

高速逆流色谱技术在天然产物研究中的应用进展

李淑芳¹, 陈晓明¹, 丁舒¹, 钱磊¹, 张东星², 张志军^{1,*}

(1. 天津市农业科学院农产品保鲜与加工技术研究所, 天津 300384;
2. 天津益倍元天然产物技术有限公司, 天津 300457)

摘要: 高速逆流色谱是液-液分配色谱, 与传统固-液分配色谱相比, 其具有固定相成本低、易回收、分离过程灵活、高效等优点, 近年来被广泛应用于天然产物研究中。本文总结归纳了高速逆流色谱的两相溶剂体系、分离洗脱方式的选择和应用方法, 分析阐述了高速逆流色谱技术在天然产物研究中的应用实例, 为天然产物功效成分的进一步深入研究提供可靠的技术参考。

关键词: 高速逆流色谱; 分离纯化; 溶剂体系; 洗脱方式

Application Progress of High Speed Countercurrent Chromatography in the Study of Natural Products

LI Shu-fang¹, CHEN Xiao-ming¹, DING Shu¹, QIAN Lei¹, ZHANG Dong-xing², ZHANG Zhi-jun^{1,*}

(1. Institute of Agricultural Products Preservation and Processing Science and Technology, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300384, China; 2. Tianjin Yibei Yuan Natural Products Technology Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: High speed countercurrent chromatography is liquid-liquid partition chromatography. Compared with traditional solid-liquid partition chromatography, it has been widely used in recent years because of its advantages of low cost, easy recovery, flexible and efficient separation process. This paper summarized the selection skills of two-phase solvent system and the application methods of separation and elution by analyzing and elaborating the application examples of high-speed countercurrent chromatography technology in the study of natural products. The flexible and efficient characteristics of high-speed countercurrent chromatography separation technology was fully demonstrated in this review. Reliable technical references for the further study of functional components of natural products were provided.

Key words: high speed countercurrent chromatography; separation and purification; solvent system; elution method

中图分类号: TS201

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6221.2021.09.019

高速逆流色谱(High speed counter-current chromatography, HSCCC)作为液-液分配色谱技术, 近年

在国内天然产物研究中应用较为广泛。与固-液色谱不同, 它是由液相的固定相和流动相构成溶剂分离系

基金项目: 天津市“131”创新型人才团队(20180337); 天津市农业科学院青年创新基金项目(2020003)

作者简介: 李淑芳(1976—), 女, 汉族, 硕士, 副研究员, 研究方向: 农产品加工与食用菌。

*通信作者: 张志军, 学士, 研究员, 研究方向: 农产品加工与食用菌。

统,具有固定相成本低、易回收、分离过程灵活、效率高等优点。溶剂体系和洗脱方式是影响天然产物逆流色谱分离效率的两个重要因素,其优化选择尚需要规律性数据的总结归纳,以突显高速逆流色谱在天然产物分离纯化研究与应用中的优势。本文对 HSCCC 溶剂体系的筛选、洗脱方式的选择、高速逆流色谱的应用等进行综述,以期高速逆流色谱技术在天然产物研究中的进一步推广应用提供参考。

高速逆流色谱技术,是根据待分离物质在互不相溶的两相溶剂体系中的分配系数的不同而进行分离的技术,结合了液-液萃取和分配色谱的优点^[1]。高速逆流色谱系统的基本构成如图 1 所示^[1]。在 HSCCC 分离系统中,多层螺旋管式离心分离是逆流色谱分离技术的核心构成部分;在多层螺旋管中通过适当的两相溶剂体系的混合、分离的运行过程,将有效成分成功洗脱出来是 HSCCC 分离的关键。

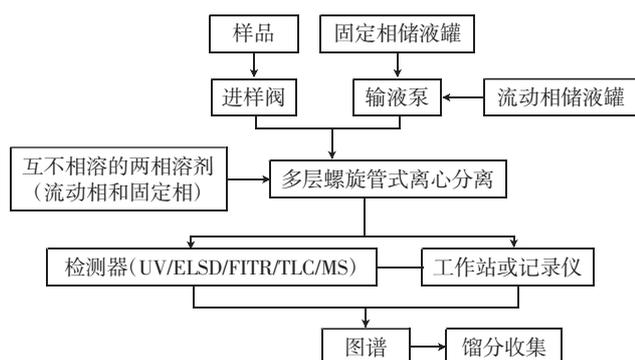


图 1 HSCCC 分离系统的构成
Fig.1 HSCCC separation system

1 高速逆流色谱溶剂体系的选择

1.1 满足溶剂体系的前提条件

溶剂体系由互不相溶的两相溶剂组成,是高速逆流色谱分离技术的核心。一个溶剂体系作为固定相和流动相,除了应满足两相“互不相溶”的特性,还需以组分在溶剂体系中不发生分解为前提。

1.2 溶剂体系的选择依据

溶剂体系的极性与分离产物极性是否匹配,是快速选择溶剂体系的重要依据。颜继忠等^[2]根据“相似相溶”原理,将高速逆流色谱所用的溶剂体系分为弱极性、中等极性和强极性 3 种,探求高速逆流色谱溶剂体系对各组分的选择分配规律,对快速选择溶剂体系起到了一定的指导作用。李成平等^[3]筛选的无水溶剂体系在 HSCCC 分离天然产物中一些极性非常小的化合物方面有着独特的优势。

1.3 影响溶剂体系选择的参数和方法

1.3.1 溶剂体系两相分离时间

溶剂体系两相的分离时间,是指混合好的两相溶剂,在重力场下完全分离成两相所需要的时间,一般应控制在 30 s 内。陈琪等^[4]研究表明,分层时间受到界面张力、密度和粘度等的影响,溶剂系统的平均粘度越大、界面张力越小、密度差越小,分层时间越长。

1.3.2 分配系数 K 值

待分离组分在两相溶剂体系中的分配系数 K 值影响着溶剂体系中溶剂种类的选择以及固定相和流动相的确定,是实现良好分离的关键参数。分配系数 K 值可通过薄层色谱、高效毛细管电泳、高效液相色谱等方法测定。 K 值一般控制在 0.5~2.0 之间分离效果较好。谭龙泉等^[5]根据薄层色谱的斑点色度观察样品中各组分含量差别,通过比移值(R_f 值)计算分离组分在两相溶剂的分配系数分别在低极性、中极性和酸改性溶剂体系中应用,均快速、准确地选择出合适溶剂强度的流动相;同样通过高效毛细管电泳方法高分辨率计算各组分在溶剂系统的上、下相中的相对含量,通过相对含量发生的明显变化选择合适的溶剂系统^[6]。纪佳^[7]结合薄层色谱和荧光分析法精确计算黄连生物碱的各组分在溶剂体系中的分配系数。金晶等^[8]以薄层色谱预选溶剂体系为流动相,然后以高效液相色谱定量测定目标组分的分配系数 K 值,最终获得了最优溶剂体系。

丁琼^[9]引入了经典热力学 Nonrandom two liquid 模型(简称 NRTL 模型),该模型表示某一溶质在特定溶剂系统中的分配行为,可用来简单、快速、可靠地预测溶剂系统的 K 值,为 HSCCC 的分离研究提供了一种快速的溶剂系统选择方法。

1.3.3 固定相保留率(Sf)

分离时,溶剂系统的固定相保留率可作为溶剂系统选择的一个参数,一般 Sf 在 50% 以上时分离效果较好。影响该参数的因素有仪器转速、流动相流速和分离温度。

1.3.4 其他影响参数

溶剂系统的粘度、介电常数、极性参数、上下相的体积比等的变化也是预选溶剂体系时的参考参数。戴德舜等^[10]利用化工热力学溶液理论模型预测溶剂体系的上下相组成和关键参数(如体积、粘度、介电常数、极性参数等),以定量评价溶剂体系的适用性。

1.3.5 选择溶剂体系的 9×9 排列表法

为了获得高速逆流色谱对天然产物的最佳分离效率,科研人员不断探寻分离产物在溶剂体系中的分

配规律及理论,同时还不断研究改进溶剂体系的筛选方法。文献中常使用的 Ito、Oka 和 Arizona 等方法可提供 16 种或 23 种可选溶剂体系,但需对每种溶剂体系依次进行试验,使用起来较为繁琐。梁君玲等^[11]提出以正己烷、乙酸乙酯、甲醇、水(HEMWat)溶剂系统为基础,利用 9×9 排列表可得到至少 60 种溶剂体系选择方案,同时发现该排列法中线性排列的溶剂体系分配系数的对数(logK)与对应溶剂比例呈线性关系。因此,根据目标样品的极性物化性质,在 9×9 排列表中随机选择 2 个溶剂体系(2 点),只需分别测定这 2 个体系中化合物的分配系数,即可通过拟合回归方程 $y(\text{体系系数}) = a \log K + b$ (a, b 为拟合系数),最后获得理想分配系数(如 $K=1$)的溶剂体系比例,这大大提高了溶剂体系筛选工作的效率。王玉等^[12]利用 9×9 排列表方法从油橄榄叶提取物中分离多酚类化合物,以最优溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1.2:8.8:1.7:8.3, V/V)分离得到橄榄苦苷、木犀草素-4'-O- β -D 葡萄糖苷、羟基酪醇 3 种物质,纯度均大于 90%。

2 高速逆流色谱洗脱方式的选择

在逆流色谱的两相溶剂体系中,天然产物的分离是将流动相连续泵入,通过流动相与固定相的充分混合,使流动相将组分从固定相中依次洗脱出来。通常,同一流动相仅能洗脱一定极性范围的组分。对于复杂样品,如分离组分较多,且各组分间浓度差异大、极性区间分布广或分配系数 K 值相近等,则可变换洗脱方式如梯度洗脱、双向洗脱、循环洗脱或推挤洗脱等,通过合适的洗脱方式达到天然产物分离纯化的目的。

2.1 梯度洗脱

梯度洗脱是通过改变流动相的组成、pH 值以及流速来实现的,可分为线性梯度、步进梯度、pH 梯度等方式。近年来梯度洗脱被广泛应用于天然产物有效活性成分的分离纯化中,优点是可以扩大高速逆流色谱的分离范围,减少溶剂的消耗及分离时间;缺点是在进行梯度洗脱时溶剂体系变化不能太大,否则会造成固定相的损失,影响分离效率。张云峰等^[13]以决明子乙酸乙酯萃取物为样品,应用高速逆流色谱,以正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(5:3:6:6, V/V)上相为固定相,先由正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(5:3:6:6, V/V)下相洗脱,再由正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(5:3:5:7, V/V)下相洗脱,梯度洗脱一次分离得到 5 种单体化合物,分别是橙橙叶决明素、甲基钝叶决明素、钝叶决明素、大黄素甲醚、大黄素,纯度分别为 97.4%、93.0%、94.8%、96.3%、95.5%。而童胜强等^[14]则采用高

速逆流色谱的 pH 梯度洗脱,从决明子的氯仿-乙醚提取物中分离得到橙黄决明素(纯度 98.7%)和大黄酸(纯度 95.5%)。

2.2 双向洗脱

双向洗脱包括正向洗脱(常规洗脱)和反向洗脱两个阶段。高速逆流色谱的双向洗脱方式可以借助切换阀来实现,在分离过程中通过相角(固定相和流动相两相角色互换)和洗脱方向的转变来提高物质的分离效率与分离度^[15]。

姜博海^[16]采用逆流色谱的双向洗脱模式从中药补骨脂中反向分离溶出补骨脂酚。蒋志国^[17]以二氯甲烷-石油醚-乙醇-水(6:2:4:4, V/V)为溶剂系统,采用 HSCCC 双向洗脱从南瓜正丁醇提取物中分离得到甘油糖脂 GCL₁、GCL₂ 和 GCL₃。在黑茶的水提取物中,其组分的极性分布较宽,宋鲁彬^[18]以乙酸乙酯-水(1:1, V/V)为溶剂体系,采用双向洗脱,在 300 min 时转换相角,大大缩短了 HSCCC 分离时间,并且出峰峰型较为尖锐。

2.3 循环洗脱

循环洗脱是将检测器的出口连接到高速逆流色谱的入口,从而将目标组分重新泵入高速逆流色谱中进行再次分离,以提高目标组分分辨率与分离效果的方法。循环洗脱的实质是延长分离柱的长度,使组分在分离柱中充分的混合平衡,从而达到提高分离效率的目的^[19]。循环洗脱的优点是适于分离分配系数相近的物质,它能提高 K 值相近物质的分离度。特别在手性分离上,它能显著提高目标对映异构体的分辨率。循环洗脱的缺点是在循环期间,随着循环次数的增加,色谱峰会逐渐变宽且分离时间变长。在进行循环洗脱时,若发现色谱峰出现重叠,应立即停止循环。粟雯^[20]通过在水相中加入 0.1 mol/L Cu²⁺络合剂改变香草酸和 β -谷甾醇在两相溶剂体系正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:2:1:2, V/V)中的分配系数 K ,利用循环 HSCCC,从金钱草乙酸乙酯部分得到了香草酸和 β -谷甾醇。吕力琼^[21]研究逆流色谱立体选择性分离双手性中心化合物,经过逆流色谱闭路循环洗脱,从 20 mg (\pm)-反式-帕罗西汀中得到 5.6 mg 对映体,纯度大于 99%。

2.4 推挤洗脱

推挤洗脱包括洗脱-推挤洗脱和洗脱-反推挤洗脱两种方式^[22]。路艳珍等^[23]利用洗脱-推挤逆流色谱从苹果叶中分离得到有效活性成分。程屹俊等^[24]利用洗脱-推挤逆流色谱技术(EECCC)分离纯化人参皂苷 Rg₁、Rf 及 Rd,纯度分别达到 96.2%、94.3%和 95.1%。

洗脱-推挤洗脱充分利用了固定相和流动相都是液相的特点,拓展了HSCCC的分离能力,大大减少了溶剂系统的筛选时间。洗脱-推挤洗脱相比双向洗脱,其优点在于可以连续不间断地按 K 值顺序分离出来,不足之处是操作分离过程中需要停泵来更改流动相。

反推挤洗脱只改变流动相的洗脱方向。洗脱-反推挤洗脱的优点在于不需要停泵,仅需要改变流动相的洗脱方向,缺点与双向洗脱相同,都不能连续不间断出峰,且可能出现回声峰。

3 高速逆流色谱在天然产物研究中的应用

随着高速逆流色谱的发展,其应用领域从天然产物的分离纯化扩展到标准品制备研究,近年来也推广用于中药指纹图谱的研究开发。但是,高速逆流色谱技术主要还是用于天然产物的分离纯化。

3.1 高速逆流色谱在天然产物分离制备中的应用

获得较高纯度分离产物,有助于天然产物的生物活性及其活性组分作用机制的科学研究快速发展,可积极推动药物和功能性食品的研发。由于HSCCC具有处理温度低、不使样品变性等优点,经HSCCC分离得到的组分具有较强生物活性。因此,HSCCC技术可对黄酮、生物碱、多酚类和萜醌类衍生物等多种天然产物进行分离纯化,其不仅能快速分离目标产物,而且能获得较高纯度和生物活性的分离产物,在天然产物的研发中发挥着积极作用。

3.1.1 单一高速逆流色谱的应用

单一高速逆流色谱技术,一次分离即可获得多种较高纯度的天然产物,分离效率极高。通常样品经过粗筛提取获得粗提物,即可使用高速逆流色谱进行分离纯化。李响等^[29]利用HSCCC技术分离花脸香蘑固体发酵的乙酸乙酯粗提物,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(9:1:9:1, V/V)为溶剂系统,一次分离得到细胞毒活性化合物1-羟基-6-甲基-9,10-萜醌,纯度为95.6%;经细胞毒活性试验表明,此产物对人肺癌A549、人骨肉瘤MG63、人结肠癌Sw480和人肝癌HepG2细胞等多种细胞具有中等毒活性。陈田等^[26]采用HSCCC技术处理干辣椒的生物碱粗提物,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水-冰乙酸(15:15:20:20:7.5, V/V)为溶剂系统,一次获得二氢辣椒素和辣椒素2种产物,纯度分别为98.2%、98.0%;辣椒素和二氢辣椒素对巨噬细胞RAW264.7的抗炎作用均明显强于吡喹美辛(抗炎类西药)。陆英等^[27]利用HSCCC溶剂体系乙酸乙酯-正丁醇-0.5%乙酸水溶液(3:1.5:5, V/V),从百合磷茎粗提物中一步分离到王百合苷A(Rega-

loside A)、乙酰化王百合苷C(Acetylregalosite C)、王百合苷B(Regalosite B)3种产物,纯度分别为96.2%、95.1%、98.8%。Lu等^[28]采用高速逆流色谱法从纤毛虫粗提物一次分离获得5种产物,包括3种酚类化合物——木犀草素(luteolin)、4-羟基苯甲酸(4-hydroxy benzoic acid)、3,4-二羟基苯甲酸(3,4-dihydroxy benzoic acid),纯度分别是98%、99.1%、99.5%;2种环烯醚萜苷——Verproside和Catalposide,纯度分别是99.8%、99%,均表现出较强的抗氧化活性和抗肝癌活性,其中木犀草素、4-羟基苯甲酸和3,4-二羟基苯甲酸是首次从纤毛虫中分离得到。Wu等^[29]比较了七步脱蛋白法、柱层析法和HSCCC法分离螺旋藻水溶性多糖(PSP),HSCCC法可一步分得PSP,其产率比传统方法提高了近5倍,该多糖具有较强清除自由基作用。

对于有些复杂化合物,HSCCC法一步未能分离的组分,亦可进行第二次HSCCC分离,即离线二维HSCCC,这有助于改善色谱分辨率及峰容量,能有效解决因峰重叠引起的分离纯度不高、回收率较低等问题。丁琼等^[30]利用该法从湖北海棠叶中分离制备黄酮化合物,初次利用溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:4:1:4, V/V)从粗提物中仅分离得到纯度为96.5%的3-羟基根皮苷(组分1),以及混合物(组分2和组分3);作者改变溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-0.1 mol/L Cu^{2+} 水溶液(1:4:1:4, V/V),又从中分离得到纯度为98.1%的槲皮素(组分2)和98.9%的根皮苷(组分3)。

3.1.2 大孔树脂吸附-高速逆流色谱的联用

获得较高纯度的天然产物,往往需要多种方法多步分离。采用大孔树脂吸附技术作为前处理技术,可大幅提高后续高速逆流色谱技术对天然产物进行分离纯化的效果,获得较高纯度、生物活性的分离产物。薛宏坤等^[31]以桑葚为原料,联合大孔树脂纯化技术-高速逆流色谱技术对桑葚花色苷进行分离纯化,以正丁醇-甲基叔丁基醚-乙腈-水-三氟乙酸(2:2:1:5:0.01, V/V)为两相溶剂体系,获得飞燕草素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、天竺葵素-3-葡萄糖苷3个产物,纯度都在90%以上。高亮等^[32]联合大孔树脂技术-高速逆流色谱技术(HSCCC)分离纯化荷叶中的原花青素,以正己烷:乙酸乙酯:水=1:80:80的溶剂体系,得到均具有抗氧化活性的儿茶素、表儿茶素、原花青素B₂3种产物。朱忠敏^[33]利用大孔树脂层析结合高速逆流色谱分离纯化灵芝酸,分离得到纯度高于93%的灵芝酸F、高于90%的灵芝酸C₁和灵芝酸A、高于85%的灵芝酸C₂。用大孔树脂代替传统的硅胶

柱层析,节约了试验成本,消除了有机溶剂带来的环境污染等问题;高速逆流色谱具有高效、快速、制备量大、费用低等优点。大孔树脂吸附-高速逆流色谱的应用有利于天然产物分离纯化的产业化。

3.1.3 高速逆流色谱-高效液相色谱的联用

高速逆流色谱对低含量化学成分具有较好富集优势。Pan 等^[34]以西番莲种子为研究对象,首先用 HSCCC 溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:2:1:2.8, V/V)分离得到 2 个二苯乙烯类化合物,纯度分别为 90.2%、94.8%;然后利用 HPLC 进一步纯化获得 4 个新的苦味子醇衍生物和 3 个已知化合物,均具有体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性。Huang 等^[35]以虎杖为研究对象,先采用 HSCCC 溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3:5, V/V)获得 2 个酚苷异构体组分,然后利用 HPLC 进一步纯化获得 4 个化合物,纯度分别达到 98.2%、98.71%、98.49%、98.52%;其中,产物 2 为新的酚苷类化合物。王尉等^[36]结合 HSCCC 和 Pre-HPLC 法从葡萄籽乙醇提取物中获得 8 种多酚产物;其中,以正丁醇-乙酸乙酯-水(1:14:15, V/V)为溶剂系统, HSCCC 法分离得到了没食子酸 GA(纯度 98.3%)、儿茶素 C(纯度 96.7%);接着调整溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-水(1:10:10, V/V), HSCCC 再次分离获得表儿茶素 EC(纯度 99.2%)、表没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG(纯度 99.3%)和没食子儿茶素没食子酸酯 GCG(纯度 99.2%);进而采用制备型液相色谱进一步纯化得到了原花青素 B₁(纯度 98.5%)、原花青素 B₂(纯度 97.2%)、表儿茶素没食子酸酯 ECG(纯度 98.9%)。Fang 等^[37]以高良姜为研究对象,结合 HSCCC 和 1,1-二苯基-2-三硝基苯胍自由基-高效液相色谱技术(DPPH-HPLC),首先以 DPPH-HPLC 靶向分离得到具有抗氧化活性产物,然后以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(0.8:1:1:0.8, V/V)为溶剂体系, HSCCC 法获得高良姜素和山萘酚苷两种抗氧化剂,纯度分别为 99.3%和 98.5%。这为从天然产物中获得高纯度的活性产物提供了一种新的分离纯化方法。

3.1.4 高速逆流色谱-重结晶的联用

紫杉醇粗提物中三尖杉宁碱和紫杉醇的纯度分别为 33.1%和 36.5%。林楠等^[38]采用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-乙醇-水(5:7:5:1:6.5, V/V)溶剂体系,利用高速逆流色谱仪分离紫杉醇粗提物,得到三尖杉宁碱和紫杉醇馏出物纯度分别为 88.4%和 89.7%,然后,以 50%乙腈进行重结晶,三尖杉宁碱和紫杉醇纯度分别达到 98.7%和 97.6%。由此可见,高速逆流色谱技术在分离纯化中对目标产物的富集能起到关键性作用,

可大大提高产物组分的纯度。

3.1.5 高速逆流色谱与其它技术的联用

HSCCC 用于天然产物分离纯化,还可与多种萃取技术联用,实现目标组分的高效分离和快速检测。目前研究较多的萃取新技术有超声波辅助萃取(UAE)^[39]、微波辅助萃取(MAE)^[40-41]、超临界 CO₂ 萃取(SFE-CO₂)^[42]、高速剪切分散乳化剂技术(HSDE)^[43]、氯化胆碱深度共晶溶剂萃取(DES)^[44]等。

3.2 高速逆流色谱在天然产物标准品制备中的应用

目前,我国研发的天然产物标准样品种类和数量严重不足,影响相关产品的质量检测,也制约了相关行业的发展。为改善这一现状,可将 HSCCC 应用到天然产物标准品制备。王岱杰等^[45-46]采用 HSCCC,分离制备芝麻素单体(纯度 99.73%)和厚朴酚单体(纯度 99.76%);贺天雨等^[47]利用 HSCCC,以乙酸乙酯-正丁醇-水(2:1:3, V/V)为溶剂体系,分离制备葛根素标准品(纯度 99.53%);林云良等^[48]采用 HSCCC 分离制备异补骨脂素单体(纯度 99.83%);耿岩玲等^[49]采用 95%乙醇加热回流和乙酸乙酯粗提芸香科植物白鲜皮,再经硅胶柱色谱富集, HSCCC 精制,多次重复分离获得白鲜碱单体(纯度 99.85%)。因此,将高速逆流色谱技术用于天然产物标准品的高效制备,具有分离步骤少、标准品纯度高、制备量大等优点。

3.3 高速逆流色谱在天然产物指纹图谱中的应用

在中药现代化进程中,指纹图谱技术是国内外认可的反映中药及中药制剂内在质量的方法之一,高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)、气相色谱(GC)等技术被广泛地应用于中药指纹图谱研究。由于高速逆流色谱在物质分离中具有明显优势,将其用于建立指纹图谱,可以体现中药不同产地、不同批次所含化学成分的种类、浓度等差异,能真实反映产品质量情况。顾铭等^[50-52]利用高速逆流色谱分离纯化丹参醌类成分,以正己烷-乙醇-水(10:5.5:4.5)为溶剂体系,分步洗脱,分离纯化 3 个批次的丹参脂溶性成分,洗脱图谱中对应洗脱峰为同一组分,洗脱峰保留时间的相对标准偏差均小于 3%;而不同批次样品中同一组分的相对含量有较大差异。采用高速逆流色谱建立指纹图谱的样品不但使预处理过程大为简化,而且可根据需要放大样品量,有利于开展样品的结构-生物活性相互关系等后续研究。

4 前景与展望

高速逆流色谱(HSCCC)工作原理独特,主要用于天然产物的分离、分析检测和标准品制备,具有完

整保留分离成分物化性的特点。目前,科研人员对HSCCC的关注度较高,以植物、水产物、动物、中药、微生物为研究对象的应用越来越广泛。但是HSCCC分离机理、流体动力学平衡和分离理论、溶剂体系精准选择等关键问题尚需进一步深入研究。随着仪器的改进和技术的进步,设备稳定性、产物分离效率和样品制备量逐步提高,HSCCC将在天然产物、生物医药、环境、食品等领域发挥重要技术支撑作用,应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 颜继忠,褚建军,童胜强. 中药分离中高速逆流色谱溶剂体系的选择[J]. 中国现代应用药学,2003,20(5):374-376.DOI:10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2003.05.012.
- [3] 李成平,卢程华,唐岚,等. 高速逆流色谱无水溶剂体系在天然产物分离纯化中的应用[J]. 药物分析杂志,2014,34(2):201-206.DOI:10.16155/j.0254-1793.2014.02.002.
- [4] 陈琪,朱家文,陈葵,等. 高速逆流色谱分离制备红霉素A的溶剂系统的选择及优化[J]. 华东理工大学学报(自然科学版),2008,34(5):622-626.DOI:10.14135/j.cnki.1006-3080.2008.05.019.
- [5] 谭龙泉,张所明. 薄层色谱在高速逆流色谱溶剂系统选择过程中的应用[J]. 分析化学,1996,24(12):1448-1451.
- [6] 谭龙泉,阮宗琴,欧庆瑜. 高效毛细管电泳在高速逆流色谱的溶剂系统选择过程的应用[J]. 分析化学,1997,25(5):515-518.
- [7] 纪佳. 薄层色谱和荧光分析法测定黄连生物碱在高速逆流色谱溶剂体系中分配系数的方法[J]. 中国医药科学,2012,2(9):109-110.
- [8] 金晶,童胜强. 高速逆流色谱法分离当归挥发油中有效成分藁本内酯及其气相色谱-质谱法的分析和鉴别[J]. 材料与测试,2018,54(10):1163-1167.DOI:10.11973/lhjj-hx201810009.
- [9] 丁琼. 高速逆流色谱中天然产物分离及溶剂体系选择方法的研究[D]. 长沙:中南大学,2014.
- [10] 戴德舜,王义明,罗国安. 高速逆流色谱溶剂体系软件在桂枝汤A部分研究中的应用[J]. 中成药,2001,23(9):3-6.DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2001.09.001.
- [11] 梁君玲,孟杰,吴定芳,等. 一种九九表式定向逆流色谱溶剂选择新策略[C]//中国化学会第十八届全国有机分析及生物分析学术研讨会论文集. 北京:中国化学会,2015.
- [12] 王玉,夏鹏飞,杨雪,等. 基于新型溶剂系统筛选的高速逆流色谱分离油橄榄叶中的多酚类化合物[J]. 北京中医药大学学报,2019,42(9):766-772.DOI:10.3969/j.issn.1006-2157.2019.09.011.
- [13] 张云峰,魏东,郭祀远,等. 决明子活性成分的高速逆流色谱分离[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2009,37(10):129-134.DOI:10.3321/j.issn:1000-565X.2009.10.025.
- [14] 童胜强,盛柳青,颜继忠,等. pH梯度洗脱高速逆流色谱制备性分离决明子中的橙黄决明素和大黄酸(英文)[J]. 中国现代应用药学,2009,26(5):391-394.DOI:10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2009.05.006.
- [15] 李攻科. 样品前处理仪器与装置[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [16] 姜博海. 补骨脂及伤疔膏的CPC分离与近红外分析[D]. 大连:大连理工大学,2012.
- [17] 蒋志国. 甘油糖脂的分离制备及生物活性研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2010.
- [18] 宋鲁彬. 中国黑茶药理功能评价及活性物质研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2008.
- [19] 陈山,赵永杰,刘杨. 高速逆流色谱溶剂体系及洗脱模式研究进展[J]. 化学研究与应用,2017,29(11):1628-1634.DOI:10.3969/j.issn.1004-1656.2017.11.003.
- [20] 粟雯. 高速逆流色谱分离纯化中草药广金钱草和连翘活性成分的研究[D]. 长沙:中南大学,2014.
- [21] 吕力琼. 逆流色谱立体选择性分离双手性中心化合物[D]. 杭州:浙江工业大学,2018.
- [22] GUO W, DONG H J, WANG D J, et al. Separation of seven polyphenols from the rhizome of *Smilax glabra* by offline two dimension recycling HSCCC with extrusion mode[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2018, 23(2). DOI:10.3390/molecules23020505.
- [23] 路艳珍,魏芸. 洗脱-推挤逆流色谱-半制备液相色谱联用技术分离纯化苹果叶中的有效活性成分[C]//中国化学会第十一届全国生物医药色谱及相关技术学术交流会(食品与环境分析分会)论文摘要集. 北京:中国化学会,2016.
- [24] 程峻俊,梁琼麟,王义明,等. 应用洗脱-推挤逆流色谱法高效分离制备人参皂苷Rg₁、Rf及Rd[J]. 中成药,2012,34(1):89-93.
- [25] 李响,蔡旭,李倩,等. 高速逆流色谱法快速分离花脸香蘑中细胞毒活性化合物[J]. 食品科技,2019,44(3):221-226.DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2019.03.040.
- [26] 陈田,商婷婷,何珍,等. 辣椒生物碱的高速逆流色谱分离及抗炎活性测定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2018,44(1):56-61.DOI:10.13331/j.cnki.jhau.2018.01.011.
- [27] 陆英,刘仲华,肖文军,等. 百合磷茎中Regaloside A、Acetylregaloside C与Regaloside B高速逆流色谱分离及生物活性研究[J]. 分析测试学报,2018,37(9):1027-1033.DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2018.09.007.
- [28] LU Q X, SUN Y, SHUY Y, et al. HSCCC Separation of the two iridoidglycosides and three phenolic compounds from *Vernonia ciliate* and their in vitro antioxidant and antihepatocarcinomaactivities[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2016, 21(9):1234-1246. DOI:10.3390/molecules21091234.
- [29] WU X Y, LI R C, ZHAO Y J, et al. Separation of polysaccharides from *Spirulina platensis* by HSCCC with ethanol-ammonium sulfate ATPS and their antioxidant activities[J].

- Carbohydrate Polymers,2017,173:465–472. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.06.023.
- [30] 丁琼,任达兵,秦燕华,等. 离线二维高速逆流色谱分离制备湖北海菜叶中的黄酮化合物[J]. 江西化工,2014,3(1):115–121.DOI:10.14127/j.cnki.jiangxihuagong.2014.01.002.
- [31] 薛宏坤,李鹏程,钟雪,等. 高速逆流色谱分离纯化桑葚花色苷及其抗氧化活性[J]. 食品科学,2020,41(15):96–104. DOI:10.7506/1SPKX1002-6630-20190715-193.
- [32] 高亮,蔡为荣,张孟雪,等. HSCCC 分离荷叶原花青素及其抗氧化活性研究[J]. 安徽工程大学学报,2019,34(4):1–7.
- [33] 朱忠敏. 大孔树脂层析结合高速逆流色谱分离纯化灵芝酸[C]//2013 年灵芝产品研究与开发学术研讨会论文摘要集. 南京:中国药理学学会,2013.
- [34] PAN Z H, NING D S, FU Y X, et al. Preparative isolation of piceatannolderivatives from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds by high-speed countercurrent chromatography combined with high-performance liquid chromatography and screening for α -Glucosidase inhibitory activities[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2020,68(6):1555–1562.DOI:10.1021/acs.jafc.9b04871.
- [35] HUANG L, PENG T, LI Y, et al. Isolation and purification of four phenolic glycoside isomers from the leaves of *Idesiapolycarpa* Maxim. by high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatographic Science,2020,57(10):901–909.DOI:10.1093/chromsci/bmz063.
- [36] 王尉,贺天雨,兰韬,等. 高速逆流色谱结合制备液相色谱法分离制备葡萄籽中的多酚[J]. 色谱,2019,37(11):1193–1199. DOI:10.3724/SP.J.1123.2019.05024.
- [37] FANG L, ZHANG H, ZHOU J, et al. Rapid screening and preparative isolation of antioxidants from *Alpinia officinarum* Hance using HSCCC coupled with DPPH-HPLC assay and evaluation of their antioxidant activities[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry,2018(1):1–6. DOI:10.1155/2018/3158293.
- [38] 林楠,王尉,高峡,等. 高速逆流色谱-重结晶法制备高纯度三尖杉宁碱和紫杉醇[J]. 分析仪器,2018,6(1):184–189.DOI:10.3969/j.issn.1001-232x.2018.01.034.
- [39] KAN X H, YAN Y M, RAN L W, et al. Ultrasonic-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of zeaxanthin dipalmitate from the fruits of *Lycium barbarum* L. [J]. Food Chemistry,2020,310. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125854.
- [40] SHAO P, ZHANG J F, CHEN X X, et al. Microwave-assisted extraction and purification of chlorogenic acid from by-products of *Eucommia Ulmoides Oliver* and its potential anti-tumor activity[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52: 4925–4934. DOI:10.1007/s13197-014-1571-8.
- [41] JIANG W H, SHAN H, SONG J Y, et al. Separation and purification of ombuoside from *Gynostemma pentaphyllum* by microwave-assisted extraction coupled with high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatographic Science, 2017,55: 69–74. DOI:10.1093/chromsci/bmw152.
- [42] LI S N, GUO L P, LIUC M, et al. Application of supercritical fluid extraction coupled with counter-current chromatography for extraction and online isolation of unstable chemical components from *Rosa damascene*[J]. Journal of Separation Science, 2013, 36(13): 2104–2113. DOI:10.1002/jssc.20130324.
- [43] GONG Y, HUANG X Y, LIU J F, et al. Effective on-line high-speed shear dispersing emulsifier technique coupled with high-performance countercurrent chromatography method for simultaneous extraction and isolation of carotenoids from *Lycium barbarum* L. fruits[J]. Journal of Separation Science,2020, 43(14): 2949–2958. DOI:10.1002/jssc.202000215.
- [44] YU J Q, ZHAO L, SUN X W, et al. Application of choline chloride deep eutectic solvents and high-speed counter-current chromatography to the extraction and purification of flavonoids from the thorns of *Gleditsia sinensis* Lam[J]. Phytochemical Analysis, 2021, 32(4): 457–456. DOI:10.1002/pca.2993.
- [45] 王岱杰,闫慧娇,崔莉,等. 芝麻素标准样品的研制[J]. 中国油脂,2018,43(9):144–148.DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2018.09.031.
- [46] 王岱杰,林云良,耿岩玲,等. 厚朴酚标准样品的研制[J/OL]. 天然产物研究与开发,2018(2018-04-12)[2020-11-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20180412.1134.006.html>.
- [47] 贺天雨,王尉,徐双双,等. 葛根素标准样品的研制[J]. 分析仪器,2018,3(2):82–89.DOI:10.3969/j.issn.1001-232.2018.02.017.
- [48] 林云良,耿岩玲,于金倩,等. 异补骨脂素标准样品的研制[J]. 分析试验室,2018,37(10):1165–1169. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2018.0226.
- [49] 耿岩玲,宋祥云,王晓,等. 白鲜碱标准样品的研制[J]. 时珍国医国药,2018,29(7):1603–1606. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2018.07.021.
- [50] 顾铭,苏志国. 高速逆流色谱用于天然产物分离和指纹图谱构建[J]. 生物加工过程,2003,1(2):59–62. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2003.02.014.
- [51] 顾铭,欧阳藩,苏志国. 高速逆流色谱法分离纯化丹参并尝试制订中药指纹图谱[J]. 生物工程学报,2003,19(6):740–744. DOI:10.13345/j.cjb.2003.06.020.
- [52] 顾铭,张贵峰,苏志国,等. 高速逆流色谱技术在丹参指纹图谱中的应用[J]. 中国药品标准,2005,6(6):7–12. DOI:10.19778/j.chp.2005.06.002.

收稿日期:2020-10-14