

# 桂枝化学成分系统化色谱分离方法研究

王西宁<sup>1</sup>, 朱靖博<sup>1,2</sup>, 丁燕<sup>1,2</sup>, 寇自农<sup>2</sup>, 王振中<sup>3</sup>, 萧伟<sup>3</sup>

(1. 大连工业大学 食品学院, 辽宁 大连 116034; 2. 大连工业大学 植物资源化学与应用研究所, 辽宁 大连 116034;

3. 江苏康缘药业有限公司, 江苏 连云港 222001)

**摘要:**以中药桂枝为试材, 采用 TLC 和 HPLC 分析法对桂枝化学成分系统性色谱分离的样品前处理、色谱分离条件和制备色谱参数进行了系统研究。在台阶梯度洗脱时, 根据 TLC 数据中的  $R_f$  值, 利用化合物的移动速率  $u = u_0 / (1 + k)$ , 对各化合物色谱分离洗脱剂的保留体积可以进行较准确的计算与预测, 避免色谱分离时的盲目性。结果表明: 甲醇提取和正己烷萃取是富集桂枝主要化学成分的有效方法; 研究建立的系统性 TLC 分析方法可以快速有效地选择桂枝主要成分色谱分离的填料、溶剂体系、比例及程序。桂枝主要成分的最佳色谱分离填料为硅胶, 最佳洗脱体系为正己烷-乙酸乙酯。采用建立的条件经一次制备色谱分离, 得到了 8 个纯化合物, 5 个化合物的 HPLC 纯度均在 95% 以上。该研究建立了桂枝化学成分有效的系统化色谱分离方法。

**关键词:**桂枝; 色谱分离; 薄层层析色谱; 制备色谱

**中图分类号:**S 503.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)14-0107-05

中药桂枝(*Cinnamomi ramulus*)中已有包括苯丙素类、酚酸类、黄酮类、糖苷类、甾体类等在内的 50 多种化合物<sup>[1-3]</sup>被分离和鉴定。现代药理分析表明, 桂枝具有杀菌、抗氧化、抗过敏、治疗痛风、抑制黑色素形成<sup>[4]</sup>和抑制血小板聚集<sup>[5]</sup>等作用。中药成分的系统性与规模化色谱分离的核心是系统性、重现性、批量、纯度和成本。最大的挑战是中药成分的复杂性和色谱分离的可行性, 基于色谱填料与技术的特点, 实现中药成分系统性分离的关键是样品的有效处理和分离条件的理性选择。

该试验试图对桂枝中化学成分系统性色谱分离方法进行研究。建立基于薄层色谱分析的系统性色谱分离条件选择方法<sup>[6-8]</sup>, 对中药成分色谱分离的填料、洗脱体系及洗脱强度进行筛选, 确定桂枝中主要成分的系统性色谱分离条件, 并初步建立复杂化合物体系色谱分离条件的筛选模式。利用薄层色谱中  $R_f$  值与柱色谱洗脱速度之间的关系, 通过计算, 预测台阶梯度洗脱时各溶剂强度的洗脱体积数和化合物的保留体积, 实现复杂物质体系色谱分离的可控与有效。

**第一作者简介:**王西宁(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的研究及开发利用。E-mail: wangxining2010@126.com.

**责任作者:**朱靖博(1963-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药现代化研究开发与应用。E-mail: zhujingb@sina.com.

**基金项目:**中药制药过程新技术国家重点实验室资助项目(SKL2010M0205; SKL2010Z0201)。

**收稿日期:**2013-03-04

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

桂枝药材由江苏连云港康缘药业有限公司提供。

R502B 旋转蒸发器、SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器责任有限公司); GF<sub>254</sub> 薄层层析硅胶预制板、聚酰胺板、三氧化二铝板(烟台市化学工业研究所); HGTZF-1 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司); Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司); 薄层层析硅胶 H60(青岛海洋化工厂); C18 色谱柱(大连迪马科技有限公司); P500 恒流泵、UV230 紫外检测器(大连依利特有限公司); 40 mm×300 mm 不锈钢高压制备色谱柱(大连博迈科技有限公司)。正己烷、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、甲酸, 分析纯(天津科密欧试剂有限公司); 乙腈(O&Pudtion, 瑞典); 超纯水(实验室自制)。肉桂酸和桂皮醛标准品, 从桂枝中分离得到<sup>[9]</sup>。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 药材提取** 取 8.85 kg 中药桂枝药材粉末, 用 60 L 工业级甲醇加热提取 3 次, 合并提取液, 浓缩至干, 浸膏于 -40℃ 冰箱保存。

**1.2.2 系统溶剂萃取** 取 10 mg/mL 的桂枝甲醇提取物水溶液, 分别用正己烷、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次进行萃取, 各萃取 3 次, 合并萃取液, 浓缩, 定容至 10 mg/mL。对不同萃取相分别进行 TLC 和 HPLC 检测。取肉桂酸和桂皮醛标准品进行 HPLC 对照分析。TLC 条件为石油醚: 乙酸乙酯 = 17: 3, 检测条件为 254、365 nm, 然后利用磷钼酸硫酸溶液显色。HPLC 条

件为  $C_{18}$  色谱柱,进样量为  $20\ \mu\text{L}$ ,流速  $1\ \text{mL}/\text{min}$ ,检测波长为  $265\ \text{nm}$ ,柱温为室温。流动相 A 为  $0.01\%$  甲酸-水,流动相 B 为乙腈。流动相梯度洗脱: $0\ \text{min}, 90\% \text{A}; 12\ \text{min}, 80\% \text{A}; 35\ \text{min}, 50\% \text{A}; 40\ \text{min}, 0\% \text{A}; 42\ \text{min}, 90\% \text{A}$ 。确定萃取条件后,将  $500\ \text{g}$  桂枝药材浸膏,溶于  $7\ \text{L}$  的  $10\%$  甲醇水溶液中,采用等体积的有机溶剂进行萃取,萃取 3 次,合并萃取液,浓缩。

1.2.3 色谱分离条件的选择 分离填料的选择:取  $1\ \text{mg}/\text{mL}$  样品甲醇溶液,分别采用硅胶、聚酰胺和中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  3 种薄层板进行薄层点样分析,其中硅胶板和中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  板展开剂采用正己烷-丙酮(体积比为  $9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5$  共 5 个比例展开)和氯仿-甲醇(体积比为  $9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5$  共 5 个比例展开);聚酰胺板展开剂采用甲醇-水(体积比为  $9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5$  共 5 个比例展开)。在  $254, 365\ \text{nm}$  下观察,然后喷以磷钼酸浓硫酸溶液显色。系统性色谱分离溶剂的筛选:确定分离填料后,分别采用正己烷、氯仿作为主溶剂,乙酸乙酯、丙酮和甲醇作为调节剂,进行薄层色谱分析选择分离洗脱体系,溶剂配比从  $9:1$  至  $1:9$  连续变化。色谱分离洗脱体系及比例的确定:根据混合溶液的溶剂强度为各溶剂强度与体积分数乘积之和,取相同溶剂强度的正己烷-乙酸乙酯和正己烷-丙酮分别对样品进行展开,以薄层色谱中斑点数目、各点  $R_f$  值和相邻斑点间的分离度  $R$  为指标,确定最佳分离体系。确定最佳溶剂体系后,调节展开剂中强极性溶剂的比例,使主

表 1 相同溶剂强度正己烷-乙酸乙酯和正己烷-丙酮溶液的配比

Table 1 Ratio of n-hexane/ethyl acetate and n-hexane/acetone with the same solvent strength

溶剂强度( $\epsilon$ )	0.013	0.035	0.066	0.088
$V_{\text{正}}:V_{\text{乙}}$	94:6	92:8	85:15	80:20
$V_{\text{正}}:V_{\text{丙}}$	95:5	93.7:7.3	87.3:13.7	83:17

溶剂与  $R_f$  调节剂 2 种溶剂比例分别为  $99:1, 98:2, 97:3$  至  $90:10, 80:20, 70:30, 60:40$ ,使化合物依次展开。  
1.2.4 制备柱色谱的分离参数的预测 洗脱体积数及各化合物保留体积的预测:参考卢佩章<sup>[10]</sup>的方法,预测溶剂强度台阶梯度的洗脱体积数及各化合物的保留体积。以溶质在色谱柱内流动速率  $u=u_0 \times R_f$  为依据,参照许琴永<sup>[9]</sup>的方法计算台阶梯度中化合物保留体积,制备色谱分离:采用自制  $40\ \text{mm} \times 300\ \text{mm}$  不锈钢色谱柱,利用 1.2.3 得到的起始溶剂进行洗脱,直至柱压稳定。 $0.6\ \text{g}$  桂枝正己烷萃取物,等量干法拌硅胶,上样。采用确定的洗脱条件进行洗脱。以  $100\ \text{mL}$  为收集组份体积,收集各样品。利用 TLC 和 HPLC 分别逐一对样品进行检测,合并相同样品,得到各化合物。

## 2 结果与分析

### 2.1 药材桂枝的提取与分析

$8.85\ \text{kg}$  中药桂枝甲醇提取得浸膏  $560\ \text{g}$ ,提取率为  $6.3\%$ 。由图 1 可以看出,桂枝甲醇提取物中主要含有 7 个化合物。根据对照肉桂酸、桂皮醛标准品的保留时间和紫外吸收确定峰 3 和峰 5 为肉桂酸和桂皮醛;以对照桂枝 HPLC 指纹图谱<sup>[11]</sup>和化合物的紫外吸收<sup>[12]</sup>,确定峰 1 和峰 2 分别为香豆素和肉桂醇。

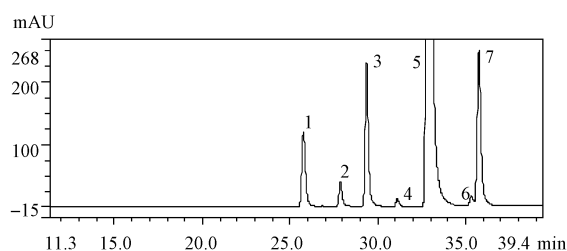


图 1 桂枝甲醇提取物的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of methanol extract from *Cinnamomi ramulus*

### 2.2 系统溶剂的萃取

系统溶剂萃取桂枝甲醇提取物的 HPLC 和 TLC 结果见图 2。由图 2 可以看出,正己烷萃取液组成与总提

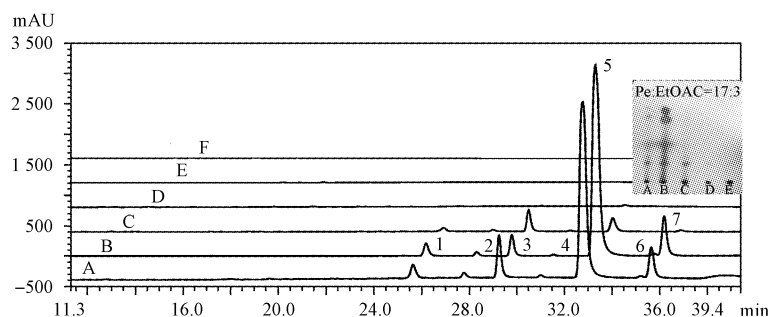


图 2 桂枝甲醇提取物及不同萃取相的 HPLC 和 TLC 图

注:A:桂枝甲醇提取物;B:正己烷萃取液;C:氯仿萃取液;D:乙酸乙酯萃取液;E:正丁醇萃取液;F:水相。

Fig. 2 HPLC and TLC of methanol extract and five different extraction of *Cinnamomi ramulus*

Note: A: Methanol extract of *Cinnamomi ramulus*; B: n-hexane extraction liquid; C: Chloroform extraction liquid; D: Ethyl acetate extraction liquid; E: n-butanol extraction liquid; F: Water phase.

取物相似,有效地实现了桂枝中的主要化合物富集,包括香豆素、肉桂醇、肉桂酸和桂皮醛;氯仿萃取液中含有一定量肉桂酸和少量桂皮醛,经正丁醇萃取液的 HPLC 和 TLC 分析显示,其中几乎不含任何弱极性化合物。

2.3 色谱分离条件的筛选

2.3.1 色谱填料的选择 甲醇提取物的不同填料薄层色谱分析见图 3。由图 3 可知,硅胶薄层中斑点数为 9,分离良好,聚酰胺板中斑点数为 4,拖尾严重,三氧化二铝板发生严重的死吸附现象,硅胶填料适合于桂枝正己烷相化合物的分离。

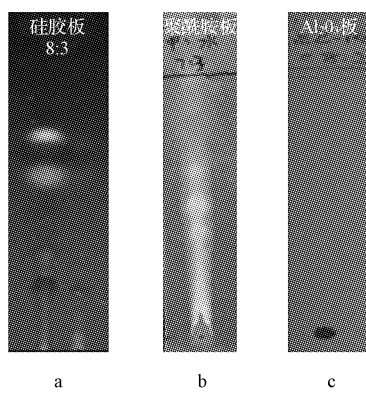


图 3 桂枝甲醇提取物在硅胶(a)、聚酰胺(b)和三氧化二铝(c)展开后的 TLC 图

Fig. 3 TLC of *Cinnamomi ramulus* developed in silica gel(a), polyamide(b) and alumina(c)

2.3.2 色谱分离体系的筛选 考虑 Snyder 溶剂分类法中的典型溶剂及获得的方便性,以正己烷、氯仿和乙酸乙酯作为主溶剂进行系统薄层分析的结果见图 4。由图 4 可以看出,正己烷-乙酸乙酯和正己烷-丙酮展开斑点数为 9,分离良好,桂枝正己烷相分离可以选择正己烷为

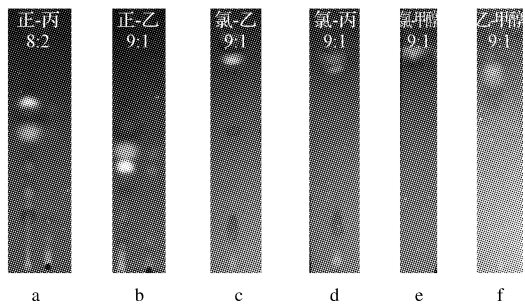


图 4 桂枝正己烷相在不同展开体系下的 TLC 图

注:a:正己烷-丙酮;b:正己烷-乙酸乙酯;c:氯仿-乙酸乙酯;d:氯仿-丙酮;e:氯仿-甲醇;f:乙酸乙酯-甲醇。

Fig. 4 TLC of n-hexane extract of *Cinnamomi ramulus* in different development solvent systems

Note:a,n-hexane-acetone;b,n-hexane-ethyl acetate;c,Chloroform-ethyl acetate;d,Ehloroform-acetone; e, Chloroform-methanol; f, Ethyl acetate-methanol.

主溶剂,乙酸乙酯和丙酮作为调节剂的洗脱体系。

2.3.3 分离体系及分离比例的确定 桂枝正己烷部位的相同溶剂强度正己烷/乙酸乙酯和正己烷/丙酮薄层分析结果见图 5 和表 2。由图 5 可知,桂枝中主要化合物出现顺序和移动规律在相同溶剂强度的正己烷/乙酸乙酯和正己烷/丙酮体系中相似,化合物 *R<sub>f</sub>* 值和斑点宽度在正己烷/乙酸乙酯体系中较小。由表 2 可以看出,物质对分离度随溶剂强度变化规律不同。物质对 A-B 分离度不随溶剂体系和溶剂强度改变,合理的溶剂强度可确保分离的有效性。物质对 B-C、C-D 的分离度在正己烷/乙酸乙酯体系中较大,更适于色谱分离。调节展开剂中乙酸乙酯比例,桂枝正己烷部位各化合物在 TLC 中依次展开结果见图 6,化合物按 TLC 斑点出现顺序,从上到下分别编号为 A~I。一般认为被分离物质对分离度较大且化合物 *R<sub>f</sub>* 值为 0.3<sup>[13]</sup> 时的洗脱强度适合于色谱柱分离。由图 6 可知,物质对 C-D 分离度随二元体系中乙酸乙酯含量的增加而减小,当混合溶剂体积比为 96:4 时,分离度最大。物质对 D-E 分离度最大时溶剂

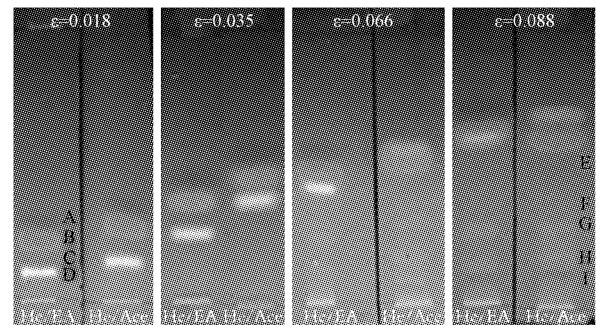


图 5 桂枝正己烷部位相同强度正己烷/乙酸乙酯和正己烷/丙酮 TLC 分析

Fig. 5 TLC of n-hexane extract of *Cinnamomi ramulus* developed by n-hexane/ethyl acetate and n-hexane/acetone with the same solvent strength

表 2 不同溶剂强度下相邻物质对分离度在正己烷-乙酸乙酯和正己烷-丙酮体系的比较

Table 2 Comparison of resolution of adjacent compositions series in different solvent strength of n-hexane/ethyl acetate and n-hexane/acetate system								
溶剂强度	0.018		0.035		0.066		0.088	
物质对	He	He	He	He	He	He	He	He
	/EtOAc	/Ace	/EtOAc	/Ace	/EtOAc	/Ace	/EtOAc	/Ace
A-B	1.13	1.15	1.20	1.20	1.25	1.26	0.80	1.10
B-C	2.42	1.40	1.23	1.30	0	0	0	0
C-D	0.77	1.26	2.08	1.30	1.70	0.78	0	0
D-E	3.20	2.30	1.07	1.10	2.30	1.80	3.10	1.40
E-F	—	—	3.41	4.80	2.40	0	0	0
F-G	—	—	0	0.30	2.00	0	2.80	5.50
G-H	—	—	2.00	1.80	2.00	2.86	1.00	3.00
H-I	—	—	0	0	2.40	2.90	4.00	2.80

比例为 92 : 8。台阶梯度洗脱时,以分离度和  $R_f$  值为考察指标,确定各物质的台阶梯度洗脱条件,不同条件下化合物的  $R_f$  值见表 3,由表 3 可知,5 个比例分别分离化合物 A-D、E-F、G、H、I。

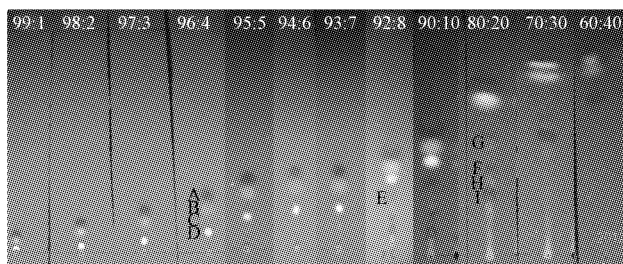


图 6 桂枝正己烷部位依次展开图

Fig. 6 TLC of n-hexane extract of *Cinnamomi ramulus* developed step by step

表 3 不同强溶剂比例下 TLC 中桂枝主要化合物的  $R_f$  值

Table 3  $R_f$  values of main compounds of *Cinnamomi ramulus* in TLC developed by different percentage of polar solvent

乙酸乙酯百分含量/%	A	B	C	D	E	F	G	H	I
4	0.30	0.23	0.16	0.12					
8			0.45	0.35	0.22	0.15	0.10		
15					0.39	0.32	0.33	0.20	0.10
20								0.30	0.19
40									0.45

## 2.4 制备色谱参数预测及分离

2.4.1 台阶梯度洗脱剂洗脱体积及溶质保留体积的预测 由表 4 可知,洗脱体积最大为 16.1。以目标化合物的保留体积为所要选择的洗脱溶剂的洗脱体积数,确定桂枝正己烷台阶梯度洗脱的洗脱体积,由表 5 可知,所选 5 个比例洗脱体积数分别为 8.3、4.7、2.9、0.6、0.5。

表 4 试验所得溶质保留体积与预测保留体积的比较

Table 4 Comparison of retention volume of analytes between the calculated and the experiment

化合物编号	A	B	C	D	E	F	G	H
$V_{\text{预测}}$	3.3	4.3	6.3	8.3	10.0	12.6	15.5	16.1
$V_{\text{试验}}$	3.3	4.3	6.3	8.3	10.0	13.0	14.4	15.0

表 5 计算所得各溶剂的洗脱体积数

Table 5 Elution volumes of 5 solvent mixtures by calculated

$V_{\text{正}}$	96 : 4	92 : 8	85 : 15	80 : 20	60 : 40
洗脱体积数	8.3	4.7	2.9	0.6	0.5
分离目标化合物	A、B、C、D	E、F	G	H	I

2.4.2 制备柱色谱分离 试验经 1 次简单的制备色谱柱分离,便得到了 8 个 TLC 中单点,5 个化合物的 HPLC 纯度均在 95% 以上,从图 7 和图 8 可以看出,与标准品对照确定分离的化合物 A、C、F、I 分别为桂皮醛、

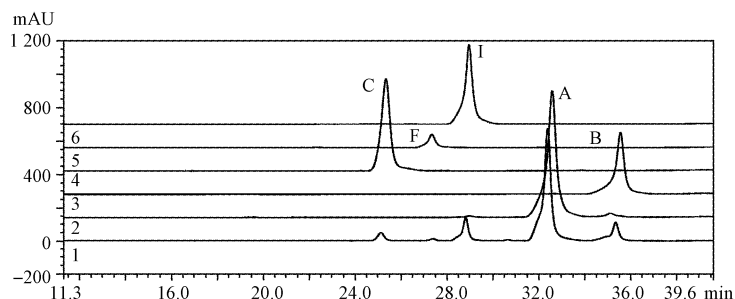


图 7 桂枝正己烷萃取液和制备柱分离后样品的 HPLC 图

注: A: 桂皮醛; C: 香豆素; F: 肉桂醇; I: 肉桂酸。

Fig. 7 HPLC of n-hexane extract of *Cinnamomi ramulus* and the samples after separation by preparative silica gel chromatography

Note: A: Cinnamic aldehyde; C: Coumarin; F: Cinnamyl alcohol; I: Cinnamic acid.

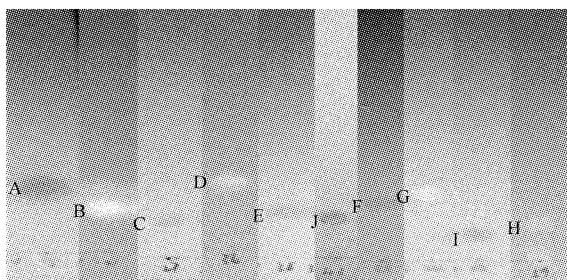


图 8 桂枝经制备柱分离后各样品 TLC 图

Fig. 8 TLC of pure compounds separated from *Cinnamomi ramulus* by preparative silica gel chromatography

香豆素、肉桂醇和肉桂酸。将试验后化合物的保留体积进行计算,所得结果与预测值相差极小,尤其是前 2 个梯度,结果完全相同,表明该方法是合理的。因柱洗脱时间的增大,色谱柱本身发生了变化,因此后面梯度试验保留体积与预测保留体积有所差异,是合理的。

## 3 结论

在中药或者天然产物等复杂成分分离过程中,合理的色谱条件选择和准确度洗脱参数预测,可以保证分离的有效性。该试验利用薄层色谱技术,通过量化薄层色谱各种数据,包括斑点数目、斑点  $R_f$  值和相邻斑点分离度,筛选柱色谱分离的填料和溶剂体系。试验主要根据

薄层色谱与柱色谱原理的相似性,利用  $R_f$  值预测各种化合物的保留体积。试验结果表明,桂枝最佳前处理手段为正己烷萃取、最佳分离填料为硅胶、最佳洗脱流动相为正己烷-乙酸乙酯、分离溶剂为正己烷:乙酸乙酯。台阶梯度洗脱时,首个梯度中化合物的保留体积为柱体积积与化合物的  $R_f$  之比。

### 参考文献

- [1] 刘江云. 常用中药桂枝化学成分的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2002.
- [2] Liu C, Zhong S M, Chen R Y, et al. Two new compounds from the dried tender stems of *Cinnamomum cassia*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(9): 845-849.
- [3] Tran M N, Do T H, Ik S L, et al. Two new diterpenes from the twigs of *Cinnamomum cassia*[J]. Helv Chim Acta, 2009, 92: 2058-2062.
- [4] Tran M N, Ik S L, Do T H, et al. Tyrosinase-inhibitory constituents from the twigs of *Cinnamomum cassia*[J]. J Nat Prod, 2009, 72: 1205-1208.
- [5] Sun Y K, Yean K K, Ja Y K, et al. Platelet anti-aggregation activities of compounds from *Cinnamomum cassia* [J]. J Med Food, 2010, 13 (5): 1069-1074.

- [6] Lu D Y, Kang Q S. Theory and practice from TLC to industrial preparative chromatography(IPC) in the separation of natural product[J]. Natural product research and development, 2004, 16: 153-156.
- [7] Justin D F, Chad M K. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data[J]. J Chromatography A, 2008, 1211: 49-54.
- [8] Tero W, Irena V, Pia V, et al. Use of drylab for simulation of TLC separation and method transfer from TLC to HPLC[J]. J Planar Chromatography, 2009, 19: 118-122.
- [9] 许琴永. 药食两用中药抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性及作用机制研究[D]. 大连:大连工业大学,2010.
- [10] 卢佩章. 高效液相色谱法及其专家系统[M]. 大连:辽宁科学技术出版社,1991:322-359.
- [11] Ding Y, Wu E Q, Liang C, et al. Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig sample sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis[J]. Food Chemistry, 2011, 127: 755-760.
- [12] 张艺轩. 基于液质联用技术的温络方药效物质基础研究[D]. 北京:北京协和医学院,2010.
- [13] Szabolcs N, Karin D T, Georg C, et al. Strategies of mobile phase transfer from thin-layer to medium-pressure liquid chromatography with silica as the stationary phase[J]. J Chromatography A, 1990, 499: 453-462.

## Study on Systemic Chromatography Separation Methods of Chemical Compounds from *Cinnamomi ramulus*

WANG Xi-ning<sup>1</sup>, ZHU Jing-bo<sup>1,2</sup>, DING Yan<sup>1,2</sup>, KOU Zi-nong<sup>2</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>3</sup>, XIAO Wei<sup>3</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034; 2. Institute of Chemistry and Application of Plant Resources, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034; 3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Company Limited, Lianyungang, Jiangsu 222001)

**Abstract:** Taking *Cinnamomi ramulus* as material, the systemic chromatography separation methods including pre-treatments of samples, selection of chromatography separation conditions and the estimate of parameters about preparative chromatography were systemically studied. Elution volumes of reagents and retention volume of each compounds could be calculated and estimated accurately based on the  $R_f$  value of TLC data and moving velocity of compounds  $u = u_0 / (1 + k)$  in silica gel chromatography which avoided the blindness of separation process. The results showed that extracted by methanol and n-hexane extraction were effective methods for the enrichment of main compounds of *Cinnamomi ramulus*; the systemic TLC methods studied and built would select chromatography packing, reagents systems and reagents proportion quickly and effectively. For main compounds of *Cinnamomi ramulus* the best chromatography separation packing was silica gel and the best elution system was n-hexane/ethyl acetate. 8 compounds were separated by once preparative chromatography separation which conditions were selected by this method and purity of 5 fractions were greater than 95% detected by HPLC. Systemic chromatography separation methods for chemical compounds of *Cinnamomi ramulus* were built.

**Key words:** *Cinnamomi ramulus*; chromatography separation; thin layer chromatography; preparative chromatography