

高速逆流色谱法对补骨脂中 补骨脂素和异补骨脂素的分离纯化研究*

□白 鸽 曹学丽** (北京工商大学化学与环境工程学院 北京 100048)
北京市植物资源研究开发重点实验室
谭 莉 唐亚林** (中国科学院化学研究所 北京 100190)

摘 要:补骨脂素和异补骨脂素是中药补骨脂的特征成分,含量较高且具有多种生物活性,目前已成为补骨脂及其产品的质量成分。本文以补骨脂干燥成熟果实为原料,经乙醇回流制备补骨脂粗提物,率先采用高速逆流色谱技术进行分离,所得样品由高效液相色谱检测纯度,并由对照品确定成分。实验结果表明:采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(7:3:5:5)作为两相溶剂体系,经一步逆流分离可以从补骨脂粗提物中分离得到补骨脂素和异补骨脂素,二者纯度分别达到 99.4%、99.1%。该法具有制备量大、分离效率高等优点。

关键词:高速逆流色谱 补骨脂 补骨脂素 异补骨脂素

中药补骨脂,别名和兰菟、胡韭子,为豆科植物补骨脂(*Psoralea corylifolia* L.)干燥成熟果实。味辛性温,具有补肾助阳,温中止泻,纳气平喘之功效。主要活性成分补骨脂素(Psoralen)和异补骨脂素(Isopsoralen)等香豆素类成分具有较强的光敏化作用和镇静、解痉、止血、致光敏作用^[1-2],用于治疗白癜风、斑秃、牛皮癣以及瘤样皮肤病。近来研究表明,补骨脂素对多种动物及人的肿瘤生长具有明显抑制作用^[3-5],异补骨脂素具有与雌激素类似的促细胞增殖作用,可调节机体的内分泌失调状态,从而达到缓解更年期综合征的效果^[6]。因此,研究补骨脂素和异补骨脂素的高效分离制备方法

具有重要意义。

目前,补骨脂素和异补骨脂素的主要提取方法有浸取法^[7]、超声法^[8]和索氏法^[9],主要分离方法是柱层析。有文献报道^[10]补骨脂先后用石油醚、乙酸乙酯及正丁醇进行萃取,得到的总浸膏上硅胶柱,用超载柱进行分离得到补骨脂素和异补骨脂素,但此法工序复杂,产品提纯困难。高速逆流色谱(High-Speed Counter-current Chromatography, HSCCC)是一种新型高效的色谱分离技术,由于其具有制备量大、分离效率高等优点,近年来已广泛应用于天然活性成分的分离制备^[11]。对于香豆素类成分,如羌活中的蛇羌活醇、异欧前胡素^[12],蛇床子中的欧芹酚甲醚、花椒毒酚^[13],HSCCC法都达到了很好的分离效果。

收稿日期:2009-06-07

修回日期:2009-08-21

* 国家自然科学基金面上项目(B030107):以转铁蛋白受体介导的天然抗肿瘤化合物靶白给药物系相互作用的物理化学性质研究,负责人:唐亚林。

** 联系人:曹学丽,教授,主要研究方向:生物分离, Tel:010-68983116, E-mail:caoxl@th.btbu.edu.cn;唐亚林,教授,主要研究方向:化学生物学和药物化学, E-mail:tangyl@iccas.ac.cn。

本文结合分配系数测定法,考察了一系列不同配比的溶剂体系,从中筛选出一种适合于补骨脂提取物中补骨脂素和异补骨脂素分离的溶剂体系,并成功用于两种成分的高效制备分离。

一、实验部分

1. 材料

补骨脂干燥种子(购于北京同仁堂药店,产于河南,炒制品;经中国科学院化学研究所唐亚林教授鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实);补骨脂素、异补骨脂素对照品(购于深圳美荷生物科技有限公司,纯度 98%);乙醇、正己烷、乙酸乙酯、甲醇等溶剂为分析纯(北京化学试剂公司);液相色谱分析用的甲醇为色谱纯(Merck 公司),水为超纯水。

2. 补骨脂粗提物的制备

取补骨脂 1kg 分装于冷凝回流装置中,以 95%乙醇(3L)加热回流 3h,滤过,得提取液。残渣以 95%乙醇(3L)重复加热回流 2 次,每次 3h,合并提取液,减压浓缩至粘稠状,真空干燥,所得 10g 补骨脂粗提物储存于冰箱(4℃)中备用。

3. HSCCC 溶剂体系选择

溶剂体系的选择可以通过测定目标化合物的分配系数(K)来确定。取一定量的乙醇提取物溶解于某一待选溶剂体系的下相做 HPLC 检测,目标物质的峰高响应值记作 H_{L1} ,加入等体积的上相充分混合后至完全分层,再取下相做 HPLC 检测,此时目标物质的峰高响应值记作 H_{L2} ,根据公式(1)计算其在不同体系下的分配系数 K。其中 V_U 表示分层平衡后上相的体积, V_L 表示下相的体积,用 HPLC 进行测定时可以取等体积的上下相溶液以简化计算。

$$K_{U/L} = \frac{H_{L1} - H_{L2}}{H_{L2}} \cdot \frac{V_U}{V_L} \quad (1)$$

4. HSCCC 分离

每次分离前,首先配制已选择好的两相溶剂体系,充分混合后静置分层。取上相作为固定相,下相作为流动相。用输液泵以 $10\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速将固定相注满螺旋管柱(300mL),然后启动 HSCCC 主机(TBE-300A 高速逆流色谱仪,上海同田生化技术有限公司),调节转速为 850rpm,以 $2.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速向柱内输入流动相。当流动相从主机出口流出且流出的固定相体积保持不变时,表明体系已经达到流体动力学平衡,适合进行样品的分离。此时记录推出的固定相体积 V_e ,利用柱体

积 V_e 和柱外流通死体积 V_f ,即可由公式 $S_r = [(V_e + V_f) - V_f] / V_e \times 100\%$ 推算出固定相的保留百分率。然后将预先准备好的样品溶液从进样阀注入到样品环,进样量 20mL。柱出口与紫外检测器连接(8823B-紫外检测仪,北京滨达英创科技有限公司),在 280nm 下在线连续检测,并根据 N2000 色谱数据工作站的色谱峰分段收集各级分。

5. 补骨脂粗提物及 HSCCC 分离物的 HPLC 分析

补骨脂粗提物和 HSCCC 分离得到的各级分经 HPLC 分析。Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司,含四元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Chem Station 色谱工作站);Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm)色谱柱;流动相为甲醇-水(50:50);流速为 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量为 10μL;柱温 30℃;检测器为 DAD 二极管阵列;检测波长为 280nm。

HSCCC 分离物经补骨脂素标准品、异补骨脂素标准品进行对照鉴定。

二、结果与讨论

1. HPLC 分析方法的优化

本研究采用不同的流动相体系(甲醇-水,乙腈-水)对补骨脂粗提物进行分析。结果显示当用甲醇-水(50:50)作流动相时,补骨脂粗提物中两种主要成分 A 和 B 可以达到基线分离,如图 1。与对照品的 HPLC 保留时间和紫外吸收谱进行比较,确定组分 A 为补骨脂素, B 为异补骨脂素。在后续的分离中以二者为目标物进行。

2. HSCCC 溶剂体系的选择

根据补骨脂素和异补骨脂素的极性,重点考察了

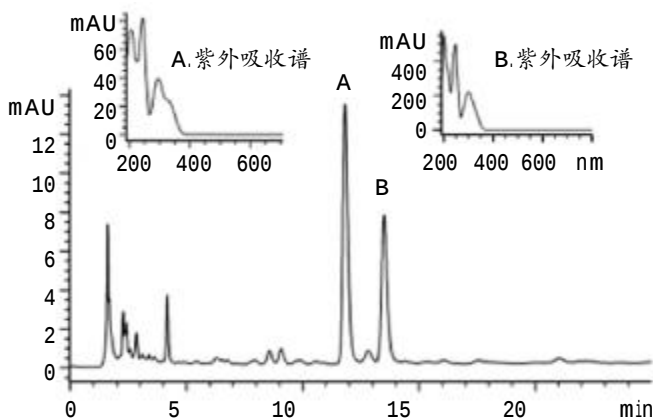


图 1 补骨脂粗提物 HPLC 图及 A、B 的紫外吸收谱

HSCCC 中常用于中等极性物质分离的溶剂体系正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水^[11]。研究了不同溶剂配比,对目标组分 A、B 的分配系数 K 值的影响,结果如表 1。

根据分配系数选择溶剂体系时,通常选择使分配系数在 0.5~2 之间的溶剂体系。因分配系数过大,将导致保留时间延长;相反分配系数太小,则目标物出峰太快,分离度会降低。另外,分配系数之间的差异越大,化合物之间分离度越好。

从表 1 可以看出,从正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:5)溶剂体系开始,随着体系中正己烷/乙酸乙酯比例的增加,上相的保留能力降低,K 值表现出不同程度的降低,但均在 0.5~2 之间,且二者之间有一定的差异,因此比较符合分离要求。相反,当降低正己烷/乙酸乙酯比例,同时降低甲醇/水的比例时,不仅上相的保留能力增强,同时下相的洗脱能力降低,从而使分配系数显著增大,不适于目标物的分离。因此,我们选用符合分配系数范围的溶剂体系分别进行了分离。

3. HSCCC 分离结果

分离度是衡量两个相邻色谱峰之间分离效果的一个参数,可表示为: $R_s=2(t_{R2}-t_{R1})/(W_1+W_2)$ 。其中 t_{R2} 、 t_{R1} 分别是两峰的保留时间; W_1 、 W_2 分别为两峰的峰底宽度。由图 2 的分离结果可以看出,采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:5)溶剂体系, $R_s=0.85$,表明补骨脂粗提取物中两峰 A、B 重叠较多(图 2a);采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5)溶剂体系, $R_s=1.25$,表明 A、B 两峰之间有部分重叠(图 2b);继续优化,当采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(7:3:5:5)溶剂体系时, $R_s=1.64$,表明目标组分 A、B 两峰之间达到了基线分离,分离效果较为理想(图 2c)。因此,未继续增加正己烷/乙酸乙酯的比例。

4. HPLC 纯度分析

在分离过程中一直采用 HPLC 对 HSCCC 分离得到的各级分进行跟踪检测。结果表明(图 3),采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(7:3:5:5)溶剂体系,可从 190mg 粗提取物中得到纯度为 99.4%的补骨脂素 70.8mg(HSCCC 保留时间 247~308min)和纯度为 99.1%的异补骨脂素(HSCCC 保留时间 325~380min)48.2mg,得率分别为 37.3%和 25.4%。

三、结 论

本文经过优化筛选溶剂体系,建立了适合补骨脂

表 1 目标成分 A 和 B 在正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水中的分配系数(K 值)表

溶剂体系	H_{AL1}	H_{AL2}	K_A	H_{BL1}	H_{BL2}	K_B	K_A/K_B
8:2:5:5	8.099	4.796	0.69	6.184	3.103	0.99	0.70
7:3:5:5	28.846	10.068	1.87	22.021	8.968	1.46	1.28
6:4:5:5	9.532	4.211	1.26	7.168	3.719	0.93	1.35
5:5:5:5	19.886	7.632	1.61	15.098	5.206	1.90	0.85
5:5:3:7	16.977	1.476	10.50	12.389	1.549	7.01	1.50
4:6:3:7	52.661	3.781	12.93	39.027	3.198	11.20	1.15
3:7:3:7	51.775	3.057	15.94	38.248	2.687	13.24	1.20

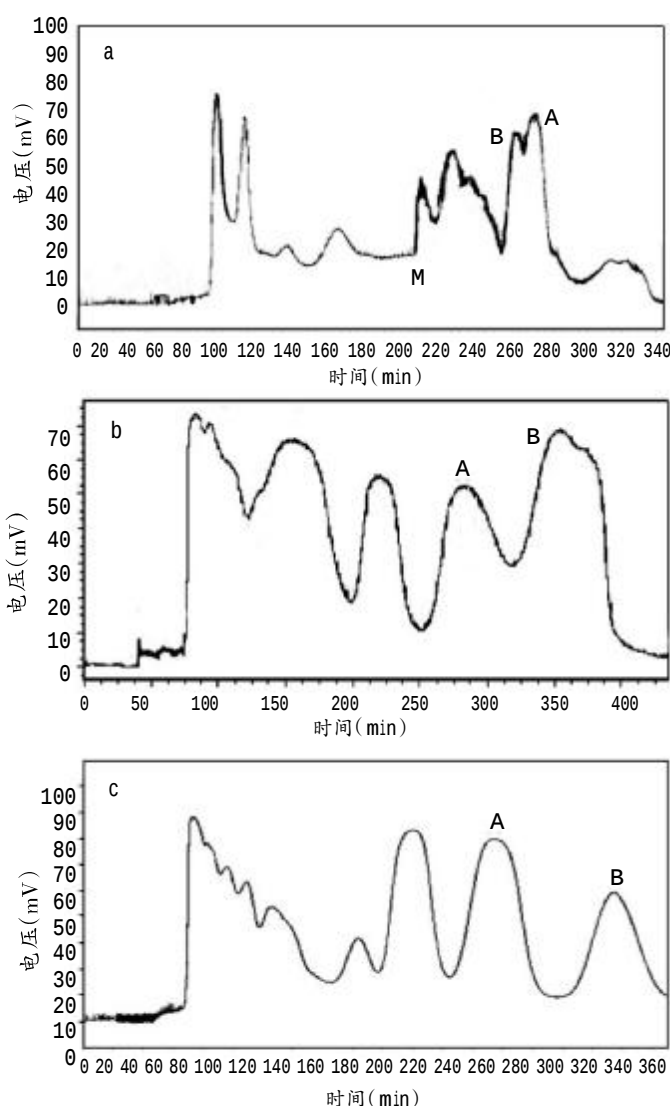


图 2 各溶剂体系分离补骨脂粗提取物的 HSCCC 优化过程图

a. 正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:5)溶剂体系,其固定相保留率 82.1%,进样量 170mg。(注:M 改变进液洗脱方式,以上相作为流动相下相作为固定相); b. 正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5)溶剂体系,其固定相保留率 78.93%,进样量 200mg; c. 正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(7:3:5:5)溶剂体系,其固定相保留率 77.14%,进样量 190mg。

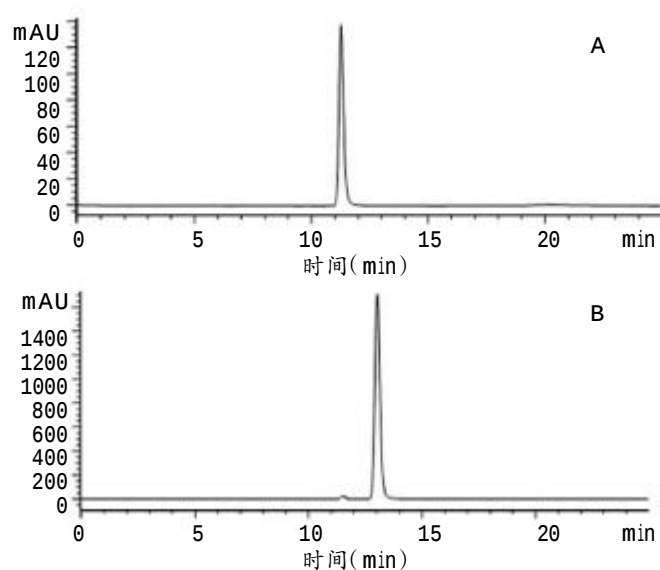


图3 HSCCC 峰组分的 HPLC 图

A. 补骨脂素; B. 异补骨脂素

提取物中补骨脂素和异补骨脂素的高速逆流色谱分离方法,显示了高速逆流色谱在高效分离制备中的优势,为补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的分离制备提供了一条新的技术路线。

参考文献

- 1 朱兆荣,李玉强,刘娟等.补骨脂总黄酮抗氧化作用研究.中国兽药杂志,2005,39(2):18-20.
- 2 Herrmann G, Brenneisen P, Wlaschek M, et al. Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts in

- vitro reminiscent of cellular senescence. Journal of Cell Science, 1998,6(111):759-767.
- 3 Fisher G J, Wang Z Q, Datfa S C, et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. New England Journal of Medicine, 1997, 337:1419-1429.
- 4 闫晓光.补骨脂素类抗肿瘤作用的光敏特性研究.国外医学肿瘤学分册,1999,4(26):85-89.
- 5 李冬云,陈信义,刘瑞娟.单味中药成分逆转白血病多药耐药基础研究评述.中国中医药信息杂志,2004,11(11):951-954.
- 6 赵丕文,牛建昭,王继峰,等.异补骨脂素和蜕皮甾酮对人乳腺癌 T47D 细胞增殖及 ER 亚型表达的影响.北京中医药大学学报,2007,30(4):242-245.
- 7 袁小红,李爱群.正交试验法优选补骨脂的浸取工艺.中药材,2001,24(1):48-50.
- 8 杨帆,金描真,宋凤兰,等.补骨脂提取工艺的比较研究.中国中药杂志,2005,16(30):1290-1291.
- 9 国家药典委员会.中华人民共和国药典.北京:化学工业出版社,2005:129-130.
- 10 彭国平,吴盘华,李红阳,等.补骨脂化学成分研究.中药材,1996(11):563-565.
- 11 曹学丽.高速逆流色谱技术及应用.北京:化学工业出版社,2005.
- 12 Yang F Q, Zhang T Y, Liu Q H. et al. Preparative isolation and purification of notopteron and isopteron from Notopterygium forbesii Boiss (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A, 2000, 883:67.
- 13 Wei Y, Zhang T Y, Ito Y. Preparative isolation of osthol and xanthoxol from Common Cnidium Fruit (Chinese traditional herb) using step-wise elution by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A, 2004, 1033:373.

Preparative Isolation and Purification of Psoralen and Isopsoralen from Psoralea Corylifolia by High-Speed Counter-Current Chromatography

Bai Ge¹, Cao Xueli¹, Tan Li², Tang Yalin²

(1.Beijing Key Lab of Plant Resources Research and Development, School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;2.Research Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: High-speed counter-current chromatography (HSCCC) was employed for the separation of psoralen and isopsoralen from a crude extract of *Psoralea corylifolia*. The crude extract was obtained by extracting with ethanol from the dried seeds of *Psoralea corylifolia*. n-Hexane-ethyl acetate-methanol-water (7 : 3 : 5 : 5) was used as the HSCCC two-phase solvent system for the separation. The isolated high-pure components were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and identified by comparing of the retention time with those of the standards. The results indicated that psoralen and isopsoralen were separated from other elements at 99.4% and 99.1% purity. High-speed counter-current chromatography could separate and prepare these two components successfully from *Psoralea corylifolia* seeds.

Keywords: High-speed Counter-current Chromatography (HSCCC); *Psoralea corylifolia*; Psoralen; Isopsoralen

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立巍)