制备型高效液相色谱法及其在中药研究中的应用

□ 王永禄[1] 王丽瑶[2]

（1. 南京工业大学 江苏 南京 210009 2. 中国药科大学 江苏 南京 210009）

摘 要 本文介绍了制备型高效液相色谱法的研究概况，制备型高效液相色谱的特点，影响制备型高效液相色谱分离纯化的因素，及其在中药研究中的实际应用，并对制备型高效液相色谱的研究现状与发展方向做了总结。

关键词 制备型高效液相色谱法 制备型 HPLC 中药

高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）是上世纪60年代诞生的一种高效分离纯化技术。至今，HPLC已成为中药研究领域最重要和最有效的分离分析方法之一。HPLC按操作方式和目的可分为分析型和制备型两类。分析型高效液相色谱的目的是为了获得反映样品组成的信息，制备型高效液相色谱（preparative high performance liquid chromatography，PHPLC）目的是为了按一定的纯度要求，获得所需产品。近十几年来，随着人们对分离与纯化技术的不断探索，色谱分离技术得到了迅速发展，制备高效液相色谱法已成为当代高效分离与纯化技术的研究前沿，用于制备高纯度生物活性物质[1]。本文将就高效制备型液相色谱的原理及其在中药中的应用作一综述。

1 制备型高效液相色谱概述

1.1 制备型HPLC与分析型HPLC区别 制备型HPLC是在传统的分析型HPLC的基础上发展起来的一种高效分离纯化技术，但制备色谱不是分析色谱的简单放大，它与分析色谱有许多不同之处。分析色谱需要全面反映样品组成的信息，不需要收集特定的馏分，洗脱液通常废弃；而制备色谱中，目标产物的纯度、产量、生产周期、运行成本等成为主要的考虑因素，因此制备色谱与分析色谱在操作参数的优化上有很大不同。两者的比较可详见表1所示。

1.2 制备型HPLC分类 制备高效液相色谱根据待分离样品的负载量可分为两类，一类为研究开发型，另一类为工业生产型。研究开发型高效液相制备色谱属于实验室规模的制备分离，样品量为微克级至克级，分离的样品一般供生物活性测试、结构鉴定以及作为标准品等。这类色谱中经济效益并不是首要考虑的因素，对仪器装置要求不高，任何达到预期分离目标的仪器均可使用。对于工业生产型制备高效液相色谱，经济效益是其整个纯化过程考虑的核心因素，纯

化样品量为千克至吨级。这两类制备色谱的在其柱设计上也有很大不同，实验规模制备分离所用色谱柱的设计、填充及操作与常用分析柱基本相同，其内径一般为10～50mm，但大规模生产所用制备柱的内径通常大于50mm，为了得到高效柱，其柱型及结构与前者不同，对填料及其填充技术要求也更高[2]。

表1　制备型HPLC与分析型HPLC区别

	分析型HPLC	制备型HPLC
目的	获得样品的定量定性信息	分离、富集或纯化样品成分
样品量	<0.5mg	半制备型HPLC：≤100mg；制备型HPLC：0.1－100g；工业生产型HPLC≥0.1kg
进样模式	批操作	批操作连续操作
上样量	尽可能小，基本范围：10^{-10}－10^{-3}样品/柱填料（g/g）	尽可能大，基本范围：0.001－0.1样品/柱填料（g/g）
流速	1.0ml/min	>10ml/min
理论基础	线性色谱	非线性色谱

1.3　影响制备型HPLC分离纯化的因素　在对制备型HPLC分离纯化过程进行优化时，影响因素有很多，包括色谱柱的柱径、柱长、填料尺寸、上样量以及流动相的组成、流速等各种因素。

1.3.1　*柱尺寸*　现代高效制备液相色谱柱具有柱短、内径大、呈圆饼状（pancake）的特征。目前高效制备柱的柱长与常规分析柱相仿，一般为20～50cm，远短于传统柱长lm甚至lm以上的制备柱，而内径为10～1000mm，因此可以在较大的流速下不致产生很高的柱压降，从而获得较高的产率[2]。王志祥等[3]考察了柱尺寸对柱效和分离度的影响，认为增加柱长虽然可以提高制备分离效果，但柱长的增加将显著提高柱前压。因此，在制备型HPLC分离过程中，为了提高分离效率，可以采用增加柱长的办法。但在满足分离度的前提下，应尽量使用较短的制备柱。为了提高制备量，可以使用内径较大的制备柱，但随着色谱柱内径的增加，会产生柱放大效应，使得柱效降低，导致总分离效果下降。因此，在制备型HPLC分离过程中，在满足分离度要求的前提下，可以采用增加制备柱内径的方法提高制备量。

1.3.2　*高效制备填料*　一般来说，分析HPLC中的填料可考虑用于制备HPLC中，但制备色谱由于填料使用量大，故对填料尤其是用于大规模工业化色谱中的填料有其特殊的要求。高效制备填料一般具有机械强度高，负载量高，粒度分布范围窄，填料各批量之间重现性好等特点。通常制备型HPLC每米的塔板数在20000以上，有的甚至可达到与分析柱相仿的柱效[2,4]。王志祥等[5]考察了填料尺寸对柱效和分离度的影响，认为采用小粒径的色谱填料可以明显提高柱效和分离度，但填料粒径越小，柱压降越大，受到泵能力的制约。因此，在制备分离过程中，对于难分离物系，可以采用较小粒径的色谱填料，以提高分离效率。但在满足分离要求的前提下，使用较大粒径的色谱填料，可以获得较大的生产能力，而且填料价格相对便宜，因而更为有利。

1.3.3　*装柱技术*　传统的装柱法有干法和匀浆法。上世纪70年代，人们开始尝试动态压缩装柱法，主要有轴向压缩法、径向压缩法和环向压缩法。其中动态轴向压缩法（dynamic axial compression，DAC）填装的色谱柱柱床均匀、性能稳定、柱效高。目前，DAC柱已基本上主宰了整个制备型色谱柱市场，柱径已从25mm发展到1.6m[6,7]。

1.3.4　*柱型*　制备高效色谱柱按柱型可分为锥型柱与圆柱型柱两大类。马继平等[8]研究了不同色谱柱柱型对柱效的影响。将锥型柱同有相同长度、相同容积的圆柱型柱的柱效、样品容量及峰高进行比较，结果表明：锥型柱优于圆柱型柱，锥型柱的样品容量约为圆柱型柱的2倍，柱效比圆柱型柱高36%，色谱流出曲线峰值高于圆柱型柱12%。

1.3.5　*上样量*　制备型HPLC为了提高柱产量，一

般需采用柱超载方式进行操作。提高处理量可以采用两种操作方式：一种是使用小的注入体积，但增加样品浓度，即所谓的“质量超载”。另一种是保持较小的样品浓度，但增加样品体积，即所谓的“体积超载”。王志祥等[9]认为在满足分离要求的前提下，可以采用柱超载方式操作，以提高制备量。当一次操作所要处理的样品量较小时，采用质量超载方式更为有利。当一次操作所要处理的样品量较大时，采用体积超载方式更为有利。

1.3.6 *流动相的流速* 现代高效制备液相色谱法具有流动相流速高的特点。流动相的线速一般在5～l0cm/min，以便提高产率，降低生产成本[2]。

除上述因素外，柱头设计、样品粘度、流体摩擦热等因素都会对柱效有所影响[10]。

2 制备高效液相色谱在中药研究中的应用

目前，制备型HPLC在中药研究中的应用主要体现在标准品的制备与样品的分离纯化方面。

2.1 **用于标准品的制备** 茶氨酸是影响茶叶品质的重要组成部分，约占茶叶中游离氨基酸的40%以上，占茶叶干重的1～2%。药理学研究表明茶氨酸能拮抗咖啡碱引起的神经系统兴奋，同时具有降压作用。随着茶氨酸的保健功效逐渐为人们所认识，对茶氨酸的需求量不断上升。目前，仅日本有少量的茶氨酸对照品，且价格较贵，限制了对其进一步的研究与应用。肖伟涛等[11]采用制备高效液相色谱技术分离纯化茶氨酸对照品，纯度达到98%以上，制备收率大于60%。方法简便，生产周期短、费用低，茶氨酸产品可用作分析方法的对照品。

苯乙醇苷类化合物为传统补益中药肉从蓉的有效成分，该类化合物有明显提高记忆功能、抗衰老、助阳等作用。松果菊苷是肉从蓉中含量较高的一种苯乙醇苷类化合物，在以管花肉从蓉［Cistanche tubulosa (Schenk) R. Wight］为原料制成的国家级二类新药——苯乙醇总苷中其质量分数高达48%。但目前国内外还未见有松果菊苷标准品出售。雷厉等[12]利用反相制备高效液相色谱法从管花肉从蓉的乙醇提取物中纯化制备了松果菊苷的标准品，纯度达到98%以上。该方法操作简便，重现性好，可用于松果菊苷及其它苯乙醇苷类化合物的大量制备。

罗汉果甜苷Ⅴ（mogroside Ⅴ）我国传统出口商品罗汉果中的主要甜味成分，具有甜度高、热量低、水溶性好等优点。药理研究表明，罗汉果甜苷Ⅴ具有镇咳、祛痰以及增强免疫等功效[13]。但目前市场上还没有罗汉果甜苷Ⅴ的标准品出售。余丽娟等[14]利用半制备高效液相色谱法得到罗汉果甜苷Ⅴ标准品，纯度达98.5%。方法具有操作简便、重现性好、产品纯度高等优点。为研究mogroside Ⅴ单体的活性及体内药物学过程提供了方便，也为制备其他罗汉果三萜苷类标准品提供了有益的参考。以甜苷Ⅴ作为罗汉果中的含量测定的指标，对于确定罗汉果品质的好坏、指导罗汉果的收购和罗汉果甜苷产品的生产具有重要意义。

2.2 **用于样品的分离纯化** 石衫碱甲（Huperzine A）是一种可逆性乙酰胆碱酯酶抑制剂，对重症肌无力、记忆力减退以及老年痴呆等症状有较好的疗效。石杉碱甲已有的生产工艺是生药用溶剂提取、柱层析分离、反复重结晶等工序，周期长，费用大。为此，杨明等[15]建立了用制备型HPLC制备石衫碱甲的方法。每次进样3g石杉总生物碱，可以得到将近180mg Huperzine A，纯度达到>90%的工艺要求，重复性良好。与常规的分离方法比较，HPLC法制备石杉碱甲具有操作简单，重复性好，周期短，成本低廉等特点。

绿原酸具有抗菌、抗病毒、利胆、增高白血球及兴奋中枢神经系统等功效。国外多以咖啡豆和金银花为原料提取绿原酸。有实验结果表明，杜仲叶片中绿原酸的含量与金银花的相当，而且资源丰富，价格低廉。目前，国内外对杜仲中绿原酸高纯单体的分离多采用硅胶或大孔吸附树脂反复柱层析或多级萃取，再采用重结晶法得到少量纯品。彭密军等[16]采用制备高效液相色谱技术，从杜仲叶提取物中分离纯化得到高纯活性成分绿原酸，绿原酸的纯度达98.61%。同时，彭密军等人认为流速及洗脱方式对绿原酸的分离情况有较大影响，提出并应用了流动相速度梯度洗脱方法，该方法可以缩短分离时间，保持较高的分辨率，同时还能降低试剂的用

量。此外，彭密军等[17]还利用制备高效液相－台阶梯度法分离纯化了杜仲中三种环烯醚萜化合物。结果表明，产品纯度均可达到95%以上，其中京尼平苷酸的产率可高达100.89mg/h。

表没食子儿茶素没食子酸酯（EGCG）是绿茶中主要活性成分之一，具有抗血栓、抗衰老、抗癌等药理功能，现已成为医药、食品领域研究的热点。目前，EGCG的提取技术目前主要还沿袭传统的有机溶剂提取法，其工艺繁琐、周期长且提取效率低。Jung Il Kim等[18]采用反相高效液相制备色谱法，从绿茶中分离纯化表没食子儿茶素没食子酸酯（epigallocatechin gallate，EGCG），并讨论了固定相颗粒度及流动相流量对EGCG分离纯化工作的影响。实验结果表明，在粒径为15μm和40－63μm时EGCG可以得到相对良好的分离；但当粒径为150μm时，EGCG的纯度由于受表儿茶素（epicatechin，EC）的影响而有所下降。此外，随固定相粒径的增加，流动相流量也应相应加大。如果制备具有抗氧化和抗癌活性的EGCG与EC的混合物，可以采用150μm粒径的填料。

3 结　语

制备型HPLC是制备纯化天然产物的一种很有效的手段，具有产品纯度高、产率高、分离速度快等优点。然而，现有的理论结构还不够完善，应加大其理论研究，尤其是对优化操作条件的系统研究，以进一步完善这项技术。制备型HPLC未来的发展趋势是开发大规模工业化过程，但由于对其升级放大方面的研究还不成熟，限制了制备型HPLC的工业化发展。

相信随着制备型HPLC理论的不断完善，中药现代化的迅速发展，制备高效液相色谱法会在中药研究中显示出广阔的应用前景。

参考文献

[1] Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M. Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation [J]. Plant Growth Regulation, 1997, 8 (4): 375－376.

[2] 李瑞萍，黄骏雄. 高效制备液相色谱柱技术的研究进展 [J]. 化学进展，2004，16 (3)：273－283.

[3] 王志祥，张志炳，何志敏，等. 制备型高效液相色谱分离过程的放大研究（Ⅱ）柱尺寸 [J]. 化工时刊，2001，15 (2)：22－24.

[4] 王学军，赵锁奇，王仁安. 制备色谱技术进展 [J]. 青岛大学学报，2001，16 (4)：92－97.

[5] 王志祥，张志炳，何志敏，等. 制备型高效液相色谱分离过程的放大研究（Ⅰ）填料尺寸 [J]. 化工时刊，2001，15 (1)：28－31.

[6] Joon Ho Koh, B. Scott Broyles, Hong Guang－sajonz, et al. Consolidation and column performance of several paching materials liquid chromatography in a dynamic axial compression colunmn [J]. Chromatogr. A, 1998, 13 (8)：223－238.

[7] 韩金玉，魏文英，常贺英，等. 制备型液相色谱动态轴向压缩柱技术和应用 [J]. 色谱，2004，22 (4)：403－407.

[8] 马继平，陈令新，谭　峰，等. 锥型与圆柱型液相色谱制备柱的比较研究 [J]. 分析化学，2003，31 (11)：1317－1321.

[9] 王志祥，张志炳，何志敏，等. 制备型高效液相色谱分离过程的放大研究（Ⅲ）操作方式 [J]. 化工时刊，2001，15 (3)：21－24.

[10] 马继平，关亚风. 制备液相色谱的流型研究 [J]. 化学进展，2003，15 (1)：25－30.

[11] 肖伟涛，朱小兰，陈　波，等. 制备高效液相色谱分离纯化茶氨酸对照品 [J]. 中草药，2004，35 (2)：148－150.

[12] 雷　厉，宋志宏，屠鹏飞，等. 反相高效液相色谱法制备松果菊苷标准品 [J]. 色谱，2001，19 (3)：200－202.

[13] 周欣欣. 罗汉果的化学成分及其开发应用 [J]. 中医药学刊，2003，21 (9)：1482－1483.

[14] 余丽娟，陈全斌，义祥辉，等. 高效液相色谱法制备罗汉果甜甙Ⅴ标准品 [J]. 色谱，2003，21 (4)：397－399.

[15] 杨　明，姚志伟，赵毅民，等. HPLC法制备石杉碱甲 [J]. 解放军药学学报，2003，19 (50)：352－354.

[16] 彭密军，周春山，钟世安，等. 制备型高效液相色谱法分离纯化绿原酸 [J]. 中南大学学报（自然科学版），2004，35 (3)：408－412.

[17] 彭密军，周春山，董朝青，等. 制备液相色谱－台阶梯度法分离纯化杜仲中三种环烯醚萜化合物 [J]. 色谱，2004，22 (2)：184.

[18] Jung Il Kim, Seung Bum Hong, Kyung Ho Row. Effect of particle size in preparative reversed－phase high－performance liquid chromatography on the isolation of epigallocatechin gallate from Korean green tea [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 949：275－280.