

高速逆流色谱分离制备裂叶独活中香豆素类成分

严志宏¹, 黄秀珍², 顿珠次仁³, 刘志勇¹, 熊耀坤¹, 谢一辉¹, 朱根华^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004
2. 抚州市第一人民医院, 江西 抚州 344000
3. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000

摘要: **目的** 建立高速逆流色谱(HSCCC)法从裂叶独活根中分离制备高质量分数的香豆素类成分。**方法** 利用高效液相色谱-二极管阵列检测器分析优化溶剂体系, 选择正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1.5:2.5:2:1.5)为HSCCC溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 主机转速为850 r/min, 体积流量为3 mL/min, 检测波长为323 nm。所接收馏份在50 °C减压浓缩, 静置得到蛇床子素晶体、二氢欧山芹醇乙酸酯晶体和二氢欧山芹醇当归酸酯晶体, 应用核磁共振氢谱、碳谱、质谱、红外光谱等进行鉴定, 并用HPLC测定质量分数。**结果** 进样量为300 mg浸膏, 得到二氢欧山芹醇乙酸酯6.3 mg、蛇床子素10.6 mg、二氢欧山芹醇当归酸酯6.4 mg, 三者的质量分数均达到96.0%以上。**结论** HSCCC法可用于裂叶独活中高质量分数香豆素类成分的快速分离制备。

关键词: 高速逆流色谱; 裂叶独活; 香豆素; 二氢欧山芹醇乙酸酯; 蛇床子素; 二氢欧山芹醇当归酸酯

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)20-3023-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.20.010

Separation and purification of coumarins from *Heracleum millefolium* by high-speed counter-current chromatography

YAN Zhi-hong¹, HUANG Xiu-zhen², DUN Zhu-ciren³, LIU Zhi-yong¹, XIONG Yao-kun¹, XIE Yi-hui¹, ZHU Gen-hua¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. The First People's Hospital of Fuzhou, Fuzhou 344000, China
3. College of Tibetan Medicine, Lhasa 850000, China

Abstract: Objective To separate and purify coumarins from *Heracleum millefolium* by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). **Methods** HPLC was used to analyze and optimize the solvent system and hexane-ethyl acetate-water-methanol (1.5 : 2.5 : 2 : 1.5) was chosen as the two-phase solvent system of HSCCC, in which the upper phase was used as the stationary phase, while the lower phase was used as the mobile phase with flow rate of 3 mL/min, the revolution speed was set at 850 r/min, and detected at 323 nm. Three compounds were obtained as crystals by vacuum concentration at 50 °C, and determined through HPLC, then their structures were identified by IR, ESI-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. **Results** Columbianetin acetate (6.3 mg), osthole (10.6 mg), and columbianadin (6.4 mg) were obtained from crude sample (300 mg) extracts and their purity were above 96.0%. **Conclusion** HSCCC is a powerful technique for the rapid separation and purification of coumarins from crude extract of *H. millefolium*.

Key words: high-speed countercurrent chromatography; *Heracleum millefolium* Diels; coumarins; columbianetin acetate; osthole; columbianadin

裂叶独活 *Heracleum millefolium* Diels 为伞形科 独活 (秦岭植物志), 产于我国西藏、青海、甘肃、
(Umbelliferae) 独活属, 又名藏当归 (青海)、千叶 四川、云南, 属于高海拔药材。裂叶独活传承了藏

收稿日期: 2015-03-19

基金项目: 江西省科技支撑计划 (20112BBG70021); 江西中医药大学道地药材及特色中药资源研究专项; 西藏自治区自然科学基金资助项目 (2015ZR-14-65)

作者简介: 严志宏 (1977—), 男, 讲师, 研究方向为新型材料及化学分析技术研究。Tel: (0791)87118768 E-mail: yanzhihong03@126.com

*通信作者 朱根华, 男, 讲师, 研究方向为中药学。Tel: (0791)87118825 E-mail: zgh971029@163.com

药效果快、药力强、纯净、天然、无污染的特点，以干燥全草入药，味苦、辛，性平，消散肿胀、破除癥结痞块。饶高雄等^[1]从裂叶独活中分离鉴定了11个化学成分，其中香豆素类成分有4个。文献调研显示裂叶独活化学成分研究报道较少，因此，进一步阐明裂叶独活中的化学成分，对研究其药效物质基础、质量控制、现代藏药的开发等具有重要意义。查阅大量文献，未见关于裂叶独活活性成分的研究。据报道，香豆素成分广泛存在于独活属植物中，其中二氢欧山芹醇当归酸酯具有很好的抗炎、镇痛效果^[2]；蛇床子素在癌症和肝脏、脑部疾病等方面发挥重要作用^[3-5]；二氢欧山芹醇乙酸酯可以明显抑制大鼠体外血小板的聚集^[6]。

高速逆流色谱（high-speed countercurrent chromatography, HSCCC）是20世纪80年代发展起来的一种连续高效的液-液分配色谱分离技术，被广泛应用于中药、食品、抗生素、蛋白质和多肽等分离制备方面^[7-13]。传统的制备分离单体方法存在耗时、溶剂消耗量大，而且污染环境等缺点，HSCCC具有无污染、无吸附、一次制备量大、操作简单、耗材低廉、所用溶剂少、分离时间短、制备样品纯度高优点，甚至可用于制备高质量分数的标准品^[14]。

本研究中采用溶剂提取法和液-液萃取法得到裂叶独活粗提物，以此粗提物为原料利用HSCCC进行化学成分的分离纯化，得到3种香豆素类化合物蛇床子素、二氢欧山芹醇乙酸酯和二氢欧山芹醇当归酸酯，质量分数均达到96.0%以上。该法简单、快速、高效，分离纯度高。目前还未见关于利用HSCCC法从裂叶独活中一次性分离纯化3种高质量分数的香豆素类成分的报道。该研究结果可为裂叶独活的药理药效、物质基础研究和临床应用研究提供有用参考和信息，同时也为香豆素类成分的制备分离提供一种快速、简单、高效的方法。

1 仪器与材料

TBE-300C型高速逆流色谱仪，上海同田生物技术股份有限公司；Agilent1260型自动进样高效液相色谱仪、Agilent1260DAD检测器、Agilent C₁₈色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），美国安捷伦公司；Bruker Avance 400型超导核磁共振仪、VERTEX70型红外光谱仪，瑞士布鲁克公司；X-4A数字熔点测定仪，北京福凯仪器有限公司；N7001型旋转蒸发器，厦门精艺兴业科学仪器有限公司；Triple

QUAD 5500，ABSciex公司；高速多功能粉碎机，永康市绿可食品有限公司；SZ-93A型自动双重纯水蒸馏器，上海亚荣生化仪器厂；Milli-Q超纯水制备系统，美国Millipore公司；真空干燥箱，上海恒科学仪器有限公司；万分之一电子天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司。

石油醚（AR），沸程60~90℃，天津市恒兴化学试剂制造有限公司；正己烷（AR）、醋酸乙酯（AR）、95%乙醇（AR），上海泰坦科技公司，甲醇（AR），上海试一化学试剂有限公司；HPLC流动相中所使用的水均为Milli-Q超纯水，其他用水为双蒸水；甲醇为色谱级，美国Tedia试剂公司。

裂叶独活根采集于拉萨市当雄县，经西藏藏医学院实验标本中心达瓦讲师鉴定为裂叶独活*Heracleum millefolium* Diels的根，晒干后用于实验。样品保存于江西中医药大学药学院实验标本中心。

2 方法和结果

2.1 裂叶独活粗提物的制备

将裂叶独活在45℃下真空干燥12 h，粉碎过60目筛，称取1 000 g，用5倍量95%乙醇常温浸泡24 h，重复3次，合并上清液。将上清液减压浓缩得浸膏，加适量水混悬，用3倍量石油醚萃取5次，合并萃取液，减压浓缩得到20.9 g浸膏，得率为2.1%，常温保存备用。

2.2 溶剂系统筛选

以试管法结合HPLC法，测定HSCCC溶剂系统的分配系数（*K*）。取1 mg裂叶独活粗提物溶于上、下相各1 mL的溶剂体系中，振摇，静置，重新分层后，取等量的上、下相溶液分别用HPLC检测I、II、III号峰，用上相峰面积除以下相峰面积即得到*K*值。HSCCC最佳的*K*值一般为0.5~2.0，如果*K*值>2.0，则目标成分分离时间延长；当*K*值<0.5时，目标成分与其他成分重叠而不能分开^[10]，以此为依据，共考察了5个不同体积比的溶剂体系，见表1。根据*K*值，选择了第3种溶剂体系。

2.3 分离条件的优化

预实验结果表明，当流动相体积流量为2 mL/min时，III号峰完全出来共用了将近330 min，实验时间太长，尝试将体积流量改为3 mL/min，拟达到不影响分离效果的前提下缩短实验时间的目的，实验时间缩短为250 min；固定进样体积为20 mL，依次加大进样质量浓度为5、10、15、20、25、

表 1 不同溶剂体系 3 个组分 K 值

Table 1 K values of three compounds in different solvent systems

溶剂体系	K 值		
	组分 I	组分 II	组分 III
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 5 : 5 : 5 : 5	0.89	3.72	4.58
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 5 : 5 : 6 : 4	0.57	0.67	0.81
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 1.5 : 2 : 2.5 : 1.5	0.68	1.17	1.36
石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 5 : 5 : 5 : 5	0.51	3.25	3.78
石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 5 : 5 : 6 : 4	0.32	2.47	3.45

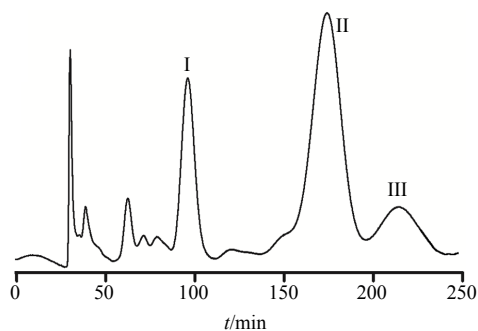
30 mg/mL, 发现以大于 15 mg/mL 为进样质量浓度时会有固定相流失, 所以实验选择进样质量浓度为 15 mg/mL, 尽量增加一次实验的制备量; 升高温度有利于增加固定相的保留率, 但是也会让两相的互渗性增加, 而且主机里的管路容易老化, 而降低仪器寿命, 因此保持循环水温度为 25 °C; 转速越快, 分离效果越好, 但是转速太快又会缩短主机里的皮带寿命, 综合考虑选择转速为 850 r/min。经优化后, 实验能够达到最优的分离效果, 且达到节省时间和保护仪器的目的, 固定相保留率达到 73%。

2.4 HSCCC 分离制备

以正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水 (1.5 : 2 : 2.5 : 1.5) 作为溶剂体系。将这 4 种溶剂按比例混合后, 强烈震荡, 静置分离上下相并超声脱气 20 min。开启循环水泵恒温装置, 使温度保持在 25 °C, 紫外检测吸收波长为 323 nm。将上相 (固定相) 以 30 mL/min 的体积流量泵入主机, 泵满后, 正转, 调转速为 850 r/min, 以 3 mL/min 的体积流量把下相 (流动相) 泵入主机。当只有下相从检测器流出时, 及体系达到流体动力学平衡时, 计算保留率为 73%。取上、下相各 10 mL 溶解 300 mg 裂叶独活粗提物浸膏溶液由进样阀注入分离管路。根据 HSCCC 色谱图手动收集各色谱峰馏份, 得到裂叶独活粗提物的 HSCCC 色谱图见图 1。所接收馏份在 50 °C 下减压浓缩、静置滤过得到晶体, 待测。

2.5 HPLC 测定分析

香豆素成分的 2 个最大紫外吸收区集中在 280、350 nm 附近^[14], 经 HPLC-DAD 检测可知, 二氢欧山芹醇乙酯的最大吸收峰在 330 nm 附近, 蛇床子素的最大吸收峰在 320 nm 附近, 二氢欧山芹醇当归酸酯的最大吸收峰在 325 nm 附近, 综合考虑, 实验选择 323 nm 作为检测波长。将 HSCCC 所得的 3 种晶体用甲醇溶解, 均制备成质量浓度为



I-二氢欧山芹醇乙酯 II-蛇床子素 III-二氢欧山芹醇当归酸酯
I-columbianetin acetate II-osthole III-columbianadin

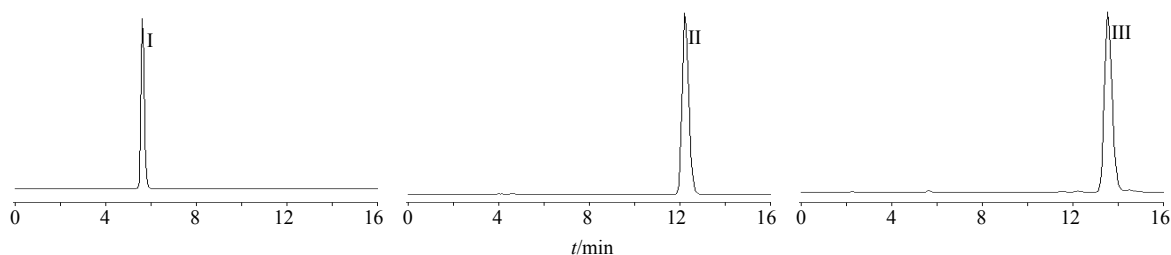
图 1 裂叶独活粗提取物 HSCCC 图谱

Fig. 1 HSCCC of crude extract from *H. millefolium*

100 μg/mL, 进样。流动相为甲醇-水 (70 : 30), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 20 °C, 检测波长为 323 nm, 进样量 5 μL。用 Agilent1260 色谱工作站进行质量分数分析。按峰面积归一化法计算质量分数, 测定结果为二氢欧山芹醇乙酯的质量分数为 98.1%, 称定质量为 6.3 mg, 得率为 2.1%; 蛇床子素质量分数为 97.3%, 称定质量为 10.6 mg, 得率为 3.5%; 二氢欧山芹醇当归酸酯质量分数为 96.9%, 称定质量为 6.4 mg, 得率为 2.1%。3 种晶体的 HPLC 图见图 2。

2.6 结构鉴定

组分 I: 白色粒状结晶 (甲醇-水 70 : 30), mp 133~134 °C; IR ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 1 728 (内酯环), 1 614, 1 580, 1 488, 1 453, 841; ESI-MS *m/z*: 288 [M]⁺ (甲醇), 228, 213, 203, 187, 176, 159, 131, 77, 59; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.21 (1H, d, *J* = 18.0 Hz, H-3), 7.65 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-4), 7.28 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 6.76 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 3.30 (2H, dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, H-3'), 5.15 (1H, dd, *J* = 18.0, 16.4 Hz, H-2'), 1.58 (3H, s, H-4'), 1.52 (3H, s, H-5'),



I-二氢欧山芹醇乙酸酯 II-蛇床子素 III-二氢欧山芹醇当归酸酯
I-columbianetin acetate II-osthole III-columbianadin

图2 HSCCC分离的3种晶体的HPLC图

Fig. 2 HPLC of three crystals obtained by HSCCC

2.01 (3H, s, OAc-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.1 (OAc-C=O), 160.8 (C-2), 112.3 (C-3), 143.8 (C-4), 128.8 (C-5), 106.6 (C-6), 163.9 (C-7), 113.4 (C-8), 151.3 (C-9), 113.4 (C-10), 27.6 (C-1'), 88.7 (C-2'), 82.1 (C-3'), 22.1 (C-4'), 22.0 (C-5'), 20.9 (OAc-Me)。以上数据与文献报道基本一致^[15-16], 故鉴定为二氢欧山芹醇乙酸酯。

组分 II: 无色块状结晶 (甲醇-水 70 : 30), mp 83~84 °C; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 1 720 (-C=O), 1 604, 1 562, 1 499 (Ar), 1 251 (-C-O); ESI-MS *m/z*: 244 [M]⁺ (甲醇), 229, 213, 201, 159, 131, 103, 89, 77, 63, 51; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.67 (3H, s, H-5'), 1.84 (3H, s, H-4'), 3.52 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 3.92 (3H, s, OCH₃), 5.22 (1H, m, H-2'), 6.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 7.28 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.61 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 6.23 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-3); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 160.2 (C-2), 113.0 (C-3), 143.6 (C-4), 126.2 (C-5), 107.4 (C-6), 161.2 (C-7), 113.0 (C-8), 152.9 (C-9), 118.1 (C-10), 21.9 (C-1'), 121.2 (C-2'), 132.5 (C-3'), 25.7 (C-4'), 17.8 (C-5'), 56.1 (OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 鉴定为蛇床子素。

组分 III: 白色针形结晶 (甲醇-水 80 : 20), mp 114~115 °C; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 1 710 (内酯环), 1 616, 1 579, 1 491 (Ar), 1 455, 1 385; ESI-MS *m/z*: 328 [M]⁺ (甲醇), 228, 213, 187, 159, 131, 83, 55, 43; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.21 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3), 7.63 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-4), 7.26 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 6.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 3.38 (2H, m, H-3'), 5.13 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-2'), 1.60 (3H, s, H-4'), 1.64 (3H, s, H-5'), 5.98 (1H, m, H-3''), 1.89 (3H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 3''-CH₃), 1.67 (3H, s,

2''-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 160.9 (C-2), 113.0 (C-3), 143.8 (C-4), 128.8 (C-5), 106.6 (C-6), 164.0 (C-7), 112.2 (C-8), 151.3 (C-9), 113.5 (C-10), 89.2 (C-2'), 27.6 (C-3'), 82.0 (C-4'), 21.2 (4'-CH₃), 22.3 (4'-CH₃), 167.1 (C-1''), 128.7 (C-2''), 137.3 (C-3''), 15.5 (2''-CH₃), 20.4 (3''-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[15,17], 鉴定为二氢欧山芹醇当归酸酯。

3 讨论

本实验采用 HSCCC 法, 以正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (1.5 : 2 : 2.5 : 1.5) 作为溶剂体系, 一次性从裂叶独活粗提物中分离制备到 3 种香豆素类化合物, 质量分数均高于 96%。裂叶独活作为一种藏药, 相对研究比较少。二氢欧山芹醇乙酸酯、蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯具有多种药理活性, 推断这些成分很有可能是裂叶独活的活性成分。本实验利用 HSCCC 一次制备这 3 种香豆素成分量大, 这不仅为裂叶独活药性物质基础的研究提供依据, 同样为其他香豆素类的分离制备提供参考。同时, 本研究充分体现了 HSCCC 法的简单、高效、快速、制备量大和制备质量分数高等优点。HSCCC 拥有众多优势, 但其也存在一些缺点, 如精密度不如分析性色谱仪器高, 溶剂体系选择方法及理论远不如其他色谱成熟等。

参考文献

- [1] 饶高雄, 溥发鼎, 孙汉董. 裂叶独活和长裂叶独活的化学成分及其分类学意义 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(2): 16-19.
- [2] 马哲, 梁茂新. 二氢欧山芹醇当归酸酯在家兔体内的药理学 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(21): 1817-1818.
- [3] Zhang Y, Xie M L, Xue J, *et al.* Osthole improves fat

- milk-induced fatty liver in rats: Modulation of hepatic PPAR- α / γ -mediated lipogenic gene expression [J]. *Planta Med*, 2007, 73(8): 718-724.
- [4] Guh J H, Yu S M, Ko F N, *et al*. Antiproliferative effect in rat vascular smooth muscle cells by osthole, isolated from *Angelica pubescens* [J]. *Eur J Pharmacol*, 1996, 298(2): 191-197.
- [5] 何蔚, 刘建新, 周钰梅, 等. 蛇床子素对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(11): 1528-1530.
- [6] 吴雅娜, 栾立标. 二氢欧山芹醇乙酸酯在体单灌流肠吸收研究 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(22): 1719-1722.
- [7] 胡瑕, 谢红旗, 罗巍, 等. 高速逆流色谱法分离制备蛹虫草发酵液中虫草素 [J]. *中草药*, 2013, 44(5): 557-561.
- [8] Liu D, Chen X F, Song X Y. Application actuality of high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) [J]. *Food Machin*, 2006, 22(2): 98-101.
- [9] 胡利锋, 廖晓兰, 柏连阳, 等. 硅胶柱色谱-高速逆流色谱法分离纯化羌活中佛手柑内酯 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 701-704.
- [10] Ito Y. Golden rules and pit falls in selecting optimum conditions for high speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1065(2): 145-168.
- [11] 林文津, 徐榕青, 张亚敏, 等. 超临界流体萃取-高速逆流色谱法分离纯化泽泻中 23-乙酰泽泻醇 B [J]. *中草药*, 2014, 45(20): 2928-2931.
- [12] 韩利文, 陈锡强, 袁延强, 等. 高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(4): 241-246.
- [13] 楼招欢, 杨波, 沈炜, 等. 丹参二萜醌部位高速逆流色谱制备工艺及体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(5): 679-682.
- [14] 尹连红. 高速逆流色谱技术在天然产物分离制备中的探索性研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2010.
- [15] 张才煜, 张本刚, 杨秀伟. 独活化学成分研究 [J]. *解放军药学学报*, 2007, 23(4): 241-245.
- [16] 孙希彩, 张春梦, 李金楠, 等. 紫花前胡的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2044-2047.
- [17] 许剑锋, 孔令义. 紫花前胡茎叶化学成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2001, 26(3): 178-179.