

硅胶柱色谱-高速逆流色谱法分离纯化羌活中佛手柑内酯

胡利锋¹, 廖晓兰¹, 柏连阳^{1,2*}, 周小毛¹

1. 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128

2. 湖南人文科技学院 农业科学研究所, 湖南 娄底 417000

摘要: 目的 以羌活的根和根茎为原料, 建立硅胶柱色谱-高速逆流色谱(HSCCC)法制备分离羌活中佛手柑内酯的方法。方法 羌活粗提物先经过硅胶柱色谱初步分离, 富集目标化合物; 组分 Q₅ 再经过 HSCCC 分离, 以正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(5:5:4:5)为溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相; 经气-质及核磁共振氢谱、碳谱鉴定化合物的结构。结果 经过 HSCCC 分离后, 从 300 mg Q₅ 样品中一次性分离得到佛手柑内酯 37.6 mg, 经 HPLC 检测其质量分数达到 99.1%。结论 该方法操作简便、高效, 为制备高纯度的佛手柑内酯提供了一条新途径。

关键词: 硅胶柱色谱; 高速逆流色谱; 羌活; 香豆素; 佛手柑内酯

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)06-0701-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.013

Separation and purification of bergapten from *Notopterygii Rhizoma et Radix* by silica gel column and high-speed counter-current chromatography

HU Li-feng¹, LIAO Xiao-lan¹, BAI Lian-yang^{1,2}, ZHOU Xiao-mao¹

1. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Agriculture Research Institute, Hunan Institute of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, China

Key words: silica gel column chromatography; high-speed counter-current chromatography; *Notopterygii Rhizoma et Radix*; coumarins; bergapten

羌活为伞形科羌活属植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 或宽叶羌活 *N. franchetii* Boiss. 的干燥根和根茎, 具有散寒祛风、除湿止痛等功效; 用于治疗风寒感冒、头痛、风湿痹痛、肩背酸痛等症^[1]。羌活主要含有挥发油、香豆素类化合物, 除此之外还含有糖类、氨基酸、有机酸、甾醇等成分^[2]。香豆素类化合物是羌活主要的非挥发性成分, 其中作为多种中药材中主要的香豆素类成分之一的佛手柑内酯具有抗癌作用^[3-5]、并可能与一些中药镇痛的效应有关^[6]。此外, 华燕青等^[7]研究发现, 佛手柑内酯对粘虫和菜青虫具有较强的拒食活性。近年来, 关于羌活的指纹图谱^[8-10]和化学成分^[11-13]已有较深入的研究, 但是有关羌活中佛手柑

内酯分离鉴定的研究尚未见报道。因此, 建立佛手柑内酯单体化合物的高效制备技术对羌活的质量控制和进一步开发应用具有重要意义。

传统的硅胶柱色谱分离量大, 但存在耗时长、溶剂消耗量大、分离效率低等缺点。高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)法是一种能够在数小时内即可实现毫克级样品分离制备的方法, 目前在天然和人工合成产物的分离和纯化方面得到了广泛的应用^[14-15]。本实验采用硅胶柱色谱法对羌活无水乙醇粗提物进行初分并富集, 用 HSCCC 法对其进行进一步分离, 结合利用两种色谱法的优点, 从中分离制备出一种高纯度的香豆素类化合物, 经 GC-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171891); 湖南省自然科学基金重点项目(10JJ2020)

作者简介: 胡利锋(1980—), 男, 湖南邵阳人, 在职博士, 讲师, 研究方向为天然产物的分离与应用。

Tel: (0731)84618169 E-mail: hfl28lucky@126.com

*通信作者 柏连阳 Tel: (0731)84673707 E-mail: bailianyang2005@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-01-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130109.1525.004.html>

定其为佛手柑内酯。本方法实现了经济、快速、有效分离佛手柑内酯的目的,为羌活的进一步开发应用提供了参考依据。

1 仪器与材料

KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TBE-300A 高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司);N2000 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);LC 10 AT-VP 高效液相色谱仪(日本岛津公司),Ultimate C₁₈ 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。5973/6980 气质联用仪(美国安捷伦公司);Varian Inova-300 核磁共振仪器(美国瓦里安公司)。

200~300 目柱层析硅胶(青岛裕民源硅胶试剂厂),GF 254 硅胶板(青岛海洋化工厂)。正己烷、石油醚、甲醇、醋酸乙酯等为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。色谱甲醇(美国 Tedia 天地试剂公司)。羌活药材购于湖南省药材公司,经湖南农业大学中药资源与开发系肖深根教授鉴定为羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 HPLC 分析条件

色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇(A)-水(B),梯度洗脱程序:0~15 min, 45%~50% A; 5~20 min, 50%~55% A; 20~25 min, 55%~55% A; 25~30 min, 55%~65% A;柱温 30 ℃,体积流量 1 mL/min,检测波长 330 nm。

2.2 羌活粗提物的制备

将干燥的羌活根和根茎粉碎。称取羌活粉(过 40 目筛)500 g,以无水乙醇为提取溶剂,分多次用索氏提取器在 90 ℃的水浴中回流提取 6~8 h,直至提取液无色为止,浓缩得到 120 g 胶状物置于冰箱中备用。

2.3 硅胶柱色谱初步分离

实验发现,直接以羌活粗提物为 HSCCC 进料原料时,由于组分过于复杂,达不到理想的分离效果。采用硅胶柱色谱法进行初分,可以去掉大部分杂质,使目的组分得到较大程度的富集。分别考察了石油醚-丙酮、石油醚-醋酸乙酯洗脱系统,经过 TLC 分析,结果显示选用石油醚-丙酮作为洗脱系统时的分离效果不如石油醚-醋酸乙酯,因此最终选择石油醚-醋酸乙酯系统进行硅胶柱色谱洗脱。取经无

水乙醇提取的羌活粗提物 50 g 用硅胶柱色谱进行初步分离,以石油醚-醋酸乙酯(8:2、7:3、6:4、5:5)进行梯度洗脱收集。经薄层色谱(TLC)检验合并相同馏分,得到 Q₁~Q₁₀ 组分,经 HPLC 检测发现组分 Q₅(3.9 g)中的化合物在 330 nm 处有较强的吸收,异羟肟酸铁显色反应呈红色,初步确定 Q₅ 中有香豆素类化合物存在,且为几种物质的混合物(图 1)。将其冷冻干燥,用于 HSCCC 进一步分离纯化。

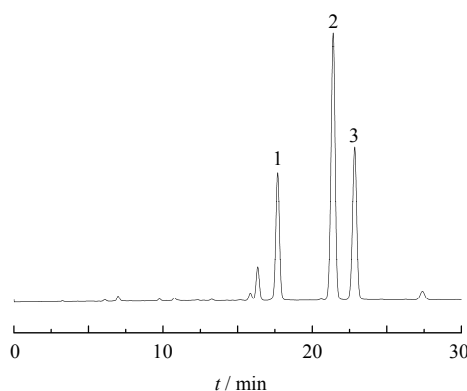


图1 组分 Q₅ 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of fraction Q₅

2.4 HSCCC 溶剂体系的选择

选择合适的两相溶剂系统对于 HSCCC 的成功分离非常关键^[14]。对于 HSCCC 来说,分配系数 K 值满足 $0.5 \leq K \leq 2$ 时为较理想的范围,而 K 值的最佳范围为 $0.5 \leq K \leq 1$ ^[16]。本实验中通过测定 K 值来选择 HSCCC 的溶剂体系。将不同溶剂按比例配制,混匀,静置平衡后取适量粗提物用下相溶解,取样 10 μL 经 HPLC 检测,峰面积记为 A_1 ;再取该下相 2 mL 与等体积的上相充分混合,静置分层后取 10 μL 下相进行 HPLC 检测,峰面积记为 A_2 ;则 $K = (A_1 - A_2) / A_2$ 。

不同溶剂体系的 K 值见表 1。可以看出,1 和 5 两种溶剂体系各化合物的 K 值都偏大。而 4 组分 1 和 2 的 K 值相差太小,难以对其进行分离。2、3 的 K 值处在理想范围之内,选用体系 2、3 进行 HSCCC 分离,结果表明体系 3 的分离效果更好,因此确定正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水为 5:5:4:5 作为 HSCCC 分离的溶剂体系。

2.5 HSCCC 分离制备

将选好的溶剂体系按比例配制,充分混匀后在室温下静置过夜。使用前,将达到分配平衡的两相溶剂体系分开后分别放入棕色试剂瓶中,超声脱气

表1 不同溶剂体系的 K 值

Table 1 K values of components in different solvent systems

编号	溶剂体系	K		
		组分 1	组分 2	组分 3
1	石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:4.8:5)	2.10	2.51	4.99
2	石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:5:4)	0.64	0.74	1.12
3	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:4:5)	0.56	0.63	0.74
4	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:4:6)	0.76	0.81	0.97
5	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (3:5:4:6)	3.75	4.73	6.02

30 min。将上相（固定相）以 20 mL/min 的体积流量泵入 HSCCC 的分离管中，待上相充满整个分离管后，调节主机的转速为 850 r/min，待转速稳定后，以 1.8 mL/min 的体积流量泵入下相（流动相）。当两相平衡后，称取经过硅胶柱色谱分离获得的组分 Q_5 样品 300 mg，用 10 mL 下相超声溶解，从进样口加入。紫外检测波长为 254 nm，按照色谱峰收集目标成分。

用溶剂体系 3 对组分 Q_5 进行分离，固定保留率为 75%(图 2)。总的分离时间为 8 h，手动收集 360~430 min 流出液，减压干燥得到 37.6 mg 的组分 F，为淡黄色针状结晶，经 HPLC 检测，面积归一化测定其质量分数达到 99.1% (图 3)。

2.6 单体化合物的鉴定

采用 GC-MS、 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 鉴定分离所得到的组分 F。GC-MS: m/z 216 [M], 201, 187, 173, 145, 89; ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ : 8.17 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-4), 7.60 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-12), 7.14 (1H, s, H-8), 7.03 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-11), 6.28 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 4.28 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -NMR (D_2O , 300 MHz): δ : 161.31 (C-2), 158.37 (C-7), 152.68 (C-9), 149.55 (C-5), 144.79 (C-

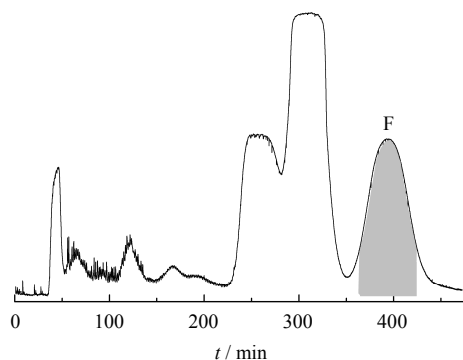


图2 组分 Q_5 的 HSCCC 图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of component Q_5

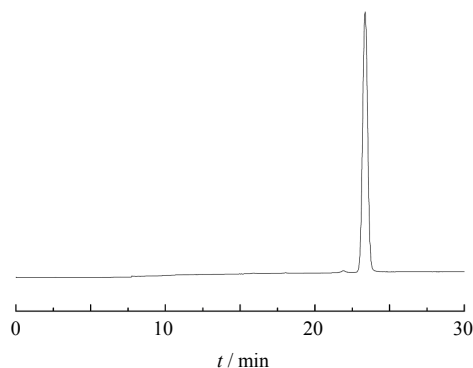


图3 组分 F 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of component F

12), 139.33 (C-4), 112.61 (C-3), 112.53 (C-6), 106.36 (C-10), 105.07 (C-11), 93.83 (C-8), 60.07 ($-\text{OCH}_3$)。上述波谱数据与文献报道基本一致^[4,17]，可推测该化合物为佛手柑内酯。

3 讨论

由于佛手柑内酯具有较强的药理活性，对该化合物的研究具有较大的实用价值。佛手柑内酯等香豆素类化合物为羌活中的主要活性成分，该类化合物在结构和活性方面非常相似，采用传统的硅胶柱色谱分离纯化羌活中的香豆素不仅溶剂消耗量大、费时，而且化合物纯度难以达到理想的效果。本实验采用硅胶柱色谱和 HSCCC 相结合的方法分离制备羌活中的佛手柑内酯，羌活粗提物首先经过硅胶柱色谱分离，富集目标化合物，然后采用 HSCCC 将佛手柑内酯与其他组分分离。实验结果表明，通过这两种方法的联用可以分离制备高纯度的佛手柑内酯。该方法简便、高效、快速，为从羌活中分离纯化佛手柑内酯提供了技术参考，为佛手柑内酯的进一步开发应用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李云霞, 高春华, 沙明. 中药羌活化学成分及药理作

- 用研究进展 [J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 6(1): 22-23.
- [3] 王志国, 何 德, 金 洪, 等. 无花果抗癌作用的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(11): 2183-2186.
- [4] 董 芳, 刘汉柱, 孙 阳, 等. 北沙参中佛手柑内酯的分离鉴定及体外抗肿瘤活性的初步测定 [J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(1): 95-96.
- [5] 王俏先, 张香莲, 高 凌, 等. 无花果抗癌作用的研究 [J]. 癌症, 1999, 9(3): 223-225.
- [6] 崔秋兵, 张 艺, 兰 莎. 白芷镇痛作用物质基础研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 102-104.
- [7] 华燕青, 李广泽, 陈安良, 等. 藁本中杀虫活性成分的分离与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(增刊): 54-56.
- [8] 刘志刚, 李发美. 羌活的 HPLC 指纹图谱 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(1): 89-91.
- [9] 王海波, 邸 学, 包永睿, 等. 中药羌活 HPLC-荧光指纹谱研究 [J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 568-572.
- [10] Qian G S, Wang Q, Leung K S Y, *et al.* Quality assessment of *Rhizoma et Radix Notopterygii* by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(3): 812-817.
- [11] 李丽梅, 梁宝德, 愈绍文, 等. 羌活的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 351-354.
- [12] 张文学. 中药羌活的化学成分研究 [J]. 山西中医学院学报, 2008, 9(4): 45-46.
- [13] Yang X W, Zhang P, Tao H Y, *et al.* GS-MS analysis of essential oil constituents from rhizome and root of *Notopterygium incisum* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2006, 15(3): 172-177.
- [14] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1065(2): 145-168.
- [15] 冯雪娇, 任 虹, 曹学丽, 等. 鸡血藤中黄酮成分的高速逆流色谱分离及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2244-2247.
- [16] Han S. Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 971(1/2): 237-241.
- [17] 徐希科, 胡 疆, 柳润辉, 等. 无花果根化学成分研究 [J]. 药学服务与研究, 2005, 5(2): 138-140.