

# 高速逆流色谱法分离制备独活中蛇床子素

黄秀珍<sup>1</sup>, 顿珠次仁<sup>2</sup>, 谢一辉<sup>1</sup>, 朱根华<sup>1</sup>, 严志宏<sup>1\*</sup>, 严正<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 西藏藏医学院, 拉萨 850000)

**[摘要]** 目的:以独活粗提物为原料,利用高速逆流色谱法(HSCCC)分离制备高纯度蛇床子素。方法:利用超高效液相色谱(UPLC)分析并优化溶剂体系,选择正己烷-乙酸乙酯-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,流速 $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,主机转速 $850\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量 $200\text{ mg}$ ,检测波长 $323\text{ nm}$ 。所接收馏分在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓缩,得到蛇床子素单体,应用核磁共振氢谱、碳谱、质谱、红外光谱等进行鉴定,并用UPLC测定其纯度。结果:蛇床子素一次制备量为 $6.6\text{ mg}$ ,纯度达到 $97.1\%$ 。结论:高速逆流色谱技术操作简单,分离快速高效,一次制备量大,可以用于独活中高纯度蛇床子素的分离制备。

**[关键词]** 高速逆流色谱; 独活; 蛇床子素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0050-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120050

**Separation and Purification of Osthole from Angelicae Pubescentis Radix by High-speed Counter-current Chromatography** HUANG Xiu-zhen<sup>1</sup>, DUN Zhu-ciren<sup>2</sup>, XIE Yi-hui<sup>1</sup>, ZHU Gen-hua<sup>1</sup>, YAN Zhi-hong<sup>1\*</sup>, YAN Zheng<sup>1</sup> (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. College of Tibetan Medicine, Lhasa 850000, China)

**[Abstract]** **Objective:** Separation and purification of osthole by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) from crude extract of Angelicae Pubescentis Radix. **Method:** Ultra high performance liquid (UPLC) was used to analyze and optimize the solvent system and the hexane-ethyl acetate-water-methanol (1.5:2.5:2.0:1.5) was chosen as the two-phase solvent system, in which the upper phase was used as the stationary phase, while the lower phase was used as the mobile phase, the flow rate was set at  $3.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , the revolution speed was  $850\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , and detected at  $323\text{ nm}$ . The fraction was received and the solvent evaporated at  $50\text{ }^\circ\text{C}$  using a rotary evaporator, then the osthole was received and its purity was determined through UPLC, and its structure was identified by IR, ESI-MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. **Result:** We got  $6.6\text{ mg}$  of osthole one time and its purity was up to  $97.1\%$ . **Conclusion:** The high-speed counter-current chromatography is a simple and high-efficiency method and through which we can obtain osthole with high purity from crude extract of Angelicae Pubescentis Radix.

**[Key words]** high-speed countercurrent chromatography; Radix Angelicae Pubescentis; osthole

独活主产于四川、湖北、安徽等地,主要功效为祛风胜湿、散寒止痛,为治疗风湿炎症的常药,研究还证明独活中的一些活性成分具有抗肿瘤、镇痛镇静、抑制血小板聚集和降压的作用<sup>[1]</sup>。药理研究发现,独活中的主要活性成分为香豆素类,其中蛇床子素含量最多<sup>[2]</sup>。据研究,蛇床子素在癌症,肝脏,脑

部疾病等方面发挥重要作用<sup>[3-5]</sup>。

高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)是20世纪80年代由Yoichiro Ito发展起来的一种连续高效的液-液色谱分离技术。HSCCC被广泛应用于天然产物、中药、多肽、抗生素、食品、蛋白质、及无机分离制备分离方

**[收稿日期]** 20140801(001)

**[基金项目]** 江西省科技计划项目(20142BBG70010);江西省教育厅项目(GJJ13604);江西中医药大学校基金项目(2012ZR022);西藏自治区自然科学基金项目(2015ZR-14-65)

**[第一作者]** 黄秀珍,在读硕士,从事药物质量分析研究, Tel:18679184130, E-mail:327780672@qq.com

**[通讯作者]** \* 严志宏,博士研究生,讲师,从事新型材料及化学分析技术研究, Tel:0791-87118768, E-mail:yanzhihong03@126.com

面<sup>[6]</sup>。高速逆流色谱作为一种液-液分配色谱,与其他分离纯化技术相比,具有其独特的优势。固定相不需要载体,所分离样品不会产生变性、污染、被吸附、拖尾<sup>[7]</sup>,因而其可以做到高回收率;一次进样可达到几十毫升,一次可分离几十克粗样;对样品前处理要求非常低,简单的粗提就可以进样而达到分离纯化的目的;耗材低廉,所用溶剂少,分离时间短,制备样品纯度高,可达99%以上,可用于制备高纯度的对照品。HSCCC经过三十几年的发展,衍生出了手性逆流色谱技术、离子对逆流色谱技术、二元模式逆流色谱、pH区带逆流色谱等,实现了高速逆流色谱-质谱联用,高速逆流色谱-高效液相色谱联用,高速逆流色谱-高速逆流色谱联用。

有报道<sup>[8-10]</sup>已从独活中得到多个活性成分,但是均为采用溶剂萃取和柱色谱法进行分离纯化得到,不仅步骤繁琐,时间长,还需要大量的溶剂和药材。刘佳川<sup>[11]</sup>利用高速逆流色谱从独活中分离得到了高纯度的水合氧化前胡素,也有文献报道从蛇床子中分离制备到了高纯度的蛇床子素<sup>[12-13]</sup>,但是有关应用高速逆流色谱从独活中制备蛇床子素的文献还未见报道。本文利用高速逆流色谱从独活粗提物中一次制备了6.6 mg高纯度的蛇床子素,保留率73%,为独活中活性成分的分离纯化提供参考。

## 1 材料

TBE-300C型高速逆流色谱仪(上海同田),Ultimate 3000型超高效液相色谱仪(Dionex);Avance400型超导核磁共振仪,Vertex70型红外光谱仪(瑞士布鲁克公司);QTRAP4500型LC-MC(ABSciex公司),1290系列高效液相色谱仪(美国,Agilent),Milli-Q超纯水制备系统(Millipore公司,美国),SZ-93A型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

石油醚(分析纯,60~90℃,天津市恒兴化学试剂制造有限公司),正己烷、乙酸乙酯、95%乙醇(AR,Shanghai Titanchem Co. Ltd),甲醇(AR,上海试一化学试剂有限公司),用于UHPLC的流动相中所用到的水均为Milli-Q超纯水,其他用水为双蒸水。

独活切片购自南昌黄庆仁大药房,经刘庆华老师鉴定为四川独活为伞形科植物毛当归*Angelica pubescens f. biserruta*。蛇床子素对照品购自中国食品药品检定研究院,批号110822-201308。

## 2 实验方法

### 2.1 独活粗提物的制备

将独活切片在40℃下真

空干燥8 h取出打粉过60目筛,称取500 g,用4倍量95%乙醇常温浸泡24 h,保留上清液,重复3次。将3次所得的上清液在50℃下减压浓缩得到75 g浸膏,常温保存备用。

### 2.2 分配系数的测定

取独活粗提物1 mg溶于上下相各有1 mL的溶剂体系中,振摇,静置,重新分层后,取等量的上下相用UPLC检测,用上相峰面积除以下相峰面积即得到分配系数K。

### 2.3 HSCCC分离

以正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(1.5:2:2.5:1.5)溶剂体系。将这4种溶剂按比例混合后,强烈震摇5 min,静置过夜分离上下相并超声脱气20 min。开启循环水泵,分离温度25℃,紫外检测波长323 nm。将上相作为固定相以10 mL·min<sup>-1</sup>的速度泵入主机,泵满后,正转,缓慢调转速为850 r·min<sup>-1</sup>,下相为流动相,以3 mL·min<sup>-1</sup>的速度泵入主机。待只有流动相从检测器流出时,及体系达到流体动力学平衡,计算保留率73%。取用5 mL上相溶解好的200 mg独活粗提物浸膏由进样阀注入分离管路。根据色谱图手动收集各色谱峰组分。在50℃下减压浓缩待测。

### 2.4 UPLC测定分析

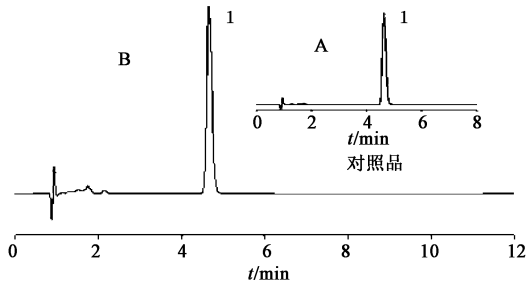
将对照品和HSCCC所得的减压浓缩峰组分分别用甲醇溶解进样。Thermo C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm,2.2 μm),流动相甲醇-水(70:30),流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>,柱温25℃,检测波长323 nm,进样量5 μL。以蛇床子素对照品的浓度和峰面积计算标准曲线,R<sup>2</sup> 0.999 8,采用外标法计算蛇床子素接收液的质量浓度。

## 3 结构鉴定

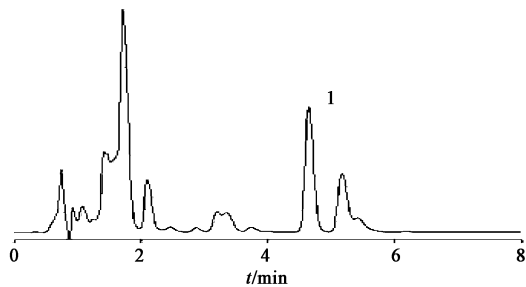
样品为无色针形结晶,mp 83~84℃;IR ν(KBr) cm<sup>-1</sup>: 1 720(-C=O), 1 604, 1 562, 1 499(Ar), 1 251(-C-O);ESI-MS m/z 244[M]<sup>+</sup>, 229, 213, 201, 159, 131, 103, 89, 77, 63, 51;<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.67(3H, s, H-5'), 1.84(3H, s, H-4'), 3.52(2H, d, J = 8.0 Hz, H-1'), 3.92(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 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 = 6.23 Hz, H-3);<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 160.2(C-2), 113.0(C-3), 143.6(C-4), 118.1(C-4α), 126.2(C-5), 107.4(C-6), 161.2(C-7), 113.0(C-8), 152.9(C-8α), 21.9(C-1'), 121.2(C-2'), 132.5(C-3'), 25.7(C-4'), 17.8(C-5'), 56.1(OMe)。以上数据与文献[9]报道基本一致,鉴定为蛇床子素。

### 4 结果与讨论

4.1 吸收波长的选择及测定结果 蛇床子素在 202,323 nm 处有最大吸收,但是考虑到 202 nm 最大吸收处干扰很大,故我们选择 323 nm 作为蛇床子素的 UPLC 和 HSCCC 的检测分离吸收波长。经 HSCCC 分离得到蛇床子素化合物峰接收液经减压回流得到浸膏 6.6 mg,用甲醇溶解做 UPLC 检测,测定纯度达到 97.1%。见图 1,2。



A. 对照品;B. 样品;1. 蛇床子素  
图1 HSCCC 分离的蛇床子素 UPLC  
Fig.1 UPLC chromatogram of osthole



1. 蛇床子素  
图2 独活粗提物的 UPLC  
Fig.2 UPLC chromatogram of Radix Angelicae Pubescentis exchact

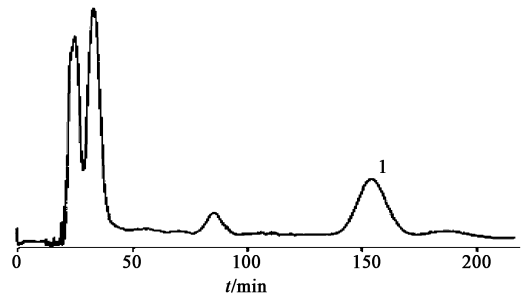
4.2 溶剂体系的选择及分离条件的优化 在高速逆流色谱中,合适的溶剂系统直接影响到分离效果。需考虑溶剂对目标分离物的溶解性、分配系数 K、黏度、分离因子、分离时间、保留率、上下相分层的时间等。HSCCC 最好的分配系数 K 在 0.5 ~ 2.0,当 K < 0.5 时,目标分离物与其他成分重叠而不能分开,如果 K > 2.0,则目标分离物分离时间延长;上下相分层应在 30 s 之内,否则会产生乳化,造成固定相流失,使保留率大大降低,而严重影响分离效果。本文根据蛇床子素的极性选择了正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水为溶剂体系。为了使独活中的蛇床子素能和其他成分得到充分分离,需要调节溶剂体系中各溶剂体积的比例,使蛇床子素在上下相中的分配系数 K 在 0.5 ~ 2.0。我们共考察了 5 个不同体积比的溶剂体系,见表 1。

表1 不同溶剂体系蛇床子素 K

Table 1 K value of different solvent system

No.	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水溶剂体系	K
1	1:1:1:1	3.72
2	2:2:2.5:2	4.57
3	2:2:2.5:1.5	2.07
4	1.5:2:2.5:2	3.39
5	1.5:2:2.5:1.5	1.17

根据 K,选择了第 3 种和第 5 种溶剂系统。结果发现第 3 种溶剂体系所得到的蛇床子素纯度太低,而第 5 种溶剂体系得到的蛇床子素纯度达到 97.1%。高速逆流分离独活成分见图 3。实验还对流动相流速、温度、转速进行了优化,结果流速 3 mL·min<sup>-1</sup>,温度 25 °C,转速 850 r·min<sup>-1</sup>,保留率达到 73%,能达到最优的分离效果。



1. 蛇床子素  
图3 独活提取物 HSCCC  
Fig.3 HSCCC chromatogram of Radix Angelicae Pubescentis exchact

### 5 结论

本研究通过超高效液相选择溶剂体系,采用高速逆流色谱法,用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1.5:2:2.5:1.5)作为体系,从独活浸膏中分离得到高纯度的蛇床子素,固定相保留率为 73%,分离能力高。高速逆流色谱用于独活中蛇床子素的分离制备快速简单,对独活的进一步药理药性研究具有重要意义。

#### [参考文献]

[1] 林黎,钱晓萍,刘宝瑞. 中药独活的化学成分及其抗肿瘤活性的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(2):373-376.

[2] 姚丽,冯红玄,霍红,等. 独活活性成分蛇床子素的药理学研究进展[J]. 中华中医药学刊,2012,30(10):2221-2224.

[3] Zhang Y, Xie M L, Xue J, et al. Osthole improves fat

- milk-induced fatty liver in rats: modulation of hepatic PPAR- $\alpha$ / $\gamma$ -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 osthol, 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 ] 刘迪,陈雪峰,宋晓宇. 高速逆流色谱技术应用现状[J]. *食品与机械*, 2006, 22(2):98-101.
- [ 7 ] 罗国安,王义明. 中药复方有效部位研究方法以及理论初探[J]. *中成药*, 1997, 19(8):44-45.
- [ 8 ] 丁希飞,冯煦,董云发,等. 中药独活化学成分的研究[J]. *中药材*, 2008, 31(4):516-518.
- [ 9 ] 张才煜,张本刚,杨秀伟. 独活化学成分的研究[J]. *解放军药化学学报*, 2007, 23(4):241-245.
- [ 10 ] 杨秀伟,郭庆梅,张才煜. 独活化学成分的进一步研究[J]. *解放军药化学学报*, 2008, 24(5):389-392.
- [ 11 ] 刘佳川,于丽丽,艾萍. 高速逆流色谱分离独活中水合氧化前胡素[J]. *理化检验-化学分册*, 2010, 46(9):1008-1009.
- [ 12 ] Wei Y, Zhang T Y, Ito Yoichiro. Preparative isolation of osthol and xanthotoxol from common cnidium fruit (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1033(2):373-377.
- [ 13 ] Liu Renmin, Lei Feng, Sun Ailing, et al. Preparative isolation and purification of coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) *Cusson* by high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1055(1/2):71-76.
- [责任编辑 顾雪竹]

## 《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD (E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database,简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种,其中中国出版的英文期刊 194 种,中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记);扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点,自提供使用以来,深受用户好评,被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库,曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。