

# 高速逆流色谱法分离纯化红景天苷、葛根素和淫羊藿苷3种标准样品

徐双双<sup>1</sup>, 王尉<sup>1,2\*</sup>, 贺天雨<sup>1</sup>

(1. 北京市理化分析测试中心, 有机材料检测技术与质量评价北京市重点实验室, 北京 100089;  
2. 北京市科学技术研究院分析测试技术重点实验室, 北京 100089)

**摘要:** **目的** 采用高速逆流色谱技术分离纯化红景天苷、葛根素和淫羊藿苷3种标准样品。**方法** 采用溶剂体系正丁醇:乙酸乙酯:水(2:3:5, V:V:V)分离红景天粗提物; 采用溶剂体系正丁醇:乙酸乙酯:水(1:2:3, V:V:V)分离葛根粗提物; 采用氯仿:甲醇:水(4:3.5:2, V:V:V)分离淫羊藿苷粗提物, 并采用高效液相色谱法对所得单体进行纯度检测。**结果** 所得红景天苷、葛根素、淫羊藿苷标准样品纯度分别为98.9%、99.8%和99.5%。将核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)<sup>13</sup>C-NMR数据归属并与相关文献比对, 进一步确认了该3种物质的结构。**结论** 红景天苷、葛根素、淫羊藿苷3种样品满足GB/T 15000.3-2008标准样品工作导则的要求, 可用于相关药品检测方法的校正和相关产品的质量控制。

**关键词:** 高速逆流色谱法; 分离纯化; 红景天苷; 葛根素; 淫羊藿苷

## Separation and purification of salidroside, puerarin and epimedium glycoside by high-speed counter current chromatography

XU Shuang-Shuang<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1,2\*</sup>, HE Tian-Yu<sup>1</sup>

(1. Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing Key Laboratory of Organic Materials Testing Technology & Quality Evaluation, Beijing 100089, China; 2. Beijing Academy of Science and Technology Key Laboratory of Analysis and Testing Technology, Beijing 100089, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for separation and purification of salidroside, puerarin and epimedium glycoside by high-speed counter current chromatography (HSCCC). **Methods** The HSCCC solvent systems of N-butanol:ethyl acetate:water (2:3:5,V:V:V), N-butanol:ethyl acetate:water (1:2:3, V:V:V) and chloroform:methyl alcohol:water (4:3.5:2, V:V:V) were used for isolation of salidroside, puerarin and epimedium glycoside, respectively. The purities of the end products were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). **Result** The purities of salidroside, puerarin and epimedium glycoside were 98.9%, 99.8%, and 99.5%, respectively. The structures of the target compounds were furtherly identified by data of <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C-NMR) and comparison with the related literature. **Conclusion** The reference materials of salidroside, puerarin and epimedium glycoside can conform to directives of the reference materials of GB/T 15000.3-2008, which can be used for method validation and quality control of regarding drug products.

**KEY WORDS:** high-speed counter current chromatography; isolation and purification; salidroside; puerarin; epimedium glycoside

\*通讯作者: 王尉, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为天然产物分离纯化。E-mail: wangwei\_1217@126.com.

\*Corresponding author: WANG Wei, Master, Research Associate, Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, 27 West 3rd ring North Road, Haidian District, Beijing 100089, China. E-mail:wangwei\_1217@126.com.

## 1 引言

天然产物因其特有的复杂结构和丰富的生物活性,一直是国内外研究的热点,目前我国天然产物标准样品数量和种类严重不足,大部分依赖进口,影响了检测结果的可比性,制约了相关行业的发展。为改善这种现状,目前我国许多研究人员正积极开展标准样品的研制工作<sup>[1]</sup>。

传统的标准样品分离纯化技术如柱层析、膜分离、超临界萃取等存在样品回收率低、环境污染严重和制备量小等缺点,因此选择能够满足纯化要求并且一定制备规模的分离纯化方法,是目前研究的重点<sup>[2,3]</sup>。

高速逆流色谱技术 (high-speed counter current chromatography, HSCCC)是由美国 Ito 教授于 20 世纪 80 年代研制开发的一种新型的连续高效液-液分配色谱技术<sup>[4]</sup>。该技术利用多层螺旋管同步行星式离心运动,在短时间内完成样品在互不相溶的两相溶剂系统中的高效分配,进而实现多种成分的分离。高速逆流色谱仪工作时,色谱仪中的螺旋管做行星运动,由于重力及螺旋管力的作用,固定相移向螺旋管的入端,使得固定相得以保留,同时两相溶剂在螺旋管中得以混合。由于不同溶质在两相中的分配系数不同,溶质在两相溶剂中进行分配平衡,从而使不同成分得以分离。HSCCC 因其制备物纯净、制备量大、技术成本低等优势正发展成为一种备受关注的新型液-液分配色谱分离纯化技术,已经广泛应用于天然产物、生物医药、生命科学、农业食品和化工材料等领域<sup>[5-7]</sup>。

目前 HSCCC 在天然产物标准样品研制中得到很好的应用和发展,本文主要介绍本实验室采用 HSCCC 研制 3 种标准样品。

## 2 材料与仪器

### 2.1 材料

大红花红景天粗提物、野葛粗提物和淫羊藿苷粗提物,均购自西安三江生物工程有限公司。

### 2.2 试剂与仪器

氯仿、乙酸乙酯、甲醇、正丁醇(分析纯,北京化工厂);甲醇(色谱纯, Thermo Fisher 公司)。

TBE-300B 半制备型高速逆流色谱仪(上海同田生物技术有限公司); LC-20 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); ALPHR1-2 冷冻干燥机(德国 Marin Christ 公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 HSCCC 分离纯化红景天苷样品<sup>[8]</sup>

##### (1) 液相色谱条件

色谱柱为 Aglient ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇:水=20:80(V:V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 运行时间 30 min; 检测波长为 275 nm; 进样量: 5 μL。

##### (2) HSCCC 条件

HSCCC 溶剂体系为正丁醇:乙酸乙酯:水=2:3:5(V:V:V),将配制好的溶剂静置过夜,取上相为固定相,下相为流动相,分别超声脱气 30 min。

HSCCC 操作过程如下:称取红景天粗提取物 250 mg,等体积上下相溶解后,备用。泵入固定相(上相) 400 mL,流速为 10 mL/min; 换流动相(下相),主机正转,缓慢调节转速至 900 r/min; 泵入流动相,流速为 2 mL/min; 25 °C 下分离,于波长 254 nm 下检测。待流动相从出口流出时,上样。根据 HSCCC 图收集目标化合物,旋转蒸发去除溶剂,冷冻干燥后备用。

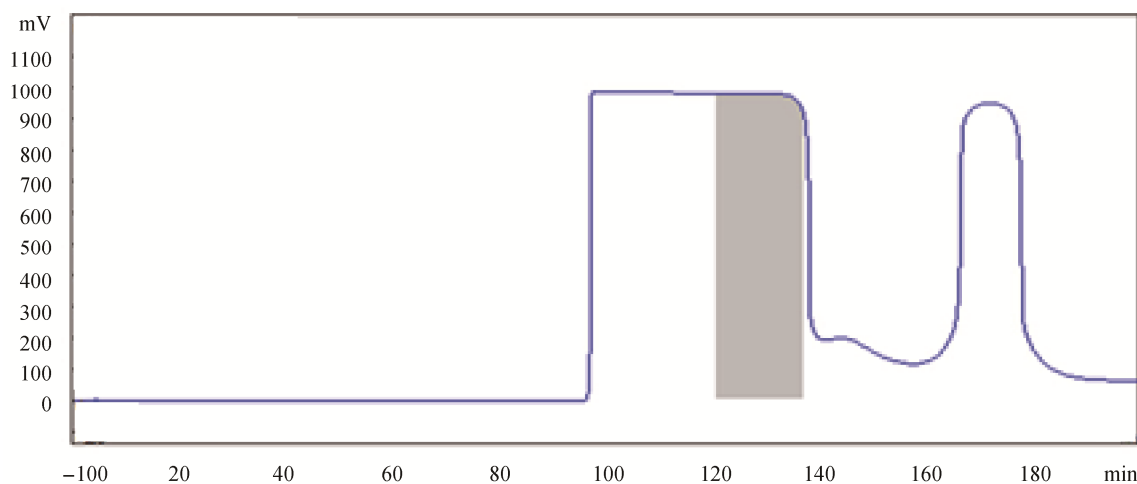


图 1 红景天苷的 HSCCC 色谱图  
Fig. 1 HSCCC chromatogram of salidroside

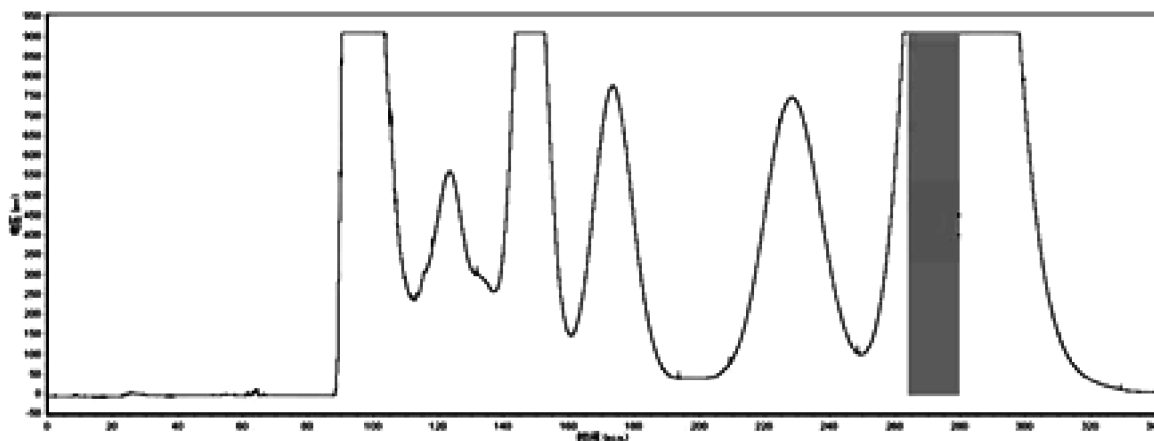


图 2 葛根素的 HSCCC 色谱图  
Fig.2 HSCCC chromatogram of puerarin

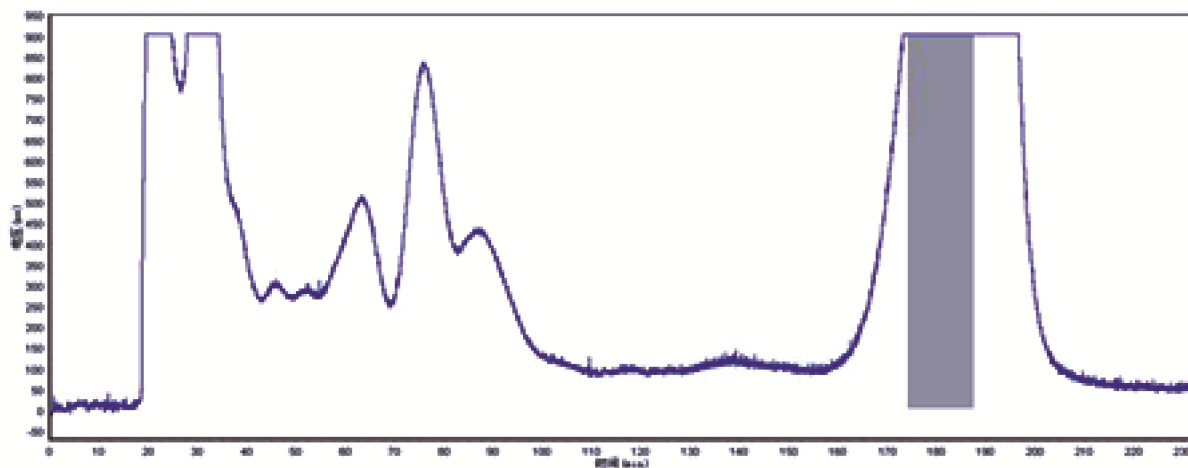


图 3 淫羊藿苷的 HSCCC 色谱图  
Fig.3 HSCCC chromatogram of epimedii glycoside

### 2.3.2 HSCCC 分离纯化葛根素样品<sup>[9]</sup>

#### (1) 液相色谱条件

色谱柱为 Wondasil C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈:水=12:88(V:V), 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃; 运行时间 30 min; 检测波长为 250 nm。进样量 5 μL。

#### (2) HSCCC 条件

HSCCC 溶剂体系为: 正丁醇:乙酸乙酯:水=1:2:3(V:V:V), 进样量 200 mg, 试验操作过程同 2.3.1(2)。

### 2.3.3 HSCCC 分离纯化淫羊藿苷样品<sup>[10]</sup>

#### (1) 液相色谱条件

色谱柱为 Wondasil C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈:水=27:73(V:V), 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃;

运行时间 30 min; 检测波长为 270 nm。进样量 5 μL。

#### (2) HSCCC 条件

HSCCC 溶剂体系为: 氯仿: 甲醇: 水=4:3.5:2(V:V:V), 进样量 300 mg, 检测波长 280 nm, 试验操作过程同 2.3.1(2)。

## 3 结果与分析

### 3.1 纯度分析

红景天苷、葛根素和淫羊藿苷 3 种样品的 HSCCC 色谱图见图 1~3。纯化后红景天苷、葛根素和淫羊藿苷 3 种样品的色谱图见图 4~6, 采用面积归一化法扣除溶剂峰计算, 红景天苷、葛根素和淫羊藿苷 3 种样品的纯度分别为 98.9%、99.8%和 99.5%。

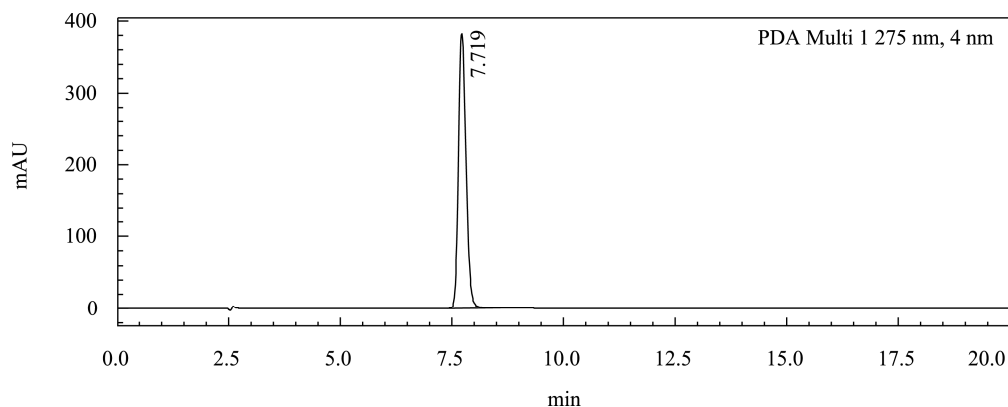


图4 纯化后红景天苷的HPLC色谱图  
Fig. 4 HPLC chromatogram of salidroside after purification

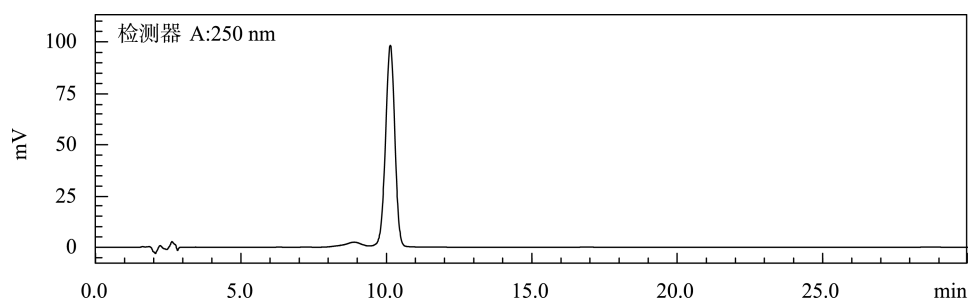


图5 纯化后葛根素的HPLC色谱图  
Fig. 5 HPLC chromatogram of puerarin after purification

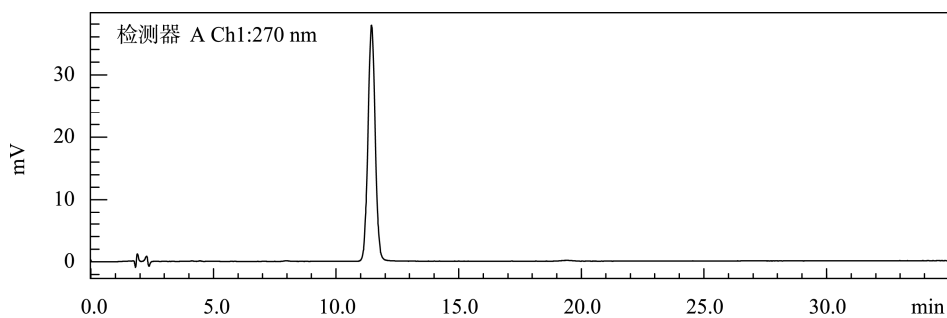


图6 纯化后的淫羊藿苷HPLC色谱图  
Fig. 6 HPLC chromatogram of epimedii glycoside after purification

### 3.2 结构鉴定

采用紫外-可见光谱(ultraviolet spectrum)、红外光谱(infrared spectroscopy, IR)、质谱(mass spectrum, MS)、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)的方法对所制备的样品进行测试,通过对数据分析和归属,确认所制备的样品分别为红景天苷、葛

根素、淫羊藿苷(结果见表1~3)。

对红景天苷、葛根素、淫羊藿苷3种标准样品进行均匀性检验、稳定性考察和不确定度评定,确认了这3种标准样品的均匀性和稳定性均符合GB/T 15000.3-2008<sup>[11]</sup>标准的规定,该标准样品可用于相关成分的测定以及分析仪器校准、分析方法确认与评价、仲裁检测以及相关生产部门和实验室质量控制等。

表 1 红景天苷的  $^{13}\text{C}$ -NMR 数据(氘代溶剂  $\text{CD}_3\text{OD}$ )Table 1  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of solidoside ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

$^{13}\text{C}$	测定值	文献值 <sup>[8]</sup>
1	155.4	156.6
2,6	114.7	116.1
3,5	129.6	130.7
4	129.3	130.9
7	35.0	36.3
8	70.7	71.8
1'	102.9	104.2
2'	73.7	74.0
3'	76.6	75.0
4'	70.2	71.5
5'	76.5	77.8
6'	61.3	62.7

表 2 葛根素的  $^{13}\text{C}$ -NMR 数据  
Table 2  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of puerarin ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

$^{13}\text{C}$	测定值	文献值 <sup>[9]</sup>
2	153.09	152.7
3	123.61	123.1
4	175.47	175.3
5	126.78	126.4
6	115.52	115.0
7	161.58	160.9
8	113.10	112.3
4a	117.35	116.7
8a	156.63	156.1
1'	123.03	122.5
2'	130.51	130.0
3'	115.52	115.0
4'	157.61	156.8
5'	115.52	115.0
6'	130.51	130.0
1''	73.99	73.3
2''	70.94	70.7
3''	79.22	78.4
4''	70.94	70.1
5''	82.17	81.3
6''	61.86	61.1

表 3 淫羊藿苷的  $^{13}\text{C}$ -NMR 测试数据( $\text{CD}_3\text{OD}$ )Table 3  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of epimedium glycoside ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

$^{13}\text{C}$	测定值	文献值
2	153.50	153.0
3	135.14	135.7
4	178.77	178.3
5	159.57	160.5
6	98.62	98.2
7	161.90	161.4
8	108.81	108.4
9	157.78	157.3
10	106.09	105.6
11	21.89	21.1
12	122.62	122.3
13	131.56	131.1
14	25.92	25.4
15	18.32	17.5
1'	122.75	122.2
2'	131.02	130.5
3'	114.56	114.1
4'	161.00	160.5
5'	114.56	114.1
6'	131.02	130.5
1''	102.48	102.0
2''	70.55	70.4
3''	70.82	70.6
4''	70.17	69.7
5''	71.16	70.1
6''	17.92	17.9
1'''	101.06	100.6
2'''	73.58	73.4
3'''	77.10	76.7
4'''	71.61	71.2
5'''	77.68	76.7
6'''	61.14	60.7
-OMe	55.98	55.5

## 4 结 论

目前我国研制的天然产物对照品有几百种, 但通过

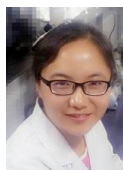
国家审批的有证天然产物标准样品仅有90项,传统分离纯化方式的局限性限制了天然产物标准样品的研制。HSCCC是一种连续高效的液-液分配色谱分离技术,有着许多其他色谱分离方法所不可取代的优点,已在天然产物标准样品的研制中显示出较大的优势。随着pH区带逆流色谱等一些新技术的发展,HSCCC技术会不断得到完善和丰富,其在分离纯化中的应用将得到极大的拓展,从而为天然产物标准样品的研制提供技术支撑。

#### 参考文献

- [1] 杜宁. 我国天然产物标准样品研复制工作组织管理[J]. 现代科学仪器, 2010, 6(3): 140-142.  
Du N. Management of development work for Chinese natural product reference materials [J]. Mod Sci Instrum, 2010, 6(3): 140-142.
- [2] 甘春芳, 韦万兴. 高速逆流色谱技术在天然产物分离中的应用[J]. 应用化工, 2009, 38(10): 1505-1508.  
Gan CF, Wei WX. Application of high-speed counter-current chromatography in natural products separation [J]. Appl Chem Ind, 2009, 38(10): 1505-1508.
- [3] 曹学丽, 王尉. 逆流色谱技术及其在食品领域的应用进展[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2010, 28(3): 6-10.  
Cao XL, Wang W. Counter current chromatography and its application in food separation [J]. J Beijing Technol Bus Univ (Nat Sci Ed), 2010, 28(3): 6-10.
- [4] 刘迪, 陈雪峰. 高速逆流色谱技术应用现状[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 97-100.  
Liu D, Chen XF. Application actuality of high-speed counter-current chromatography(HSCCC) [J]. Food Mach, 2006, 22(2): 97-100.
- [5] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.  
Cao XL. High-speed counter-current chromatography separation technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [6] 张天佑. 高速逆流色谱技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991.  
Zhang TY. High speed counter current chromatography [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1991.
- [7] 欧霞, 潘阳. 高速逆流色谱法在天然药物研究中的应用概况[J]. 中草药, 2014, 3(12): 246-248.  
Ou X, Pan Y. Application of HSCCC in research of natural medicine [J]. Central South Pharm, 2014, 3(12): 246-248.
- [8] 王曙, 王锋鹏. 大红花红景天化学成分的研究[J]. 药学学报, 1992, 27(2): 117-120.  
Wang S, Wang FP. The chemical research of *Rhodiola rosea* [J]. Acta Pharm Sin, 1992, 27(2): 117-120.
- [9] Kinji JE. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35: 4846-4850.
- [10] Mizuno M. Flavonol glycosides from *Epimedium sagittatum* [J]. Phytochemistry, 1988, 27(11): 3641-3643.
- [11] GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3)标准样品 定值的一般原则和统计方法 [S].  
GB/T 15000.3-2008 Working guideline standard of standard sample (3) standard sample general principles of fixed value and statistical methods [S]

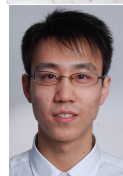
(责任编辑: 姚 菲)

#### 作者简介



徐双双, 硕士, 主要研究方向为天然产物分离纯化。

E-mail: 316533886@qq.com



王尉, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为天然产物分离纯化。

E-mail: wangwei\_1217@126.com