

牡丹丹皮提取物的纯化研究

成玉梅¹, 康业斌^{2,3}, 商鸿生², 董苗菊⁴

(1 河南科技大学 化工与制药学院, 河南 洛阳 471003; 2 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨陵 712100;
3 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003; 4 洛阳市国花园, 河南 洛阳 471001)

摘要:为了研究牡丹根皮提取物的纯化方法与纯化效果, 试验以水蒸气蒸馏法获得的丹皮提取物为样品, 用两相溶剂萃取法与酸碱分离法相结合对其纯化重结晶; 用薄层层析法与紫外分光光度法和气相色谱质谱法相结合对纯化物进行分析; 用气相色谱质谱法测定纯化物的含量。结果表明, 两相溶剂萃取法与酸碱分离法相结合使样品中丹皮酚的纯度达到 93%, 然后用重结晶法, 使丹皮酚的纯度由 93% 提高到 98.5%。用薄层层析法进行定性分析, 纯化物和标准品的 R_f 值相同, 说明两者分子量相同。用紫外分光光度法、气相色谱质谱法对纯化物和标准品在波长 200~400 nm 之间扫描, 结果在 211.80 nm 和 274.20 nm 处有共同的最大吸收峰, 说明两者具有相同组分。用气相色谱质谱法测定粗提物丹皮酚的含量为 87.7%、纯化物(I)、(II)丹皮酚的含量分别为 93.0%、98.5%。结果证明此纯化工艺简单, 纯化效果好。

关键词:牡丹; 丹皮; 提取物; 纯化; 测定

中图分类号: S685.110.099

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2008)01-0154-04

Purification of Paeonol from Extracts Cortex Moutan

CHENG Yu-mei¹, KANG Ye-bin^{2,3}, SHANG Hong-sheng², DONG Miao-ju⁴

(1. Chemical Engineering & Pharmaceutics College, He'nan University of Science and Technology, Luoyang He'nan 471003, China;
2. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 3. College of Forestry, He'nan University of Science & Technology, Luoyang He'nan 471003, China; 4. National Garden of Luoyang, He'nan 471001, China)

Abstract: Methods of extraction and purification of paeonol from the extracts of cortex moutan were studied. CC-MS was used to measure the content of paeonol in the extract. It was found that with the combination of solvent extraction and acid and base isolation methods, the extracts with a paeonol content of 87.7% could be purified to 93%, which would be further purified by recrystallization method with a purity of 98.5%. The purified paeonol had the same R_f value with authentic sample in the thin layer chromatographic test. Paeonol obtained and authentic sample exhibited same UV absorption in 211.80 nm and 274.20 nm.

Key words: moutan; cortex moutan; extract; purification

近年来, 国内学者对牡丹根皮中丹皮酚的提取、含量测定等进行了一些研究。本文在总结前人各种提取、测定方法^[1~8]优缺点的基础上, 笔者运用两相溶剂萃取法、酸碱分离法与重结晶法^[9,10]相结合, 使牡丹根皮提取物中丹皮酚得到分离纯化; 用薄层层析法^[11]、紫外分光光度法及气相色谱质谱法^[11~15]对纯化效果进行了测定分析, 为进一步研究牡丹丹皮酚的活性提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牡丹根皮提取物(水蒸气蒸馏法获得^[16], 供纯化用); 99.9%丹皮酚晶体(安徽宣城市百草植物工贸有限公司)。

1.2 仪器与试剂

岛津 UV-2100 紫外可见分光光度计(日本岛津

收稿日期: 2007-03-22 修回日期: 2007-07-27

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0411030200)

作者简介: 成玉梅(1964-), 女, 河南孟州人, 高级实验师, 主要从事农产品分析测试研究。

通讯作者: 康业斌(1964-), 男, 河南唐河人, 教授, 博士, 主要从事植物免疫学研究。E-mail: kangyb@mail.haust.edu.cn

有限公司);6890/5973H 气相色谱质谱仪(美国安捷伦科技有限公司);微量进样器(上海医用激光仪器厂);UV-8 型三用紫外分析仪(无锡科达仪器厂);薄层层析硅胶板 HSGF254(烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂)。无水乙醇、乙醚、二氯甲烷、氯仿、正己烷、碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钠均为分析纯。去离子水(电导率小于 $1 \mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的纯化 称取牡丹根皮提取物 1 g,溶于 20 mL 乙醚中,转入分液漏斗,加入 10 mL 5% Na_2CO_3 反复振摇,静置,分出下层液 Na_2CO_3 相,如此萃取 2 次。然后向漏斗中乙醚相加入 10 mL 5% NaOH ,反复振摇,静置,分出下层液 5% NaOH 相,如此萃取 2 次;合并分出的 5% NaOH 相,加 1 mol HCl 25 mL 酸化,过滤,得浅黄色晶体(纯化物 I),加入无水乙醇重结晶,析出白色柱状晶体,过滤,得

柱状纯丹皮酚(纯化物 II);滤液加入 3 倍量水,变白色浑浊液,放入冰箱,在 4°C 条件下冷藏 24 h,析出针状、羽状晶体,过滤,得针状、羽状丹皮酚晶体(纯化物 II),其分离、纯化工艺流程如下。

1.3.2 纯化物的检测分析 薄层层析鉴定:取经 1.3.1 纯化获得的纯化物 II (精品丹皮酚)和标准品各 5 mg,分别置于小试管中,各加氯仿 5 mL 溶解。用微量进样器各吸取 $5 \mu\text{L}$,点于 $5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 的 HSGF254 硅胶板的点样线上,斑点直径小于 3 mm,竖直放入盛有展开溶剂的密闭玻璃缸中,待溶剂上行约 10 cm 处时取出,迅速用铅笔划出溶剂的前沿,待溶剂挥发干后,放到三用紫外仪 253.6 nm 波长下观察,在显示不同颜色的斑点位置,用铅笔轻轻标记,测量并计算物质所移动的距离与溶剂前沿所移动的距离的比值(即 R_f 值)。

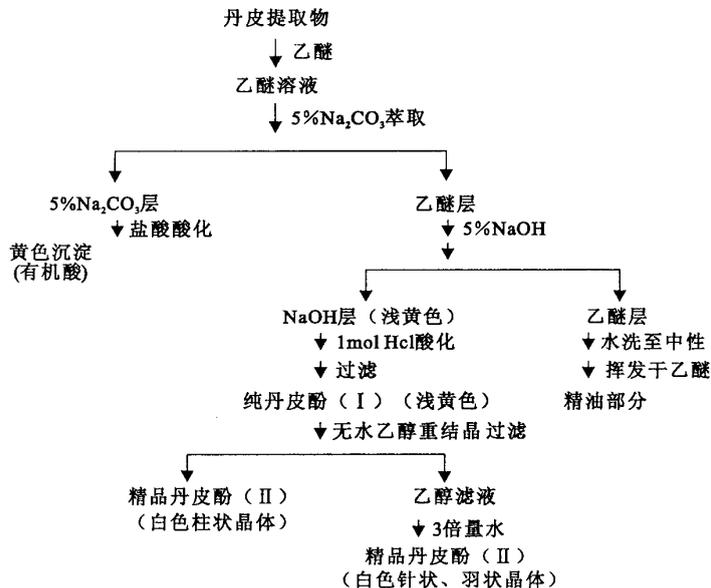


图 1 丹皮酚的纯化工艺流程图

Fig. 1 Flowchart of purification for paeonol

展开溶剂预选:以二氯甲烷为基本展开剂,加入不同比例的极性、非极性溶剂,配比为:①正己烷:氯仿:乙醇(7:3:1);②正己烷:二氯甲烷(4:1);③二氯甲烷(连续展开两次);④正己烷:二氯甲烷:乙醇(8:2:1);⑤正己烷:氯仿:乙醇(8:2:1)。根据展开的结果选择展开溶剂,以鉴定提取物组分。

紫外分光光度法鉴定:仪器工作条件为狭缝宽度 5.0,测定波长间隔 0.2 nm,扫描速度为快速。

取经 1.3.1 纯化获得的纯化物 II (精品丹皮酚) 5 mg,加无水乙醇溶解,并定容至 50 mL,再稀释成

含量为 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液,同时配制标准品含量为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液,用紫外可见分光光度计在波长 200~400 nm 之间扫描,观察其吸收图谱。

气相色谱质谱法鉴定:色谱质谱工作条件为色谱柱:HP-5MS($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$)弹性石英毛细管柱,柱流量 $0.8 \text{ mL}/\text{min}$;柱温:初温 80°C ,以 $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温到 250°C ;载气:高纯氮气;进样口温度 260°C ;进样方式:不分流;GC/MS 接口温度 260°C ,EI 源(70eV),离子源 230°C ,四极杆温度 150°C ,EM 电压 1 294 V,扫描范围 33~380 amu。

取经 1.3.1 纯化获得的纯化物 I (精品丹皮酚) 和对照品各 50 mg, 加无水乙醇溶解、定容 50 mL, 进样量 5 μ L, 观察其图谱变化。

1.3.3 纯化物中丹皮酚含量的测定 纯化物的含量测定的工作条件同气相色谱质谱法。

标准曲线的制作: 准确称取对照品丹皮酚 50 mg, 用无水乙醇定容 50 mL, 并配制成 0, 10, 25, 100, 250 μ g \cdot mL⁻¹ 的标准溶液。用上述色谱质谱工作条件进样分析, 每样两次, 每次 1 μ L, 以丹皮酚峰面积对浓度线性回归, 得标准工作曲线。

$$Y = 44.1171X - 1.9999, \quad r = 1.0000$$

样品分析: 精密称取丹皮酚提取物、纯化物 (I) (I) 各 50 mg, 用无水乙醇溶解并定容 50 mL, 进样测定, 每样两次, 根据标准曲线计算牡丹酚的含量。

2 结果分析

2.1 丹皮酚的纯化

用水蒸气蒸馏法获得的丹皮酚粗品, 多为灰白色粉状物, 混杂有少量浅黄色块状物, 丹皮酚的含量为 87.7%。经分离纯化, 纯化物 (I) 大部分为淡黄色晶体, 少量为长约 1~3 mm 的针状晶体, 丹皮酚的含量为 93.0%, 提高了 5.3%。纯化物 (I) 经无水乙醇重结晶, 析出长 0.5~1 mm、白色、四棱柱状晶体纯化物 (II); 经无水乙醇: 水 (1: 3) 重结晶, 析出长 1~3 mm、白色、针状或羽状晶体纯化物 (II); 纯化物 (II) 的丹皮酚含量为 98.5%, 提高了 10.8%。

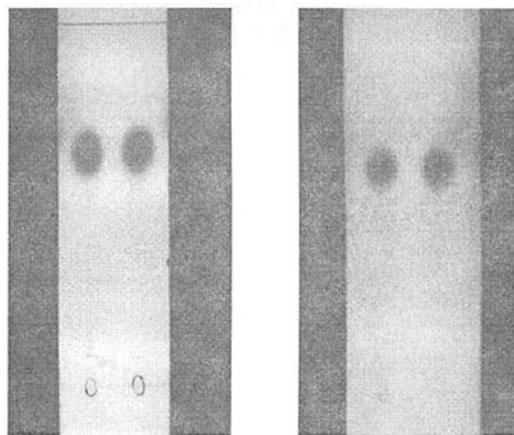
2.2 纯化物的检测

2.2.1 纯化物的薄层层析 从表 1 中可看出, 第一种展开剂 R_f 值大于 0.85, 极性太强; 第二种展开剂 R_f 值小于 0.05, 极性太弱; 均不适合作鉴定组分的展开剂。后 3 种展开剂极性适中, 适合作鉴定组分的

展开剂。本试验选择正己烷: 二氯甲烷: 乙醇 (8: 2: 1) 和正己烷: 氯仿: 乙醇 (8: 2: 1) 为展开剂。

从图 2(1) 可看出, 纯化物 (I) 和标准品均只有一个移动斑点。展开溶剂为正己烷: 二氯甲烷: 乙醇 (8: 2: 1) 时, 溶剂的前沿所移动的距离为 9.10 cm, 标准品所移动的距离为 5.85 cm, 纯化物 (I) 所移动的距离为 5.85 cm, 标准品 $R_{f\text{标}} = 0.64$, 样 $R_{f\text{试}} = 0.64$ 。

从图 2(2) 可以看出, 展开溶剂为正己烷: 氯仿: 乙醇 (8: 2: 1) 时, 溶剂的前沿所移动的距离为 8.35 cm, 标准品所移动的距离为 5.55 cm, 纯化物 (I) 所移动的距离为 5.60 cm, 标准品 $R_{f\text{标}} = 0.67$, 纯化物 $R_{f\text{试}} = 0.67$ 。说明经纯化获得的精品丹皮酚和标准品丹皮酚分子量相同, 且本品具有高纯度。



(1) 正己烷: 二氯甲烷: 乙醇 (8: 2: 1)

(2) 正己烷: 氯仿: 乙醇 (8: 2: 1)

图 2 纯化物的薄层层析结果

Fig. 2 Thin layer chromatography results of purified samples by different expended solvent system

表 1 不同展开剂对纯化物的薄层层析结果

Table 1 Thin layer chromatography results of purified samples by different expended solvent system

展开剂	纯化样品			标准品		
	物质移动距离/cm	溶剂前沿移动距离/cm	R_f 值	物质移动距离/cm	溶剂前沿移动距离/cm	R_f 值
正己烷: 氯仿: 乙醇 (7: 3: 1)	9.5	10.0	9.5	9.5	10.0	9.5
正己烷: 二氯甲烷 (4: 1)	0	5.3	0	0	5.3	0
二氯甲烷 (展开两次)	5.5	11.0	0.5	5.5	11.0	0.50
正己烷: 二氯甲烷: 乙醇 (8: 2: 1)	3.5	5.5	0.64	3.5	5.5	0.64
正己烷: 氯仿: 乙醇 (8: 2: 1)	3.3	5.6	0.67	3.3	5.6	0.67

2.2.2 纯化物的紫外分光光度法分析 纯化物 (I) 和标准品在波长 200~400 nm 之间扫描, 在 211.80 nm 和 274.20 nm 处有共同的吸收峰, 与《中国药典》记载的丹皮酚在 211 \pm 1 nm、274 \pm 1 nm 的波长处有最大吸收的光谱图相同 (图 3), 说明

经纯化获得的精品丹皮酚和标准品丹皮酚具有相同组分。

从图 4、图 5 可看出, 纯化物 (I) 峰值比标准品峰值略低, 无明显的杂质峰, 说明经纯化获得的精品丹皮酚和标准品主要组分相同, 且纯度高。

2.3 纯化物中丹皮酚的含量

经气质色谱测定,粗提物中丹皮酚的含量为 87.7%、纯化提取物(I)、(II)中丹皮酚的含量分别为 93.0%、98.5%。

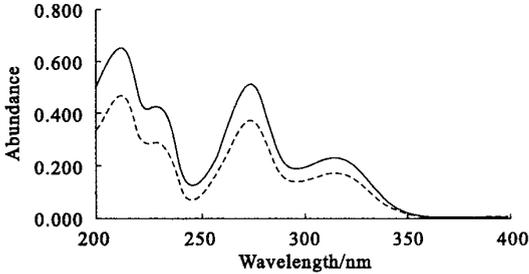


图 3 纯化物和标准品丹皮酚的紫外光谱结果

Fig.3 UV-spectrogram result of paeonol in purified samples and standard sample

2.2.3 纯化物的气相色谱质谱法分析

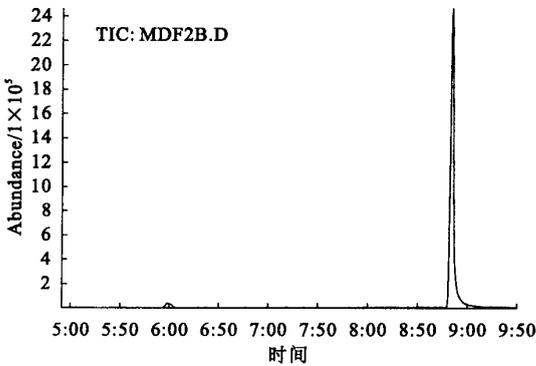


图 4 标准品丹皮酚的气相色谱质谱结果

Fig.4 Chromatogram mass spectrum result of standard sample

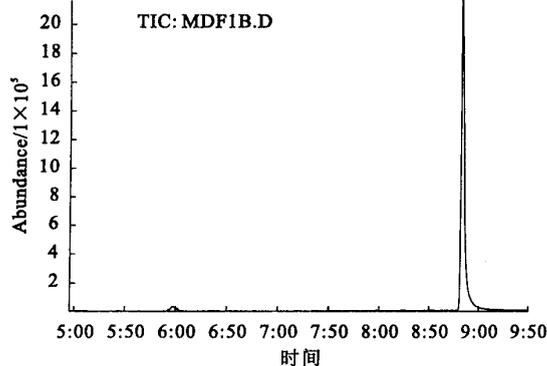


图 5 纯化物的气相色谱质谱结果

Fig.4 Chromatogram mass spectrum result of purified sample

3 结论与讨论

本试验以水蒸气蒸馏法获得的丹皮提取物为样品,研究丹皮酚的纯化方法与纯化效果。结果表明,用两相溶剂萃取法与酸碱分离法相结合,使丹皮酚的纯度达到 93%,然后用重结晶法,使丹皮酚的纯

度由提高到 98.5%。试验结果证明,结晶重结晶过程是丹皮酚高度纯化的重要步骤,选择合适溶剂是关键,选择的溶剂最好是在冷时对所需要的成分溶解度较小,而热时溶解度较大。

文献报道对植物提取物分离纯化的方法有两相溶剂萃取法、结晶重结晶法、吸附层析法、沉淀法、酸碱分离法、离子交换法等多种,一般常用甲醇、丙酮、氯仿、乙醇、乙酸乙酯等作为溶剂^[17]。本试验选择的溶剂是价廉、无毒的无水乙醇,在 45℃时对丹皮酚溶解度增大,冷时对丹皮酚溶解度降低,依此进行重结晶。溶剂的用量、降温速度是影响晶体形状的重要因素。溶液浓度高,降温快,析出晶体速度快,晶粒小;溶液浓度适宜,慢慢降温,析出高纯度柱状、针状或羽状晶体。

薄层层析法^[11]是快速分离和定性分析少量样品的一种重要方法,是一种固、液分离技术,其 R_f 值范围在 $0.05 < R_f < 0.85$ 之间为宜;对多组分样品能否获得满意的分离,取决于展开剂的选择;试验证明展开剂极性太强或太弱,多组分样品均得不到分离。本试验展开剂的选择是从中等极性溶剂二氯甲烷、氯仿开始,经掺进各种不同比例的极性或非极性溶剂,通过预选试验筛选而定,获得了较为满意的分离效果,可以在试验与生产中推广应用。

参考文献:

- [1] 范明,邱燕,范榕. 不同产地牡丹皮中丹皮酚含量测定[J]. 福建中医药,1999,30(4):41.
- [2] 李海燕,陈小坚. 牡丹中不同部位丹皮酚含量测定[J]. 时珍国医国药,2000,11(8):681.
- [3] 范俊安,于超,王继生,等. 重庆垫江牡丹皮丹皮酚含量动态变化研究[J]. 中国药房,2006,17(5):394-396.
- [4] 李海燕,陈小坚. 牡丹皮中丹皮酚含量动态变化研究[J]. 时珍国医国药,2000,11(3):197-198.
- [5] 周海梅,李克君,郭巧霞,等. UV 测定丹皮中丹皮酚[J]. 中草药,1995,26(6):325.
- [6] 杨树声,宋平顺,罗兴平,等. 紫牡丹各部位中丹皮酚和芍药苷的含量分析[J]. 西北药学杂志,2001,16(3): 108-109.
- [7] 仲英,唐文照,王菊,等. 薄层扫描法测定牡丹皮中丹皮酚含量[J]. 时珍国医国药,1998,9(4):317.
- [8] 汪显阳,汪新. 差示光谱法测定六味地黄丸中丹皮酚的含量[J]. 中国医院药学杂志,1998,18(7): 317-319.
- [9] Rios J L, Recio M C, Villas A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity; A review of the literature [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1988, 23: 127-149.
- [10] Miyazawa M, Shimamura H, Nakamura S, et al. Antimutagenic activity of (+)- β -eudesmol and paeonol from *Dioscorea japonica* [J]. J. Agric. Food Chem. 1996,44,1647-1650.

致病菌未检出。

4 结论

提出了以柿果浆为原料,在只接种酵母菌条件下,采用同步发酵法酿制柿醋新工艺的工艺参数:柿果浆加水量为30%,发酵温度32℃,酵母菌接种量为0.1%,发酵周期为7d,每天搅拌3次。

采用本工艺生产的柿醋酸味柔和,具有柿果清香,符合果醋质量标准。因此,本工艺技术可用于生产实际,进行柿醋加工。

此工艺技术比较简单,容易操作,加工周期短,投资少,为柿醋工厂化生产提供了理论和技术依据。

参考文献

- [1] 王军. 牛心柿、橘蜜柿清汁的加工工艺研究[D]. 陕西师范大学攻读硕士学位毕业论文,2005.
- [2] 李世秀. 新型保健饮料——果醋的酿造技术[J]. 中国调味品,2001(1):3-6.
- [3] 刘月梅,白卫东,鲁周民,等. 我国柿子加工研究进展[J]. 西北林学院学报,2007,22(2):152-155.
- [4] 顾立众. 发酵食品工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997.
- [5] 赵德安. 论传统发酵调味品生产工艺[J]. 中国调味品,2003(9):3-8.
- [6] 高云超,李秀珍,孙霞,等. 磨盘柿天然发酵制醋的真菌区系鉴定和毒素分析[J]. 生态科学,2000,19(4):39-43.
- [7] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.
- [8] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000:145-148.
- [9] 靳敏,夏玉宇. 食品检验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [10] 蒋红军. 醋酸高产菌株的选育及代谢控制发酵的研究[J]. 中国酿造,2005(1):25-27.
- [11] 左殿清,李安定. 食醋生产方法的探讨[J]. 中国调味品,1999(12):4-8.
- [11] Homans A L, Fuchs A. Direct bioautography on thinlayer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances[J]. Journal of chromatography, 1970, 51(1): 327-329.
- [12] Miyazawa M, Maruyama H, Kameoka H. Essential oil constituents of "Moudan radices cortex" *Paeonia moutan* SIMS. (= *P. suffruticosa* Andrews) [J]. Agric. Biol. Chem. 1983, 47(12):2925-2927.
- [13] Miyazawa M, Maruyama H, Kameoka H. Essential oil constituents of "paeoniae radix" *Paeonia lactiflora* Pall. (*P. albiflora* Pall.) [J]. Agric. Biol. Chem. 1984, 48(11): 2847-2879.
- [14] Fukuhara Y, Yoshida D. Paeonol: Abio-antimutagen isolated from a crude drug moutan cortex[J]. Agric. Biol. Chem. 1987, 51(5): 1441-1442.
- [15] Cao X, Tian Y, Zhang T Y, et al. Semi-preparative Separation and Purification of taxolanalogs by High-speed counter-current chromatography [J]. Prep Biochem Biotechnol. 1998, 28(1): 79-87.
- [16] 康业斌,商鸿生,成玉梅. 水蒸汽蒸馏法提取丹皮酚工艺的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(11): 133-135.
- [17] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:人民卫生出版社,1978. 112-113.

(上接第157页)