

## 高速逆流色谱法分离纯化续随子种子中的七叶内酯

余霞<sup>1,2</sup>, 张卫明<sup>2</sup>, 石雪萍<sup>2</sup>, 孙力军<sup>2\*</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046; 2. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

**摘要**: 建立了高速逆流色谱(HSCCC)技术分离纯化续随子种子中七叶内酯的方法。将续随子种子的乙酸乙酯萃取物直接进行高速逆流色谱分离,考察了不同溶剂系统的分离效果。结果表明,最佳的溶剂系统为氯仿-甲醇-水(体积比为4:3:2),以其上相为固定相,下相为流动相。从200 mg续随子种子乙酸乙酯萃取物中分离得到80 mg七叶内酯,纯度为99.04%。HSCCC技术可高效分离纯化续随子种子中的七叶内酯,为得到高纯度的七叶内酯提供了制备技术。

**关键词**: 高速逆流色谱; 七叶内酯; 续随子种子

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2010)08-0809-04

## Isolation and purification of esculetin from the seeds of *Euphorbia lathyris* L. using high-speed counter-current chromatography

YU Xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Weiming<sup>2</sup>, SHI Xueping<sup>2</sup>, SUN Lijun<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China;

2. Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

**Abstract**: A method for the isolation and purification of esculetin from the seeds of *Euphorbia lathyris* L. was developed using high-speed counter-current chromatography (HSCCC). The ethyl acetate extract of the seeds of *Euphorbia lathyris* L. was separated by the HSCCC directly. Different solvent systems were investigated, and the results showed that the best solvent system was the two-phase solvent system composed of chloroform-methanol-water (4:3:2, v/v/v). The lower phase was used as the mobile phase and the upper phase was used as the stationary phase. A total of 80 mg esculetin with the purity of 99.04% was successfully obtained from 200 mg crude extract of the seeds of *Euphorbia lathyris* L. The results indicate that optimized HSCCC offers a preferred method for the preparation of esculetin from the seeds of *Euphorbia lathyris* L.

**Key words**: high-speed counter-current chromatography (HSCCC); esculetin; seeds of *Euphorbia lathyris* L.

续随子(*Euphorbia lathyris* L.)属大戟科大戟属植物。续随子的干燥成熟种子(即千金子)是我国传统中药材,文献记载始见于《开宝本草》<sup>[1]</sup>。千金子具有逐水消肿、破血消癥作用,主治水腫、痰飲、积滞、胀满、二便不通、血瘀经闭,外治顽癬等<sup>[2]</sup>。文献报道多为续随子种子中脂肪酸类物质的相关研究<sup>[3-5]</sup>和千金子炮制的相关研究<sup>[6,7]</sup>。七叶内酯即6,7-二羟基香豆素,为简单的香豆素类化合物(结构

式见图1)。药理实验表明:七叶内酯具有抗炎、抗菌止咳、祛痰、平喘等药理作用<sup>[8]</sup>。现代研究证明:续随子种子中含有香豆素类成分,其中七叶内酯具有促进血液循环的作用,动物实验结果表明其具有增加尿量和促进尿酸从组织中排出的效果,这与中医的逐水消肿作用一致<sup>[9]</sup>。

关于七叶内酯的分离纯化,通常采用硅胶柱色谱法<sup>[10-14]</sup>,但结果差异较大。在使用柱色谱法分离

\* 通讯联系人: 孙力军, 博士, 主要研究方向为生物技术。Tel: (025) 85289850, E-mail: hanchuansun@126.com.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD07A04)和江苏省自然科学基金项目(No. BK2008095)。

收稿日期: 2010-04-20

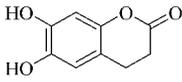


图 1 七叶内酯的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of esculetin

纯化物质时,样品在固定相的吸附是导致样品回收率低的一个重要因素。高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)是一种基于运转螺旋管内两相溶剂的单向性流体动力学现象而获得高效率分离的色谱系统,是一种连续的无需任何固体支持物的高效、快速的液-液分配色谱分离技术。它不使用固相载体作固定相,克服了固相载体带来的样品不可逆吸附、污染、失活和变性等缺点,并且分离量大,样品无损失,回收率高,节约溶剂,而且分离物能达到相当高的纯度。因此,HSCCC已广泛用于分离天然产物中的有效成分<sup>[15]</sup>和中国传统中药的研究<sup>[16-19]</sup>,如苯丙素类物质<sup>[16]</sup>、香豆素类物质<sup>[17]</sup>、萘醌素类物质<sup>[18]</sup>、黄酮类物质<sup>[19]</sup>。本研究采用HSCCC的分离方法,简便、快速、有效地分离纯化了续随子种子中的七叶内酯。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

TBE-300 高速逆流色谱仪(螺旋管行星式串联3柱逆流色谱仪,管径1.9 mm,柱体积300 mL,进样圈体积20 mL),TBP-50A型双柱塞恒流泵(上海同田生物技术有限公司),TBD-2000型紫外检测器(上海金达生化仪器有限公司),TC-1050型恒温循环器(上海同田生物技术有限公司),Agilent 1200型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司),旋转蒸发器RE-2000(上海亚荣生化仪器厂)。

HPLC分析用甲醇为色谱纯(美国Tedia公司),高速逆流色谱和提取用试剂均为分析纯(南京化学试剂有限公司)。

续随子种子为南京野生植物综合利用研究院选育的高油优良品种,经钱学射研究员鉴定。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 粗提物的制备

取续随子种子,经粉碎机粉碎,过40目筛。称取500 g干燥粉末,加入1 000 mL 75%乙醇回流提取3次,每次2 h,过滤后合并滤液。将滤液减压浓缩至浸膏后,加入热水,制成水悬浮液,然后依次用等体积的正己烷萃取7次,乙酸乙酯、正丁醇各萃取1次。萃取后减压浓缩各相萃取液,实验所用样品为乙酸乙酯相萃取产物。

#### 1.2.2 溶剂体系和样品液的配制

在分液漏斗中配制氯仿-甲醇-水(体积比为4:3:2)两相溶剂体系,充分振荡后在室温下静置过夜。使用前分别取上相和下相,超声脱气30 min。

取200 mg续随子种子的乙酸乙酯相萃取物,依次加入6 mL甲醇、8 mL氯仿和4 mL水溶解样品,备用。

#### 1.2.3 HSCCC分离样品

以10 mL/min的流速将溶剂体系的上相注入HSCCC分离管中,待上相充满整个管路后调整主机转速为800 r/min,再以1.5 mL/min流速注入下相,待流动相(即下相)从柱口流出,两相在分离管中达到动态平衡后,由进样口注入18 mL样品液,于254 nm波长下检测,记录色谱图,根据色谱图收集目标成分。

#### 1.2.4 纯度分析

应用HPLC对制备得到的样品进行纯度分析。所用色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C18柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),检测波长254 nm,测定温度25℃,进样量为10 μL。流动相为甲醇和0.4%磷酸水溶液,流速为0.8 mL/min;梯度洗脱程序:0~20 min,10%甲醇~35%甲醇;20~30 min,35%甲醇~50%甲醇;30~40 min,50%甲醇~10%甲醇。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理方法的选择

对比了不同浓度乙醇的回流提取效果以及各萃取溶剂的萃取次数对产物收率的影响。实验结果显示,75%乙醇的提取率要高于95%和70%乙醇的提取率。所以本文采用75%乙醇,料液比1:2,回流提取3次,每次2 h。由于续随子种子的含油量高达45%<sup>[20]</sup>,因此去除脂肪酸甘油酯类物质对后续实验很关键。预实验表明:用正己烷至少萃取7次才能基本去除脂肪酸甘油酯类物质。

### 2.2 HSCCC分离条件的选择

在高速逆流色谱中,溶剂系统的选择至关重要,合适的溶剂系统是其分离的关键。本实验依据所分离化合物的特性及HSCCC分离香豆素的相关报道<sup>[21-22]</sup>,考察了不同溶剂体系中样品的分配系数,以此来优选续随子种子中七叶内酯的最佳溶剂体系的配比。按溶剂体系配制一定体积的上相、下相溶剂,平衡好后,各取相同体积的上相、下相溶剂放置于同一容器中。加入一定量的样品,剧烈振摇后静置,待上相与下相分层后,取相同体积的上相和下相样品液,注入HPLC仪测定目标成分在上相和下相

中的浓度  $C_S$  和  $C_M$ , 用来计算分配系数  $K$  ( $K = C_S / C_M$ ), 以选取合适的溶剂系统<sup>[23-25]</sup>。一般情况下, 分配系数  $K$  值在 0.5 ~ 1 之间能得到令人满意的分离效果<sup>[26]</sup>。采用体积比为 4:3:2 的氯仿-甲醇-水溶

剂体系时七叶内酯的分配系数  $K = 0.85$  (见表 1), 因此本文选择此溶剂体系进行 HSCCC 分离。实验过程中, 还对流动相的流速进行了优化, 最终选择流动相的流速为 1.5 mL/min。

表 1 续随子种子粗提取物中七叶内酯在不同溶剂体系中的分配系数  
Table 1 Partition coefficients ( $K$ ) of esculetin in the crude extract from the seeds of *Euphorbia lathyris* L. in different two-phase solvent systems

No.	Solvent system	$K$
1	<i>n</i> -hexane-ethyl acetate-methanol-water (3:5:3:5, v/v/v/v)	2.47
2	<i>n</i> -hexane-ethyl acetate-methanol-water (3.4:5:3.4:5, v/v/v/v)	0.37
3	<i>n</i> -hexane-methanol-water (5:5:5, v/v/v)	6.44
4	light petroleum-ethyl acetate-methanol-water (5:5:7:4, v/v/v/v)	5.92
5	chloroform-methanol-water (4:3:2, v/v/v)	0.85

### 2.3 HSCCC 分离制备结果

采用 HSCCC 对续随子种子的乙酸乙酯萃取物进行了分离, 固定相保留率为 70%, 分离时间为 5 h, HSCCC 色谱图见图 2; 根据 HSCCC 图谱手动收集, 收集了 5 个组分 (见图 2 中的组分 I ~ V)。将各收集组分减压浓缩干燥并对各收集物进行 HPLC 分析。

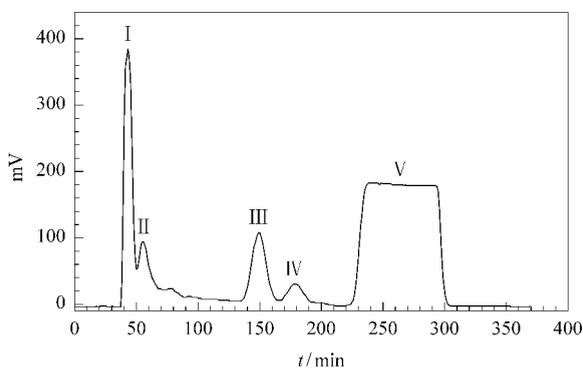


图 2 续随子种子粗提取物的高速逆流色谱图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of the crude extract from the seeds of *Euphorbia lathyris* L.

HSCCC conditions: solvent system, chloroform-methanol-water (4:3:2, v/v/v); the upper phase as stationary phase, the lower phase as mobile phase; flow rate, 1.5 mL/min; revolution speed, 800 r/min; detection wavelength, 254 nm; retention of the stationary phase, 70%.

对组分 V 进行减压浓缩, 得到淡黄色粉末状物质 80 mg (进样量为 200 mg), 收率为 40%。对组分 V 进行 HPLC 检测 (谱图见图 3), 采用峰面积归一化法测定其纯度为 99.04%。

对组分 V 进行结构鉴定。其为淡黄色粉末, 易溶于二甲基亚砷 (DMSO)。飞行时间质谱 (TOF MS) 鉴定结果:  $m/z$  201.09 ( $[M + Na]^+$ );  $m/z$  177.13 ( $[M - H]^-$ , 相对丰度为 100%)。核磁共振氢谱 ( $^1H$ -NMR) (500 MHz, DMSO) 鉴定结果:  $\delta$ : 6.169 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz, H-3), 6.714 (1H, s, H-

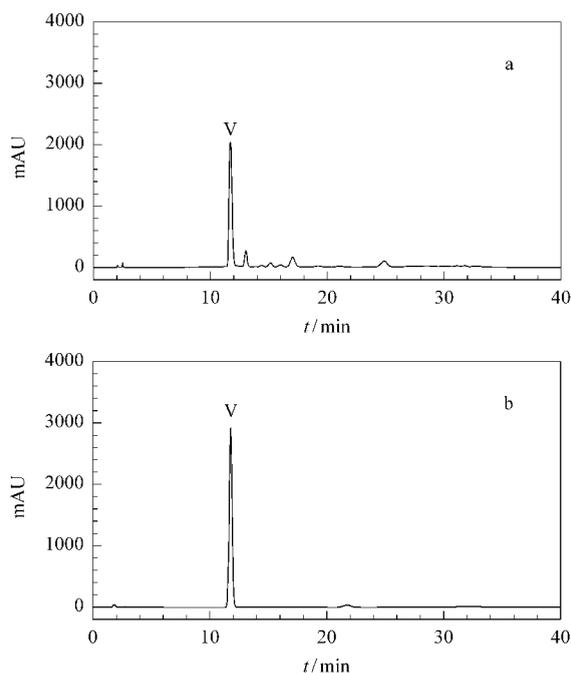


图 3 (a) 续随子种子粗提取物和 (b) HSCCC 分离得到的七叶内酯的 HPLC 谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of (a) the crude extract of the seeds of *Euphorbia lathyris* L. and (b) the prepared esculetin by HSCCC from the crude extract

5), 6.980 (1H, s, H-8), 7.871 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz, H-4), 9.402 (1H, s, 6-OH), 10.211 (1H, s, 7-OH)。以上波谱数据与文献<sup>[12,13,27]</sup>报道一致, 故鉴定组分 V 为七叶内酯。

经减压浓缩和 HPLC 分析测定后, HSCCC 分离所得组分 I ~ IV 中七叶内酯的含量少且成分复杂, 有待于进一步的分析研究。

上述实验结果表明, 利用 HSCCC 对七叶内酯进行大量制备分离的方法切实可行。七叶内酯易溶于三氯甲烷、甲醇、乙醇等有机溶剂的特性, 使得氯仿-甲醇-水 (4:3:2, v/v/v) 溶剂体系中的下相可以很好地溶解粗提取物中的七叶内酯, 这可能是该溶剂

体系的优越处所在。

### 3 结论

建立了高速逆流色谱从续随子种子中分离制备七叶内酯的方法。该方法具有简便、快速、节省溶剂等特点,具有较好的应用价值,且对于后续的续随子种子的药理研究和综合利用都具有非常重要的参考价值。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Cheng Z H. Hubei Journal of Traditional Chinese Medicine (程卓华. 湖北中医杂志), 2001, 23( 8 ): 50
- [ 2 ] Du T X, Wang Z D, Wang M T. China Journal of Chinese Materia Medica (杜天信, 王中东, 汪茂田. 中国中药杂志), 2004, 29( 10 ): 1006
- [ 3 ] Jin M Y, Ma C, Wei W L, et al. Chinese Journal of Oil Crop Sciences (金梦阳, 马冲, 危文亮, 等. 中国油料作物学报), 2007, 29( 2 ): 107
- [ 4 ] Wei W L, Jin M Y, Ma C, et al. China Oils and Fats (危文亮, 金梦阳, 马冲, 等. 中国油脂), 2007, 32( 5 ): 70
- [ 5 ] Jia Y C, Xu L, Chen Z, et al. Journal of Anhui Agricultural Sciences (贾元超, 徐琅, 陈重, 等. 安徽农业科学), 2008, 36( 18 ): 7509
- [ 6 ] Sun X M, Zhang Z W, Cao Y H. Chinese Traditional Patent Medicine (孙秀梅, 张兆旺, 曹艳花. 中成药), 2003, 25( 12 ): 981
- [ 7 ] Li Y X, Sun Z X, Li Y, et al. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy (李英霞, 孙兆祥, 李岩, 等. 中华中医药杂志(原中国医药学报)), 2008, 23( 7 ): 614
- [ 8 ] Sheng P, Du N S, Guli · Sitan, et al. Journal of Xinjiang Medical University (盛萍, 堵年生, 古丽·斯坦, 等. 新疆医科大学学报), 2003, 26( 6 ): 586
- [ 9 ] Li Z G, Sun X G, Zhou K F, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (李振国, 孙信功, 周可范, 等. 中国中药杂志), 1993, 18( 8 ): 458
- [ 10 ] Masamoto Y, Ando H, Murata Y. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67 : 631
- [ 11 ] Zheng F L, Luo Y H, Wei X Y, et al. Journal of Tropical and Subtropical Botany (郑飞龙, 罗跃华, 魏孝义, 等. 热带亚热带植物学报), 2009, 17( 3 ): 298
- [ 12 ] Yuan N N, Huang W H, Qiu R X, et al. Journal of Jinan University : Natural Science (袁宁宁, 黄伟欢, 邱瑞霞, 等. 暨南大学学报: 自然科学版), 2009, 30( 3 ): 302
- [ 13 ] Du Z L, Yin Z Q, Wang L, et al. Natural Product Research and Development (杜彰礼, 殷志琦, 王磊, 等. 天然产物研究与开发), 2008, 20 : 630
- [ 14 ] Gao G C, Wu P, Cao H L. Journal of Tropical and Subtropical Botany (高广春, 吴萍, 曹洪麟. 热带亚热带植物学报), 2006, 14( 3 ): 233
- [ 15 ] Huang T H, Zhou J. Chinese Traditional and Herbal Medicine (黄天辉, 周俊. 中草药), 2009, 40( 1 ): 67
- [ 16 ] Li F Y, Gou Z P, Ma X C, et al. Chromatographia, 2010, 71 : 481
- [ 17 ] Wei Y, Xie Q Q, Fisher D, et al. Chromatographia, 2009, 70 : 1185
- [ 18 ] Feng L, Ji H W, Gu H X, et al. Chromatographia, 2009, 70 : 1197
- [ 19 ] Sun Y S, Liu Z B, Wang J H, et al. Chinese Journal of Chromatography (孙印石, 刘政波, 王建华, 等. 色谱), 2009, 27( 2 ): 244
- [ 20 ] Jin M Y, Wei W L. Journal of Nuclear Agricultural Sciences (金梦阳, 危文亮. 核农学报), 2008, 22( 5 ): 569
- [ 21 ] Wu H K, Su Z, Yi L A. Chem Nat Compd, 2007, 43( 1 ): 109
- [ 22 ] Skalicka-Wozniaka K, Mroczek T, Garrard I, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216 : 5669
- [ 23 ] Kumar N S, Wijekoon W M A M B, Kumar V, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216 : 4295
- [ 24 ] Cao X L, Hu G H, Huo L S, et al. J Chromatogr A, 2008, 1188 : 164
- [ 25 ] Xie J C, Sun B G, Wang S B, et al. Food Chem, 2009, 117 : 375
- [ 26 ] Ito Y. J Chromatogr A, 2005, 1065 : 145
- [ 27 ] Tan J J, Jiang S H, Zhu D Y. Natural Product Research and Development (谭俊杰, 蒋山好, 朱大元. 天然产物研究与开发), 2005, 17( 3 ): 267