

文章编号:1001-6880(2011)04-0739-04

## 高速逆流色谱对大黄蒽醌类成分的分离研究

袁萍<sup>1</sup> 周东斌<sup>2</sup> 林顺权<sup>1</sup> 高俊飞<sup>1</sup> 何浏<sup>1</sup> 袁晓<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国科学院武汉植物园 武汉 430074; <sup>2</sup>牌牌科技有限公司 广州 510540

**摘要:**利用高速逆流色谱对大黄中的5个蒽醌活性成分进行了分离,当两相溶剂系统的组成是石油醚:乙酸乙酯:甲醇:水=8:2:8:1时,分离出大黄素;当两相溶剂比为3:4:3:2时,分离出大黄酸和芦荟大黄素;当溶剂比为12:2:12:1时,分离出大黄酚和大黄素甲醚;经高压液相色谱检测大黄素、大黄酸和芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量分别为98.81%、99.15%、98.51%、98.89%和98.16%。

**关键词:**高速逆流色谱; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 分离

中图分类号:R284.2; Q946.91

文献标识码:A

Separation of Anthraquinone from *Rhubarb* by High Speed Countercurrent ChromatographyYUAN Ping<sup>1</sup> ZHOU Dong-bin<sup>2</sup> LIN Shun-quan<sup>1</sup> GAO Jun-fei<sup>1</sup> HE Liu<sup>1</sup> YUAN Xiao<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; <sup>2</sup>PI & PI Technologies Inc., Guangzhou 510540, China

**Abstract:** Five anthraquinones from *Rhubarb* were separated by high speed countercurrent chromatography. When two-phase solvent system composition was petroleum ether: ethyl acetate: methanol: water (8:2:8:1), emodin was obtained. Rhein and aloe emodin were separated when the proportion of solvents was 3:4:3:2, while chrysophanol and rheochrysidin were separated at the proportion of solvents 12:2:12:1. The purities of emodin, rhein, aloe emodin, chrysophanol and rheochrysidin are 98.81%, 99.15%, 98.51%, 98.89% and 98.16% respectively by HPLC.

**Key words:** high speed countercurrent chromatography; aloe emodin; rhein; emodin; chrysophanol; rheochrysidin; separation

高速逆流色谱(HSCCC)是一种连续高效的液-液分配色谱分离技术,它无需任何固体支撑体或载体,在短时间内实现样品在互不相溶的两相溶剂系统中的高效分配,从而实现样品分离,同时样品的利用率非常高<sup>[1,2]</sup>。

大黄为蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)、药用大黄(*R. officinale* Baill.)或唐古特大黄(*R. tanguticum* Maxim. ex Balf.)的根及根茎,是我国重要的传统中药之一,具有抗菌、抗病毒、消炎止血及降血脂等多种功效,在临床上有重要作用。大黄也是我国重要的出口药材,现在世界上许多国家将大黄收录在药典中,可以说大黄已经成为世界性的药物,各国的科学工作者对大黄所含的化学物质进行了许多深入研究,以求建立起简便快速分离大黄

品种优劣的方法。目前从大黄属分离出成分160多种,主要包括蒽醌类、蒽酚酮及其酯衍生物、双蒽酮类等。大黄药用成分主要为大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚以及它们与糖苷生成的结合型蒽醌<sup>[3]</sup>。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料

HPD-100大孔吸附树脂由沧州宝恩吸附材料科技有限公司提供,大黄(*Rheum palmatum* L.)干燥根茎由湖北省中药材公司提供。

## 1.2 仪器与药品

OptichromeTM-A半制备J型螺旋管行星式高速逆流色谱仪;江阴逆流科技有限公司生产;检测器为UV3000紫外检测器。L-2000型高压液相色谱;日本日立公司生产。5L/25型低温冷却循环泵,由巩义市予华仪器有限责任公司生产;试剂均为分析纯,

## 1.3 方法和条件

收稿日期:2010-03-08 接受日期:2010-06-17

基金项目:国家科技基础专项项目(2008FY230400)

\*通讯作者 Tel: 86-013871483413; E-mail: yuanyuanxiao@yahoo.com

### 1.3.1 游离蒽醌的提取

将 10 kg 大黄干燥茎块切片, 粉碎后过 2 号筛, 分别装入 5000 mL 三角瓶, 加入量为三角瓶容量的 1/5, 分别倒入 95% 的乙醇。置入超声仪中超声 30 min, 过滤出溶液后, 回收溶剂。将回收的溶剂再倒入三角瓶, 继续超声, 重复以上操作 3 次, 得到乙醇提取干浸膏。将乙醇干浸膏与氯仿按重量比 1:5 比例置入三角瓶里萃取超声, 抽滤、浓缩萃取液, 再将回收的溶剂重新倒入装乙醇浸膏的瓶里继续超声萃取、抽滤、浓缩, 重复 3 次得到游离蒽醌的氯仿萃取物。继续将氯仿萃取后的渣置入三角瓶中, 用 20% 的硫酸和氯仿在水浴上回流 4~5 h, 稍放冷, 过滤, 分离出氯仿层, 用水洗至中性, 回收氯仿后, 得到游离蒽醌, 合并 2 次提取物, 得到总的游离蒽醌<sup>[4,5]</sup>。

### 1.3.2 大黄的分离

HSCCC 两相溶剂系统的组成是石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水(体积比为 8:2:8:1), 混合前总体积为 1L, 充分摇匀后, 在室温下静置过夜, 使用前分离。上相作为固定相, 下相作为流动相, 上相与下相的体积比约为 2:3。用甲醇清洗逆流的管柱, 然后用空气压缩机将甲醇吹出, 用泵把固定相以 10 mL/min 速度泵入管柱, 待管子的另一侧有固定相出来后停止泵入固定相, 然后主机反转 1100 r/min, 以 3 mL/min 泵入流动相, 待流出来的液体与固定相的液体产生浑浊, 继续以 3 mL/min 泵入流动相, 直到工作站上的基线走平则柱子已平衡, 取干燥后的游离蒽醌的氯仿萃取物约 200 mg, 用 20 mL 流动相超声溶解, 超滤后(滤膜孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ )用注射器进样; 流动相的速度为 3 mL/min; 检测器的波长为 220 nm<sup>[6]</sup>。仪器检测出峰时开始收集流份, 其监测图如图 1 根据图 1 中的 3 个峰面积收集溶液, 经 TLC 检测, 相同的化合物分为 3 组合并。

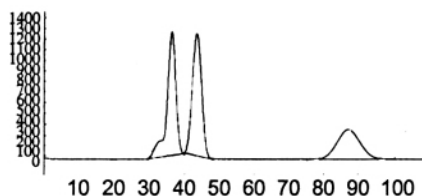


图 1 用 HSCCC 分离大黄的监测图

Fig. 1 Separation of emodin by HSCCC

### 1.3.3 芦荟大黄素和大黄酸的分离

HSCCC 两相溶剂系统的组成是石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水(体积比为 3:4:3:2), 对收集的 1 组

化合物继续分离, HSCCC 其他的操作条件和方法同 1.3.2 一样。仪器检测出峰时开始收集流份, 其监测图如图 2 根据图 2 中的 2 个峰面积收集溶液。

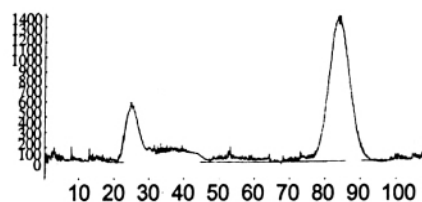


图 2 用 HSCCC 分离芦荟大黄素和大黄酸的监测图

Fig. 2 Separation of aloes emodin and rhein by HSCCC

### 1.3.4 大黄酚和大黄素甲醚的分离

HSCCC 两相溶剂系统的组成是石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水(体积比为 12:2:12:1), 对收集的 3 组化合物继续分离, HSCCC 其他的操作方法同 1.3.2 一样, 仪器检测出峰时开始收集流份。其监测图如图 3 根据图 3 中的 2 个峰面积收集溶液, 对收集的 2 个化合物重结晶, 大黄酚用适量的乙酸乙酯在 96  $^{\circ}\text{C}$  下热熔, 过滤, 室温静置析出黄色片晶, 大黄素甲醚用适量丙酮在 96  $^{\circ}\text{C}$  下热熔, 过滤, 室温静置析出金黄色针晶, 2 个晶体用石油醚洗晶。

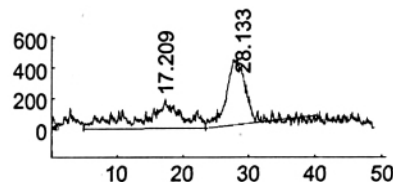


图 3 用 HSCCC 分离大黄酚和大黄素甲醚的监测图

Fig. 3 Separation of chrysophanol and rheochrysidin by HSCCC

### 1.3.5 高压液相色谱检测条件

色谱柱为 Fortis  $\text{C}_{18}$  (250\*4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 为甲醇: 乙酸乙酯(4:1)加 0.3% 的甲酸; 流动相 B 为 0.3% 甲酸; 流速为 1 mL/min; 检测波长为 430 nm<sup>[7,8]</sup> 进样量为 30  $\mu\text{L}$ , 用 A 和 B 梯度洗脱的条件为; 当 A 的浓度为 80%~95% 时, 洗脱时间为 30 min, 当 A 的浓度为 95~100 时, 洗脱时间为 15 min。

## 2 结果

当溶剂系统体积比为石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 = 8:2:8:1 时(图 1), 收集到的第一个峰的溶液, 经 TLC 检测为 2 个化合物, 为芦荟大黄素和大黄酸, 第 2 个峰为大黄素, 第 3 个峰为 2 个化合物, 为大黄酚和大黄素甲醚。收集的第 2 个峰(大黄素)

的液体放置 12 h 后自然结晶。当溶剂系统体积比为石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 = 3:4:3:2 时(图 2), 对收集第 1 个峰重新分离, 重新分离后, 收集到的第一个峰为芦荟大黄素, 第 2 个峰为大黄酸。当溶剂系统用石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水体积比为 12:2:12:1 时(图 3), 对第 3 个峰重新分离, 重新分离后, 收集到的第一个峰为大黄酚, 第 2 个峰为大黄素甲醚。

200 mg 氯仿萃取物经过 HSCCC 分离得到大黄酸 37.8 mg, 得率为 18.90%; 大黄素 32.1 mg, 得率为 16.05%; 芦荟大黄素 11.7 mg, 得率为 5.85%; 大黄酚 40.9 mg, 得率为 20.45%; 大黄素甲醚 19.0 mg, 得率为 9.50%。

经高压液相色谱用外标法检测, 大黄素单体纯度为 98.81%; 大黄酸为 99.15%; 芦荟大黄素 98.51%; 重结晶后大黄酚为 98.89%; 大黄素甲醚为 98.16%。

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 HPLC 测试谱图如图 4~8。

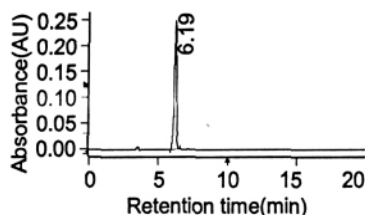


图 4 芦荟大黄素 HPLC 测试图谱

Fig. 4 Test pattern of aloe emodin by HPLC

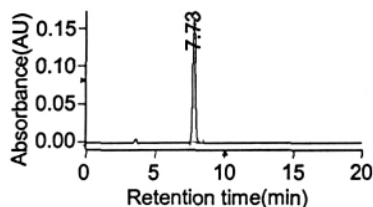


图 5 大黄酸 HPLC 测试图谱

Fig. 5 Test pattern of rhein by HPLC

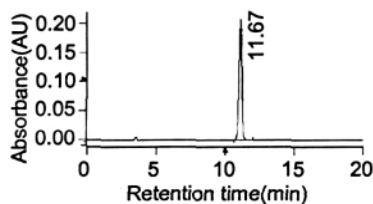


图 6 大黄素 HPLC 测试图谱

Fig. 6 Test pattern of emodin by HPLC

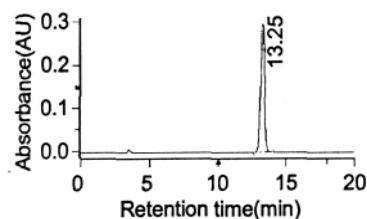


图 7 大黄酚 HPLC 测试图谱

Fig. 7 Test pattern of chrysophanol by HPLC

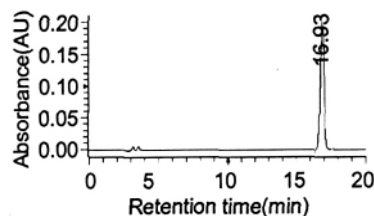


图 8 大黄素甲醚 HPLC 测试图谱

Fig. 8 Test pattern of rheochrysidin by HPLC

### 3 讨论

用高速逆流分离游离蒽醌类化合物, 选择溶剂系统是关键<sup>[7]</sup>, 如本试验第一个溶剂系统选择石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水(体积比为 8:2:8:1)时, 能从游离蒽醌中把大黄素分离为单体, 而且单体不做重结晶, 高压液相色谱验证纯度在 98% 以上。对其它的化合物, 也能做到初步分离, 所有的溶剂系统只用了石油醚、乙酸乙酯、甲醇、水这 4 种溶剂, 分离时间短。经过初步分离后的化合物, 只需改变系统溶剂比例, 能达到化合物完全分离<sup>[8]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Sun YY(孙媛媛), Tang YH(唐玉海). Application of high speed countercurrent chromatography in separation of effective ingredients of Chinese medicine. *Northwest Pharm*(西北药学杂志) 2003, 18: 282-283.
- 2 Huang JG(黄健光), Li ZC(李总成). Separation of active anthraquinone ingredient in Chinese rhubarb by high speed countercurrent chromatography. *J Shunde Polytech*(顺德职业技术学院学报) 2006, 4: 31-33.
- 3 Huang Y(黄园), Xu XL(徐雄良), Zhang ZR(张志荣) et al. Study on purification process of total anthraquinone in Radix et Rhizoma Rhei decoction. *Chin Tradit Patent Med*(中成药) 2003, 25: 783-785.

(下转第 733 页)

更高,有效物质的溶出度更大有关。另一方面,棉花根中含有棉酚,而棉酚的极性较小,醇提法比水煎法可能会将更多的棉酚溶解出来,因此还需进一步考察比较两种提取物的毒副作用。

#### 参考文献

- 1 Zhu XX(朱晓西), Zhu SL(朱胜龙). Preparation of Health Granules from the Extract of Cotton Root. China, 200610054825. 7. 2007-8-22.
- 2 Jia MH(贾美华). Clinical application of cotton seeds and root bark. *Shanghai J Tradit Chin Med*(上海中医药杂志), 1992, 4: 31-34.
- 3 Ma TY(马铁璞). Sixty cases of senile chronic bronchitis treated with cotton root. *China's Naturopathy*(中国民间疗法) 2000, 8: 31-32.
- 4 Xu SY(徐叔云), Bian RL(卞如廉), Chen X(陈修). Methodology of Pharmacological Experiment(药理实验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. 1363.
- 5 Zou HB(邹华彬), Wu B(吴波), Du AQ(杜爱琴) *et al.* Separation of the effective components from *Rheum*. *Chem Anal Comput*(化学分析计量) 2002, 11: 13-15.
- 6 Zhang D(张德), Cheng SP(程树平), Han HH(韩海洪), *et al.* Extraction of rhapontin from the roots of *Rheum tanguticum* Maxim by ultrasonic wave. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2005, 17: 217-219.
- 7 Shi XG(时新刚), Chen ZW(陈志伟), Liu DW(刘东武). A review on application of high speed countercurrent chromatography. *Life Sci Apparatus*(生命科学器) 2009, 8: 3-6.
- 8 Yuan LM(袁黎明), Li BF(李本发), Wang D(王东), *et al.* Separations of *Rubia cordifolia* L., *Polygonum cuspidatum* and *Cassia seed* by high speed countercurrent chromatography. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2002, 14: 57-59.
- 9 Rukachaisirikul V, *et al.* Antibacterial caged-tetraprenylated xanthenes from the stem bark of *Garcinia scortechnii*. *Planta Med* 2005, 71: 165-170.
- 10 Rukachaisirikul V, *et al.* Caged-triprenylated and -tetraprenylated xanthenes from the latex of *Garcinia scortechnii*. *J Nat Prod* 2003, 66: 933-938.
- 11 Rukachaisirikul V, *et al.* Caged-tetraprenylated xanthenes from *Garcinia scortechnii*. *Tetrahedron* 2000, 56: 8539-8543.
- 12 Bennett GJ, Lee HH. Review article number 43. Xanthenes from Guttiferae. *Phytochemistry* 1989, 28: 967-997.
- 13 Gu HY(顾红燕), *et al.* Gambogic acid induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells with p53 and Bax Up2-regulated. *Chin J Nat Med*(中国天然药物) 2005, 3: 168-172.
- 14 Han QH, *et al.* Gambogic acid and epigambogic acid, C-2 epimers with novel anticancer effects from *Garcinia hanburyi*. *Planta Med* 2006, 72: 281-284.
- 15 Wang LL, *et al.* A new cytotoxic caged polyprenylated xanthone from the resin of *Garcinia hanburyi*. *Chin Chem Lett*, 2008, 19: 1221-1222.
- 16 Bhat HB, *et al.* The colouring matters of *Garcinia morella*: Part V-Isolation of desoxymorellin and dihydroisomorellin. *Ind J Chem* 1964, 2: 405-410.
- 17 Karanjankar CG, *et al.* Morellin, isomorellin and gambogic acid. *Tetrahedron Lett* 1966, 7: 687-691.
- 18 Sukpondma Y, *et al.* Xanthone and sesquiterpene derivatives from the fruits of *Garcinia scortechnii*. *J Nat Prod* 2005, 68: 1010-1017.

(上接第 741 页)

(上接第 795 页)