

高速逆流色谱分离纯化川西獐牙菜中 3 种吡酮苷元

贾 静^{1,2} 李玉林^{*1} 赵晓辉¹ 肖远灿¹ 陈桂琛¹ 尤进茂¹ 魏立新¹

¹(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

²(中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要 建立了高速逆流色谱分离川西獐牙菜中 3 种吡酮苷元的方法。溶剂系统为 V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(甲醇):V(水)=5:5:6:4, 上相为固定相, 下相为流动相, 转速为 850 r/min, 流速为 2.5 mL/min, 温度为 25 °C。从川西獐牙菜氯仿萃取部位的吡酮苷元混合物中制备得到 18 mg 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡酮(Methylswertianin, I), 26 mg 1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡酮(Gentianaquin, II) 和 14 mg 1-羟基-3,7,8-三甲氧基吡酮(Decussatin, III), 纯度均大于 98%。采用 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 2D NMR 对目标化合物的结构进行了鉴定。

关键词 高速逆流色谱; 川西獐牙菜; 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡酮; 1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡酮; 1-羟基-3,7,8-三甲氧基吡酮

1 引 言

川西獐牙菜(*Swertia mussotii* Franch.) 为龙胆科獐牙菜属草本植物, 上品藏药材, 俗名“藏茵陈”, 用于治疗肝炎、胆囊炎及利胆退黄等肝胆系统疾病^[1]。其主要活性成分为环烯醚萜类和吡酮类化合物, 其中吡酮类是黄色酚性化合物, 具有中枢神经系统兴奋或抑制、利尿、强心、抑制单胺氧化酶等作用, 及解肝毒、保肝、抗炎、抗病毒和抑制黄嘌呤氧化酶等活性^[2]。因此, 建立吡酮类成分的高效分离纯化方法具有重要意义。高速逆流色谱(HSCCC)是不使用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术, 克服了固相载体对样品的吸附损失、变性等缺点, 样品回收率高^[3], 已被广泛应用于天然药物成分的分析鉴定及分离制备^[4~10]。目前, 川西獐牙菜中吡酮类化合物的分离纯化多采用传统柱色谱法。该方法分离周期长、试剂消耗量大, 所用反复的固体载体如硅胶对样品有不可逆性的吸附作用, 造成样品组分的损失、玷污、变性、失活等, 分离困难, 收率低。本实验采用从川西獐牙菜的 75% 乙醇提取物的氯仿萃取部位, 经硅胶粗分除杂后, 以 HSCCC 在吡酮苷元混合物中一步成功分离出 3 种吡酮苷元: 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡酮(Methylswertianin), 1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡酮(Gentianaquin) 和 1-羟基-3,7,8-三甲氧基吡酮(Decussatin), 经 HPLC 峰面积归一化法分析, 其纯度大于 98.2%, 实现了川西獐牙菜吡酮苷元的一次性高效制备分离。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

TBE-300A AKTA Prime 高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司), 包括 N2000 色谱工作站和溶剂选择系统; HX-1050 恒温循环器(北京博医康实验仪器有限公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 包括 G1354A 四元泵, G1313A 自动脱气机, G1315B 二极管阵列检测器和 G1329A 自动进样器; Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm); AM400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。

75% 乙醇提取剂: 由 95% 医用酒精配制, 萃取及 HSCCC 分离用试剂(氯仿、甲醇、乙酸乙酯和正己烷)均为分析纯; HPLC 分析用甲醇(色谱纯, 山东禹王公司), 实验用水为超纯水。

川西獐牙菜采集于青海省玉树地区, 经中国科学院西北高原生物研究所陈桂琛研究员鉴定。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备 取干燥的川西獐牙菜全草 500 g, 切碎至 0.5~1.0 cm 碎段, 加 10 倍体积的 75% 乙

2010-07-26 收稿; 2010-10-20 接受

本文系国家自然科学基金项目(No. 20875099)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-YW-R-216)资助

* E-mail: liyulin@nwipb.cas.cn

醇,于80℃回流提取3次,每次2h,合并提取液并减压浓缩至无醇味,得浸膏110g。将浸膏加水悬浮后,置于分液漏斗中,用石油醚(沸点60~90℃)进行萃取,直至石油醚萃取溶液无色。再用氯仿萃取3次,回收氯仿,得氯仿萃取部位26g;取全部氯仿萃取部位进行硅胶柱层析粗分并除杂,石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱,合并得4个部分,其中第3部分4.5g为HSCCC待分离样品,放置冰箱内备用。

2.2.2 分配系数的测定 取1~2mg待分样品加入静置分层的两相溶剂系统中,剧烈振荡1min,待样品充分溶解后,取上、下两相各2mL,用HPLC检测,上相峰面积为 A_1 ,下相峰面积为 A_2 ,分配系数 $K = A_1/A_2$ 。

2.2.3 两相溶剂系统的准备和样品溶液的制备 在分液漏斗中配制V(正己烷):V(乙酸乙酯):V(甲醇):V(水)=5:5:6:4两相溶剂系统,充分振摇后静置过夜。上相为固定相,下相为流动相,使用前分别超声脱气30min。取150mg待分离样品粉末,振荡完全溶解于15mL上相溶液中,备HSCCC进样。

2.2.4 HSCCC分离过程 用最大流速将溶剂系统上相泵入主机并充满分离螺旋管,开启循环水浴并将温度设定为25℃。开启主机电源,以850r/min正向旋转,待转速稳定后,泵入流动相,待流动相从管柱出口流出且基线稳定后,将样品溶液由进样圈注入。管柱出口处流出液在254nm波长下连续检测,根据色谱图手动收集各色谱峰组分,HPLC检测纯度。

2.2.5 HPLC色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈(150mm×4.6mm i.d., 5μm);流动相为甲醇-水,梯度洗脱:0~2.5min,80%~85%甲醇;8.0~9.0min,85%~95%甲醇。柱温25℃;检测波长254nm;流速1.0mL/min;进样量10μL。在此条件下,待分离样品HPLC检测如图1所示。

3 结果和讨论

3.1 HSCCC溶剂系统的选择

在高速逆流色谱中,溶剂系统的选择至关重要。合适的溶剂系统是天然药物中活性成分分离纯化的关键。合适的两相溶剂系统应满足下列要求:

分层时间短于30s;目标化合物在两相中具有合适的分配系数即: $0.5 < K < 2.0^{[1]}$ 。本实验测定目标化合物吡酮苷元在乙酸乙酯-水、乙酸乙酯-甲醇-水、氯仿-水、氯仿-甲醇-水、正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水等溶剂系统中的分配系数见表1。当采用乙酸乙酯-水、乙酸乙酯-甲醇-水、氯仿-水、氯仿-甲醇-水作为两相溶剂系统进行分离时,吡酮苷元大部溶于其中的上相或下相,而在另一相中溶解度甚微,难以实现分离;采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:6:4,V/V)为两相溶剂系统时,对吡酮苷元有较合适的分配系数,实现了目标化合物的高效分离。

表1 3种吡酮苷元在不同溶剂系统中的分配系数

Table 1 Partition coefficient(K) values of three xanthenes in different solvent systems

溶剂系统 Solvent system	体积比 Volume ratio(V/V)	分配系数 Partition coefficient (K)		
		Methylswertianin	Gentianaquin	Decussatin
乙酸乙酯-甲醇-水 Ethylacetate-Methanol-Water	7:1:2	14.4	16.7	74.4
	6:2:3	10.04	11.1	26.1
	4:2:3	8.61	11.2	20.8
氯仿-甲醇-水 Chloroform-Methanol-Water	4:6:4	21.5	49.4	211.8
	4:6:3	9.12	24.1	46.4
	4:5:2	2.29	4.09	4.64
正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 n-Hexane-Ethylacetate-Methanol-Water	6:2:3:5	5.96	13.9	73.2
	5:5:6:5	1.58	3.28	6.98
	5:5:6.5:4	0.77	1.68	3.68
	5:5:6:4	0.85	1.47	1.89

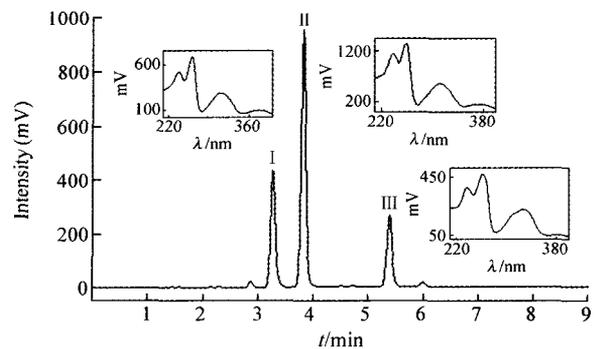


图1 样品HPLC图及各主要色谱峰紫外光谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of sample and UV spectra of main peaks

3.2 HSCCC 分离条件的优化

在逆流色谱分离过程中,分离温度影响固定相保留率、组分的分配效率和溶质的溶解,高温有助于提高固定相保留率,增加组分的分配效率以及溶质的溶解。但是,温度过高也会产生大量气泡,影响仪器使用寿命,本实验选择分离温度为 25 °C。

主机转速高则固定相保留率高,但易产生乳化,分离管易损坏,本实验主机转速设定为 850 r/min。

考察了流速 1.5, 2.0 和 2.5 mL/min 对样品分离效果的影响(图 2),3 种流速均能实现 3 种吡酮苷元的分离,在固定相的保留率均为 65%。但在 1.5 mL/min 流速下分离时间达 550 min,较 2.0 和 2.5 mL/min 流速分离时间延长 100 min;在 2.0 和 2.5 mL/min 流速下分离时间无差异,但在 2.5 mL/min 时组分 I 和 II 的分离度较在 2.0 mL/min 时有明显优势,故本实验流速采用 2.5 mL/min。

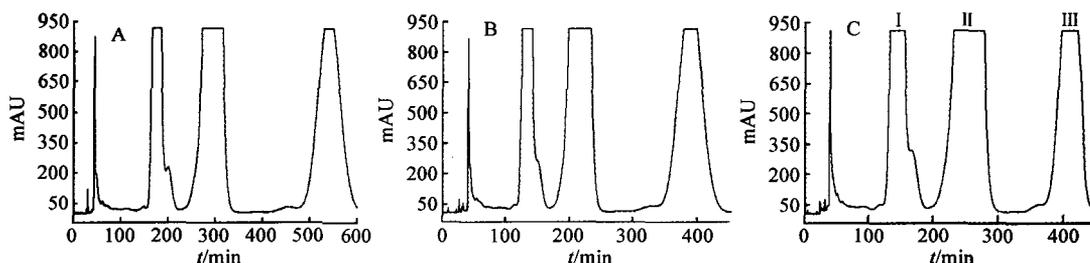


图 2 3 种不同流速下样品的 HSCCC 色谱图

Fig. 2 High-speed counter-current chromatogram (HSCCC) of sample in different flow rate of mobile phase

A. 1.5 mL/min; B. 2.0 mL/min; C. 2.5 mL/min.

在优化条件下,对川西獐牙菜提取物氯仿萃取部位进行 HSCCC 分离纯化,从 150 mg 待分离样品中一次性得到 18 mg 化合物 I, 26 mg 化合物 II 和 14 mg 化合物 III,其纯度分别为 98.2%, 99.1% 和 98.6%, HPLC 纯度检测结果如图 3 所示。

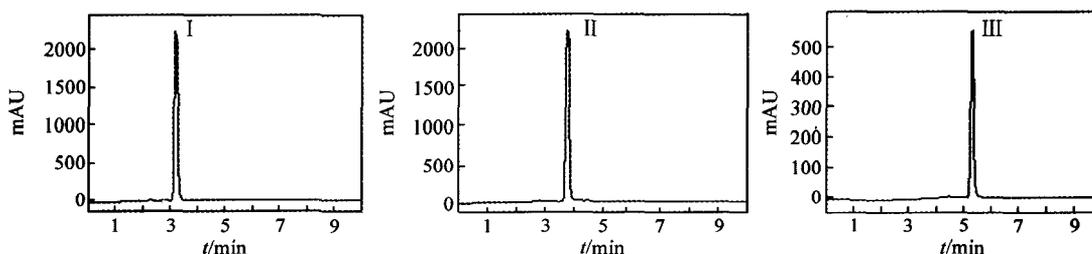


图 3 高速逆流制备组分 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of fractions obtained by HSCCC

3.3 根据 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 2D NMR 数据对 HSCCC 峰组分的鉴定

化合物 I 为黄色针状结晶。 ^1H NMR(DMSO, 400 MHz) δ : 11.82(1H, s, 1-OH), 11.80(1H, s, 8-OH), 7.51(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-6), 6.98(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-5), 6.60(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-4), 6.39(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 3.89(3H, s, OCH_3), 3.84(3H, s, OCH_3)。 ^{13}C NMR(DMSO, 100 MHz) δ : 184.3(C=O), 167.2(C-3), 161.9(C-1), 157.6(C-4a), 149.1(C-4b), 148.8(C-8), 142.6(C-7), 121.3(C-6), 107.4(C-8a), 105.7(C-5), 101.7(C-8b), 97.3(C-2), 92.9(C-4), 56.6(OCH_3), 56.3(OCH_3)。与文献[12]对照,确定为 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡酮(Methylswertianin)。

化合物 II 为黄色针状结晶。 ^1H NMR(DMSO, 400 MHz) δ : 13.30(1H, s, 1-OH), 9.65(1H, s, 7-OH), 7.39(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-6), 7.23(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-5), 6.53(1H, s, H-4), 6.33(1H, s, H-2), 3.87(3H, s, OCH_3), 3.81(3H, s, OCH_3)。 ^{13}C NMR(DMSO, 100 MHz) δ : 180.5(C=O), 166.0(C-3), 162.8(C-1), 156.7(C-4a), 149.3(C-8), 147.0(C-4b), 145.3(C-7), 124.4(C-6), 114.6(C-8a), 113.1(C-5), 103.2(C-8b), 96.7(C-2), 91.8(C-4), 61.0(OCH_3), 56.0(OCH_3)。与文献[12]对照,确定为 1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡酮(Gentiacalein)。

化合物 III 为黄色粉末, ^1H NMR(DMSO, 400 MHz) δ : 13.21(1H, s, 1-OH), 7.61(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-6), 7.30

(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-5), 6.50(1H, s, H-4), 6.32(1H, s, H-2), 3.92(3H, s, OCH₃), 3.87(3H, s, OCH₃), 3.82(3H, s, OCH₃)。¹³C NMR(DMSO, 100 MHz) δ : 180.5(C=O), 166.1(C-3), 162.8(C-1), 156.6(C-4a), 149.9(C-4b), 149.1(C-7), 147.8(C-8), 120.9(C-6), 114.8(C-8a), 112.8(C-5), 103.1(C-8b), 96.7(C-2), 91.9(C-4), 61.0(OCH₃), 56.6(OCH₃), 56.0(OCH₃)。HMQC 谱显示: $\delta_{\text{H}}6.32$ 和 $\delta_{\text{C}}96.7$, $\delta_{\text{H}}6.50$ 和 $\delta_{\text{C}}91.9$, $\delta_{\text{H}}7.30$ 和 $\delta_{\text{C}}112.8$, $\delta_{\text{H}}7.61$ 和 $\delta_{\text{C}}120.3$ 之间有相关峰;HMBC 谱显示: δ 13.21(OH)分别与 δ 103.1(C-8b), δ 96.7(C-2)和 δ 162.8(C-1)之间有远程相关峰,说明羟基处于1位; δ 7.30(H-5)分别与 δ 114.8(C-8a)和 δ 149.1(C-7)之间远程相关; δ 7.61(H-6)分别与 δ 149.8(C-4b)和 δ 147.8(C-8)之间远程相关。以上数据确定此化合物为1-羟基-3,7,8-三甲氧基呋喃(Decussatin)。

References

- 1 YANG Hui-Ling, LIU Jian-Quan(杨慧玲, 刘建全). *Chinese Tradit. Herb. Drugs*(中草药), **2005**, 36(8): 1233~1237
- 2 Goutam B, Sadhan M, Arindam G, Dilip G, Bodhiswatta M, Shamal S, Arun K B, *Chemistry & Biodiversity*, **2004**, 1(11): 1627~1651
- 3 Han X, Zhang T Y, Wei Y, Cao X L, Yoichiro I. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 971(1-2): 237~241
- 4 ZHAO Shu-Jie, HAN Mei, HAN Zhong-Ming, LI Yan-Ying, YANG Li-Min(赵淑杰, 韩梅, 韩忠明, 李彦颖, 杨利民). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(9): 1354~1358
- 5 ZHANG Neng-Sheng, WANG Jin-Bin, WANG Xiao-Yan, WANG Xiao-Dong, HU Feng-Lin(章能胜, 王金彬, 汪小艳, 王小董, 胡丰林). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2010**, 28(1): 68~72
- 6 PENG Ai-Yi, QU Xue-Wei, LI Hui, GAO Lu, YU Bo, YANG Hong(彭爱一, 曲学伟, 李慧, 高璐, 于波, 杨红). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2010**, 28(4): 383~387
- 7 HAN Zhong-Ming, WANG Yun-He, HAN Mei, ZHAO Shu-Jie, YANG Li-Min(韩忠明, 王云贺, 韩梅, 赵淑杰, 杨利民). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(11): 1679~1682
- 8 HUANGFU Ze-Kun, NI Shi-Feng, SUN Wen-Ji(皇甫泽坤, 倪士峰, 孙文基). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(6): 883~886
- 9 Yao S, Luo J H, Huang X F, Kong L Y. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 864(1-2): 69~77
- 10 LU J J, Wei Y, Yuan Q P. *Sep. Purif. Technol.*, **2007**, 55(1): 40~43
- 11 Ouyang X K, Jin M C, He C H. *Sep. Purif. Technol.*, **2007**, 56(3): 319~324
- 12 PAN Li, ZHANG Xiao-Feng, WANG Ming-Kui, LIAO Zhi-Xin, DING Li-Sheng(潘莉, 张晓峰, 王明奎, 廖志新, 丁立生). *Chinese Tradit. Herb. Drugs*(中草药), **2002**, 33(7): 583~586

Separation and Purification of Three Xanthones from *Swertia Mussotti* Franch by High Speed Counter-Current Chromatography

JIA Jing^{1,2}, LI Yu-Lin^{*1}, ZHAO Xiao-Hui¹, XIAO Yuan-Can¹, CHEN Gui-Chen¹, YOU Jin-Mao¹, WEI Li-Xin¹

¹(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

²(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract High speed counter-current chromatographic (HSCCC) method was used to purify and separate methylswertianin, gentiacaulein and decussatin from *Swertia mussotti* Franch. with a two-phase solvent system composed of hexane-ethyl acetate-ethanol-water(5:5:6:4, V/V). The upper phase was used as the stationary phase and the lower phase was used as the mobile phase at a flow rate of 2.5 mL/min. The experimental conditions were controlled at 850 r/min and 25 °C, and the effluent was detected at 254 nm. The separation products of methylswertianin, gentiacaulein and decussatin with the purity of over 98% were obtained by high performance liquid chromatography, and identification of their structures was performed by ¹H NMR, ¹³C NMR and 2D NMR.

Keywords High speed counter-current chromatography; *Swertia mussotti*; Methylswertianin; Gentiacaulein; Decussatin

(Received 26 July 2010; accepted 20 October 2010)