

高速逆流色谱分离纯化木蝴蝶中黄芩素和白杨黄素

孙爱玲 孙清华 柳仁民*

(聊城大学化学化工学院, 聊城 252059)

摘要 建立了高速逆流色谱分离纯化木蝴蝶黄芩素和白杨黄素的方法。两相溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水, 固定相为 5:5:5:5 (V/V) 体系的上相, 以 5:5:5:5 (V/V) 和 5:5:7:3 (V/V) 体系的下相为流动相进行梯度洗脱。从 300 mg 木蝴蝶粗提物中一步分离纯化得到 25.5 mg 黄芩素和 36.6 mg 白杨黄素。经高效液相色谱分析, 纯度分别为 99.2% 和 100%。其化学结构由 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定。

关键词 高速逆流色谱, 木蝴蝶, 黄芩素, 白杨黄素

1 引言

木蝴蝶为紫葳科植物木蝴蝶 (*Oroxylum indicum* (L.) Vent) 的干燥成熟种子, 是我国常用中草药之一, 并被收入中国药典^[1], 具有止痛、止咳及清热等作用, 用于治疗感冒、支气管炎和其它一些疾病。黄芩素和白杨黄素为木蝴蝶主要有效成分, 具有清热、抗过敏、抗氧化和抗癌等功能。近几年来对木蝴蝶中黄酮类成分的研究非常活跃^[2-4]。因此, 建立相关成分的高效分离纯化方法具有重要意义。

高速逆流色谱 (HSCCC) 是一种不使用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术。它克服了固相载体对样品的吸附损失、变性等缺点, 并可以在短时间内实现高效制备性分离^[5], 因而在中药有效成分的分离与纯化方面得到了广泛的应用^[6-11]。本实验应用 HSCCC 从木蝴蝶药材中成功地分离纯化出黄芩素和白杨黄素 (结构见图 1), 经高效液相色谱 (HPLC) 分析, 其纯度分别为 99.2% 和 100%。

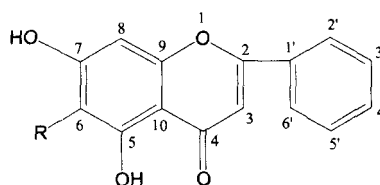


图 1 黄芩素 (R = OH) 和白杨黄素 (R = H) 的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of baicalin (R = OH) and chrysin (R = H)

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

TBE-300A 高速逆流色谱仪 (上海同田生化技术有限公司); ÄKTA prime 泵及检测系统 (瑞士安玛西亚生物有限公司); HX-1050 恒温器 (北京博医康实验仪器有限公司); 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 色谱柱: Spherigel ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Mercury plus 400 核磁共振仪 (美国瓦里安公司)。

粗提物的制备及 HSCCC 分离用溶剂 (石油醚、乙酸乙酯、甲醇等) 均为分析纯 (天津化学试剂三厂)。HPLC 分析用甲醇为色谱纯 (禹城化工厂), 实验用水为二次蒸馏水。

木蝴蝶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。

2.2 样品制备

取 100 g 于 60 °C 恒重的木蝴蝶药材粉碎, 用 700 mL 70% 甲醇回流提取 3 次 (每次 2 h), 合并提取液, 减压蒸馏, 得浸膏 34.3 g。浸膏加水溶解后用其 3 倍体积的正丁醇萃取 3 次, 合并正丁醇部分, 减压蒸馏回收溶剂, 得浸膏 16.6 g。此浸膏再用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:5:5, V/V) 体系的下相 100 mL 溶解后, 取等体积的上相萃取 4 次, 合并上相部分, 减压蒸馏得淡黄绿色粉末 (即木蝴蝶药材的粗提物) 5.8 g, 放置冰箱内备用。

2005-09-06 收稿; 2006-01-28 接受

2.3 分配系数的测定

本实验用 HPLC 测定样品在不同溶剂体系的分配系数。取适量木蝴蝶药材的粗提取物于 5 mL 试管中,用预先达到分配平衡的两相溶剂系统的下相将其溶解,用 HPLC 进行检测,峰面积为 A_1 。然后取等体积的上相加入此溶液,剧烈振荡使其充分混合,待达到分离平衡后,再取下相用 HPLC 检测,峰面积为 A_2 。分配系数 K 则按下式计算: $K = (A_1 - A_2) / A_2$ 。

2.4 两相溶剂系统及样品溶液的制备

本实验所用溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:5:5 和 5:5:8:2, V/V), 按其比例分别将各种溶剂加入分液漏斗中,剧烈振荡使溶液充分混合,分相平衡后,分出上相和下相,使用前分别用超声波脱气 30 min。取大约 300 mg 木蝴蝶药材粗提取物,溶于 4 mL 石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:5:5, V/V) 上相中,振荡使之完全溶解,以备 HSCCC 进样。

2.5 HSCCC 分离过程

用 ÄKTA prime 系统将石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:5:5, V/V) 的上相 (固定相) 和下相 (流动相) 以 40:60 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 的流速泵入流动相,同时将螺旋管转速调为 850 r/min。达到动力学平衡后 (大约 30 min),将样品通过进样阀注入分离螺旋管。进样 80 min 后,进行梯度洗脱。流动相在 50 min 内由 100% 的 5:5:5:5 体系的下相变为 100% 的 5:5:7:3 体系的下相。分离温度控制在 25℃,柱后流出物以紫外检测器检测,检测波长为 254 nm。色谱图于进样 80 min 开始记录,根据色谱图手动收集各色谱峰组分。

3 结果与讨论

3.1 高效液相色谱条件的优化

本实验在 HPLC 分析木蝴蝶样品粗提取物过程中,尝试了用不同比例的甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸作为流动相,结果表明:当采用甲醇-0.1% 磷酸在 30 min 内体积比由 40:60 线性变为 70:30,流速为 1.0 mL/min 时,粗提取物中的主要组分可以得到良好分离 (见图 2)。

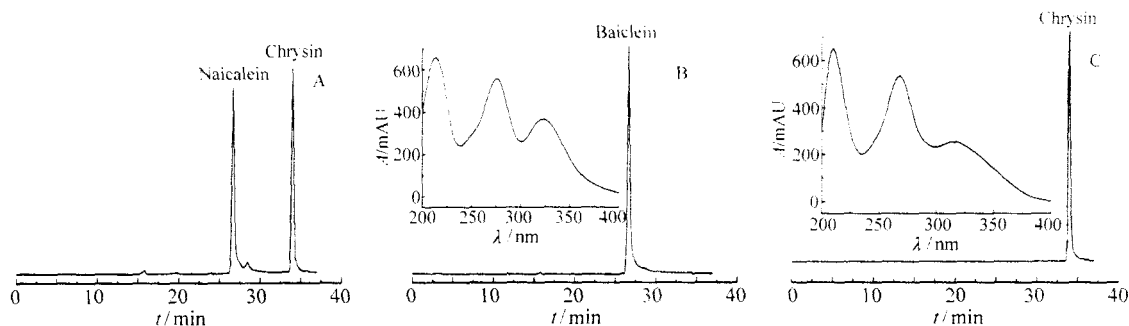


图 2 木蝴蝶粗提取物和 HSCCC 峰组分的 HPLC 色谱图及黄芩素、白杨黄素紫外光谱图

Fig 2 High performance liquid chromatogram of crude extracts and high speed counter-current chromatographic (HSCCC) peak fractions and the ultraviolet spectra of baicalein and chrysin

A. 粗提取物 (crude extracts); B. 黄芩素 (baicalein); C. 白杨黄素 (chrysin)。

3.2 HSCCC 分离条件的优化

应用 HSCCC 分离纯化天然药物中的活性成分的关键,是合适的两相溶剂系统的选择。溶剂系统合适与否是由目标化合物在其中的分配系数来衡量的。本实验测定了目标化合物在乙酸乙酯-水、乙酸乙酯-甲醇-水、石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水等溶剂体系中的分配系数。实验结果表明,当采用乙酸乙酯-水、乙酸乙酯-甲醇-水作为两相溶剂系统进行分离时,难以实现目标化合物的分离;采用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水为两相溶剂系统时,可以实现目标化合物的分离。目标化合物在不同比例石油醚-乙醇乙酯-甲醇-水体系中的分配系数见表 1。由表 1 可以看出,黄芩素和白杨黄素在体积比为 5:5:6:4、5:5:5.5:4.5 和 5:5:5:5 三个溶剂系统中均有可能分开。但当应用 5:5:5:5 体系作为溶剂系统时,分离白杨黄素所需

时间较长,峰展宽严重。当应用 5 5 6 4和 5 5 5.5 4.5体系作为溶剂系统时,得到的黄芩素纯度较差。基于以上情况,实验采用梯度洗脱的方式进行 HSCCC分离纯化。实验结果表明,进样后先以 5 5 5 5体系的下相洗脱 80 min,然后流动相在 50 min内由 100% 5 5 5 5体系的下相变为 100% 5 5 7 3的下相,可得到较理想的分离效果。

对流动相流速、旋转管转速和分离温度等也进行了优化,结果发现,在流速 2 mL/min、转速为 850 r/min、温度为 25 条件下,分离结果令人满意。

在优化 HSCCC条件下,对木蝴蝶粗提物进行了 HSCCC分离纯化,结果见图 3。从 300 mg木蝴蝶粗提物中一步分离纯化得到 25.5 mg黄芩素和 36.6 mg白杨黄素,经 HPLC分析其纯度分别为 99.2%和 100%。HPLC 色谱图及相应组分的紫外光谱图见图 2 (B、C)。

3.3 HSCCC 峰组分的鉴定

根据 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据对各峰组分作了鉴定:

峰 : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) : 6.60 (1H, s, H-8), 6.90 (1H, s, H-3), 7.6 (3H, m, H-3, H-4, H-5), 8.0 (2H, m, H-2, H-6), 8.45 (1H, s, C₆-OH), 10.56 (1H, s, C₇-OH), 12.67 (1H, s, C₅-OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO) : 153.6 (C-2), 104.5 (C-3), 182.1 (C-4), 149.9 (C-5), 129.4 (C-6), 163.0 (C-7), 94.0 (C-8), 147.0 (C-9), 104.3 (C-10), 131.0 (C-1), 126.3 (C-2, C-6), 129.2 (C-3, C-5), 131.9 (C-4)。经与文献 [12] 数据对照,确定为黄芩素。

峰 : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) : 6.20 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6), 6.51 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-8), 6.95 (1H, s, H-3), 7.6 (3H, m, H-3, H-4, H-5), 8.0 (2H, m, H-2, H-6), 10.86 (1H, s, C₇-OH), 12.78 (1H, s, C₅-OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO) : 163.2 (C-2), 105.2 (C-3), 181.9 (C-4), 161.5 (C-5), 99.1 (C-6), 164.5 (C-7), 94.2 (C-8), 157.5 (C-9), 104.0 (C-10), 130.7 (C-1), 126.4 (C-2), 129.2 (C-3), 132.0 (C-4), 129.2 (C-5), 126.4 (C-6)。以上数据和文献 [12] 对照,确定为白杨黄素。

表 1 黄芩素和白杨黄素在石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水体系中的分配系数

Table 1 Partition coefficients of baicalein and chrysin in light petroleum-ethyl acetate-methanol-water solvent systems

石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 Light petroleum-ethyl acetate- methanol-water system	分配系数 Partition coefficient	
	黄芩素 Baicalein	白杨黄素 Chrysin
5 5 7 3	0.089	0.30
5 5 6 4	0.28	0.82
5 5 5.5 4.5	0.55	1.67
5 5 5 5	0.99	3.23

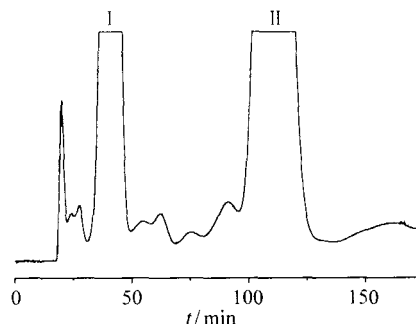


图 3 木蝴蝶粗提物 HSCCC 色谱图

Fig 3 HSCCC chromatogram of crude extracts

References

- Editorial Committee of the Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国卫生部药典委员会编). *The Pharmacopoeia of People's Republic of China* (Part) (中华人民共和国药典 (一部)). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 1999: 48
- Kyo R, Nakahata N, Sakakibara I, Kubo M, Ohizumi Y. *J. Pharm. Pharmacol*, 1998, (50): 1179 ~ 1182
- Chan Franky L, Choi H L, Chen Z Y, Chan Peter S F, Huang Y. *Cancer Lett*, 2000, (160): 219 ~ 228
- Takizawa H, Dellipizzi A M, Nasjletti A. *Hypertension*, 1998, (31): 866 ~ 871
- Zhang Tianyou (张天佑). *Technology of Countercurrent Chromatography* (逆流色谱技术). Beijing (北京): Science and Technology Press (北京科学技术出版社), 1991: 267
- Yuan Liming (袁黎明), Chen Xuexian (谌学先), Liu Guoxiang (刘国祥). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2003, 31(2): 251
- Sun Ailing (孙爱玲), Feng Lei (冯蕾), Liu Renmin (柳仁民). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2005, 33(7): 1016 ~ 1018
- Liu R M, Chu X, Sun A L, Kong L Y. *J. Chromatogr. A*, 2005, (1074): 139 ~ 144

- 9 Liu R M, Sun Q H, Sun A L, Cui J C. *J. Chromatogr A*, **2005**, (1072): 195 ~ 199
- 10 Yang F Q, Zhang T Y, Liu Q H. *J. Chromatogr A*, **2000**, (883): 67 ~ 73
- 11 Ma X F, Zhang T Y, Wei Y, Tu P F, Chen Y J, Ito Yoichiro. *J. Chromatogr A*, **2002**, 962(1~2): 243 ~ 247
- 12 Xiao Lihe(肖丽和), Wang Hongyan(王红燕), Song Shaojiang(宋少江), Zhang Guangping(张广平), Song Haixiu(宋海秀), Xu Suixu(徐绥绪). *Journal Shenyang Pharmaceutical University*(沈阳药科大学学报), **2003**, 20(3): 181 ~ 183

Isolation and Purification of Baicalein and Chrysin from the Extracts of *Oroxylum Indicum* by High Speed Counter-current Chromatography

Sun Ailing, Sun Qinghua, Liu Remin*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059)

Abstract High speed counter-current chromatography (HSCCC) was successfully used for the isolation and purification of baicalein and chrysin from the extracts of *Oroxylum indicum* using stepwise elution with a pair of two-phase solvents systems composed of light petroleum-ethyl acetate-methanol-water (5 5 5 5 and 5 5 7 3, V/V). From 300 mg of the crude extracts, 25.5 mg of baicalein and 36.6 mg of chrysin were obtained with a purity of 99.2% and 100%, respectively, as determined by high performance liquid chromatography. The structures of the isolated compounds were identified by ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR) and ^{13}C -NMR.

Keywords High speed counter-current chromatography, *Oroxylum indicum*, baicalein, chrysin

(Received 6 September 2005; accepted 28 January 2006)

《微量元素与健康研究》2007年征订启事

《微量元素与健康研究》是国内外公开发行的综合性学术刊物,双月刊,创办于1984年。原名《微量元素》,1992年更名为《微量元素与健康研究》,是国内创刊最早的微量元素学科专业期刊。本刊集理论研究、临床应用、预防医学及教学实践经验于一体,内容丰富、信息量大、可读性强。栏目包括了微量元素研究的各行业、各学科与前沿、交叉多学科,全面报道与常量元素、微量元素有关的研究项目、科研动态及新技术、新方法、新成果等。是从事临床、科研、中西医结合、中医中药、预防医学、环保、商检以及医疗保健的广大科技工作者必需的参考工具以及发表研究成果的重要园地。在该领域本刊已成为专业工作者获取我国微量元素情报信息的重要来源,是我国微量元素学科的重点期刊。设置的栏目有:“基础研究”、“现代医学”、“妇科疾病与保健”、“中医中药”、“食品营养与食物链”、“调查研究”、“实验技术”、“综述·讲座”、“元素专论”、“短篇论著”等。

本刊自2003年起,已由原来的季刊改为双月刊,逢单月30日出刊。2007年订价仍为每期8.00元,全年6期订费为48.00元(含邮资)。全国各地邮局均可订阅。本刊国内统一刊号:CN 52-1081/R,国际标准刊号:ISSN 1005-5320。邮发代号:66-53。国外发行代号:4813BM。为方便读者订阅,本刊编辑部全年办理邮订业务,遗失补寄。邮局汇款寄“编辑部”收,勿寄个人。

光盘检索:中国学术期刊光盘(医药卫生版)版

邮订地址:贵阳市市东路50号,《微量元素与健康研究》编辑部 邮编:550002

联系电话:(0851) 5928845, 5616973

E-mail: wyjk@chinajournal.net.cn wyjk@periodicals.net.cn

网址: <http://wlysykjy.periodicals.net.cn>

<http://wyjk.chinajournal.net.cn>