

# 高速逆流法分离纯化五味子中的五味子酚

王 磊<sup>1</sup> 魏 芸<sup>2</sup> 袁其朋<sup>1\*</sup>

(北京化工大学: 1. 生命科学与技术学院; 2. 理学院, 北京 100029)

**摘 要:** 95% 乙醇提取五味子种子的粗提物, 经过硅胶分离后的 1 g 粗品用高速逆流色谱首次分离得到 122 mg 纯度为 99.9% 的五味子酚, 结构经 ESI-MS, MS/MS 鉴定。同时分离得到 86 mg 纯度为 98% 的五味子甲素、93 mg 纯度为 97% 的五味子乙素和 114 mg 纯度为 99% 的五味子酯甲。两相溶剂系统确定为正己烷-甲醇-水(体积比为 7:6:1)的三元溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 转速为 800 r/min, 流速为 2.0 mL/min。

**关键词:** 逆流色谱; 五味子; 五味子酚

**中图分类号:** O61

## 引 言

五味子(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill) 为传统中药材, 应用历史悠久。五味子中有多种活性物质, 有实验表明<sup>[1]</sup>五味子酚(Schisanhenol)对大鼠离体心脏具有保护作用。五味子酚发挥心肌保护作用的机制可能为: 五味子酚能抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生而保护细胞膜系统免受氧自由基损害<sup>[2]</sup>, 但是具体的作用机制到目前还没有确定。随着对五味子酚药理作用研究的深入, 迫切需要大量高纯度五味子酚。

高速逆流色谱(HSCCC)是一种基于液液分配的新型色谱技术, 可以在短时间内实现高效分离和制备, 并且可以达到几千个理论塔板数<sup>[3]</sup>。与高效液相色谱不同的是, 它不使用固相载体作固定相, 克服了固相载体带来的样品吸附、损失、污染和峰形拖尾等缺点<sup>[4]</sup>。鉴于 HSCCC 的显著特点, 此项技术已被应用于生化、生物工程、医药、天然产物化学、有机合成、环境分析、食品、地质、材料等领域<sup>[5]</sup>。但至今还未见用逆流色谱分离五味子酚的报道。

本文用五味子种子作原料, 利用硅胶层析和逆流色谱联用的技术分离纯化五味子中的木脂素单体成分。相比于前人<sup>[6-9]</sup>用逆流色谱分离五味子一次分离 2 种有效物质, 第一次经一次逆流色谱得到了

五味子酚等 4 种活性木脂素成分。实验取得了满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 实验原料和仪器

#### 1.1.1 原料

辽宁产五味子(鉴定为北五味子); 95% 乙醇、正己烷、甲醇均为化学纯, 北京市化学试剂公司; 色谱纯甲醇, 美国 Dima 公司; 五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲和北五味子粗提物对照品(中国药品生物制品检定所)。200~300 目硅胶, 青岛海洋化工厂。

#### 1.1.2 仪器

高速逆流色谱系统: 多层螺旋管行星式离心分离仪(GS10A)、8823-UV 紫外检测仪、S-1007 型数控往复塞计量泵, 北京新技术应用研究所; YOK-GAWA057 型记录仪, 四川仪表厂; 进样器, 天津高科技公司。半制备型 HSCCC 半径 1.6 mm, 柱长 90 m, 柱体积 250 mL。

LC-20AVP 系列高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; 质谱仪, AV600, 德国 Bruker 公司; 超声波清洗器, KQ-100DE, 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 五味子木脂素粗品的制备

取五味子乙醇超声提取浓缩浸膏 100 g(约含总木脂素类成分 10%), 用氯仿溶解, 滤除不溶物, 加入 5% 碳酸钠溶液萃取 1 次, 用水洗涤氯仿层 2 次, 氯仿层经无水硫酸钠脱水, 回收氯仿得膏状物。将此膏状物用石油醚溶解, 上硅胶柱层析, 用石油醚-丙酮(体积比 10:1)40 mL/min 洗脱, 收集洗脱液,

收稿日期: 2008-05-07

第一作者: 男, 1981 年生, 硕士生

\* 通讯联系人

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

旋蒸脱除溶剂可得木脂素粗品 2.418 g。

### 1.3 高速逆流色谱分离

本文所用溶剂系统为正己烷-甲醇-水(体积比为 7:6:1),三种溶剂按比例配置于分液漏斗中,充分振荡后静置,待平衡后分别得到上下两相,上相作固定相,下相作流动相。

称取 1 g 样品充分溶解于上相 5 mL 和下相 6 mL 的混合液,得到逆流色谱分离样品。

将固定相快速注满管柱。按 800 r/min 正转速启动主机。以 2.0 mL/min 的流速将流动相泵入。当主机出口流出流动相并且固定相体积不再变化时,表明整个体系建立动态平衡。测得固定相的保留率为 48.5%。由进样阀(20 mL)进样,紫外检测器设置波长 254 nm。根据紫外吸收谱图手动收集各馏分。记录仪灵敏度范围 1 A,量程 100 mV,纸速 2 cm/h。收集到的各馏分用旋转蒸发器蒸干。待测。

### 1.4 液相色谱和质谱条件

液相条件:反相 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Diamosil<sup>TM</sup>);流动相为甲醇与水的混合液,体积比 75:25;8823-UV 紫外检测仪,检测波长 254 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 35℃;进样量 10 μL。

质谱条件:电离方式,电喷雾电离源(ESI+);毛细管电压 3.5 kV,锥孔电压 30 V,二级锥孔电压 5 V,6 极杆透镜电压 0.5 V,电离源温度 110℃。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶剂系统的选择

高速逆流色谱法的应用中,最关键和最难解决的问题是溶剂系统的选择。不同的溶剂系统具有不同的上下相之比,并且黏度、极性及密度等差异均会对相同的成分产生不同的溶解分配能力,形成分配系数的差异,对分离效果产生显著的影响。根据文献和溶剂选择软件给出的溶剂系统信息,选择了下列几种不同的体积比配制的溶剂系统(20℃),取五味子酯甲标准品溶于各体系中,并用高效液相法测定相应的分配系数  $K$ ,结果见表 1。从表 1 可知正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比 22:8:20:20)和正己烷-甲醇-水(体积比 35:30:5)在理论上是可行的,其  $K$  值在 0.5~2 之间。在接下来的试验中我们发现,只有后者的分离情况比较理想。经过调整,正己烷-甲醇-水(体积比 7:6:1)作为溶剂系统最为理想。固定相保留率为 48.5%。从高速逆流色谱图(图 1)

中看出,在 4 h 中分离出 9 个峰,对应收集到 9 个馏分。

表 1 五味子酯甲在不同溶剂系统下的分配系数

Table 1 The  $K$  values for Schisantherin A in different two-phase systems

溶剂系统	体积比	$K$
乙酸乙酯-甲醇-水	10:1:10	11.7
正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	22:8:20:20	1.35
正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	10:9:9:10	2.8
正己烷-甲醇-水	50:10:40	58
正己烷-甲醇-水	50:25:25	26
正己烷-甲醇-水	50:30:20	14
正己烷-甲醇-水	50:40:10	5.8
正己烷-甲醇-水	50:50:1	0.015
正己烷-甲醇-水	35:30:5	0.12

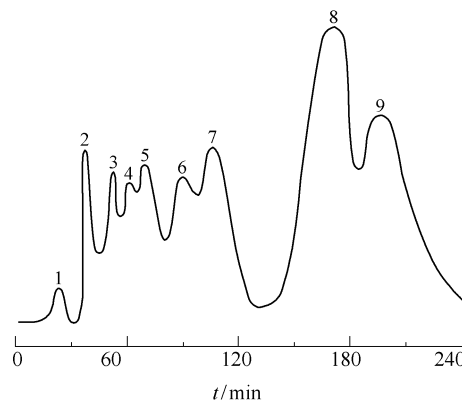


图 1 五味子提取物的高速逆流色谱图

Fig. 1 HSCCC chromatogram of the crude extract of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill

### 2.2 分离物的鉴定

对五味子木脂素粗品和各馏分用 HPLC 检测如图 2 所示。用峰面积归一法确定馏分 4,5,8 和 9 号峰纯度较高,分别为 98%,97%,99.9% 和 99%。与标准品(图 2b:1 号峰为五味子酯甲,2 号峰为五味子甲素,3 号峰为五味子乙素)保留时间对照,并做质谱与文献[7]比对。得出馏分 4 为白色粉末 86 mg,高效液相(图 2c)保留时间 20.34 min,MS  $m/z$ : 417.5( $M^+$ ),为五味子甲素。馏分 5 为白色晶体 93 mg,高效液相(图 2d)保留时间 34.36 min,MS  $m/z$ : 401.6( $M^+$ ),为五味子乙素。馏分 9 是淡黄色粉末 114 mg,高效液相(图 2f)相保留时间 12.63 min,MS  $m/z$ : 576.6( $M^+$ ),为五味子酯甲。

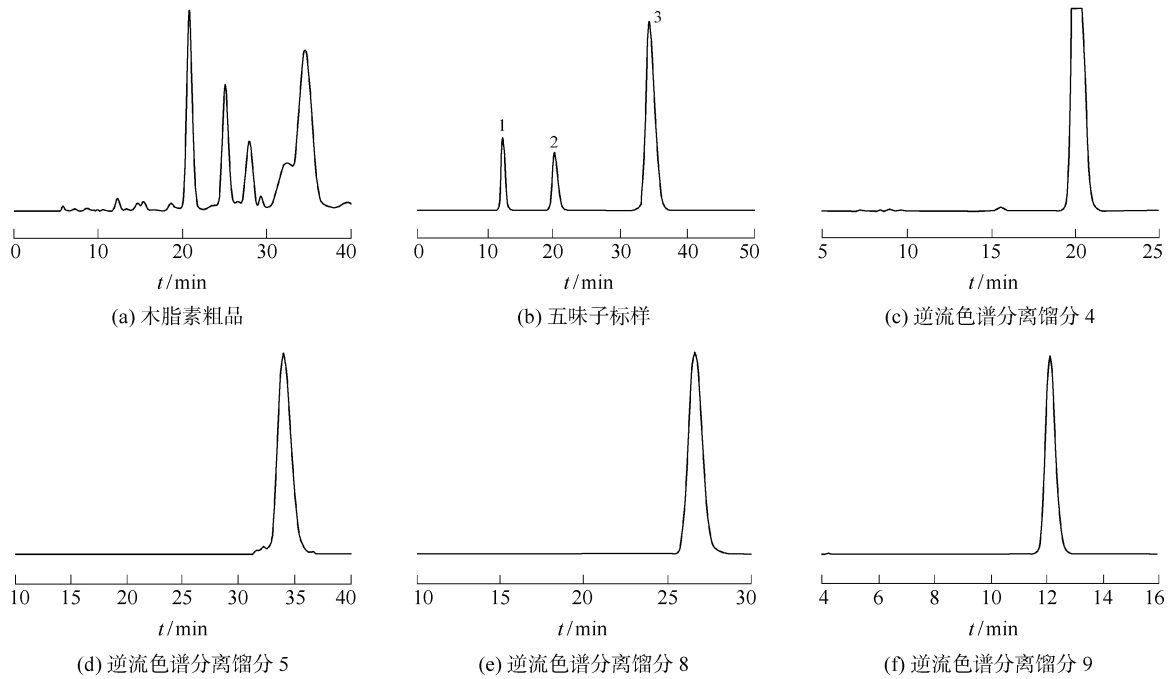


图 2 五味子 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill

馏分 8 为白色粉末 122 mg, 高效液相(图 2e)保留时间 26.62 min, MS  $m/z$ : 402.9( $M^+$ ), 由于没有标准品对照, 我们用串联质谱(MS/MS)对其进行

分析。对此物质峰进行质谱分析如图 3 所示, 推导其裂解过程如图 4 所示, 各个离子峰能够完全对应, 可以确定为五味子酚。

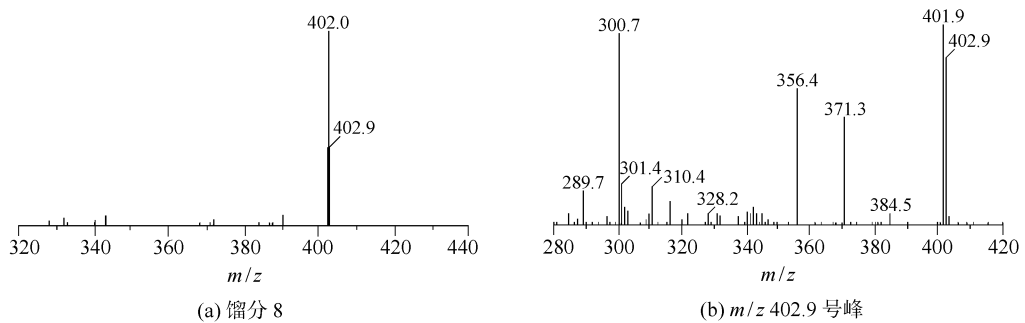


图 3 逆流色谱 8 号峰串联质谱图

Fig.3 ESI-MS<sup>2</sup> spectra of Schisanhenol

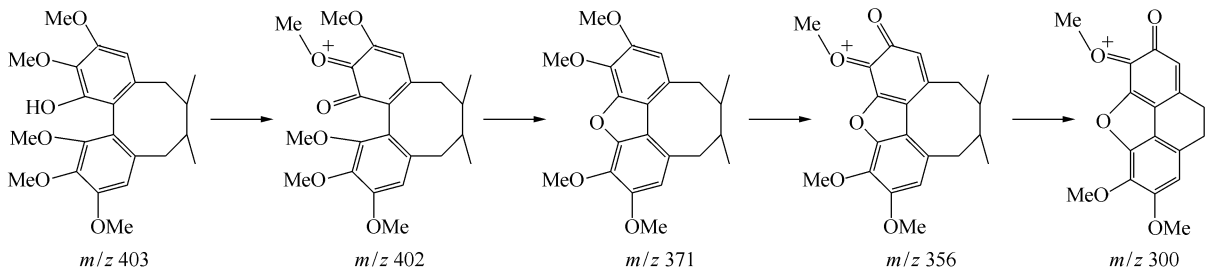


图 4 五味子酚的裂解过程

Fig.4 The cracking process of Schisanhenol

Peng<sup>[7]</sup>利用高速逆流色谱法, 从五味子中分离 五味子醇甲及戈米辛 A 溶剂体系为正己烷-乙酸乙

酯-甲醇-水(体积比为 1:0.9:0.9:1)。Huang<sup>[8-9]</sup>则利用高速逆流色谱分离纯化以石油醚为溶剂微波萃取的五味子中的五味子丙素、五味子酯;溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 22:8:20:20)。而以溶剂体系为正己烷-甲醇-水(体积比为 35:30:3),对五味子中的脱氧五味子素及五味子乙素的分离纯化。

本文经 1 次分离得到多达 4 种高纯度化合物也得益于先期用乙醇提取保留了大部分活性化合物,并经过硅胶分离得到了木脂素粗品。

### 3 结论

逆流色谱法能有效分离中草药活性物质。首次用正己烷-甲醇-水(体积比 7:6:1)三元溶剂系统在 4 h 内分离得到 122 mg 纯度为 99.9% 的五味子酚。同时分离得到了 86 mg 纯度为 98% 的五味子甲素、93 mg 纯度为 97% 的五味子乙素、114 mg 纯度为 99% 五味子酯甲。

#### 参考文献:

- [1] 李莉,刘耕陶. 五味子酚对氧自由基引起大鼠脑突触体和线粒体损伤的保护作用[J]. 药学学报, 1998, 33(2): 81-86.
- [2] 陈淑珍,付阳平. 五味子酚对大鼠中性粒细胞呼吸爆发的影响[J]. 药理学报, 2000, 35(8): 571-575
- [3] 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): 586-591.

- [4] 陆向红,王定海,计建炳. 高速逆流色谱分离茶叶中咖啡因和茶碱[J]. 中草药, 2005, 36(10): 1492-1494.
- [5] 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]. 药物分析杂志, 1998, 18(1): 60-64.
- [6] He X G, Lian L Z, Lin L Z. Analysis of lignan constituents from *Schisandra chinensis* by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 1997, 757(1/2): 81-87.
- [7] Peng J Y, Fan G R, Qu L P, et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for isolation and separation of schizandrin and gomisin A from *Schisandra chinensis* [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1082(2): 203-207.
- [8] Huang T H, Shen Y J, Shen P N. Preparative separation and purification of schisandrin and schisantherin from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005, 28(15): 2383-2390.
- [9] Huang T H, Shen P N, Shen Y J. Preparative separation and purification of deoxyschisandrin and  $\gamma$ -schisandrin from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1066(1/2): 239-242.

## Preparative separation of Schisanhenol from *Schisandra chinensis* by high-speed countercurrent chromatography

WANG Lei<sup>1</sup> WEI Yun<sup>2</sup> YUAN QiPeng<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology; 2. School of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Following an initial purification step on silica gel, preparative high speed countercurrent chromatography (HSCCC) with a two-phase solvent system composed of n-hexane-methanol-water (volume fraction 7:6:1) was used to isolate and separate first schisanhenol and then deoxyschisandrin,  $\gamma$ -Schisandrin and schisantherin A from *Schisandra chinensis* with the upper organic phase system as the stationary phase and the lower phase system as the mobile phase. Yields of 122 mg Schisanhenol, 86 mg deoxyschisandrin, 93 mg  $\gamma$ -Schisandrin, and 114 mg Schisantherin A were obtained.

**Key words:** countercurrent chromatography; *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill; Schisanhenol