

中药分离中高速逆流色谱溶剂体系的选择

颜继忠,褚建军,童胜强(浙江工业大学药学院,浙江 杭州 310032)

摘要:目的 寻找高速逆流色谱溶剂体系的选择规律。方法 综述了文献中所使用的溶剂体系,从以往文献相反的角度概括出一些规律。结果 把高速逆流色谱所用的溶剂体系分为弱极性、中等极性和强极性三种,并给出了一种用于中药分离时溶剂体系的选择方法。结论 可以快速、简便地选择出合适的溶剂体系。

关键词:高速逆流色谱;溶剂体系;中药;分离

中图分类号:R284.2 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2003)05-0374-03

The selection of solvent system for high speed countercurrent chromatography in the separation of Chinese traditional medicine

YAN Ji-zhong, CHU Jian-jun, TONG Sheng-qiang (Pharmacy institute of zjut, Hangzhou 310032, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To find the rule of solvent systems for high speed countercurrent chromatography. **METHOD** Reviewed the recent application of high speed countercurrent chromatography in the separation of Chinese traditional medicine and obtained some rules of solvent system from the reverse. **RESULTS** The solvent systems were divided into three catalogs as weak polar, medium polar and polar system. And the rule for selection solvent system was elicited. **CONCLUSION** According to the results, the proper solvent system can be selected easily.

KEY WORDS:high speed countercurrent chromatography; solvent system; Chinese traditional medicine; separation

高速逆流色谱(HSCCC)是一种液液分配色谱,由于它不采用固态物质为固定相,所以不存在固态载体所造成的吸附损耗、样品变性、沾染和色谱峰形拖尾畸变等问题^[1]。国内外已广泛应用于植物中有效成分如:生物碱、黄酮类、萜类、木脂素、香豆素等的分离^[2]。

利用HSCCC分离的必要条件是样品在互不相溶的两相中有合适的分配比。通常把分配比定义为:溶质在固定相中的质量浓度(C_s)同溶质在移动相中的质量浓度(C_m)之比^[3]。而如何快速准确地找到合适的溶剂体系是分离的关键。本文介绍一种快速而简便的方法。

1 溶剂体系的要求

选择用于高速逆流色谱仪的溶剂系统时,应注意以下几个方面^[4]:(1)不造成样品的分解或变性;(2)足够高的样品溶解度;(3)样品在溶剂系统中合适的分配系数值;(4)固定相能够实现足够高的保留。

一般来说,前两点可以较简便地进行判断,后两点对高速逆流色谱仪显得特别重要,需要经过测定或实验判断。样品成分在溶剂系统中的分配系数和管柱中固定相的保留值均会影响分离效果。一般情况下,调整固定相达到管柱总体积的50%以上,将分配系数调整在0.5和2之间能得到最满意的分离效果。

2 分离实例

2.1 生物碱类

生物碱是植物中一类重要的化学成分,在植物中分布非常广泛,至少有50多科120属以上的植物中已证明有生物碱存在,已知的生物碱种类也至少在2000种以上。到目前为止,用HSCCC研究天然产物化学成分也以生物碱的研究报道得最多。已见报道用氯仿-甲醇- NaH_2PO_4 缓冲液($\text{pH}=4$)溶剂体系从青叶胆^[5]中分离了龙胆碱;氯仿-甲醇-0.3 mol/L/0.2 mol/L盐酸(4:1.5:2)体系和异丁基甲醚-四氢呋喃-水(2:2:3)体系从高乌头^[6,7]中分离了拉巴乌头碱,冉乌头碱等;异丁基甲醚-水(1:1)(有机相加三乙胺10 mmol/L,水相加盐酸10 mmol/L)体系从苦参^[8]中分离了苦参碱、槐果碱;正己烷-乙醇-水(6:5:5)体系分离了长春花^[2]中的长春胺和长春辛碱;正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水(6:3:2:5)和正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)体系分离了红豆杉^[2]中的紫杉醇、cephalomannine、巴卡亭。

2.2 黄酮类似物

黄酮类似物是一类比较重要的植物化学成分,它包括黄酮、异黄酮、二氢黄酮、花色苷元、儿茶精和属于黄酮异构体的橙酮,以及由它们所衍生的各式各样的衍生物。已见报道用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:3:1:6)体系从红茶^[3]中分离

了茶黄素;正丁醇-醋酸乙酯-水体系分离了葛根^[9]中的葛根素;氯仿-甲醇-水(4:3:2)体系分别分离了陈皮^[10]和沙棘^[11]中的橙皮苷和茨非醇;正己烷-醋酸乙酯-正丁醇-甲醇-醋酸水(1:2:1:1:5:1)分离了大豆^[12]中的黄豆苷、染料木苷;正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:3:2:4)分离了 *Ampelopsis grossedentata*^[13]中的(+)-二氢杨梅黄酮。

2.3 萜类

萜类是具有(C₅H₈)_n通式的天然化合物,以及含氧及饱和程度不等的衍生物。植物中存在的橡胶、某些色素、挥发油、树脂、苦味素等类型成分,大多属于萜类或含有萜类成分。已见报道用异辛烷-乙酸乙酯-甲醇-水(7:3:6:4)和异辛烷-甲醇-水(10:7:3)体系从青蒿^[2]中分离了 Artemisinin 和 epideox-yarteannuin;用氯仿-甲醇-水体系以不同的体积比分别分离了龙胆^[2]和银杏^[14]中的1个裂环烯醚萜苷和白果内酯。

2.4 木脂素和香豆素类

木脂素是一类从被子植物和裸子植物中分离出的植物成分,隐花植物中很少存在,它一般在木部和树脂中存在得比较广泛,所以称为木脂素类。香豆素及其衍生物广泛分布于植物界。已见报道用氯仿-甲醇-水分离了西伯利亚人参^[2]中的 eleutheroside;正己烷-乙腈-醋酸乙酯-水(8:7:5:1)分离了 *Magnoliavirginian*^[2]中的 neelignans;正己烷-甲醇-水(6:5:5)分离了五味子^[2]中的 schisanhend 和它的乙酸化物;氯仿-甲醇-水(13:23:16)分离了 *Lomatiumdissectum*^[2]中的3个香豆素苷。

2.5 醌类及其它

醌类主要分为苯醌、萘醌、菲醌和蒽醌四种类型。其它还有强心苷、有机酸等也可以用高速逆流色谱分离。已见报道用氯仿-甲醇-水(4:3:8:2)分离了大黄^[15]和虎杖^[16]中的大黄素以及白藜芦醇和白藜芦醇苷;石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(2:3:2.5:1.7)分离了丹参^[17]中的丹参醌;正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水(6:3:2:5)分离了洋地黄^[18]中的洋地黄毒苷;正丁醇-醋酸乙酯-水(1.8:5:6)分离了山茱萸^[19]中的没食子酸。

3 总结

3.1 溶剂体系的分类

天然化合物可分成弱极性、中等极性和强极性三种。相应地也可把溶剂体系分成弱极性、中等极性和强极性溶剂体系。从以往文献总结的另一个方向找到了一个浅显易懂的规律。

3.1.1 弱极性溶剂体系 由文献可以看出弱极性溶剂体系的基本两相由正己烷和水组成,可根据需要在上下相中加入不同体积比的甲醇、乙醇、醋酸乙酯等来调节溶剂系统的极性,达到较好的分离目的,适合于弱极性的生物碱、黄酮、萜类以及木脂素等化合物的分离。典型的溶剂体系有:正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水(6:3:2:5)和正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)。

3.1.2 中等极性溶剂体系 中等极性溶剂体系的基本两相中国现代应用药学杂志 2003 年 10 月第 20 卷第 5 期

由氯仿和水组成,可根据需要在上下相中加入不同体积比的甲醇、乙醇、醋酸乙酯等来调节溶剂系统的极性,适合于黄酮类、蒽醌类、香豆素,以及一些极性较大的木脂素和萜类的分离。典型的溶剂体系是氯仿-甲醇-水(4:3:2)。

3.1.3 强极性溶剂体系 强极性溶剂体系的基本两相由正丁醇和水组成,可根据需要在上下相中加入甲醇、乙醇、醋酸乙酯等来调节溶剂系统的极性;也可在氯仿水体系中调节 pH 值以增大极性;也有在异丁基甲醚水体系的上下相中加入适量的酸和碱,如:三乙胺和盐酸。适合于极性很强的生物碱类化合物的分离。典型的溶剂体系如氯仿-甲醇-0.3 mol/L/0.2 mol/L HCl(4:1.5:2)、异丁基甲醚-水(1:1)其中有机相加三乙胺 10 mmol/L,水相加盐酸 10 mmol/L。

3.2 溶剂体系的选择

综上所述,选取一个合适的溶剂体系的步骤如下:(1)预测要分离物质的极性,从上述溶剂体系当中粗选一个。(2)按所选溶剂体系的上下相进行预实验,即:每次取少量样品溶于上下相各两毫升的溶剂体系当中,用薄层色谱(TLC)进行检验,可加入甲醇、乙醇、醋酸乙酯等来调整溶剂体系的极性,直到样品在上下相中的分配比即 K 值约为 0.5~2 为止。(3)用高效液相(HPLC)测定 K 值。(4)用分析型 HSCCC 进行预分离,再用制备型高速逆流色谱进行分离。

3.3 分离示例

所以,只要有一定天然药物化学知识的人,不管他是否熟悉高速逆流色谱这项新技术,都可以根据所分离物质的极性和本文对溶剂体系所做的分类,快速准确地找到合适的溶剂体系。依据本文所述,学生用 TLC 结合 HPLC 找到了适合分离季铵型生物碱的强极性溶剂体系氯仿-甲醇-0.1 mol/L HCl(2:1:1),成功地从黄连中分离到四种小檗碱类生物碱(另文叙述)。

参考文献

- [1] 戴德舜,王义明,罗国安. 高速逆流色谱研究进展[J]. 分析化学,2001,29(5):586.
- [2] 袁黎明,傅若农,张天佑. 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用[J]. 药物分析 1998,18(1):60.
- [3] 江和源,程启坤,杜琪珍. 高速逆流色谱在茶黄素分离上的应用[J]. 茶叶科学,2000,20(1):40.
- [4] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京,北京科学技术出版社,1991:274.
- [5] 字敏,袁黎明,刘频,等. 高速逆流色谱分离青叶胆中的生物碱[J]. 林产化学与工业,2002,22(1):74.
- [6] Fuquan Yang, Yoichiro Ito. Preparative separation of lappaconitine, ranaconitine, N-deacetylappaconitine and N-deacetylranaconitine from crude alkaloids of sample *Aconitum sino montanum* Nakai by high speed countercurrent chromatography[J]. Chromatogr. A, 2002,943(2):219.
- [7] Fuquan Yang, Yoichiro Ito. pH-Zone-refining counter-current chromatography of lappaconitine from *Aconitum sino montanum* Nakai[J]. Chromatogr. A, 2001, 923(1-2):281.
- [8] Fuquan Yang, Jiang Quan, Tianyou Zhang et al. Preparative Chin JMAP,2003 October, Vol.20 No.5 • 375 •

separation of alkaloids from the root of *Sophora flavescens* Ait by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. Chromatogr A, 1998, 822(2) :316 .

[9] Cao X, Tian Y, Zhang T Y, *et al.* Separation and purification of isoflavones from *Pueraria lobata* by high-speed counter-current chromatography [J]. Chromatogr A, 1999, 855(2) :709 .

[10] 蔡定国, 余佳红, 刘文庸, 等 . 高速逆流色谱制备性分离纯化白果内酯和橙皮甙对照品 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(6) :364 .

[11] Yang F Q, Quan J, Zhang T Y, *et al.* Multidimensional counter-current chromatographic system and its application [J]. Chromatogr A, 1998, 803(1-2) :298 .

[12] Du Q Z, Li ZH, Yoichiro Ito. Preparative separation of isoflavone components in soybeans using high-speed counter-current chromatography [J]. Chromatogr A, 2001, 923(1-2) :271 .

[13] Du Q Z, Cai WJ, Xia M, *et al.* Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns [J]. Chromatogr A, 2002, 973(1-2) :217 .

[14] 余佳红, 柳正梁, 蔡定国 . 高速逆流色谱分离制备白果内酯 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9(6) :392 .

[15] 袁黎明, 夏滔, 吴平, 等 . 高速逆流色谱对大黄有效成分的制备性分离研究 [J]. 化学世界, 2002, 4 :185 .

[16] Yang FQ, Zhang T Y, Yoichiro Ito. Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography [J]. Chromatogr A, 2001, 919(2) :443 .

[17] Tian GL, Zhang TY, Zhang YB, *et al.* Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by multidimensional counter-current chromatography [J]. Chromatogr A, 2002, 945(1-2) :281 .

[18] 缪平, 蔡定国, 相秉仁, 等 . 应用高速逆流色谱分离纯化洋地黄毒甙 [J]. 中药新药与临床药理, 1995, 6(4) :38 .

[19] 田桂莲, 张天佑, 杨福全 . 应用高速逆流色谱 (HSCCC) 分离纯化山茱萸中的没食子酸 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(6) :52

收稿日期 :2002-12-20