

## 高速逆流色谱法分离前胡提取物中香豆素类成分

蔡海林<sup>1</sup>, 杜良伟<sup>2</sup>, 刘祥英<sup>1</sup>, 陈桂华<sup>1</sup>, 王彦辉<sup>1</sup>, 柏连阳<sup>1,3\*</sup>

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.广西大学 化学化工学院, 广西 南宁 530004;  
3.湖南人文科学技术学院, 湖南 娄底 417000)

**摘 要:** 采用超临界CO<sub>2</sub>流体萃取中药前胡中总香豆素, 以石油醚-乙酸乙酯为洗脱系统, 对提取物进行硅胶柱初步分离, 利用高效液相色谱确定石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:4)作为高速逆流色谱(HSCCC)分离的溶剂体系, 在主机转速为850 r/min、流动相流速为2.0 mL/min、254 nm波长检测条件下, 根据色谱图手动收集各色谱峰组分, 分离所得化合物通过核磁共振(NMR)检测并确定其结构, 得到4个单体化合物, 分别是前胡香豆素II、北美芹素、白花前胡甲素、补骨脂素。

**关 键 词:** 白花前胡; 高速逆流色谱; 前胡香豆素II; 北美芹素; 白花前胡甲素; 补骨脂素

中图分类号: O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0086-04

## Separation of coumarins with function from extract of radix peucedani through HSCCC

CAI Hai-lin<sup>1</sup>, DU Liang-wei<sup>2</sup>, LIU Xiang-ying<sup>1</sup>, CHEN Gui-hua<sup>1</sup>, WANG Yan-hui<sup>1</sup>, BAI Lian-yang<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. Hunan Institute of Humanities Science and Technology, Loudi, Hunan 417000, China)

**Abstract:** With the extract obtained from radix peucedani by SFE(supercritical fluid extraction), coumarins were primarily purified through silica-gel chromatography with solvent system of petroleum ether:ethyl acetate and further purification was processed by HSCCC(high speed counter current chromatography) with solvent system of petroleum ether:ethyl acetate:methanol:water(5:5:5:4) at the flow rate of 2.0 mL/min under rotator speed of 850 r/min. Fractions were collected manually according to HSCCC chromatogram and then characterized by NMR(nuclear magnetic resonance), which were peucedanocoumarin II, pteryxin, praeruptorin A and psoralen respectively.

**Key words:** *Peucedanum praeruptorum*; high speed counter current chromatography; peucedanocoumarin II; pteryxin; praeruptorin A; psoralen

对白花前胡(*Peucedanum praeruptorum* Dunn.)功能成分的提取主要采用水煎煮、乙醇加热回流法等, 利用效率不高<sup>[1]</sup>, 而对前胡提取物的分离则主要采用硅胶柱层析、制备液相色谱分离等技术<sup>[2]</sup>, 成本较高, 制备量小, 过程复杂, 不适合大规模的分离制备。为了弥补上述方法的不足, 笔者采用CO<sub>2</sub>超临界流体萃取对样品所含香豆素类功能成分进

行初提后, 用硅胶柱对初提物进行第一步分离, 再用高速逆流色谱(HSCCC)<sup>[3]</sup>对目标成分实现细分, 并得到单体化合物。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材 料

前胡购自湖南省药材公司, 经湖南省中医药大

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971951); 湖南农业大学稳定人才基金项目(09WD18)

作者简介: 蔡海林(1979—), 男, 湖南常德人, 博士研究生, 研究方向为农药毒理与加工技术; \*通信作者, Bailianyang2005@yahoo.com.cn

学于永秩教授鉴定确认为伞形科白花前胡。

主要仪器：HPTLC 薄层色谱仪(德国 CAMAG 公司)；HL-1L/40-A 型超临界萃取仪(杭州华黎泵业有限责任公司)；EYELA 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)；岛津 Uvmini-1240 紫外分光光度计(日本岛津公司)；TBE-300A 高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司)；岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司)；Varian INOVA-300 核磁共振仪(瑞士 Broker 公司)。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 样品制备

前胡洗净后自然阴干，机械粉碎。取粉碎的前胡根茎 2.0 kg，以 1 : 1 的比例用无水乙醇浸泡 24 h，采用 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取其中的香豆素类成分，萃取温度 60 °C，萃取压力 35 MPa，萃取时间 60 min，CO<sub>2</sub> 动态流量 2 kg/h。

精确称取前胡 CO<sub>2</sub> 超临界萃取物 10 g(相当于前胡粉碎物 200 g)，用丙酮溶解后，加入 100 g 硅胶拌匀；硅胶柱柱径 8 cm，柱长 120 cm，硅胶 1 500 g，石油醚湿法装柱，装柱后反复用石油醚冲洗，湿法上样。利用薄层层析色谱(TLC)试验确定石油醚 乙酸乙酯体系为硅胶柱分离的洗脱系统。

收集分离组分：每 100 mL 收集 1 份，流速控制在 0.08 BV/h(100 mL/h)，分步收集，以薄层层析结合 5% 三氯化铁甲醇溶液显色，监测柱层析各分离组分中成分的变化，调整洗脱比例。

### 1.2.2 高速逆流色谱分离

1) 溶剂系统的选择。根据色谱理论，利用 HSCCC 分离样品的必要条件是样品在两相中具有合适的分配系数( $0.5 < K < 2.0$ )<sup>[6]</sup>，可用 HPLC、EC、TLC 测定<sup>[7]</sup>。本试验选用 HPLC 测定，共考察了 7 个溶剂系统，分别是：正己烷 乙酸乙酯 甲醇 水=1 : 1 : 1 : 1，正己烷 乙酸乙酯 乙腈 甲醇=5 : 2 : 5 : 4，正己烷 乙醇 水=6 : 5 : 5，正己烷 乙腈 氯仿=5 : 5 : 1，正己烷 乙腈=1 : 1，石油醚 乙酸乙酯 甲醇 水=5 : 5 : 5 : 4，石油醚 乙酸乙酯 甲醇 水=5 : 5 : 5 : 2。

2) 高速逆流色谱分离初提物。将待测溶剂加入分液漏斗中，充分振摇后静置 24 h 分相，上相为固

定相，下相为流动相，上、下相超声脱气 20 min，测定其固定相保留率。考虑到样品浓度高固定相易流失的因素，将样品用等体积的上相和下相溶解，尽可能用大体积稀释样品进样。HSCCC 主机转速为 850 r/min，流动相流速为 2.0 mL/min，254 nm 波长检测，根据色谱图手动收集各色谱峰组分。

3) 检测各组分纯度。采用 HPLC 检测经 HSCCC 分离后各组分的纯度。HPLC 分析条件：流动相为 甲醇 水，梯度洗脱：0 min、0 甲醇→70 min、100% 甲醇；流速 0.8 mL/min；检测波长为 254 nm，柱温 30 °C。

### 1.2.3 鉴定单体化合物结构

将分离所得单体化合物冷冻干燥，利用核磁共振(NMR)检测并鉴定其结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 初提物的初步分离

超临界 CO<sub>2</sub> 萃取白花前胡甲素提取率平均为 2.66%，高于采用乙醇加热回流法 1.81% 的提取率。根据香豆素类化合物已知的各种理化特征，以石油醚 乙酸乙酯体系为洗脱系统，硅胶柱分离共收集 520 个组分，经过 TLC 检测，合并相同组分，用旋转蒸发仪浓缩，共得到 14 种分离组分，其中 A2、A4、A6、A13 组分在 365 nm 紫外灯照射下呈亮蓝色，具备香豆素类成分的显著特征<sup>[8]</sup>，将这 4 个组分混合后作为样品(记为 B1)进行 HSCCC 分离。

### 2.2 高速逆流色谱分离结果

#### 2.2.1 溶剂系统的确定

根据表 1 的 *K* 值结果，选择石油醚 乙酸乙酯 甲醇 水=5 : 5 : 5 : 4 作为溶剂体系进行 HSCCC 分离。该溶剂体系 HPLC 色谱图见图 1、图 2。

#### 2.2.2 HSCCC 分离功能成分

选择石油醚 乙酸乙酯 甲醇 水=5 : 5 : 5 : 4 作为溶剂体系进行 HSCCC 分离，共得到 4 个组分(图 3)，通过 HPLC 检验，化合物 I (12.0 mg)、化合物 II (10.5 mg)、化合物 III (5.8 mg)、化合物 IV (4.6 mg) 纯度分别达到了 97.6%、98.1%、95.8%、95.2%，可以用作单体化合物的结构鉴定。

表 1    各溶剂体系  $K$  值  
Table 1     $K$  values of different solvent system

溶剂系统							分配系数 <i>K</i>				
							1	2	3	4	5
正己烷	乙酸乙酯	甲醇	水=1	1	1	1	1.657 030	3.117 752	4.429 515	3.927 932	6.597 913
正己烷	乙酸乙酯	乙腈	甲醇=5	2	5	4	0.001 870	0.042 161	0.146 494	0.053 558	0.025 221
正己烷	乙醇	水=6	5	1			0.099 040	0.080 198	0.217 007	0.193 260	0.057 760
正己烷	乙腈	氯仿=5	5	1			0.071 522	0.366 740	0.160 738	0.257 187	0.026 303
正己烷	乙腈=1	1					0.009 722	0.195 635	0.142 557	0.118 647	0.020 160
石油醚	乙酸乙酯	甲醇	水=5	5	5	4	0.974 753	2.190 878	2.729 154	2.335 488	3.054 306
石油醚	乙酸乙酯	甲醇	水=5	5	5	2	0.364 241	0.411 474	1.176 355	0.714 664	0.953 283

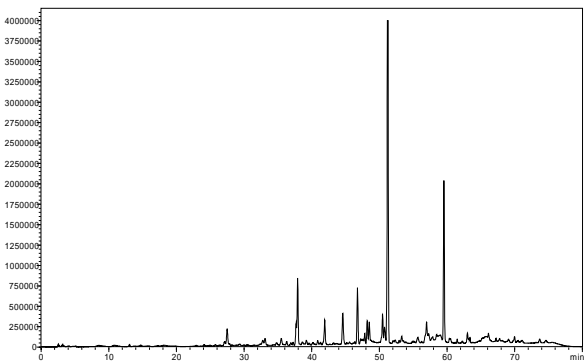


图 1    上相溶解样品液相色谱

Fig.1    Chromatogram of sample distribution in upper solvent used for HSCCC by HPLC

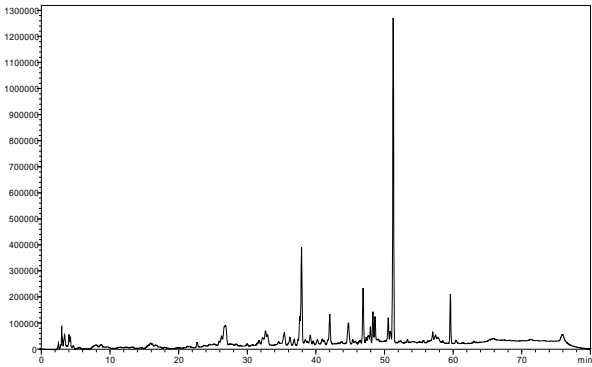


图 2    下相溶解样品液相色谱

Fig.2    Chromatogram of sample distribution in lower solvent used for HSCCC by HPLC

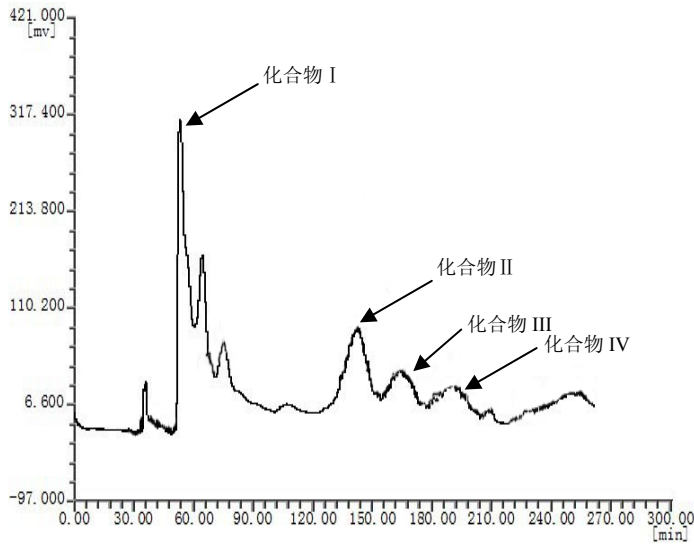


图 3    HSCCC 分离效果

Fig.3    HSCCC chromatogram

2.3    结构鉴定

通过核磁共振(NMR)对 4 种化合物进行结构鉴定,解析结果如下。

化合物 I :  $^1\text{H}$ NMR(300MHz ,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ppm:  
7.61 (1H , d ,  $J$ =9.6Hz) , 7.38(1H , d ,  $J$ =8.7Hz) ,  
6.83(1H , d ,  $J$ =8.7Hz) , 6.28 (1H , d ,  $J$  =5.1Hz) ,

6.23(1H, d, J=9.6Hz), 6.07(1H, br.q, J=7.2Hz), 5.33(1H, d, J=5.1Hz), 2.11(3H, s), 2.01(3H, d, q, J=7.2, 1.8Hz), 1.84(3H, t, J=1.5Hz), 1.46(3H, s), 1.39(3H, s);  $^{13}\text{C}$ NMR(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  ppm: 169.4, 166.2, 159.8, 156.5, 154.2, 143.2, 138.9, 129.1, 127.1, 114.5, 113.2, 112.5, 106.7, 77.1, 71.7, 63.0, 23.8, 23.5, 20.7, 20.4, 15.7。

该化合物与已知化合物前胡香豆素 II 的波谱数据<sup>[9]</sup>一致, 确定化合物 I 为前胡香豆素 II。

化合物 II:  $^1\text{H}$ NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  ppm: 7.61(1H, d, J=9.6Hz), 7.38(1H, d, J=8.4Hz), 6.82(1H, d, J=8.4Hz), 6.63(1H, d, J=5.1Hz), 6.21(1H, d, J=9.6Hz), 6.02(1H, br. q, J=7.2Hz), 5.34(1H, d, J=5.1Hz), 2.09(3H, s), 2.00(3H, br.d, q, J=7.2, 1.8Hz), 1.87(3H, m, J=1.5 Hz), 1.47(3H, s), 1.44(3H, s);  $^{13}\text{C}$ NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  ppm: 169.8, 166.9, 159.7, 156.6, 154.0, 143.2, 137.7, 129.2, 127.4, 114.4, 113.2, 112.5, 107.2, 77.2, 70.5, 60.1, 25.3, 22.1, 20.7, 20.3, 15.5。综合分析化合物 II 为北美芹素<sup>[10-11]</sup>。

化合物 III:  $^1\text{H}$ -NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  ppm: 6.24(1H, d, J=9.6Hz, 3-H), 7.60(1H, d, J=9.6Hz, 4-H), 7.35(1H, d, J=8.7Hz, 5-H), 6.80(1H, d, J=8.7Hz, 6-H), 1.479(3H, s, 2'-CH<sub>3</sub>), 1.437(3H, s, 2'-CH<sub>3</sub>), 5.41(1H, d, J=4.8Hz, 3'-H), 2.11(3H, s, 2''-CH<sub>3</sub>), 6.13(1H, m, 3'''-H), 1.87(3H, m, 4'''-CH<sub>3</sub>), 1.96(3H, d, q, 5'''-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  ppm: 159.8(C-2), 113.1(C-3), 143.2(C-4), 129.1(C-5), 114.3(C-6), 156.7(C-7), 107.0(C-8), 153.9(C-9), 112.4(C-10), 77.6(C-2'), 69.7(C-3'), 61.0(C-4'), 24.8(C-2'-CH<sub>3</sub>), 22.9(C-2'-CH<sub>3</sub>), 169.8(C-1''), 20.6(C-2''), 166.4(C-1'''), 126.9(C-2'''), 139.8(C-3'''), 15.7(C-4'''), 20.4(C-5''')。综合分析化合物 III 为白花前胡甲素<sup>[12]</sup>。

化合物 IV:  $^1\text{H}$ -NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  ppm: 6.37(1H, d, J=9.6Hz, 3-H), 7.79(1H, d, J=9.3Hz, 4-H), 7.69(1H, s, 5-H), 7.48(1H, s, 8-H), 7.70(1H, d, J=2.1Hz, 2'-H), 6.83(1H, dd, J=2.4Hz, 3'-H);  $^{13}\text{C}$ -NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  ppm: 161.0(C-2), 114.6(C-3), 144.0(C-4), 119.8(C-5), 124.8(C-6),

156.4(C-7), 99.8(C-8), 152.0(C-9), 115.4(C-10), 146.8(C-2'), 106.3(C-3')。综合分析化合物 IV 为补骨脂素<sup>[13]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 刘爱东, 侯微, 陈雪松, 等.  $\text{CO}_2$  超临界流体萃取前胡药材中白花前胡甲素[J]. 中西医结合学报, 2008, 12(6): 1286-1289.
- [2] 陈桂华. 前胡提取物诱导水稻抗稻瘟病和抗寒性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 2007: 25-39.
- [3] Ito Y, Sandlin J, Bowers W G. Hig-speed preparative counter-current chromatography with a coil Planet centrifuge[J]. J Chromatogr, 1982, 244: 247-258.
- [4] Wang X, Wang Y Q, Geng Y L, et al. Isolation and purification of honokiol and magnolol from cortex *Magnoliae officinalis* by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2004(2): 171-175.
- [5] Jiang Y, Lu H T, Chen F. Preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of liquorice using high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2004(1): 183-196.
- [6] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 565-566.
- [7] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2005(2): 145-168.
- [8] 卢艳花. 中药有效成分提取分离实例[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 188.
- [9] Takata M S, Okuyama, T Structures of angular pyranocoumarins of Bai-Hua Qian-Hu, the root of *Peucedanum raeruptorum*[J]. Planta Medica, 1990, 56(3): 307-311.
- [10] 黄平. 南岭前胡素 A 的结构鉴定[J]. 药学学报, 1997, 32(1): 62-64.
- [11] 孔令义, 裴月湖, 李锐, 等. 凯林内酯类香豆素的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1994, 6(1): 50-65.
- [12] 陈政雄, 黄宝山, 余其龙, 等. 中药白花前胡化学成分的研究——四种新香豆素的结构[J]. 药学学报, 1979, 14(8): 485-489.
- [13] 彭国平, 吴盘华, 李红阳, 等. 补骨脂化学成分的研究[J]. 中药材, 1996, 19(11): 563-565.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 易来宾