固定相的保留率可达 50%，分离效果令人满意（图 2）。

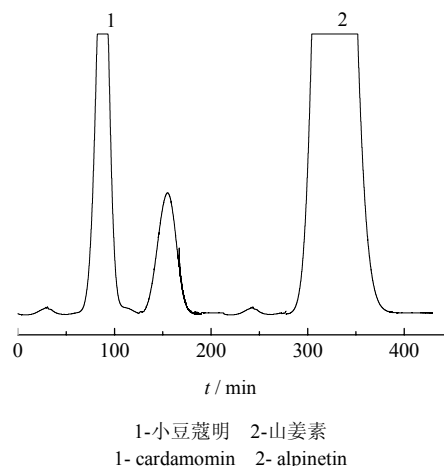


图 2 草豆蔻粗提物的 HSCCC 色谱图
Fig. 2 HSCCC chromatogram of crude extract from *A. katsumadai*

在上述 HSCCC 分离条件下，从 100 mg 粗提物中一步分离纯化得到 17.2 mg 山姜素和 25.1 mg 小豆蔻明。经 HPLC 面积归一化法分析，质量分数分别为 98.1% 和 99.2%。

3.3 HSCCC 峰组分的鉴定

根据 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据对于各个 HSCCC 峰组分进行了鉴定。

峰 1: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.75 (1H, s, 6-OH), 10.78 (1H, s, 4-OH), 7.92 (1H, d, H- α), 7.80 (1H, d, H- β), 7.67 (2H, m, H-2', 6'), 7.45 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.04 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-5), 5.97 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-3), 3.90 (3H, s, -OCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 194.5 (C=O), 169.1 (C-4), 167.3 (C-6), 165.2 (C-2), 143.1 (C- β), 137.5 (C-1'), 131.6 (C- α), 130.1 (C-2', 6'), 129.7 (C-3', 4', 5'), 107.3 (C-1), 97.6 (C-3), 93.0 (C-5), 56.5 (-OCH₃). 经与文献数据^[11]对照，该化合物确定为小豆蔻明。

峰 2: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 10.90 (1H, s, 7-OH), 7.56 (2H, m, H-2', 6'), 7.35 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.45 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-8), 6.15 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6), 5.55 (1H, m, H-2), 3.80 (3H, s, -OCH₃), 3.15 (1H, t, H-3 α), 2.88 (1H, m, H-3 β). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ 189.8 (C-4), 166.5 (C-7), 165.4 (C-5), 163.4 (C-9), 140.2

(C-1'), 129.1 (C-3', 4', 5'), 128.9 (C-2', 6'), 104.9 (C-10), 96.9 (C-6), 94.7 (C-8), 78.8 (C-2), 55.8 (-OCH₃), 45.9 (C-3)。经与文献数据^[12]对照, 该化合物确定为山姜素。

参考文献

- [1] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 杨 健, 戴 岳, 黄文哲, 等. 草豆蔻抗脓毒症有效成分研究 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 54-58.
- [3] 黄文哲, 戴小军, 刘延庆, 等. 草豆蔻中黄酮和双苯庚酮的抑菌活性 [J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(1): 37-40.
- [4] 黄天辉, 周 俊. 高速逆流色谱分离纯化白芍中芍药苷的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 67-68.
- [5] 孙爱玲, 冯 蕾, 柳仁民. 高速逆流色谱分离制备厚朴的有效成分厚朴酚与和厚朴酚 [J]. 分析化学, 2005, 33(7): 1016-1018.
- [6] 孙爱玲, 孙清华, 柳仁民. 高速逆流色谱分离纯化木蝴蝶中黄芩素和白杨黄素 [J]. 分析化学, 2006, 34: S243-S246.
- [7] 刘建华, 赵善仓, 王 晓, 等. 高速逆流色谱分离制备紫锥菊中的菊苣酸 [J]. 分析化学, 2008, 36(7): 964-966.
- [8] 彭金咏, 许丽娜, 韩 旭, 等. 大麻药中两个新异戊烯基黄酮的高速逆流色谱分离制备 [J]. 分析化学, 2007, 35(10): 1444-1448.
- [9] 郑国栋, 周 芳, 蒋 林, 等. 高速逆流色谱分离制备广陈皮中多甲氧基黄酮类成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 52-55.
- [10] 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.
- [11] 史道华, 廖 琴, 郭丽娇, 等. 草豆蔻中小豆蔻明提取工艺改进 [J]. 医药导报, 2009, 28(8): 58.
- [12] 郭丽冰, 王 蕾. 降香中黄酮类化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1147-1149.

版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊 (光盘版) 电子杂志社签订数字出版独家合作协议, 在协议期间, 中国药学会主办的 19 本科技期刊 (包括天津中草药杂志社出版的 3 本期刊《中草药》、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志) 的网络版由中国学术期刊 (光盘版) 电子杂志社 (其出版和信息服务网站为“中国知网”) 独家出版发行, 读者可登陆“中国知网” (www.cnki.net) 查阅浏览全文。