

0.003 7%,而正己烷、苯、对二甲苯、邻二甲苯、苯乙烯和 1,2-二乙基苯等均未检出。

3 讨论

3.1 本实验采用顶空自动进样技术,使待测物挥发后直接进样检测分析,免去样品的萃取、浓缩等前处理步骤,缩短样品处理时间,提高样品处理效率,还可以避免长时间放置对样品最终检测结果的影响^[4]。同时顶空进样也可以避免待测样品中非挥发性组分对色谱柱的污染。结果表明该方法准确、可靠、快速、灵敏,适用于贯叶金丝桃大孔树脂提取物中有机残留溶剂的控制。

3.2 溶剂的选择 由于待测定成分较多且残留物含量较少,导致峰面积小,故先后摸索了几种溶剂,如二甲基甲酰胺、二甲亚砜和十二烷基硫酸钠溶液等,发现十二烷基硫酸钠溶液对测定干扰较小且溶解度适宜。当十二烷基硫酸钠溶液的浓度为 0.6% 时,各有机溶剂的响应即峰面积最大,因此选择其做为测定溶剂。

3.3 顶空温度与加热时间的选择 待测定的各有机溶剂的沸点在 69℃~178℃ 范围内,考虑到本法采用的溶剂为水溶液,故顶空加热温度选择在 120℃;顶空加热时间经考核,10 min 和 15 min 各成分的峰面积一致,25 min 峰面积均略为增加,但加热时间太长水溶液易爆沸,故确定加热时间为 15 min。

3.4 采用本实验建立的顶空气相色谱法对 3 批贯叶金丝桃大孔树脂提取物中有机残留物进行测定,结果显示 3 批样品中除含有微量甲苯外,其余有机溶剂均未检出,符合根据中国药典 2010 年版二部附

录Ⅷ P“残留溶剂测定法”^[1] 和国家药品审评中心“大孔吸附树脂分离纯化技术专题讨论会会议纪要”^[2] 的规定。

参考文献:

- [1] Greeson J M, Sanford B, Monti D A. St John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature [J]. *Psychopharmacology*, 2001, 153: 402-414.
- [2] 李 宏,姜怀春,邹国林. 贯叶连翘活性成分研究新进展 [J]. *中草药*, 2001, 32(7): 657-659.
- [3] 殷志琦,叶文才,赵守训. 国产贯叶连翘化学成分的研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(4): 277-279.
- [4] 石永平,汪 海. 高度富集黄酮类成分的贯叶连翘提取物抗抑郁作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17(1): 4-7.
- [5] 王 刚,马忠仙,谭莉莉. 贯叶连翘总黄酮的纯化工艺研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(10): 11-14.
- [6] 于智峰,王 敏. 大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离中的应用 [J]. *中药材*, 2006, 29(12): 1380-1383.
- [7] 闫 磊,何再安,刘焱文. 大孔吸附树脂在中药研究中的应用 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(12): 2585-2586.
- [8] 郭丽冰,王 蕾. 常用大孔吸附树脂的主要参数和应用情况 [J]. *中国现代中药*, 2006, 8(4): 26-32.
- [9] 胡 军,周跃华. 大孔吸附树脂在中药成分精制纯化中的应用 [J]. *中成药*, 2002, 24(2): 127-130.
- [10] 石云峰,金樟照. 顶空气相色谱法测定中药提取物的有机溶剂残留量 [J]. *中国药业*, 2007, 16(19): 12-13.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版二部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录Ⅷ P, 61-65.
- [12] 陆 彬. 中药新剂型与新技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007, 91-93.

应用高速逆流色谱一次性分离白豆蔻中 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮

朱云霞¹, 刘 雯², 张继全², 沈平壤^{2*}, 王玲玲², 卓 超¹

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 2. 国家中药制药工程技术研究中心, 上海 201203)

摘要: 目的 研究高速逆流色谱分离白豆蔻中黄酮醇类活性成分的方法。方法 利用高速逆流色谱技术,采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水作为两相溶剂系统,上相为固定相,下相为流动相,转速为 900 r/min,体积流量为 1.2 mL/min。结果 一次性从白豆蔻黄酮醇类物质中分离得到 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮。通过 EI-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定, HPLC 检测分析,纯度达 98% 以上。结论 利用高速逆流色谱技术可从白豆蔻中分离制备 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮,分

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目——已上市戒毒中药济泰片的药效物质基础、作用机制与质量标准研究(2008BA149B05)

作者简介: 朱云霞(1986—),女,硕士生。Tel: (021) 50805522, E-mail: zyx_97@126.com

* 通信作者: 沈平壤(1953—),女,教授,从事中药现代化科技创新研究。Tel: (021) 50805522-4001, E-mail: spn@nercmcm.com

离度好,产物纯度较高。

关键词: 高速逆流色谱; 白豆蔻; 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011) 10-1750-05

One step separation of 5-hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxyflavone in *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep by HSCCC

ZHU Yun-xia¹, LIU Wen², ZHANG Ji-quan², SHEN Ping-niang², WANG Ling-ling, ZHUO Chao¹

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. National Engineering Research Center for TCM, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To research separating the active component in *Amonum kravanh* Pierre ex Gagnep by high speed counter current chromatography(HSCCC) . **METHODS** 5-hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxyflavone, one flavonol component of *A. kravanh* Pierre ex Gagnep, was one step separated by HSCCC. The solvents system used for HSCCC was composed of hexane-ethyl acetate-methanol-water(4: 4: 8: 4, *v/v*), with a rotation speed at 900 r/min and a flow rate at 1.2 mL/min. And, the upper layer was used as the stationary phase, the sublayer was used as the mobile phase. **RESULTS** The chemical composition was confirmed by EI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR and its purity was analyzed by HPLC which was as high as 98% or above. **CONCLUSION** 5-hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxyflavone is fit to be separated and prepared by HSCCC with good resolution and high purity.

KEY WORDS: high speed counter current chromatography; *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep; 5-hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxyflavone

白豆蔻又名白蔻、豆蔻,为姜科植物白豆蔻 *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep 或爪哇白豆蔻 *Amonum compactum* Soland. ex Maton 的干燥成熟果实,按产地不同分为“原豆蔻”和“印尼豆蔻”。其性温、味辛,归肺、脾胃经,有温中止呕、化湿行气之功效。主治湿阻所滞、脾胃不和、脘腹胀满、不思饮食、湿温初起、胸闷不饥、胃寒呕吐、食积不消,白豆蔻是临床常用的芳香化湿药^[1]。

白豆蔻和爪哇白豆蔻多以果实入药,含挥发油和黄酮类成分,普遍认为主含挥发油,白豆蔻挥发油中主要成分为 1,8-桉叶素,此外,含有 β-蒎烯,α-蒎烯,丁香烯,龙脑乙酸酯,α-松油醇、芳樟醇、葛缕酮、金合欢醇、及对聚伞花素等。白豆蔻中黄酮类成分主要是指甲基化的黄酮醇类化合物,包括 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮、5-羟基-3, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮、3, 7-二羟基-5, 4'-二甲氧基黄酮、3-羟基-5, 7, 4'-三甲氧基黄酮、5, 4'-二羟基-3, 7-二甲氧基黄酮、3, 5, 7, 4'-四甲氧基黄酮、3, 7-二羟基-5, 3', 4'-三甲氧基黄酮、5, 3'-二羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮、3, 5-二羟基-7, 3', 4'-三甲氧基黄酮、3, 5, 3'-三羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮、3, 5, 7, 3', 4'-五甲氧基黄酮等^[2-3]。据药理学表明,5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮具有防癌、抗癌、抗氧化、抗过敏、抗病

毒、抗真菌等多种生物活性。可见,研究此类化合物的分离纯化具有较重要的意义^[4],化学结构式如图 1 所示。

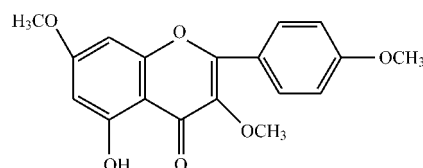


图 1 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮

Fig. 1 Chemical structures of 5-hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxyflavone

黄酮醇类化合物的分离纯化方法很多,常见的有柱层析、薄层层析、铅盐沉淀、硼酸络合、pH 梯度萃取、溶剂萃取等,近年来,高速逆流色谱技术在天然黄酮醇类活性成分的分离与纯化领域中应用越来越多^[5]。

高速逆流色谱(High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) 技术是近年来迅速发展的一种新型液-液分离技术,它避免了样品的不可逆吸附、损失和污染。由于使用的是溶剂体系,其组成和配比可以无限多,从理论上讲可以适合于任何极性范围的样品分离,具有很好的适应性;它对样品的预处理要求较低,一般的粗提物即可分离,分离效率高、

重现性好^[6-7]。由于其分离的快速性及被分离物质回收的便捷性使得分离、纯化、制备可同步完成,近年来,HSCCC 已经广泛应用于生物工程、天然产物、食品和化妆品等各领域的分离制备,如黄酮类化合物、生物碱、木脂素、蒽醌、大环内脂类、抗生素和胡萝卜素类等天然活性成分的分离制备,并将 HSCCC 与质谱(HSCCC/MS)联用,分析鉴定生物碱、木脂素及三萜类化合物等,均取得了满意的结果^[8-9]。本实验首次采用 HSCCC,选择出合适的溶剂体系,从白豆蔻中分离出黄酮醇类成分,且用此方法一次性制备得到了高纯度的 5-羟基-3,7,4'-三甲氧基黄酮纯品。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TBE-300A 型高速逆流色谱仪(上海同田生化有限公司),ÄKTA purifier P-900 泵,UV-900 紫外检测器(美国 GE Healthcare),HX-1050 恒温循环器(北京博医康),Agilent 1100 型高效液相色谱仪,包括 DAD 检测器(美国 Agilent 公司)。

正己烷、乙酸乙酯、甲醇为分析纯,水为超纯水,HPLC 所用甲醇为色谱纯试剂,白豆蔻药材由上海康桥饮片有限公司提供。

1.2 白豆蔻粗提物的制备

将白豆蔻粉碎为粗粉,取 200 g 粗粉加入 1600 mL 甲醇,回流提取 3 h 后,过滤,旋转蒸干,得棕黄色浸膏 16.3 g,作为进样物备用。

1.3 HSCCC 的分离操作

两相溶剂体系选用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(4:4:8:4)进行 HSCCC 分离操作,使用前用分液漏斗分开上下相,过滤,超声处理 20 min。将体积比为 4:1 的上、下相溶液以 10 mL/min 的体积流量泵入管路,约 20 min 后停泵,启动并调整主机转速为 900 r/min,然后以 1.2 mL/min 的体积流量将下相泵入柱内,待上下相建立动态平衡,记录上相被推出的体积,得上相保留着为 67.5%^[10];白豆蔻粗提物用下相溶解,由进样阀进样;设定紫外检测波长为 274 nm,接收目标成分,减压蒸干,TLC、HPLC 分析分离结果。

1.4 HPLC 分析条件

色谱柱:CAPCELL PAK C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(78:22);体积流量 1.0 mL/min;柱温:室温;紫外检测波长:274 nm;进样量为 10 μL。

2 实验结果

2.1 HSCCC 条件的选择与优化

本实验目标化合物为中等偏弱极性,因此选用了三个体系进行选择与优化,即正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水、三氯甲烷-甲醇-水及环己烷-甲醇-水。分配系数 K 值^[11]由 HPLC 分析测定:将适量的粗提物放入等体积混合的上下相混合均匀,用 HPLC 分别检测上、下相中目标化合物的峰面积,分别记为 A_U 和 A_L ,则 $K = A_U / A_L$ 。最终 K 值取三次测定的平均值,结果列于表 1。

表 1 样品组分在各溶剂体系中分配系数测定结果

编号	溶剂系统	比例/(v/v)	分配系数 K 值
1	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	4:4:4:4	4.34
2		4:4:6:4	2.59
3		4:4:6:6	1.99
4		4:4:8:4	1.62
5		4:4:8:8	0.87
6	环己烷-甲醇-水	3:5:3	4.16
7		3:6:3	3.73
8	三氯甲烷-甲醇-水	4:5:3	0.64
9		4:5:5	0.78

综合 K 值和实际分离情况,发现正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(4:4:8:4)对目标化合物的分离度最高,且出峰时间合适,上相保留大,因而采用该体系作为 HSCCC 分离的体系条件。

实验还研究了转速、体积流量及温度对分离效果的影响,最终选用转速为 900 r/min、体积流量为 1.2 mL/min、温度为室温。HSCCC-UV 图谱如图 2 所示,进样 30 min 后开始出峰,3 h 内出 4 个峰,分别对应收集流出液进行相关检测。

采用薄层色谱对 4 号峰进行分析,展开剂为三氯甲烷-丙酮(16:4),用香草醛-浓硫酸溶液(5%香草醛乙醇溶液与浓硫酸以 4:1 比例混合)显色,为单一的橙红色斑点^[12]。

采用上述方法,对 4 号峰经多次分离、富集后,将收集所得组分蒸干后最终得到 3.41 g 的淡黄色针状结晶,所得收率为 1.71%。

2.2 结构鉴定

2.2.1 核磁共振(NMR)对 HSCCC 分离峰的结构分析 ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ: 12.68(1H, s, 5-OH), 8.08(2H, d, $J = 11$, H-2', H-6'), 7.03(2H, d, $J = 11.5$, H-3', H-5'), 6.45(1H, d, $J = 2.5$, H-8), 6.36(1H, d, $J = 2.5$, H-6), 3.92(3H, s, OCH₃), 3.89(3H, s, OCH₃), 3.87(3H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ: 178.8(C-4),

165.4 (C-7), 162.0 (C-4'), 161.68 (C-5), 156.76 (C-9), 155.97 (C-2), 138.87 (C-3), 130.17 (C-2', C-6'), 122.82 (C-1'), 114.06 (C-3', C-5'), 106.06 (C-10), 97.82 (C-6), 92.16 (C-8), 60.1 (3-OCH₃), 55.8 (4'-OCH₃), 55.4 (7-OCH₃)。对比参考文献 [3-15], 可确定为 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮。

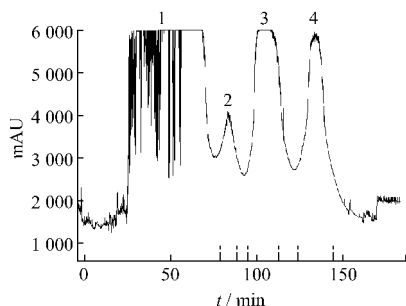


图 2 白豆蔻粗提物 HSCCC 分离图

1. HSCCC 分离峰 1 (35-60 min 之间收集) 2. HSCCC 分离峰 2 (77-89 min 之间收集) 3. HSCCC 分离峰 3 (94-116 min 之间收集) 4. HSCCC 分离峰 4 (128-147 min 之间收集)

Fig. 2 HSCCC chromatogram of crude extract from *A. kravanh* Pierre ex Gagnep

1. HSCCC peak fraction 1 (collected during 35-60 min) 2. HSCCC peak fraction 2 (collected during 77-89 min) 3. HSCCC peak fraction 3 (collected during 94-116 min) 4. HSCCC peak fraction 4 (collected during 128-147 min).

2.2.2 质谱 (ESI-MS) 对 HSCCC 分离峰的结构分析 ESI-MS: m/z (%): 328 ([M]⁺, 100), 329 (15), 327 (85), 309 (12), 285 (32)。以上数据与 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮的相对分子质量吻合。

2.3 纯度分析

将目标成分按照上述 HPLC 色谱条件进行分析, 根据面积归一化法, 纯度达到 98% 以上, 结果见图 3 所示。

2.4 回收率计算

采用外标法可以计算得到药材中 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮的实际含量, 取三次计算的平均值为 1.79%。将分离得到的相对标准品的量 (1.71%) 除以 1.79%, 即可得到 5-羟基-3, 7, 4'-三甲氧基黄酮的回收率为 95.5%。

3 讨论

常规的分离技术, HSCCC 技术预处理简单方便, 耗时短, 分离纯度高, 回收率高。在以后的应用过程中, 可采用 HSCCC 与常规分离方法相结合, 进一步提高分离效率, 使其更广泛的应用于中药分离

领域。

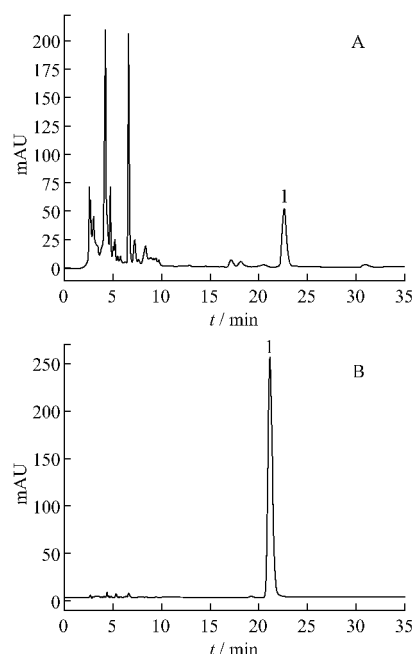


图 3 白豆蔻粗提物 (A) 及 HSCCC 分离峰 4 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of crude extract from *A. kravanh* Pierre ex Gagnep (A) and HSCCC peak fractions 4 (B)

参考文献:

- [1] 吴惠勤, 黄晓兰, 林晓珊, 等. 白豆蔻挥发油 GC-MS 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2006, 29(8): 88-91.
- [2] Fraga B M, Henandez M G, Fernandez C, et al. A chemotaxonomical study of nine Canarian Sideritis species [J]. Phytochemistry, 2009, 70(8): 1038-1048.
- [3] Sripanidkulchai B, Tattawasart U. Proceeding of the 10th World Congress on clinical nutrition [M]. Phuket Mar Biol Res Bull, Thailand. 2004: 61.
- [4] Yenesew A, Derese S, Midiwo J O, et al. Two prenylated flavonoids from the stem bark of Erythrina burttii [J]. Phytochemistry, 2003, 63(4): 445-448.
- [5] 唐德智. 黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展 [J]. 中药与天然药物, 2009, 21(12): 101-104.
- [6] 陈苏伟, 潘勇琴, 蔡纪青, 等. 高速逆流色谱法及其在中药分离中的应用 [J]. 天津药学, 2008, 20(1): 74-76.
- [7] 孙媛媛, 唐玉海. 高速逆流色谱技术在中草药有效成分分离中的应用 [J]. 西北药学杂志, 2003, 18(6): 282-283.
- [8] 赵碧清, 段更利. 高速逆流色谱法在中药有效成分分离中的应用 [J]. 中成药, 2007, 29(9): 1347-1349.
- [9] 沈平壤. 高速逆流色谱 (HSCCC) 技术与色谱指纹谱 [J]. 中成药, 2001, 23(5): 313-315.
- [10] Yoichiro Ito. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1065(2): 145-168.

- [1] Li A F, Sun A L, Liu R M. Preparative isolation and purification of costunolide and dehydrocostuslactone from *Aucklandia lappa* Decne by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1076(1-2): 193-197.
- [2] 张仲平, 邵 林. 香椿中多酚类化合物的 TLC 研究 [J]. *山东中医杂志*, 2000, 19(4): 237-238.
- [3] Jang D S, Han A R, Jhon G J, et al. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(4): 386-389.
- [4] Maria H R, Massayoshi Y, et al. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an aniba species [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(6): 1263-1269.
- [5] Consolacion Y R, Maria C L, Jadz J L, et al. Secondary metabolites from *Tectona philippinensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(9): 820-824.

维药没食子血清药化初步研究

霍仕霞, 彭晓明, 高 莉, 周 露, 斯拉甫·艾白*

(新疆维吾尔医药研究所, 新疆维吾尔医方剂学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830049)

摘要:目的 对维药没食子进行血清药物化学的初步研究。方法 建立维药没食子及口服没食子后大鼠血清指纹图谱的高效液相色谱分析方法, 比较没食子水提取物、没食子常规的粉末含药血清、超微粉含药血清、提取物含药血清和空白血清 HPLC 指纹图谱, 推断口服没食子后, 大鼠血清中的原型成分及代谢产物。结果 口服没食子后, 在大鼠血清中发现了 4 个入血成分, 其中 3 个为没食子中的原型成分, 1 个可能为原型成分的代谢产物。结论 入血成分及移行成分可能成为没食子在体内的直接作用物质, 对其进行进一步的分离、鉴定, 能更好地阐明没食子的作用物质。

关键词: 没食子; 血清药物化学; HPLC 指纹图谱

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1001-5528(2011) 10-1754-04

Pharmacochemistry of traditional Uighur medicine *Galla Turcica*

HUO Shi-Xia, PENG Xiao-ming, GAO Li, ZHOU Lu, Silafu · Aibai*

(Xinjiang Institute of Traditional Uighur Medicine, Prescription Laboratory of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Urumqi 830049, China)

KEY WORDS: *Galla Turcica*; serum pharmacochemistry; fingerprint

中药血清药化是以血液中的有效成分为研究对象, 采用现代分析方法鉴定口服中药后血清中药源性成分及移行成分, 它能够直观地分析中药口服后的血液中的形态表现, 快速寻找药效物质基础。没食子 *Galla Turcica* 是新疆维吾尔医常用药, 它是没食子蜂科昆虫没食子蜂 *Cynips gallae-tinctorie* Oliv. 的幼虫, 寄生于壳斗科植物没食子树 *Quercus infectoria* Oliv. 幼枝上, 所产成的虫瘿。没食子富含鞣质, 约占 50% ~ 70%, 其次为没食子酸、丙酸、树脂等。其中没食子鞣质具有收敛、抗炎、镇痛、抗免疫、抗病毒、降血脂、降血糖^[1-2] 等作用。而没食子鞣质是在

体内以何种形式发挥作用, 至今尚未见有报道, 本研究在建立没食子高效液相色谱指纹图谱的同时, 应用血清药物化学方法, 分析比较没食子粉末与提取物含药血清指纹图谱, 快速分析和筛选没食子活性成分, 研究其可能的作用物质基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪: Waters1525 二元泵高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Waters2996 紫外检测器, Empower 数据采集系统(美国); TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂制造);

收稿日期: 2011-03-01

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAI48B06); 新疆维吾尔自治区科技支疆工程资助项目(200840102-34)

作者简介: 霍仕霞(1983—), 女, 助理研究员, 主要从事仪器分析新方法 & 新药研究。Tel: 13565889322, E-mail: huoshixia2010@sina.com。

* 通信作者: 斯拉甫·艾白, 男, 教授, 研究员, 硕士生导师, 主要从事药理毒理学研究和新药开发。Tel: (0991) 2563702, E-mail: aibai@263.net。