

高速逆流色谱法分离丁公藤中东茛菪内酯

高赛男^{1*}, 李森^{1#}, 张林娜¹, 孙跃², 张福琴²(1. 哈尔滨医科大学大庆校区药学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 北京四环科宝制药有限公司, 北京 100070)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0224-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.11

摘要 目的: 探讨以高速逆流色谱(HSCCC)法分离丁公藤中东茛菪内酯的方法。方法: 用HSCCC法对丁公藤粗提物进行分离, 分离条件: 两相溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3.5:5, V/V/V/V), 上相为固定相, 下相为流动相, 转速为850 r/min, 流速为2 ml/min, 水浴温度为25 ℃。结果: 通过红外光谱、质谱和核磁共振分析, 得到的产物是东茛菪内酯; 经高效液相色谱测定, 产物纯度为97.89%。结论: 该法可对丁公藤中东茛菪内酯进行快速有效地分离。

关键词 丁公藤; 东茛菪内酯; 高速逆流色谱

Isolation of Scopoletin from *Erycibes schmidtii* by High-speed Counter-current Chromatography

GAO Sai-nan¹, LI Sen¹, ZHANG Lin-na¹, SUN Yue², ZHANG Fu-qin²(1. College of Pharmacy, Daqing Campus of Harbin Medical University, Heilongjiang Daqing 163319, China; 2. Sihuankebao Pharmaceuticals Co. Ltd., Beijing 100070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the isolation of scopoletin from *Erycibes schmidtii* by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). METHODS: The crude extract of *E. schmidtii* was isolated by HSCCC, and the isolation conditions were as followed: the two phase solvent system was composed of n-hexane-ethyl acetate-methanol-water (3:5:3.5:5, V/V/V/V), the upper phase was used as the stationary phase, and the lower phase as the mobile phase, the apparatus rotated at 850 r/min, the flow rate was 2 ml/min, while the bath temperature was 25 ℃. RESULTS: The product isolated by HSCCC was scopoletin identified by IR, MS and NMR, and the purity of product was 97.89% by HPLC. CONCLUSION: HSCCC can be used to isolate scopoletin from *E. schmidtii* efficiently and quickly.

KEY WORDS *Erycibes schmidtii*; Scopoletin; High-speed counter-current chromatography

丁公藤系旋花科植物丁公藤 *Erycibe obtusifolia* Benth. 或光叶丁公藤 *E. schmidtii* Craib 的干燥藤茎^[1]。东茛菪内酯是丁公藤的主要有效成分之一^[2-3], 具有祛风、抗炎、止痛等功效^[4], 因此建立东茛菪内酯的分离纯化方法具有十分重要的意义。东茛菪内酯属于香豆素类化合物, 目前香豆素类化合物的分离主要采用柱层析法和薄层色谱法, 但这两种方法操作烦琐、费时^[5]。高速逆流色谱(High-speed counter-current chromatography, HSCCC)是近年来发展起来的一种液-液分配色谱, 它不需要任何固体支撑体或载体, 具有样品回收率高、分离能力强、分离量大等优点, 被广泛应用于天然药物成分的分离制备^[6]。笔者在前期工作基础上, 采用HSCCC法从丁公藤中分离纯化出东茛菪内酯, 为香豆素类化合物的高效、快速分离提供参考。

1 材料

TBE 300B HSCCC 仪(上海同田生物技术有限公司); N2000 色谱数据工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);

* 讲师, 硕士。研究方向: 天然药物活性成分高效分离及药效物质基础。电话: 0459-8153167。E-mail: gsn_2003@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 天然药物活性成分高效分离及药效研究。电话: 0459-8153260。E-mail: lisen_116@163.com

HX 1050 恒温循环器(北京博医试验仪器有限公司); AKTA prime 泵及检测系统(美国通用电器医疗集团); LC-20AT 高效液相色谱(HPLC)仪、FTIR 8400S 红外光谱(IR)仪(日本岛津公司); Avance 400 核磁共振(NMR)仪(瑞士 Bruker 公司); Premier XE 超高效液相色谱(UPLC)-质谱(MS)联用仪(美国 Waters 公司); 9312A 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂); C3860 超声波清洗器(河南省巩义市英峪予华公司, 功率: 200 W, 频率: 40 kHz); Milli-Q Academic 超纯水器(法国密理博有限公司)。

东茛菪内酯对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110768-200504); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

丁公藤购自安徽省亳州市药材总公司, 经哈尔滨医科大学大庆校区药学院申志英副教授鉴定为旋花科植物光叶丁公藤的干燥藤茎。

2 方法与结果

2.1 样品制备

称取干燥的丁公藤粗粉 300 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇

500 ml, 放置过夜。室温下超声提取 30 min, 滤过, 滤渣再用 500 ml 甲醇提取 2 次, 滤过。合并提取液, 40 °C 减压浓缩至膏状, 110 °C 的鼓风干燥箱中干燥 0.5 h, 得干浸膏 5.40 g, 冰箱中贮藏, 备用。

2.2 对照品溶液的制备

准确称取干燥至恒质量的东莨菪内酯对照品适量, 用甲醇溶解并制成质量浓度为 140 μg/ml 的对照品溶液。

2.3 HSCCC 法分离丁公藤中东莨菪内酯

2.3.1 溶剂体系的选择 HSCCC 法分离的关键在于溶剂体系的选择, 要求上、下相溶液不能互溶, 理想分配系数应在 0.5~1.5 之间。根据文献^[7], 本试验采用 HPLC 法测定分配系数(K)。选定溶剂体系后, 配制溶剂 20 ml, 静置过夜。称取丁公藤粗提物 2 mg, 置于 5 ml 试管中, 加入达到分配平衡的上、下相溶剂各 2 ml, 超声振荡混匀, 使粗提物充分溶解。待分配达到平衡后, 分别取上、下相液体, 用 HPLC 法检测东莨菪内酯的峰面积积分值, 根据上相(固定相)和下相(流动相)的峰面积积分值比, 求出 K。丁公藤的极性较弱, 按照相似相溶原理, 本试验选择中等极性的溶剂体系, 即正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水, 考察不同体积比对东莨菪内酯 K 值的影响。不同两相溶剂体系下东莨菪内酯的 K 值见表 1。

表 1 不同两相溶剂体系下东莨菪内酯的 K 值

Tab 1 Distribution coefficients of *E. schmidtii* under different two-phase solvent systems

序号	溶剂体系	体积比	K
1	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	3:5:2.5:5	28.68
2	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	3:5:3:5	1.28
3	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	3:5:3.5:5	0.62
4	正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	3:5:4:5	0.14

从表 1 可知, 随体系中甲醇与水比例增加, K 值出现下降趋势。当正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体积比为 3:5:2.5:5 时, K 值为 28.68, 流动相的洗脱能力差, 目标产物需要很长时间才能洗脱出来; 体积比为 3:5:4:5 时, K 值为 0.14, 流动相的洗脱能力过强, 分离效果不好; 体积比为 3:5:3.5:5 和 3:5:3:5 时, K 值分别为 0.62 和 1.28, 满足理想分配系数范围, 故选择溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3.5:5 或 3:5:3:5, V/V/V/V)。

2.3.2 分离效果考察 称取干浸膏 200 mg, 共 2 份, 分别用体积比为 3:5:3.5:5 和 3:5:3:5 的正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水溶剂体系的上、下相各 10 ml 充分溶解, 在转速 850 r/min、流速 2 ml/min、检测波长 280 nm 和柱温 25 °C 的条件下, 按照 HSCCC 操作程序进样, 分离效果见图 1。从图 1 可看出, 当正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水的体积比为 3:5:3:5 时(图 1 中的 B), 组分 I 和 II 的分离效果不好, 分离时间长; 而体积比为 3:5:3.5:5 时(图 1 中的 A), 固定相保留率为 70%, 180 min 内有 2 个尖锐的峰出现, 组分 I 基本是在组分 II 完全流出后才出峰, 分离效果良好, 所以选用体积比为 3:5:3.5:5 的正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水为溶剂系统。用试管收集 123~140 min 的 I 号峰流出物, 浓缩干燥, 得到白色结晶性粉末 35.6 mg。

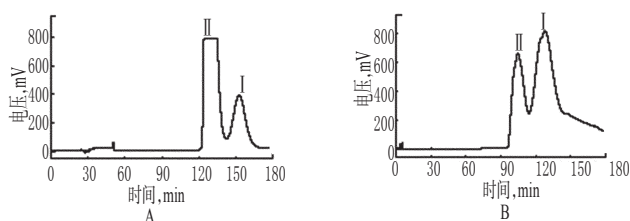


图 1 丁公藤粗提物的 HSCCC 图

A. 正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3.5:5, V/V/V/V); B. 正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3:5, V/V/V/V)

Fig 1 HSCCC chromatograms of the crude extract from *E. schmidtii*

A. n-hexane-ethyl acetate-methanol-water (3:5:3.5:5, V/V/V/V); B. n-hexane-ethyl acetate-methanol-water (3:5:3:5, V/V/V/V)

2.4 结构鉴定

样品 I 为白色结晶性粉末, 易溶于氯仿和甲醇, 熔点 202~205 °C, UV_{365 nm} 下可观察到蓝紫色荧光, 三氯化铁反应呈阳性。分子式为 C₁₀H₈O₄。UPLC-MS 测得样品 I 的分子质量为 192.164。IR 分析采用溴化钾压片法, 对样品 I 从波数 4 000 cm⁻¹ 扫描到 400 cm⁻¹。结果, 3 340 cm⁻¹ 处有尖锐峰出现, 说明有缔合的 -OH 存在; 2 990 cm⁻¹ 和 1 377 cm⁻¹ 处两峰为 -CH₃ 的特征峰; 3 030 cm⁻¹、1 609 cm⁻¹ 和 1 502 cm⁻¹ 处三峰的出现证实有苯环的存在; 1 628 cm⁻¹ 处强吸收峰为羰基的特征峰; 1 162 cm⁻¹ 处的吸收峰对应于酯中的 C-O-C 基团。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 数据如下: δ 6.268(1H, d, J=9.0 Hz, H-3), δ 7.596(1H, d, J=9.5 Hz, H-4), δ 6.926(1H, s, H-5), δ 6.852(1H, s, H-8), δ 6.152(1H, s, 7-OH), δ 3.961(3H, s, 6-CH₃O); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据如下: δ 161.501(C-2), δ 107.418(C-3), δ 143.344(C-4), δ 113.395(C-5), δ 143.988(C-6), δ 149.670(C-7), δ 103.186(C-8), δ 150.220(C-9), δ 111.475(C-10), δ 56.380(6-CH₃O), 与参考文献^[8]的数据基本一致。综合以上数据, 确定样品 I 为东莨菪内酯。样品 I 的 IR 见图 2; 东莨菪内酯分子结构式见图 3。

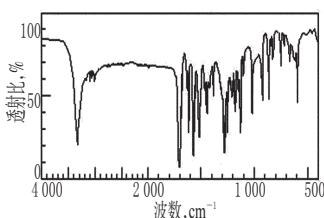


图 2 样品 I 的 IR 图

Fig 2 FT-IR spectrogram of sample I

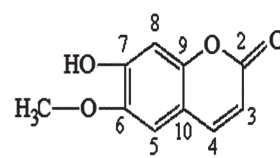


图 3 东莨菪内酯结构式
Fig 3 The structure of scopoletin

2.5 纯度分析

纯度分析采用 HPLC 法。

2.5.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil-ODS-SP(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 347 nm; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 10 μL; 流动相: 水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~5 min, 20%~40% B; 5~7 min, 40%~50% B; 7~12 min, 50%~55% B; 12~15 min, 55%~20% B; 15~20 min, 20%~10% B; 20~30 min, 10%~5% B)。

2.5.2 纯度分析 称取样品 I 1.3 mg,用甲醇溶解并定容至 5 ml 量瓶中,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,得到纯化后的供试品溶液。将此供试品溶液与“2.2”项下对照品溶液分别按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,得样品 I 纯度为 97.89%,保留时间在 11.8 min 左右,与东莨菪内酯对照品溶液的保留时间接近。色谱见图 4。

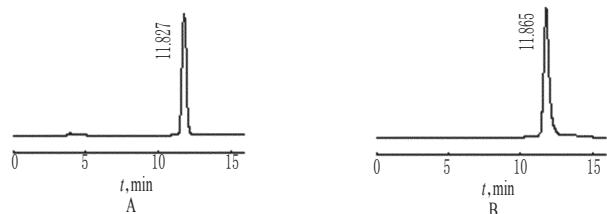


图 4 高效液相色谱图

A. 样品 I; B. 东莨菪内酯对照品

Fig 4 HPLC chromatograms

A. samples I; B. scopolamine control

3 讨论

本研究考察了加热回流法和甲醇超声法两种提取方法对东莨菪内酯含量的影响。相对于加热回流法来说,甲醇超声法操作简单,得到的东莨菪内酯含量高,可能是超声有利于丁公藤粗粉在溶剂中充分分散,促使样品与溶剂接触,便于东莨菪内酯的溶出。

采用 HSCCC 法分离目标物时,要注意转速和流速选择。适当增加转速,可以提高固定相的保留率,使样品分离达到较好的效果。在相同转速的情况下,流速越小,分离效果越好,但是分离时间会变长,试剂的损耗相应增加。通常,HSCCC 的

转速控制在 800~900 r/min 范围内,流速控制在 2~3 ml/min 之间。

笔者利用 HSCCC 法成功分离出了东莨菪内酯和 II 号产物,但 II 号产物到底是什么,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010 年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:3.
- [2] 谭建宁,张赞赞. 不同来源丁公藤药材中东莨菪内酯含量的研究[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1 651.
- [3] 刘卉,杨锦芬,詹若挺. 丁公藤研究概况与展望[J]. 广东农业科学, 2012, 39(1): 36.
- [4] 黄宝美,姚程炜,王志国,等. 丁公藤中东莨菪内酯含量的高效毛细管电泳电导法检测[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2008, 47(5): 71.
- [5] 李旻,刘友平,范婧娴,等. 川产迭鞘石斛中香豆素的分离鉴定及药材质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(7): 624.
- [6] 金再宿,田红梅,唐岚,等. 高速逆流色谱分离制备甜瓜中葫芦素类化合物[J]. 分析化学, 2011, 39(6): 867.
- [7] 高璐,于波,杨红. 高速逆流色谱法分离制备母丁香和公丁香中的 5 种非挥发性化合物[J]. 色谱, 2011, 29(11): 1 112.
- [8] 袁珊琴,赵毅民,尤勇,等. 西蒙 I 号番薯毛状根化学成分的研究(II)[J]. 中草药, 2005, 36(2): 186.

(收稿日期:2012-02-16 修回日期:2012-06-28)

卫生部副部长黄洁夫出席中俄卫生合作分委会第 13 次会议并访问波兰

本刊讯 应俄罗斯、波兰卫生部邀请,2012 年 12 月 3—12 日,卫生部副部长黄洁夫率团访问上述两国。

中俄卫生合作分委会是中俄人文合作委员会下设的分委会之一,每年召开 1 次会议,轮流在中、俄两国举行。12 月 4 日,中俄卫生合作分委会第 13 次会议在俄罗斯莫斯科召开。会议由黄洁夫副部长与俄联邦卫生部副部长卡格拉曼扬共同主持。黄洁夫表示,近年来两国卫生领域的合作不断深化,中俄卫生合作分委会是人文委员会的重要组成部分,也是历史最久、形式最稳定、最富成效的卫生合作机制。在双边合作、上海合作组织以及世界卫生组织等框架下,中俄两国卫生部门相互协作支持。会上,双方就边境地区传染病防控、灾害卫生应急、医疗产品监管领域的合作及康复治疗养和传统医学领

域的合作等进行了深入磋商,一致同意在互惠互利的基础上,大力促进卫生医学领域合作的进一步发展。双方于会后签署了会议纪要。中俄双方有关部门就传统医药合作专门召开会议,并签署了合作意向书。中方来自卫生部国际司、保健局、国家食品药品监督管理局、国家中医药管理局、北京市卫生局以及驻俄使馆代表参加了上述会议。

访问波兰期间,黄洁夫与波兰卫生部副国务秘书克里斯托夫·西勒斯举行了会谈,重点就波兰转轨时期的医疗卫生体制改革、卫生筹资和器官移植等问题进行了友好交流。代表团还参观了波兰内务部中央临床医院,该院与我北京医院一直保持友好交流,黄洁夫对双方合作给与了高度赞赏和充分肯定,希望两所医院进一步开展广范围的合作交流。