赤芍中芍药苷的分离纯化与结构鉴定

陈立江[1]，段洪云[1]，张胜[2]，刘洋[1]，刘宇[1](1.辽宁大学药学院，沈阳 110036；2.辽宁省药物研究院，沈阳 110015)

摘要：目的　建立芍药苷的分离纯化与结构鉴定方法，有效提高芍药苷的含量。**方法**　将赤芍用醇水溶液加热回流提取，用 AB-8 大孔吸附树脂、制备液相等工序进行分离纯化，通过理化常数及光谱分析鉴定化合物结构，以 HPLC 测定其含量。**结果**　该法得到的芍药苷纯度为 95.4%，总回收率为 81.03%。**结论**　本工艺具有高效、简便、成本低、回收率高等优点，是一种良好的芍药苷分离纯化方法。

关键词：赤芍；芍药苷；分离；纯化；AB-8 大孔吸附树脂
中图分类号：R284.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2011)07-0634-04

Separation, Purification and Identification of Paeoniflorin from *Paeonia Veitchii* Lynch

CHEN Lijiang[1], DUAN Hongyun[1], ZHANG Sheng[2], LIU Yang[1], LIU Yu[1](*1.College of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2.Liaoning Institute of Medicine, Shenyang 110015, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To establish the method of separation, purifying and idenfication method of paeoniflorin, and to elevate effectually paeoniflorin content. **METHODS**　*Paeonia veitchii* Lynch was extracted with ethanol-water solution, separated and purified by AB-8 macroporous resin and preparative HPLC. The structure was identified on the basis of physical and chemical characters and spectral analysis and quantitatively determined by HPLC. **RESULTS**　Paeoniflorin with purity over 95.4%, can be prepared with the total recovery more than 81.03%. **CONCLUSION**　High purity products can be obtained with this process which is high-performance, convenient, low cost and high recovery and is a good method of separation and purification of paeoniflorin.

KEY WORDS: *Paeonia veitchii* Lynch; paeoniflorin; isolation; purification; AB-8 macroporous resin

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根[1]，其主要成分为芍药苷，成无定形粉末，具吸湿性，有镇静、解痉、抗炎、抗应激性溃疡病、扩张冠脉血管、对抗急性心肌缺血以及抑制血小板聚集等多方面的作用，临床上已试用于治疗冠心病[2]。

国内外对赤芍的化学成分进行了较多的研究，但对从赤芍中提取主成分芍药的工艺过程的研究报道却很少[3-5]，用制备液相分离赤芍中的芍药苷还未见文献报道。由于芍药苷的药理作用比较明显[6-7]，而且毒性小，是一种值得开发且具有市场前景的药物。本实验采用醇水加热回流、AB-8 大孔吸附树脂、制备液相等对赤芍进行提取、纯化，并建立了高效、简便、成本低、回收率高的工艺，旨在为制备出高效、低毒的心脑血管原料药提供科学依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

高效液相色谱仪(莱比伦 3500)；色谱工作站(Ezchrom Elite)；RE 52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)；制备液相色谱仪(北京慧德易科技有限责任公司)；FW-100 型万能粉碎机(天津斯特仪器有限公司)；KQ-5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；DK-SZZ 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)；电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)；JA-1003 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)；DZF 型真空干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司)；X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司)。

1.2　试药

赤芍饮片(辽宁普兰店，经辽宁省药品检验所

基金项目：辽宁省自然科学基金(20092015)；沈阳市科学技术计划项目(F10-205-1-28)；辽宁大学“211 工程”三期建设项目
作者简介：陈立江，女，教授　　Tel: (024)62202469　　E-mail: chlj16@163.com

王维宁药师鉴定)；硅胶 H(青岛海洋化工有限公司)；芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所，批号：110736-200934，含量为 97.7%)；AB-8 大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂)；乙腈为色谱纯(山东禹王实业有限公司化工分公司)；水为高纯水；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱：Thermo C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相：乙腈-水(17∶83，磷酸调 pH 3.0)，检测波长：230 nm，流速：1.0 mL·min^{-1}，柱温：25 ℃。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取五氧化二磷干燥至恒重的芍药苷 2.04 mg，置 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得对照品溶液。分别精密吸上述溶液 3，6，9，12，15 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。以峰面积(Y)对进样质量(X)进行回归，得直线方程：Y=908 765X–30 610，r=0.999 7，进样量在 0.612~ 3.06 μg 内与峰面积具有良好的线性关系。

分别做了色谱系统精密度试验、方法重复性验和溶液稳定性试验，结果显示 RSD 均<2.0%。

2.2 赤芍饮片的含量测定[1]

取赤芍粉末 0.5 g，精密称定后置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，精密称定，浸泡 4 h，超声 20 min，放冷后再精密称定，用甲醇补足减失的重量，摇匀，过滤，精密吸取续滤液 0.5 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，混匀后作为供试品溶液。进样测定，记录峰面积，计算得赤芍饮片中芍药苷的含量为 3.42%(n=3，RSD=0.82%)。

2.3 赤芍的提取工艺

取赤芍的粗粉 200 g，用 8 倍量的 70%乙醇回流提取 2 次，每次 1.5 h。过滤，提取液合并后在 55 ℃以下减压浓缩至浸膏，称取重量为 64.79 g，用 HPLC 测得浸膏中芍药苷的含量为 6.54 g(n=3，RSD=1.21%)，提取工艺芍药苷的转移率：[6.54 g/(200 g×3.42%)]×100%=95.61%。

2.4 大孔吸附树脂纯化工艺

2.4.1 流动相的优选 参考文献[3, 8-9]，采用 AB-8 型大孔树脂纯化赤芍提取物。取赤芍提取物浸膏 32.85 g，加蒸馏水溶解成没有团块的溶液，上已经预处理过的大孔吸附树脂柱(径高比为 1∶8)，水洗至 Molish 反应为阴性时，以 5 倍量柱体积，分别用 10%，15%，20%，30%乙醇洗脱，每 100 mL 分段收集，测定芍药苷的含量，结果见表 1。

表 1 不同乙醇浓度洗脱芍药苷的结果

Tab 1 Results of different concentration of ethanol elution on paeoniflorin

乙醇浓度/%	每份中含量/mg·mL^{-1}					总量/g
	1	2	3	4	5	
20	0	0	0	0.01	0.02	0.03
30	0.04	0.05	0.08	0.07	0.03	0.27
40	0.09	0.38	0.99	0.49	0.14	2.01
50	0.07	0.15	0.11	0.16	0.09	0.58

比较洗脱物中芍药苷的含量，结果以 40%的乙醇洗脱为最佳工艺。因此，笔者采用 5 倍量柱体积 40%的乙醇洗脱。

2.4.2 工艺验证试验 取赤芍提取物浸膏 64.59 g，加蒸馏水溶解，离心，离心液上已预处理过的 AB-8 型大孔吸附树脂柱(径高比为 1∶8)，水洗至 Molish 反应为阴性时，采用 5 倍柱体积的 40%乙醇洗脱，收集洗脱液，减压回收至无醇味，干燥至恒重，精密称取 9.26 g，用 HPLC 测得芍药苷的含量为 6.13 g(n=3，RSD=1.04%)，纯化工艺芍药苷的收率：(6.13 g/6.52 g)×100%=94.01%。

2.5 制备液相的应用

色谱条件：进样量为 1 mL·次$^{-1}$；流动相为乙酸乙酯-95%乙醇(10∶1)； Quik Sep-50 中压色谱柱(300 mm×16 mm)；检测波长：230 nm；流速：6 mL·min^{-1}。

利用制备液相制备芍药苷是本工艺的关键步骤，具体操作过程如下：硅胶 H 用流动相充分浸泡 2 h，脱气后，用湿法装制备液相柱。赤芍纯化物(赤芍纯化后得到的物质)干粉 9.16 g，精密加入甲醇 100 mL，超声溶解，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，精密吸取上述续滤液注入液相色谱仪，每次 1 mL，观察色谱图，当出现芍药苷峰时，收集并合并流分，减压浓缩至干，继续减压干燥至恒重，得芍药苷干燥品，精密称取 5.81 g，芍药苷的收率：(5.81 g/6.06 g)×100%=95.8%，芍药苷的总回收率：[5.81×95.4%/(200 g×3.42%)]=81.03%。

2.6 结构鉴定

白色无定型粉末(甲醇)；mp 172 ℃；紫外灯(254 nm)下显暗斑，20%硫酸乙醇溶液显色呈紫褐色。IR(KBr)cm^{-1}：3 445(OH)，1 716(C=O)，1 600、

http://www.chinjmap.com

1 588(芳环)，1 280(C-O-C)；^{1}H-NMR(300 MHz，CD_3OD)δ：1.35(3H，s，10-H)，1.81(1H，d，*J*=12.5 Hz，3*α*-H)，1.95(1H，d，*J*=10.8 Hz，7*α*-H)，2.18(IH，d，*J*=12.5 Hz，3*β*-H)，2.47(1H，dd，*J*=10.8 Hz，6.5 Hz，7*β*-H)，2.56(1H，d，*J*=6.5 Hz，5-H)，3.84(IH，d，*J*=11.7 Hz，6′-H)，3.61(1H，dd，J=7.5 Hz，6′-H)，3.19~3.30(4H，m，2′、3′、4′、5′-H)，4.5(1H，d，*J*=7.5 Hz，1′-H)，4.74(2H，s，8-H)，5.42(1H，s，9-H)，7.47(2H，m，*J*=7.5 Hz，3″、5″-H)，7.60(IH，t，*J*=7.5 Hz，4″-H)，8.04(1H，d，*J*=7.5 Hz，2″、6″-H)。化合物波谱数据与文献报道[10-11]一致。因此鉴定化合物为芍药苷。

2.7 HPLC 色谱鉴定纯度

2.7.1 样品溶液的制备 分别精密称取赤芍纯化物和制备的芍药苷干燥品各 10 mg 和 4 mg，置 10 mL 量瓶中，得样品溶液的储备液。精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，得浓度分别为 0.1 和 0.04 mg·mL^{-1} 的样品溶液。

2.7.2 色谱条件的确定 芍药苷对照品(0.03 mg·mL^{-1})、赤芍纯化物和制备的芍药苷分别进样，色谱图见图 1 和图 2。图谱上主色谱峰和其他峰分离度好，芍药苷的保留时间为 9.7 min，最佳色谱条件见“2.1.1”。

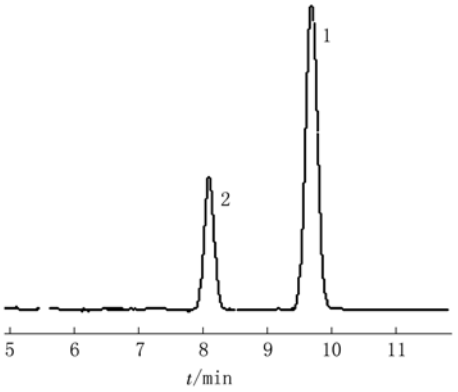

图 1 赤芍纯化物高效液相色谱图

1–芍药苷；2–芍药内酯苷

Fig 1 Purified Paeoniae of Radix Rubra by HPLC

1–paeoniflorin; 2–albiflorin

2.7.3 样品含量测定 制备的芍药苷进样 20 μL，得峰面积 A，测 3 次，求平均值。通过回归方程计算制备的样品中芍药苷的含量，结果见表 2。

3 结论

3.1 大孔吸附树脂纯化赤芍提取物

本实验采用了大孔树脂吸附法对赤芍提取物进行了分离纯化，具有吸附快、解吸率高、吸附容量大、易洗脱、树脂可再生、节省能源[12]等优点，并且获得的产品纯度高，操作简单，适用于工业化大生产。

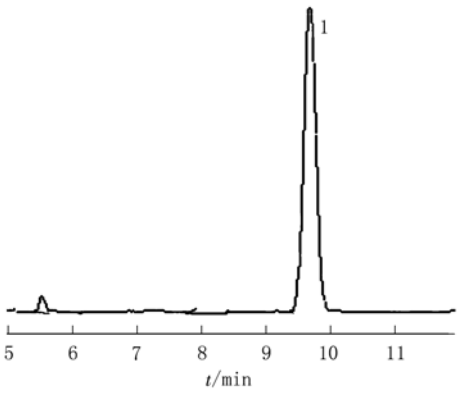

图 2 制备的芍药苷高效液相色谱图

1–芍药苷

Fig 2 Preparation of paeoniflorin by HPLC

1–paeoniflorin

表 2 样品含量测定结果

Tab 2 The assaying results of sample

序号	芍药苷含量/%	平均值/%	RSD/%
1	95.8		
2	95.4	95.4	0.37
3	95.1		

3.2 制备液相的应用

现在国内实验室大多还在沿用传统的常压玻璃柱进行分离，速度慢，回收率低，大量消耗试剂与人力，而应用制备液相分离得到芍药苷，速度快，节省溶剂和时间，是一种制备芍药苷的好方法。

本实验最后分离得到的芍药苷的纯度为 95.4%，总回收率为 81.03%，为芍药苷的分离纯化提供了实验依据。

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol Ⅱ(中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 109.

[2] MA S C, DENG S W. Optimizing the conditions for the produetion of total paeony glyeoside(TPG) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1998, 29(10): 664-667.

[3] LIN H C, DING H Y, WU T S, et al. Monoterpene glycosides from Paeonia suffruticosa [J]. Phytochemistry, 1996, 41(1): 237-242.

[4] KOSTOVA I, SIMEONOV M, TODOROVA D, et al. Two acylated monoterpene glucosides from Paeonia peregina [J]. Phytochemistry, 1998, 48(3): 511-514.

[5] PAN L S, LU X Y, WU P D. Process optimization of paeoniflorin isolation from *Paeonia veitchii* Lynch [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006, 18(1): 105-107.

[6] WU Y M, XU H P, WANGF C T, et al. Protective effects of paeoniflorin on cultured cortical neurons of mice [J]. Chin J

www.chinjmap.com

Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2002, 16(3): 172-175.

[7] YE J F, DUAN H L, YANG X M, et al. Anti-thrombosis effect of paeoniflorin: Evaluated in a photochemical reaction thrombosis model *in vivo* [J]. Planta Med, 2001, 67(8): 766-767.

[8] WANG D, LIU Q Y. Study on optimization of preparation of total peony glycoside [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(9): 1380-1383.

[9] ZHOU L. Study on extracti on separation and purification of total peony glycoside [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2008, 8(9): 152-154.

[10] LEMMICH J. Monoterpene and coumarin glucosides of Cnidium silaifolium [J]. Phytochemistry, 1996, 41(5): 1337-1340.

[11] WANG Y Z, FENG W S, SHI R B, et al. Monoterpenoids constituents of Radix Paeoniae Rubra [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(9): 669-671.

[12] HU J, ZHOU Y H. Application of macroporous resin in the purification of Chinese herbs [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2002, 24(2): 127-130.

收稿日期：2010-09-09