

文章编号:1001-6880(2014)1-0087-07

牡丹皮化学成分系统化色谱分离方法研究

朱靖博^{1*}, 韩聪敏¹, 丁 燕¹, 寇自农², 王振中³, 萧 伟³¹大连工业大学食品学院; ²大连工业大学分析测试中心, 大连 116034;³江苏康缘药业股份有限公司, 连云港 222001

摘要:以牡丹皮为研究对象,探索中药复杂成分系统化色谱分离方法。通过对牡丹皮甲醇提取物进行系统溶剂萃取,TLC、HPLC 分析化合物组成变化,确定牡丹皮化学成分色谱分离的前处理方法;以系统化 TLC 方法筛选确定了牡丹皮 Fr1.3 组分制备色谱分离条件;预测了台阶梯度洗脱条件下待分离物质的保留体积。结果显示:牡丹皮甲醇提取物经正己烷、乙酸乙酯依次萃取是有效的色谱分离前处理方法,减少了分离样品复杂性;建立的系统化 TLC 方法可以快速选定制备柱色谱的分离条件;台阶梯度洗脱分离情况下,分离目标化合物在初始洗脱溶剂下,其 $0.10 < R_f \leq 0.65$ 时,多阶梯梯度预测方法准确预测了 Fr1.3 组分制备柱分离各化合物的保留体积;选定台阶梯度洗脱条件下,1/3 理论上样量、理论上样量、最大上样量的三次制备柱色谱分离实践表明,Fr1.3 组分中的 6 个化合物均得到 TLC 单点的纯化合物,其中 3 个化合物的 HPLC 纯度在 95% 以上。该方法也可用于其它中药成分的系统化分离。

关键词:牡丹皮;系统化分离;色谱条件筛选;台阶梯度预测;制备色谱

中图分类号:R932

文献标识码:A

Systematic Chromatographic Separation of Chemical Components of Moutan Cortex

ZHU Jing-bo^{1*}, HAN Cong-min¹, DING Yan¹, KOU Zi-nong², WANG Zhen-zhong³, XIAO Wei³¹School of food Science and Technology, Dalian Polytechnic University;²Modern Education Technology Branch, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;³Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China

Abstract: In this study, a systematic chromatographic separation method was developed for the extraction and isolation of chemical components of Moutan Cortex. Pretreatment method of chromatographic separation was established through systematic liquid-liquid extraction of Moutan Cortex methanol extract. The preparative chromatographic conditions of component Fr1.3 from Moutan Cortex was determined by systematic TLC screening method. The retention volume of targeted compounds was predicted in the step gradient elution conditions. The results showed that effective pretreatment method was liquid-liquid extracting the methanol extract of Moutan Cortex using hexane, ethyl acetate sequentially. The systematic TLC methods can quickly select preparative column chromatographic separation conditions. The retention volume of the targeted compounds in Fr1.3 was accurately predicted under step gradient elution chromatographic separation conditions. Three times (with 1/3 theoretical sample loading, theoretical loading and maximum sample loading, respectively) of preparative chromatographic separation were carried out under the developed gradient elution conditions. The results showed that 6 pure compounds were successfully obtained from Fr1.3, in which the purities of 3 compounds were over 95% by HPLC. The method developed in this study can be used for the systematic chromatographic separation of other Chinese medicine components.

Key words: Moutan Cortex; systematic chromatographic separation; screening of chromatographic conditions; step gradient prediction; preparation chromatography

中药现代化的核心是对中药成分的系统性认识,包括化学成分与药理活性的认识,其中化学成分认识的前提是对化学成分的系统性分离。中药成分具有种类繁多、共存多种结构类似物、化学稳定性

收稿日期:2013-03-05 接受日期:2013-09-10

基金项目:中药制药过程新技术国家重点实验室资助项目(SKL2010Z0201)

*通讯作者 Tel:86-411-86323801; E-mail: zhujingb@sina.com

差、理化性质跨度大等特点^[1,2]。针对中药特点制定系统分离方法是实现中药现代化的关键,而色谱分离技术是实现中药成分系统分离的有效手段;植物提取物的色谱条件筛选及快速分离制备已有相关报导^[3,4]。至今已从牡丹皮中发现了80多种化学成分,包括丹皮酚类、芍药苷类、黄酮类、三萜类、甾体类等多种化合物^[5]。鉴于中药成分的复杂性和色谱分离技术的特殊性,提高色谱分离效率、降低色谱柱污染,研究系统化色谱分离方法分离牡丹皮中的化学成分,形成具有指导意义的体系与程序对于中药现代化研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

牡丹皮药材由江苏康缘药业股份有限公司提供。分析级甲醇、正己烷、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇、二氯甲烷、丙酮,天津大茂化学试剂厂;工业级甲醇、氯仿、丙酮,天津科密欧化学试剂有限公司;色谱级乙腈,美国Tedia公司;超纯水,实验室自制。

高效液相色谱仪UltiMate3000,美国戴安公司;R502B旋转蒸发仪、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵,巩义予华仪器责任有限公司;升降恒温水浴锅,英峪

高科仪器厂;硅胶GF₂₅₄板、薄层层析硅胶,青岛海洋化工有限公司;制备柱4 cm×40 cm,实验室自制;P270高压恒流泵,大连依利特公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC分析条件

HPLC条件:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm);进样量20 μL,流速0.8 mL/min,检测波长254 nm,柱温为室温。流动相0.01%甲酸-水(A)和乙腈(B)。线形梯度洗脱程序为:0~2 min,5% B;2~30 min,5%~16% B;30~70 min,16%~33% B;70~80 min,33%~80% B。

1.2.2 系统化色谱分离方法研究路线

总体思路:甲醇提取牡丹皮药材得到提取物,对提取物进行系统溶剂萃取评价;经TLC和HPLC分析选出适宜的前处理萃取溶剂。再对每个部位进行色谱分离条件筛选。选定其中一个部位,研究色谱分离条件的筛选方法,利用薄层色谱中R_f值与柱色谱洗脱速度之间的关系,进行多阶梯梯度分离预测;同时进行制备柱色谱分离验证预测结果。本文以牡丹皮正己烷相经真空液相层析后得到的Fr1.3组分为例,论证色谱分离洗脱体系及洗脱强度筛选,确定组分的色谱分离条件的过程。总体路线如图1所示。

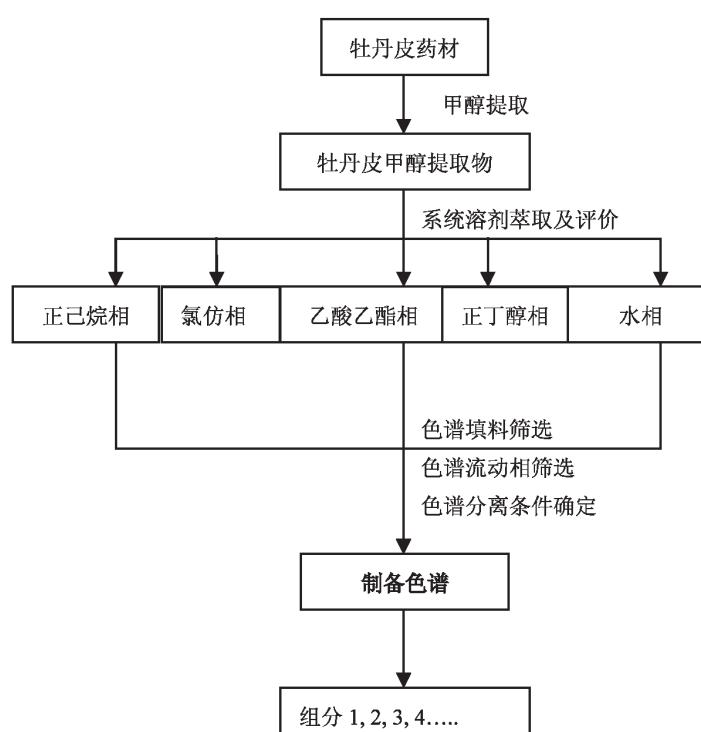


图1 牡丹皮化学成分系统分离流程

Fig. 1 Systematic separation flow chart of chemical components from Moutan Cortex

1.2.3 药材提取

牡丹皮药材 8.90 kg, 粉碎过筛后甲醇加热回流提取(料液比 1:6)3 次, 每次 2 h, 合并浓缩得到甲醇提取物。

1.2.4 系统溶剂萃取评价

分别称取 4.0 g 牡丹皮甲醇提取物三份, 加水

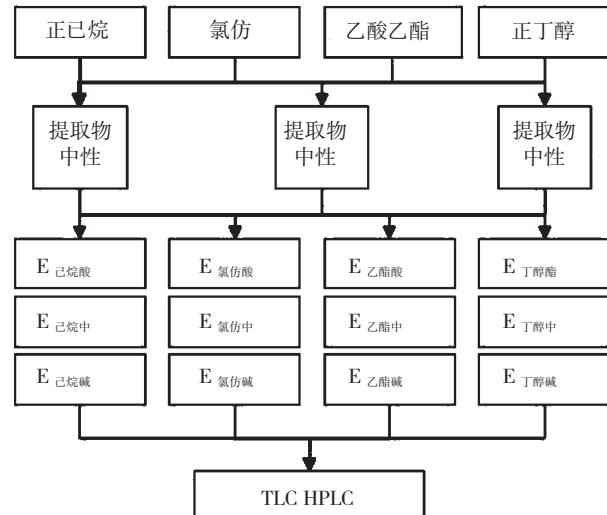


图 2 牡丹皮甲醇提取物系统溶剂萃取评价

Fig. 2 Evaluation of systematic solvent extraction of Moutan Cortex methanol extract

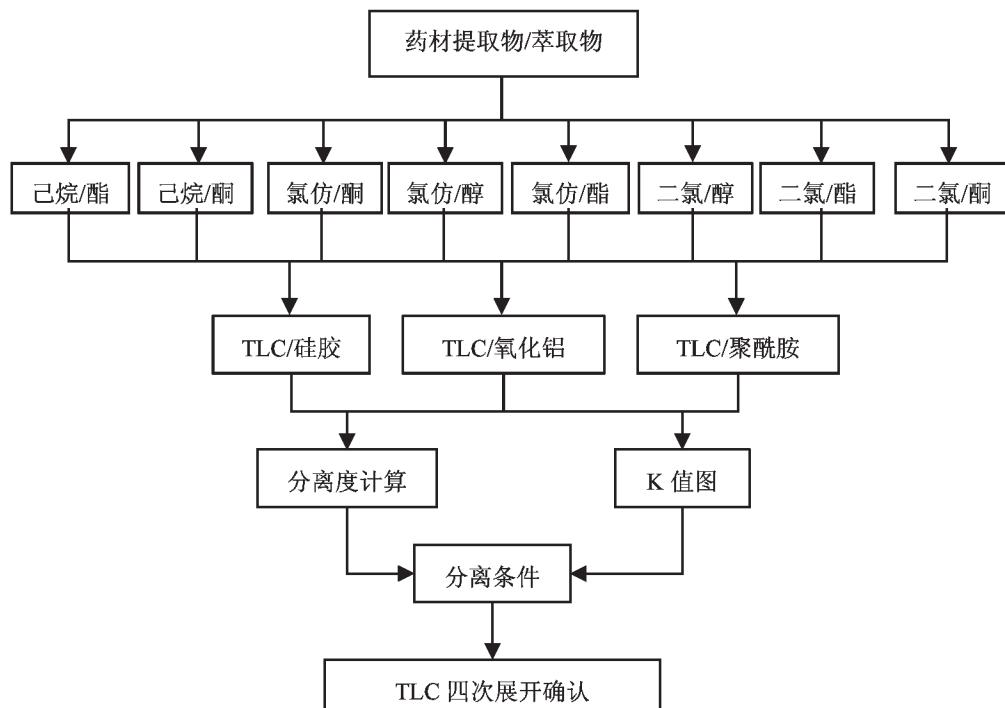


图 3 正相色谱分离条件系统筛选

Fig. 3 Systemic screening of separation condition in normal phase chromatography

至 320 mL, 用 50% 碳酸氢钠溶液调节 pH 分别至 4、7、9。按照图 2 实验设计进行萃取评价, TLC、HPLC 分析所得样品成分变化, 确定色谱前处理的萃取溶剂。TLC 分析条件: 有机相为 $V_{\text{正己烷}} : V_{\text{丙酮}} = 7:3$, 水相为 $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{甲醇}} = 8:2$, 显色剂为 5% 香草醛浓硫酸。

表 1 TLC 展开溶剂系统筛选实验条件
Table 1 Systemic screening of TLC solvent system

溶剂体系(V: V) solvent system	CHCl ₃ - EtOAc	CHCl ₃ - actone	CHCl ₃ - MeOH	CH ₂ Cl ₂ - EtOAc	CH ₂ Cl ₂ - actone	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	hexane-EtOAc	hexane- actone
编号 Number	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
展开条件 Separation conditions	99: 1	99: 1	99: 1	98: 2	99: 1	98: 2	90: 10	88: 12

1.2.5 色谱分离条件研究

1.2.5.1 待分离组分准备

牡丹皮甲醇提取物经正己烷、乙酸乙酯依次萃取,得到正己烷相、乙酸乙酯相和水相三个组分。正己烷相样品(240 g)经硅胶真空液相柱层析 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{丙酮}} = 100:0, 90:1, 70:1, 50:1, 20:1, 1:1$ 洗脱, 合并各洗脱液, 共得 Fr1.1 ~ Fr1.5 五个组分。

1.2.5.2 牡丹皮各部位色谱分离填料及流动相筛选

牡丹皮正己烷、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇、水相部位、正己烷相部位的 Fr 1.3 分别用硅胶板、聚酰胺板和中性 Al₂O₃ 板进行薄层色谱分析, 以斑点个数(N)、难分离物质对 ΔR_f 为指标, 考察三种填料的分离情况。实验设计见图 3。

1.2.5.3 流动相洗脱比例筛选

在选定洗脱溶剂的基础上进行二元溶剂 100:0、99:1、98:2、97:3 等的依次展开, 同时对洗脱初始条件进行连续四次展开, R_f 考察范围为 0.10 ~ 0.70。

1.2.6 多阶梯梯度分离预测

依据色谱理论^[6], 容量因子 k 与 TLC 中比移值 R_f 满足关系式 $k = 1/R_f - 1$ (1), 多阶梯梯度洗脱色谱中^[7], 溶质在色谱柱内的移动速率满足 $U_x = U_0/(1+k)$ (2)(其中 U_0 、 U_x 为色谱柱内流动相流速、化合物 X 移动速度, 图 4), 由(1)、(2)可得 $U_x = U_0 \cdot R_f$

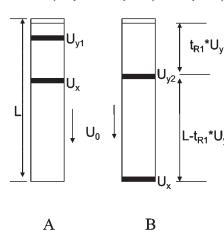


图 4 一阶梯度(A)、二阶梯度(B)洗脱色谱柱内溶质 X、Y 预测分离图

Fig. 4 Predicted column chromatography charts of first step gradient (A) and second step gradient (B) of compound X and Y

(3), 则第一个台阶洗脱下化合物 X 的保留时间 $t_{Rx} = L/U_x = L/(U_0 \cdot R_f) = t_0/R_f$, 保留体积 $V_{Rx} = t_{Rx} \cdot U_0$; 第二个台阶梯度时: 在前一个台阶洗脱基础上, 未洗脱化合物 Y 的保留时间 $t_{Ry} = (L-t_{Rx}) \cdot U_{y1}/U_{y2}$; $V_{Ry} = t_{Ry} \cdot U_0$ 。 U_{y1} 、 U_{y2} 分别是 Y 在色谱柱内第一、第二阶梯洗脱下的移动速度。选择正己烷相 Fr 1.3 进行台阶梯度洗脱分离下保留值预测。

1.2.7 制备柱色谱分离

制备柱为 4 × 40 cm, 薄层硅胶干法装柱, 初始溶剂 90 mL/min 冲洗至柱压恒定, 空柱体积 $V_0 = 490$ mL, 洗脱流速 25 mL/min, 柱压 2.2 ~ 2.4 MPa, 柱硅胶 235 ~ 240 g。上样量分别为 0.55 g、1.55 g、3.95 g, 参考上样量公式^[4]为 $SiO_{2g} = 151.2S_g + 0.5$, $SiO_{2g} = 59.8S_g$, 洗脱馏分 1/5 柱体积(约 100 mL)。

2 结果与讨论

2.1 药材提取与分析

牡丹皮药材 8.90 kg 提取得到 2.54 kg 浸膏, 得率 28.5%。液相色谱检测结果(图 5)显示牡丹皮甲醇提取物成分复杂, 对化合物的分离制备需借助萃取等前处理技术及系统色谱条件筛选来完成复杂化学成分的系统性分离。

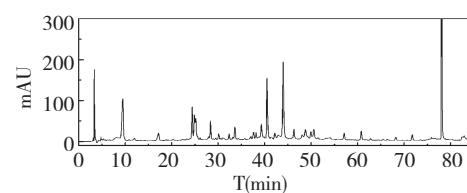


图 5 牡丹皮甲醇提取物 HPLC

Fig. 5 HPLC chromatogram of Moutan Cortex methanol extract

2.2 系统溶剂萃取评价

TLC 结果显示: 有机相与水相成分明显不同, 其中丹皮酚主要集中于正己烷相, 且以酸性溶液中最显著, pH 增大过程中, 化合物的萃取效率增大(图 6, 每个板点样样品依次为正己烷相、氯仿相、乙酸乙酯相、正丁醇相、丹皮酚、牡丹皮甲醇提取物), 氯仿

相、乙酸乙酯相、正丁醇相成分区别不大;各水相成分则在 pH 变大过程中斑点减少。说明碱性条件利于提高萃取效率。HPLC 结果(图 7)显示 pH 改变对于正己烷相、氯仿相的影响不大,而乙酸乙酯相和正丁醇相变化显著,以正丁醇萃取有机相为例,色谱

峰明显减少,说明 pH 增大牡丹皮化学成分改变,萃取适宜在原 pH 下进行。牡丹皮甲醇提取物系统萃取最终选择在 pH = 4 下采用正己烷、乙酸乙酯依次萃取。

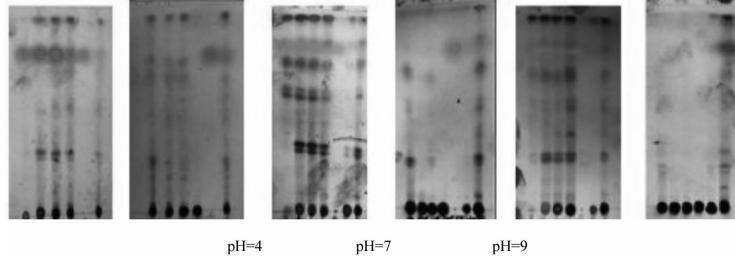


图 6 萃取评价有机相、水相 TLC 结果

Fig. 6 TLC results of organic phase and water phase of Moutan Cortex methanol extract

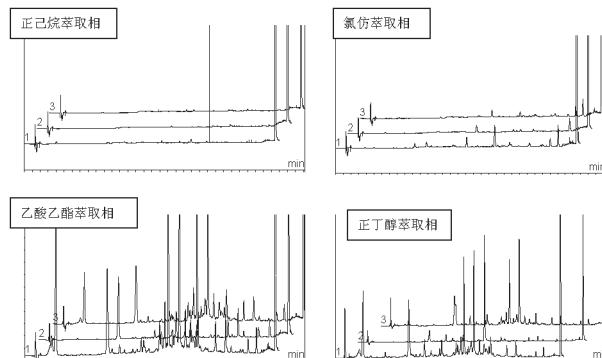


图 7 不同 pH 溶液有机萃取相 HPLC 谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of organic phase extract with different pH

2.3 柱色谱分离条件筛选

2.3.1 待分离组分分析

TLC 分析结果显示正己烷相的 Fr1.3 组分在香草醛浓硫酸显色后有 6 个斑点,HPLC 结果显示主要有三个色谱峰,通过薄层制备对 6 个化合物进行分离,得到 6 个化合物的单点,用同样的 HPLC 条件进行分析对照,确定了 TLC 与 HPLC 的对应关系。如图 8 所示,TLC 中 2、3、4 斑点分别对应 HPLC 三个色谱峰。

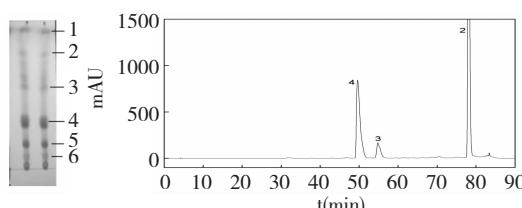


图 8 Fr1.3 组分 TLC、HPLC 分析

Fig. 8 TLC and HPLC analysis results of Fr1.3

2.3.2 分离流动相筛选

采用 1.2.5.2 流动相筛选体系,以斑点个数、难分离物质的分离度以及斑点是否拖尾作为评价指标,筛选 Fr1.3 分离体系。结果显示 S2 氯仿-丙酮体系,斑点数目最多,难分离物质对 ΔR_f 为 0.06,确定氯仿-丙酮体系为 Fr1.3 组分的洗脱溶剂体系。

2.3.3 洗脱流动相比例筛选

分别以 $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{丙酮}} = 100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 95:5$ 为展开剂对 Fr1.3 组分依次层析展开 R_f 的结果见表 3,待分离化合物为 1~6 的 R_f 在 $0.10 < R_f \leq 0.85$,初始展开剂下的 R_f 在 $0.10 < R_f \leq 0.65$,初始条件四次展开化合物 1~6 的 R_f 变化在 $0.06 < R_f \leq 0.89$ (见表 4),难分离化合物对 5、6 的 ΔR_f 经后由 0.06 增大为 0.10,预示梯度洗脱分离 6 个化合物是可能的。

表 2 Fr1.3 组分分离系统 TLC 溶剂筛选结果

Table 2 Systemic screening results of TLC developing solvents for Fr 1.3

评价指标(Evaluation index)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
N	5	6	5	5	5	5	4	5
最难分离物质对 ΔR_f ΔR_f of two most difficult separation components	0.03	0.06	0.04	0.07	0.07	0.06	0.02	0.06
是否拖尾 Tailing	是	否	否	否	否	是	否	否

表 3 Fr1.3 组分不同溶剂梯度连续展开 TLC 的 R_f 值

Table 3 Rf values of the six components in Fr1.3 under different developing solvents

$V_{\text{氯仿}} : V_{\text{丙酮}}$	1	2	3	4	5	6
100:0	0.65	0.43	0.20	0.12	-	-
99:1	0.85	0.69	0.39	0.19	0.15	-
98:2	-	-	0.47	0.35	0.20	0.14
97:3	-	-	-	0.38	0.23	0.16
95:5	-	-	-	0.41	0.25	0.19

表 4 Fr1.3 组分初始洗脱条件下的四次展开结果

Table 4 R_f values of the six components in Fr1.3 with four times development with initial solvent

$V_{\text{氯仿}} : V_{\text{丙酮}} = 100:0$	1	2	3	4	5	6
1	0.65	0.43	0.20	0.12	-	-
2	0.80	0.60	0.27	0.20	0.11	0.05
3	0.89	0.72	0.35	0.27	0.13	0.06
4	-	-	0.42	0.32	0.16	0.06

2.4 台阶梯梯度预测结果

由台阶梯梯度公式计算 Fr1.3 中目标化合物在

两台阶梯梯度洗脱分离时的保留体积 V_R , 结果见表 5。

表 5 多阶梯梯度保留体积预测结果

Table 5 Prediction results of retention volume by multi-step gradients

$V_{\text{氯仿}} : V_{\text{丙酮}}$	1	2	3	4	5	6
100:0(L)	0.73	1.13	2.42	4.30	-	-
95:5(L)	-	-	-	-	4.87	5.75

2.5 制备柱色谱分离

选定台阶梯梯度洗脱条件下, 1/3 理论上样量 0.55 g、理论上样量 1.65 g、最大上样量 3.95 g 的三次制备柱色谱分离实践表明, Fr1.3 组分中的 6 个化合物均得到 TLC 单点的纯化合物, 其中 2、3、4 等 3 个化合物的 HPLC 纯度在 95% 以上。台阶梯梯度预测结果与实际保留体积一致(表 6), 1、5、6 号化合物无紫外吸收。

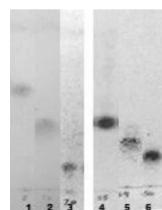


图 9 从 Fr1.3 分离出的化合物 1~6 的 TLC 图

Fig. 9 TLC chromatograms of compounds 1~6 separated from Fr 1.3

表 6 Fr1.3 组分三次制备柱分离结果

Table 6 Results of three times medium-pressure liquid chromatography separation experiments

目的化合物 Targeted compound	1	2	3	4	5	6
R_f	0.65	0.43	0.20	0.12	0.25	0.19
预测体积(L) Predicted volume(L)	0.73	1.13	2.42	4.30	4.87	5.75
实际体积(L) Actual volume(L)	0.70	1.20	2.50	4.30	4.80	5.60

3 结论

本文以牡丹皮甲醇提取物为对象,研究建立了中药复杂体系中化学成分系统色谱分离的前处理方法,构建了基于 TLC、HPLC 分析的复杂体系制备色谱分离条件筛选体系,确定了牡丹皮正己烷相的色谱分离填料、洗脱溶剂体系和系统化色谱分离等条件;建立的系统化 TLC 方法可以快速选定制备柱色谱的分离条件;台阶梯度洗脱分离情况下,分离目标化合物在初始洗脱溶剂下,其 $0.10 < R_f \leq 0.65$ 时,多阶梯梯度预测方法准确预测了 Fr1.3 组分制备柱分离各化合物的保留体积。该研究方法同样适用于其他中药组分的系统分离。

参考文献

- Wang YP (王艳萍), Feng JT (丰加涛), Jin Y (金郁), et al. Approaches to the study on material foundation of Chinese medicines. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2009, 7:13-18.

(上接第 122 页)

- Wang JR (王俊儒). Extraction, separation and identification technology of natural products (天然产物提取分离与鉴定技术). Yangling: Northwest A & F University Press, 2003. 47-52.
- Gao JL (高剑龙), Lan YY (蓝炎阳), Wang SF (王少峰). Application of oligosaccharides in agricultural production. *Fujian Sci Technol Tropical Crops* (福建热作科技), 2012, 3 (37):70-72.
- Hirano S, Nagao N. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric Biol Chem*, 1989, 53:3065-3066.
- Ayers AR, Ebel J, Valent B, et al. Host pathogen interactions; fractionation and biological activity of an elicitor isolates from mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sodae*. *Plant Physiol*, 1976, 57:760-765.
- Liu QA (刘庆安), Xia K (夏凯), Ye MR (叶梅荣). Studies on resistance induced by oligosaccharides against *Meloidogyne* spp. in cucumber (*Cucumis sativus L.*). *J Anhui Sci Technol Univ* (安徽科技学院学报), 2010, 24(2):5-9.
- Uchino K, Zahner H. Metabolic products of microorganisms 137 rinamycin, a new inhibitor of RNA synthesis. *J Antibiot*, 1975, 3:185-193.
- Graziani E, Cane D, Betlach M, et al. Macrolide biosynth: A single cytochrome P450, Pick, is responsible for the hydroxylations that generate Methymycin, Neomethymycin, and Picro-mycin in *Streptomyces venezuelae*. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8:3117-3120.

- Li HY (李海燕), Guo Z (郭桢), Zhang JW (张继稳), et al. Research of traditional Chinese medicine in terms of herb-alomics. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med*, 2010, 12:160-164.
- Weber P, Hamburger M, Schafroth N, et al. Flash chromatography on cartridges for the separation of plant extracts: Rules for the selection of chromatographic conditions and comparison with medium pressure liquid chromatography. *Fitoterapia*, 2011, 82:155-161.
- Fair JD, Kormos CM. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. *J Chromatogr A*, 2008, 1211:49-54.
- He CN, Peng Y, Zhang YC, et al. Photochemical and Biological Studies of Paeoniaceae. *Chem Biodiver*, 2010, 7:805-839.
- Sun YQ (孙毓庆). Modern Chromatography and Its Application for Pharmaceutical Analysis. (现代色谱法及其在药物分析中的应用). Beijing: Science Press, 2005;28-30.
- Lu PZ (卢佩章). High Perform Liquid Chromatography and Expert System (高效液相色谱法及其专家系统). Dalian: Liaoning Science and Technology Press, 1992. 322-350.