

高速逆流色谱法分离纯化灯心草的四个菲类化合物

李贵云, 陈泽蔓, 王小红, 黄建梅

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 本研究建立了高速逆流色谱法分离纯化灯心草中四个主要菲类成分 *effusol*、*dehydroeffusol*、*juncusol*、*dehydrojuncusol* 的方法。以环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水为溶剂体系, 上相为固定相, 下相为流动相, 流速 2 mL/min, 主机转速 850 rpm, 温度 25 °C, 对灯心草经 80% 乙醇回流提取, 乙酸乙酯超声萃取得到的粗提物经高速逆流色谱 2 次纯化, 得到 *dehydroeffusol*、*effusol*、*dehydrojuncusol*、*juncusol* 的纯度分别为 99.3%、98.5%、98.7%、97.4%。

关键词: 灯心草; 菲类成分; 高速逆流色谱; 分离;

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

Preparative Isolation and Purification of Four Phenanthrenes from *Juncus effusus* by HSCCC

LI Gui-yun, CHEN Ze-man, WANG Xiao-hong, HUANG Jian-mei*

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: This study is to establish the high-speed counter-current chromatography method for purification of *effusol*, *dehydroeffusol*, *juncusol*, *dehydrojuncusol* from *Juncus effusus* L. A two-phase solvent system was composed of cyclohexane-ethyl acetate-methanol-water (5:3:5:3), The upper phase was stationary phase while the lower as mobile phase, the flow rate was 2 mL/min, the revolution speed was 850rpm, and the temperature was 25 °C. The ethyl acetate extracts of *Juncus effusus* was purified by HSCCC twice. The purity of *effusol*, *dehydroeffusol*, *juncusol*, *dehydrojuncusol* was 99.3%, 98.5%, 98.5%, 97.4%.

Key words: *Juncus effusus*; phenanthrenes; High-speed counter-current chromatography; separation

高速逆流色谱^[1-3]是新型的液-液分配色谱技术, 无需固体载体作固定相, 克服了固体载体所带来的样品吸附, 既能分离非极性化合物, 也能分离极性化合物, 制备量大, 分离可得到高纯度化合物。前期课题研究发现灯心草的乙酸乙酯提取物具有显著的抗焦虑作用^[4], 同时证实乙酸乙酯部位中菲类成分 *effusol*、*dehydroeffusol*^[5]、*juncusol*、*dehydrojuncusol* 具有明显抗焦虑作用且四个化合物为灯心草的主要菲类成分^[6,7], 前期采用硅胶柱层析法对灯心草经乙醇回流提取, 乙酸乙酯超声萃取得到的粗提物进行分离纯化, 需多次色谱分离操作较繁琐、试剂消耗多、分离时间长, 为了灯心草后续研究, 本文应用高速逆流色谱分离纯化 *effusol*、*dehydroeffusol*、*juncusol*、*dehydrojuncusol*, 与之前的硅胶柱层析方法相比只需经高速逆流色谱两次纯化即可得到高纯度的四

个菲类化合物、试剂消耗量小、分离时间短, 为灯心草中菲类成分的制备提供了一种有效方法, 同时为灯心草的后续研究奠定了坚实的基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

上海同田 TBE-300B 高速逆流色谱仪, 紫外检测器, 浙江智达 N2000 色谱工作站; 岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪, SPD-20A 检测器; SHB-III 循环水多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); KQ300DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 电子天平 sartorius AGBS110S(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试剂

环己烷、乙酸乙酯、甲醇均为分析纯, 液相用甲醇为色谱纯, 用于 HPLC 分析的水为娃哈哈水, 其余用水均为去离子水。

灯心草药材购自黑龙江齐齐哈尔药材市场, 经

北京中医药大学中药学院生药系杨瑶珺副教授鉴定为灯心草 *J. effusus* L. 的干燥茎髓。对照品为本研究团队自制,经波谱分析确定结构。

2 实验方法

2.1 灯心草粗提物的制备

1.5 kg 灯心草干燥髓部,以 80% 乙醇回流提取两次,第一次以 25 倍量 80% 乙醇回流提取 1.5 h,第二次以 15 倍量 80% 乙醇回流提取 1 h,合并提取液,浓缩,真空干燥,得到干燥乙醇提取物 90.6 g。乙醇提取物经硅胶拌样,乙酸乙酯超声萃取两次,每次各 30 min,合并提取液,浓缩,真空干燥,得到干燥乙酸乙酯粗提物 17.6 g,备用。

2.2 两相溶剂的选择

本实验选择不同的两相溶剂体系,按不同比例混合摇匀,净置分层后分别取 2 mL 上相溶液和 2 mL 下相溶液,置于装有约 2 mg 待分离样品的离心管中,使其完全溶解,用 HPLC 法测定待测样品在上相溶液和下相溶液中的浓度,并计算其分配系数^[8]:

$$K = C_{\text{上}}/C_{\text{下}} = A_{\text{上}}/A_{\text{下}}$$

式中,K 为分配系数;C_上为上相溶液中的浓度(mol/L);C_下为下相溶液中的浓度(mol/L);A_上为上相溶液峰面积;A_下为下相溶液峰面积。

2.3 高效液相色谱条件

色谱柱 Agilent H C-C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 μm),柱温: 23 °C;进样量: 10 μL,流动相: 甲醇: 水(65: 35);流速: 1 mL/min,检测: PDA 检测器(检测波长: 270 nm)。

2.4 HSCCC 分离

将按比例配置的溶剂系统在分液漏斗中静置 24 h,次日分离后超声脱气 15 min。将上相以 20 mL/min 泵入并充满分离螺旋管,开启循环水浴并将温度设定为选定的实验温度。然后将下相以 2 mL/min 泵入,同时开启检测器并按选定的转速启动主机。待流动相从管柱出口流出且基线稳定后,进样。管柱出口处的流出物经紫外检测器检测并由色谱工作站和记录仪记录,根据色谱图手动收集各色谱峰组分,如图 3 阴影所示收集各色谱峰组分。

2.5 化合物的鉴别和纯度检查

采用上述高效液相条件,分析 HSCCC 分离得到组分,通过与实验室自制的 4 个化合物的对照品保留时间对比,确定经 HSCCC 分离得到组分对应的化合物结构,并通过色谱峰面积归一化法判断化合物的纯度。

3 结果与讨论

3.1 高速逆流溶剂系统选择

本实验根据文献报道选用了正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水、石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水,正己烷-乙酸乙酯-甲醇-1% 乙酸、环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水等不同体系,最后结合分离效果与分离时间的长短选择环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系,考察了环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系 5 种不同配比下 effusol、dehydroeffusol、juncusol、dehydrojuncusol 的分配系数(表 1),由表 1 的实验数据表明,采用环己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水(5: 3: 5: 3)溶剂体系时,可得到最佳的分配系数,满足实验需求。故本实验选择此体系分离样品。

表 1 环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水系统不同配比下四个非类化合物的分配系数

Table 1 The K values of four phenanthrenes in cyclohexane-ethyl acetate-methanol-water solvent system

环己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 cyclohexane: ethyl acetate: methanol: water(v/v)	K 厄弗酚 Effusol	K 去氢厄弗酚 Dehydroeffusol	K 灯心草酚 Juncusol	K 去氢灯心草酚 Dehydrojuncusol
5: 4: 5: 4	2.36	2.07	4.11	4.02
5: 3.5: 5: 3.5	0.84	0.68	1.28	1.28
5: 3: 5: 3	0.62	0.47	1.08	0.81
3: 2: 3: 2	44.21	27.11	5.91	11.49
3: 3.5: 3: 3.5	3.01	2.36	4.40	5.05

3.2 高速逆流色谱转速的选择

转速主要体现在固定相的保留率上,一般转速越高,固定相保留率也越高,分离效果也相对较好,

本实验采用环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5: 3: 5: 3)溶剂体系,进样量 50 mg,流速 2 mL/min,温度 25 °C 条件下,考察了转速 700、800、850、900 rpm 下的高速

逆流分离结果,如图1所示,结果表明850 rpm 转速条件下这四个物质的分离效果较好,转速为900 rpm 时,分离效果不好,可能跟该溶剂体系容易乳化有

关,乳化后固定相保留减少,从而造成分离效果变差,综合各因素最终选择转速为850 rpm。

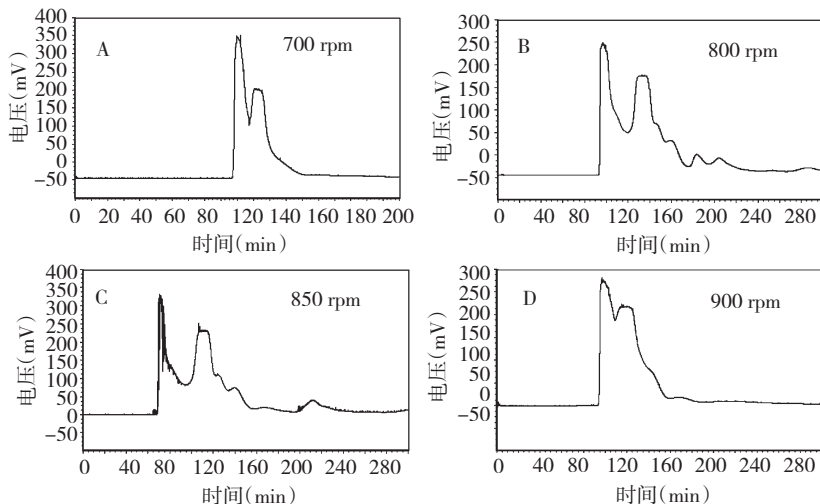


图1 不同转速 HSCCC 图

Fig. 1 High-speed counter-current chromatography under different revolution speed

3.3 高速逆流色谱温度的选择

温度影响溶剂体系的分配平衡,实验采用环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:3:5:3)体系,进样量 50

mg,转速 800 rpm、流速 2 mL/min 等相同的条件下,考察了 25、30 °C 温度下对目标化合物分离结果的影响,结果如图 2 所示,最后选择温度为 25 °C。

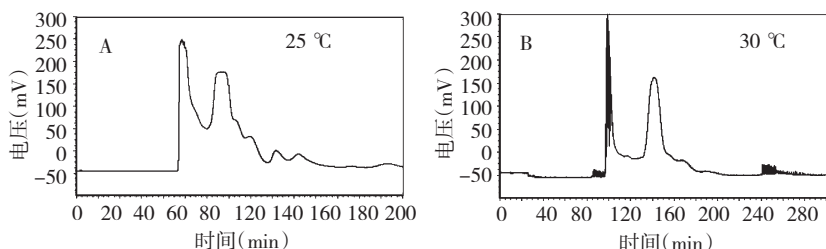


图2 不同温度 HSCCC 图

Fig. 2 High-speed counter-current chromatography under different temperature

综上所述,HSCCC 最佳分离条件为:环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:3:5:3)为两相溶剂系统,上相为固定相,下相为流动相,主机转速为 850 rpm,流动相流速 2 mL/min,分离温度 25 °C,检测波长 270 nm,进样量 50 mg,用 4 mL 下相溶解。

3.4 灯心草粗提物分离纯化结果

用环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:3:5:3)体系分离灯心草粗提物,采用 2.3 项的 HPLC 方法检测,灯心草粗提物的高效液相色谱图和灯心草粗提物的 HSCCC 分离情况见图 3,分离得到 effusol、dehydroeffusol、juncusol、dehydrojuncusol,分离效果良好。

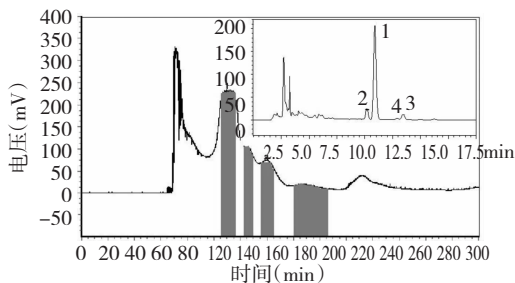


图3 灯心草粗提物的 HSCCC 和 HPLC 图

Fig. 3 The HSCCC and HPLC chromatograms of extract of *Juncus effusus*

1 dehydroeffusol; 2 effusol; 3 dehydrojuncusol; 4 juncusol

1 dehydroeffusol; 2 effusol; 3 dehydrojuncusol; 4 juncusol

3.5 产物纯度的测定

将两次进样量同为 50 mg, 高速逆流分离得到的相同物质合并, 每个物质峰再进行一次高速逆流色谱分离纯化, 分离得到四个非类成分与对照品的保留时间进行比较, 经 HSCCC 分离所得 1 为 dehydroeffusol、2 为 effusol、3 为 dehydrojuncusol、4 为 juncusol, 按照面积归一化法计算, dehydroeffusol、effusol、dehydrojuncusol、juncusol 的纯度分别为 99.3%、98.5%、98.7%、97.4%, 回收溶剂后干燥称重, 分别为 11.6、3.6、2.1、1.0 mg。

4 结论

(1)样品可以用上相、下相和上、下相按一定比例溶解, 试验中分别考察了用上相、下相和上、下相(1:1, v/v)混合溶剂制备样品溶液的分离情况。结果表明, 以上、下相混合溶剂溶解时, 分离过程中存在固定相流失的问题, 以上相溶解样品时, 由于样品在其中的溶解度较小, 需要大量的溶剂才能完全溶解样品, 进样体积较大, 致使整个分离过程的分离度大大降低。以下相溶解能满足实验要求, 故选择下相溶解样品。(2)试验结果表明, 进样量对分离度有一定的影响, 尤其是最先出现的峰(图3中峰1、2)。因此必须选择适宜的进样量。(3)高速逆流色谱分离的关键是溶剂系统的选择和优化^[9], 该试验的溶剂体系选择方法是参照相关应用文献, 在总结分析的基础上, 从所要分离的物质类别出发寻找类似的分离实例, 实验中发现, 含有环己烷的溶剂体系能很容易的将非类成分和其他成分分开而含有正己烷的溶剂体系却无法实现分离目的, 加入少量酸的溶剂体系分离所需时间较长, 因此后期实验根据具体情况做一些调整, 选出了符合实际需要的溶剂系统, 建立了适合灯心草乙酸乙酯提取物中 effusol、dehydroeffusol、juncusol、dehydrojuncusol 的高速逆流色谱分离方法, 显示高速逆流色谱在高速分离制备中的优势, 为灯心草中 effusol、dehydroeffusol、juncusol、dehydrojuncusol 的分离制备提供了一条新的技术路线, 为实验室灯心草的后续研究奠定了坚实的基础。

参考文献

1 Zhang TY(张天佑). Countercurrent Chromatography 3rd Edition(逆流色谱技术, 第3版). Beijing: Beijing Science and Technology Press, 1991.

2 Zhang HZ(张志宏). High-speed countercurrent chromatography in Chinese medicine active ingredient separation applications. *China Health Industry(中国卫生产业)*, 2012, 16: 166-167.

3 Shun Y. Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Polygonum multiflorum* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatography A*, 2006, 1115:64-71.

4 Wang YL(王衍龙), Duan Q(段琼), Duan TX(段天璇), et al. Study of the active site of the Juncus sedation. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine(北京中医药大学学报)*, 2006, 03:181-183.

5 Liao YJ, Zhai HF, Huang JM, et al. Anxiolytic and sedative Effects of dehydroeffusol from *Juncus effusus* in mice. *Planta Med*, 2011, 77:416-420.

6 Zhao DD(赵丹丹), Li GY(李贵云), Wang XH(王小红), et al. Rapid recognition and identification of phenanthrenes in *Juncus effusus* and *Juncus setchuensis* by LC-ESI-MS. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2003, 44:1539-1545.

7 Jian WJ(简伟杰), Duan Q(段琼), Duan TX(段天璇), et al. HPLC fingerprint of MedullaJunci. *Chin J Ex Tradit Med Formula(中国实验方剂学杂志)*, 2011(10):60-63.

8 Chen HY(陈会杰), Separation and preparation of gentiopicoside and sweroside from the extracts of *Swertia franchetiana* H. Smith by high speed counter-current chromatography. *J Anhui Agri Sci(安徽农业科学)*, 2010, 28:15561-15563.

9 Cheng J(程杰), Fu XH(符晓辉), Wang WN(王维娜). the selection of solvent system in the traditional Chinese medicine by high-speed countercurrent chromatography separation. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2008:1272-1275.

10 Zhang RJ(张荣劲), Yang YF(杨义芳). Selection of solvent system for high speed countercurrent chromatography in separation of natural products. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2008(2):298-303.

11 Zheng D(郑栋), Zheng W(郑威). High-speed counter-current chromatography and its application in analysis of Chinese traditional medicine separation. *Health Res(健康研究)*, 2009:394-396.

12 Guo LL(郭丽丽), Liu JS(刘景圣), Cai D(蔡丹). Selection of solvent system for high-speed countercurrent chromatography in separation of the active ingredient. *Academic Periodical of Farm Products Processing(农产品加工)*, 2010(5):27-29.

13 Yoichiro Ito. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1065:145-168.