

高速逆流色谱分离紫苏酮的研究

胡晓丹^{1,2} 张德权² 孙爱东¹ 王建中¹ 刘玉军¹

(1 北京林业大学生物科学与技术学院 2 中国农业科学院农产品加工研究所)

摘要:紫苏酮是一种对试验动物肺部具有潜在毒性的物质. 该文采用高速逆流色谱分离法从紫苏叶中分离出了紫苏酮. 结果表明, 以 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醇}):V(\text{水})=6:5:1$ 为溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 转速为 800 r/min, 流动相流速为 1.2 mL/min, 进样 1 g 粗提物, 6 h 后分离出 28.0 mg 紫苏酮, 经气相色谱测定, 组分纯度达到 98.8%, 并用核磁共振等方法进行了结构鉴定.

关键词:高速逆流色谱, 紫苏, 紫苏酮, 分离

中图分类号:Q946 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2007)05-0170-03

HU Xiao-dan^{1,2}; ZHANG De-quan²; SUN Ai-dong¹; WANG Jian-zhong¹; LIU Yu-jun¹. **Separation of perilla ketone by high speed countercurrent chromatography.** *Journal of Beijing Forestry University* (2007) 29 (5) 170-172 [Ch, 12 ref.]

1 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100094, P. R. China.

Perilla ketone is a potential lung toxin to laboratory-used animals. A new method for preparative separation of perilla ketone from the leaves of *Perilla frutescens* by high speed countercurrent chromatography (HSCCC) was established to evaluate the possible hazards to human health. The results showed that HSCCC was an efficient tool in the separation of perilla ketone. A mixture of hexane, ethanol and water in the ratio of 6:5:1 was used as the solvent system, which was shaken in a separatory funnel, and after settling for phase separation, the upper one was taken as the stationary phase, and the lower one as the mobile phase. The mobile phase was operated at a flow rate of 1.2 mL/min, while the apparatus rotated at 800 r/min. After the proceeding separation for 6 hours, 28.0 mg of perilla ketone was obtained with a purity of 98.8 % determined by gas chromatography in one step elution from 1 g crude extract, and the identification was performed by nuclear magnetic resonance (¹H-NMR, ¹³C-NMR and DEPT-NMR).

Key words high speed countercurrent chromatography (HSCCC), *Perilla frutescens*, perilla ketone, separation

高速逆流色谱 (high speed countercurrent chromatography, 简称 HSCCC) 是一种新型的液-液分配色谱, 其原理是基于样品在旋转螺旋管内, 互不溶解的两相溶剂间分配不同而获得分离, 因而无须任何固体载体或支撑体, 能在短时间内实现高效分离和制备, 并且可以达到几千个理论塔板数. 与其他柱色谱相比较, 它克服了固定相载体带来的样品吸

附、损失、污染和峰形拖尾等缺点^[1]. 目前此项技术已被应用于生化、生物工程、医药、天然产物化学、有机合成、环境分析、食品、地质、材料等领域. 美国 FDA 及世界卫生组织 (WHO) 引用此项技术进行抗生素成分的分离鉴定. 20 世纪 90 年代以来, HSCCC 被广泛地应用于天然药物成分和活性成分的分离制备和分析鉴定中. 国内外的研究表明, HSCCC 技术

收稿日期: 2006-11-07

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目: 中德科学中心资助项目 (051/4(148)).

第一作者: 胡晓丹, 博士生, 讲师. 主要研究方向: 食品化学与天然产物化学. 电话: 010-62338221 Email: huxiaodan@hotmail.com 地址: 100083 北京林业大学 112 信箱.

责任作者: 张德权, 博士, 副研究员. 主要研究方向: 农产品加工与检测. 电话: 010-62815969 Email: dqzhang0118@126.com 地址: 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院农产品加工研究所.

已经从农产品、中草药等天然产物中分离纯化与制备了数百种单体成分,这些成分包括黄酮类、生物碱类、蒽醌类、皂苷类、大环内酯类、多酚类、儿茶素类、多糖类、糖蛋白类等物质^[2]。

紫苏 (*Perilla frutescens* (L.) Britt. var. *arguta* (Benth.) Hand. -Mazz.) 别名赤苏、红苏、香苏,是原产于喜马拉雅山及中国的中南部地区的一种唇形科 1 年生草本植物,现主要分布于中国、印度、日本、朝鲜等国。紫苏是我国传统的药食两用植物,亦是国家卫生部首批颁布的既是食品又是药品的 60 种中药之一。紫苏性温、辛、入肺经,具有化痰平喘、散寒解表、理气宽胸和解郁安胎作用^[3]。紫苏叶中含有丰富的营养物质和黄酮类化合物,其中粗蛋白含量高达 28%,精油 0.3% ~ 0.7%, β -胡萝卜素 0.9 ~ 1.0 mg/kg,此外维生素 B₂ 也较丰富,可被广泛应用于功能性食品、药品和化妆品^[4-5]。

紫苏叶除了含有多种活性成分外,也含有有害成分。紫苏酮是 3 位取代的呋喃化合物,此结构与腐烂甘薯的有毒成分甘薯苦醇为同类化合物^[6],有药理毒性,实验证明,紫苏酮会产生神经毒抑制中枢作用,如食草动物的肺水肿、肺充血^[7-8]等。但紫苏酮在 50 ~ 100 mg/kg 浓度下,能完全抑制莴苣和大马唐的生长,可用于农药生产。紫苏精油及脂溶性提取物中含有紫苏酮,可能会导致神经毒,对机体运动、呼吸及循环中枢产生广泛的抑制作用^[9]。

本研究用 HSCCC 技术,从紫苏叶脂溶性提取物中成功地分离和制备了紫苏酮,并采用薄层色谱 (TLC)、气相色谱 (GC) 和核磁共振 (¹H-NMR、¹³C-NMR 和 DEPT-NMR) 等手段对其纯度和结构进行了分析和鉴定。

1 材料与方法

1.1 仪器

高速逆流色谱仪系统:美国 Pharma-Tech Research 生产的 CCC-1000 型高速逆流色谱仪,有 3 个聚四氟乙烯 (PTFE) 分离柱 (内径 2.6 mm,总容量 850 mL),并配有 BT3020 型 Biotronik HPLC 泵、Knauer UV-Vis 检测器、Pharmacia LKB 组分收集器。

气相色谱仪:美国 HP 公司生产 HP-6890 气相色谱仪,FID 检测器。

核磁共振仪:德国 Bruker 公司生产的 AMX300 型核磁共振仪。

1.2 材料与试剂

紫苏叶产自中国浙江,采收后冷冻干燥,备用。正己烷、乙醇、二氯甲烷均为分析纯 (德国 Fischer 公司),水为二次蒸馏水,并经微孔滤膜过滤。

1.3 紫苏叶脂溶性粗提物的制备

将紫苏叶适当粉碎,称取粗粉 50 g,加 200 mL 正己烷,室温静置 1 h,过滤,滤渣重复提取 2 次,每次正己烷 100 mL,过滤,合并滤液,减压回收正己烷,得到紫苏叶脂溶性膏状粗提物,冰箱冷冻保存,备用。

1.4 HSCCC 分离方法

采用 HSCCC 分离方法对紫苏叶脂溶性粗提物进行分离纯化。首先配制一定体积比的正己烷-乙醇-水两相溶剂系统,将其充分混合后,静置分层。取上相 (有机相) 作为固定相,下相 (水相) 作为流动相。每次分离前,用输液泵以 10 mL/min 的流速将固定相注满螺旋管柱。启动 HSCCC 主机,调节转速为 800 r/min,由首端向尾端,以 1.2 mL/min 的流速向柱中泵入流动相。当流动相从主机出口流出,证明体系已经达到流体动力学平衡,此时将样品溶液打入进样环。柱口流出物通过紫外检测器在 254 nm 下连续检测,记录仪同步记录,根据谱峰收集组分。分离完成后,停止主机转动,用氮气把固定相推出,测定固定相的保留率^[10]。

1.5 气相色谱分析

色谱条件^[11]:HP-5 号石英毛细管气相色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m),载气为 N₂,流速 2 mL/min,尾吹气流速 25 mL/min,柱温 200 °C,进样器温度 250 °C,检测器温度 250 °C,分流比 60:1,进样量 1 μ L。

1.6 NMR 结构确认

采用 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 DEPT-NMR 谱进行紫苏酮的结构确认。结构确认的检测在德国 Braunschweig 理工大学食品化学研究所完成。

2 结果与讨论

2.1 紫苏酮的分离

溶剂体系的选择是 HSCCC 分离中最为关键的环节,溶剂体系选择的合适与否,直接关系到分离结果的好坏。本研究利用 TLC 经过多次分离条件的摸索,最后确定采用 V (正己烷):V (乙醇):V (水)=6:5:1 为溶剂系统,以上相作为固定相,下相作为流动相。每次分离称取紫苏叶脂溶性粗提物 1 g 左右,溶于 10 mL 的两相溶剂 (等体积的上、下相) 中,选择主机转速为 800 r/min,流动相流速为 1.2 mL/min,分离温度 25 °C,检测波长 254 nm,脂溶性粗提物的 HSCCC 色谱图见图 1。

在此分离条件下,固定相的保留率为 55%,分离时间小于 6 h,一次分离得到 6 个组分,利用 TLC 和 GC 技术分别对 6 个组分进行进一步分析。

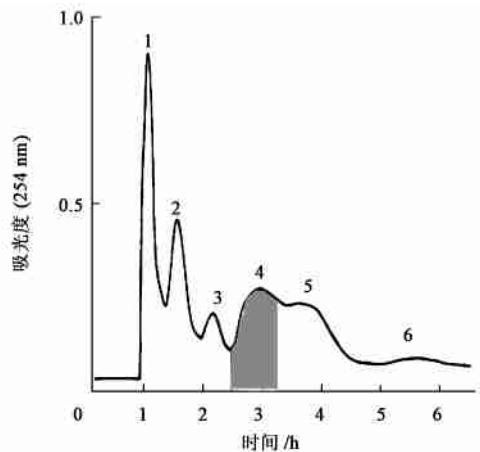


图1 紫苏叶粗提物的高速逆流色谱图

FIGURE 1 Chromatogram of the crude extracted from the leaves of *P. frutescens* by HSCCC

2.2 产物纯度及结构

对 HSCCC 分离所得 6 个组分进行 TLC 分析,以 CH_2Cl_2 为展开剂在硅胶 G 板上展开,组分 4(见图 1 中阴影部分)为单一斑点, R_f 值为 0.52. 1 g 脂溶性粗提物用 HSCCC 分离后可得到 28.0 mg 组分 4. 在 GC 色谱条件下进行分析(图 2), 组分 4 为单一色谱峰,是目标化合物紫苏酮,其峰纯度为 98.8%(峰面积归一化法).

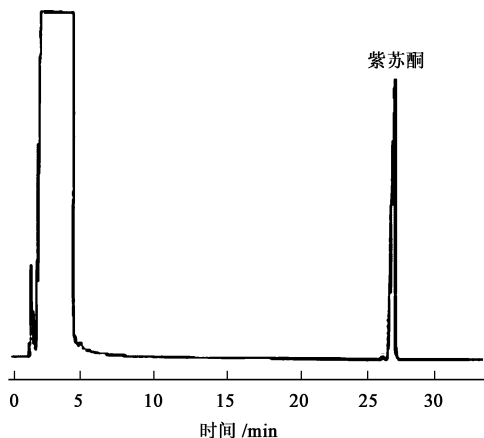


图2 组分4的气相色谱图

FIGURE 2 Gas chromatogram (GC) of component corresponding to peak 4 in the HSCCC chromatogram

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 数据, δ : 0.8 (3H, s), 0.9 (3H, s), 1.4 (1H, m), 1.6 (2H, t), 2.74 (2H, t), 6.79、7.54、8.05 (1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 和 DEPT 135 谱数据, δ (C 的位置, 见图 3): 109.1 (CH, C-1), 144.5 (CH, C-2), 147.7 (CH, C-3), 128.2 (q, C-4), 195.7 (q, C-5), 38.9 (CH_2 , C-6), 33.6 (CH_2 , C-7), 28.2 (CH, C-8), 22.7 (CH_3 , C-9, C-10).

以上 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT-NMR 数据和文献[12]报道的紫苏酮的数据一致.

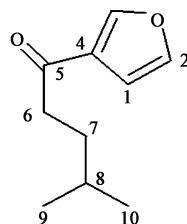


图3 紫苏酮的结构式

FIGURE 3 Chemical structure of perilla ketone

3 结 论

本研究以 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醇}):V(\text{水})=6:5:1$ 为溶剂系统,用高速逆流色谱分离紫苏叶中的紫苏酮,能在 6 h 内从 1 g 粗提物中一次性分离得到纯度高达 98.8% 的组分 28.0 mg,具有高效性和独特性. 该方法不仅为紫苏酮的进一步研究和利用奠定了良好的基础,而且为提高紫苏叶及紫苏精油的安全性提供了新的思路. 这也说明高速逆流色谱是一种分离天然产物行之有效的好方法.

参 考 文 献

- [1] ITO Y. Efficient preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge[J]. *J Chromatogr*, 1981, 214: 122.
- [2] ITO Y, CONWAY W D. *High-speed countercurrent chromatography* [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996: 73-91.
- [3] 丁树利, 朱兆仪. 紫苏属植物研究进展[J]. 国外医药: 植物药分册, 1994, 9(2): 4.
DING S L, ZHU Z Y. Review on research and development of genus *Perilla*[J]. *Foreign Medicine: Botanical Medicine Fascicle*, 1994, 9(2): 4.
- [4] 刘月秀, 张卫明. 紫苏化学成分分析[J]. 广西植物, 1999, 19(3): 285-288.
LIU Y X, ZHANG W M. The determination of chemical contents of *Perilla frutescens* var. *arguta*[J]. *Guihaia*, 1999, 19(3): 285-288.
- [5] FUJITA T, NAKAYAMA M. Monoterpene glucosides and other constituents from *Perilla frutescens* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34: 1 545-1 548.
- [6] KOEZUKA Y, KAMISAKO W. Isolation of sedative principles from *Perilla frutescens*[J]. *Ghem Pharm Bull*, 1986, 34(4): 1 672.
- [7] KERR L A, JOHNSON B J. Intoxication of cattle by *Perilla frutescens* (purplemint)[J]. *Vet Hum Toxic*, 1986, 28: 412-416.
- [8] ABERNATHY V J, ROSELLI R J. Effects of perilla ketone on the *in situ* sheep lung[J]. *J Appl Physiol*, 1992, 72(2): 505.
- [9] WILSON B J, GARST J E, CHANNEL R B. Perilla ketone: A potent lung toxin from the mint plant, *Perilla frutescens* Britt [J]. *Science*, 1977, 197: 573-574.
- [10] MING G, FAN O. Comparison of high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography on fingerprinting of Chinese traditional medicine [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1 022: 139-144.
- [11] 陈瑛, 姜玉梅. 毛细管气相色谱测定紫苏油中紫苏醛的方法研究[J]. 江西科学, 1999, 17(1): 52-55.
CHEN Y, JIANG Y M. An approach to the method of testing perillaldehyde in perilla herb oil with capillary gas chromatogram [J]. *Jiangxi Science*, 1999, 17(1): 52-55.
- [12] 刘建辉, 陈兰贵. 紫苏油中主要化学成分分离和鉴定[J]. 香料香精化妆品, 1998(1): 19-20.
LIU J H, CHEN L G. Isolation and identification of major chemical components in perilla oil [J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 1998(1): 19-20.