

半制备高效液相色谱制备5种苯乙醇苷类单体

陈文娟^{1,2}, 李典鹏¹, 陈月圆¹, 黄永林¹, 文永新^{1*}

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

摘要: 利用MCI柱层析和半制备型反相高效液相色谱法从牛耳朵中分离制备了5种苯乙醇苷类单体。在Eclipse XDB-C18(9.4 mm×250 mm, 5 μm)半制备柱上, 以甲醇-水为流动相, 流速为4 mL/min, 采用梯度洗脱方式, 制备得到5个组分。经波谱(EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR)分析, 分别鉴定为 plantainoside(1)、chiritoside C(2)、plantaninoside B(3)、plantamajoside(4)和 desrhamnosylverbascoside(5)。高效液相色谱分析表明所制备5种化合物纯度均高于98%。该方法分离条件简单, 高效, 一次可得到5个单体, 目标产物纯度较高。

关键词: 半制备高效液相色谱; 牛耳朵; 苯乙醇苷类

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)02-0269-05

Preparation of five phenylethanoid glycoside components by semi-preparative HPLC

CHEN Wen-Juan^{1,2}, LI Dian-Peng¹, CHEN Yue-Yuan¹,
HUANG Yong-Lin¹, WEN Yong-Xin^{1*}

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: A method was established for the isolation and preparation of five phenylethanoid glycoside components from *Chirita eburnea* using MCI column chromatography and semi-preparative HPLC. A semi-preparative Eclipse XDB-C18 (9.4 mm×250 mm, 5 μm) was used in the preparation process. By gradient elution with methanol-water as the mobile phase at a flow rate of 4 mL/min, five phenylethanoid glycoside components were obtained from *Chirita eburnea*, and on the basis of spectral data (EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR), these compounds were identified as plantainoside(1), chiritoside C(2), plantaninoside B(3), plantamajoside(4) and desrhamnosylverbascoside(5), and the purities of these five phenylethanoid glycoside components analyzed by HPLC were all beyond of 98%. The method is efficient, simple with high purification and got 5 components for one time.

Key words: semi-preparative HPLC; *Chirita eburnea*; phenylethanoid glycosides

牛耳朵(*Chirita eburnea*)为苦苣苔科唇柱苣苔属植物, 多年生草本, 根粗壮; 生于石山, 丘陵或山地溪边, 分布于广西、广东、湖南、湖北、四川及贵州等地。牛耳朵根茎或全草入药, 性味甘、平, 有清肺、止血、止咳、除湿、解毒、治肺结核等功用, 广西民间广泛用来治疗肺结核、高血压等病(江苏新医学院,

1977; 广西壮族自治区中医药研究所, 1986)。

药理研究表明, 苦苣苔科植物中苯乙醇苷类化合物具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗辐射、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、增强记忆、保肝、强心等作用(靖会等, 2006)。目前国内外对苯乙醇苷类单体的分离、纯化研究大部分还处于实验室研究阶段, 多采用大孔吸

收稿日期: 2009-09-22 修回日期: 2009-12-16

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划应用基础研究专项(桂科基 0832022) [Supported by the Special Fund for Application Basic of Scientific Research and Technological Development Program of Guangxi (0832022)]

作者简介: 陈文娟(1983-), 女, 广西钦州人, 硕士研究生, 主要从事天然产物研究, (E-mail) wenzhi502@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: wyx@gxib.cn)

附树脂、硅胶、sephadex LH-20、ODS 柱层析等反复分离才能得到纯品(贺震旦等, 1989; 南海函等, 2008), 由于苯乙醇苷类化合物在固相色谱上几乎是不可逆吸附的, 故经过反复柱层析后, 纯品的得率非常低。有学者采用高速逆流的方法对苯乙醇苷类化合物进行分离、纯化, 得到相对较多的纯品(Lei 等, 2001; Li 等, 2005, 2008), 但鲜见有文献详细报道牛耳朵中苯乙醇苷类单体的制备、半制备方法及其条件。为了进一步研究和开发牛耳朵的资源, 确定其药理活性成分, 对牛耳朵的苯乙醇苷类化合物进行了深入研究。

本实验利用半制备高效液相色谱的分离纯化技术对牛耳朵中的苯乙醇苷类化合物进行了系统的研究, 从牛耳朵中制备分离出 5 个化合物。经高分辨电子轰击质谱(EI-MS), 核磁共振谱(NMR)等技术的鉴定, 制备分离得到的化合物均属于苯乙醇苷类化合物, 分别为: 3, 4-二羟基苯乙醇-3-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷(plantainoside)(1), 3, 4-二羟基苯乙醇-6-O-葡萄糖咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷(chiritoside C)(2), 3, 4-二羟基苯乙醇-2-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷(plantaninoside B)(3), 3, 4-二羟基苯乙醇- β -D-葡萄糖(1 \rightarrow 3)-4-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷(plantamajoside)(4), 3, 4-二羟基苯乙醇-4-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷(desrhamnosylverbascoside)(5)。其中化合物 3 首次从该科植物中分离得到, 化合物 1, 2, 4, 5 均为首次从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1100 分析型高效液相色谱仪: 包括二极管阵列多波长检测器(DAD)、四元梯度泵、在线真空脱气机、7725i 手动进样器、HP 化学工作站(美国 Agilent 公司); Agilent1200 半制备型高效液相色谱仪: 包括 VWD 检测器、四元梯度泵、在线真空脱气机、标准自动进样器(G1329A)、安捷伦化学工作站(美国 Agilent 公司); 核磁共振波谱仪: AMX-500 MHz(德国 BRUKER 公司), 以四甲基硅烷(TMS)为内标; 质谱仪: ESQUIRE HCT(美国 Bruker Daltonics 公司); 超纯水仪(Millipore 公司); R-3000 旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司); 蒸发光散射检测器(ELSD) 2000ES(格雷斯中国有限公司)。

1.2 试剂与材料

色谱甲醇、乙腈(美国 FISHER 公司); 超纯水为自制; 薄层层析硅胶为青岛海洋化工厂产品; MCI 柱层析(日本 TOKYO 公司); 常用溶剂均为分析纯(西陇化工厂); 样品于 2008 年 7 月采自广西桂林市雁山镇, 经广西植物研究所韦发南研究员鉴定为苦苣苔科唇柱苣苔属植物牛耳朵(*Chirita eburnea*)。

2 实验方法

2.1 牛耳朵中苯乙醇苷类化合物的提取分离

新鲜牛耳朵根茎 10 kg, 室内阴干, 用 75% 乙醇加热回流提取两次(每次 3 h), 减压浓缩, 得浸膏 A 700 g。用适量的水溶解浸膏 A, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 浓缩正丁醇萃取液得浸膏 B 200 g。取正丁醇部位浸膏 B 20 g 进行 MCI 柱层析, 依次用 10%、20%、30%、40%、50%、60% 和 100% MeOH 梯度洗脱, 经 TLC 薄层色谱分析, 合并 30%、40% MeOH 洗脱部分, 得浸膏 C 3 g。将浸膏 C 用甲醇溶解至其质量浓度为 400 mg/mL, 采用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤到自动进样瓶中, 进行半制备型高压液相色谱分离, 分别收集 1-5 组分, 如图 1 所示。1-5 组分经减压浓缩, 真空干燥后, 得化合物 1(81.8 mg), 化合物 2(65.9 mg), 化合物 3(90.4 mg), 化合物 4(88.2 mg), 化合物 5(95.8 mg)(化合物 1-5 对应为组分 1-5)。

2.2 色谱条件

分析型色谱柱: Eclipse XDB-C18(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 218 nm; 流速: 0.8 mL/min; 流动相: 乙腈-水(17:83, V:V); 进样量: 10 μ L; 进样方式为手动进样, 液相专用平头针定量。

半制备色谱条件: 半制备型色谱柱: Eclipse XDB-C18(9.4 mm \times 250 mm, 5 μ m); 柱温: 38 $^{\circ}$ C; 检测波长: 218 nm; 流速: 4 mL/min; 流动相: 甲醇(A相)-水(B相); 梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0~5 min, 25%~26% A; 5~10 min, 26% A; 10~14 min, 26%~27% A; 14~25 min, 27%~28% A。进样量: 16 mg; 分析时间: 26 min; 进样方式: Agilent 标准自动进样器(G1329A)自动进样; 样品环(100 μ L)定量; 收集方式: 手动收集。

蒸发光散射色谱条件: Eclipse XDB-C18(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水(17:83, V:V);

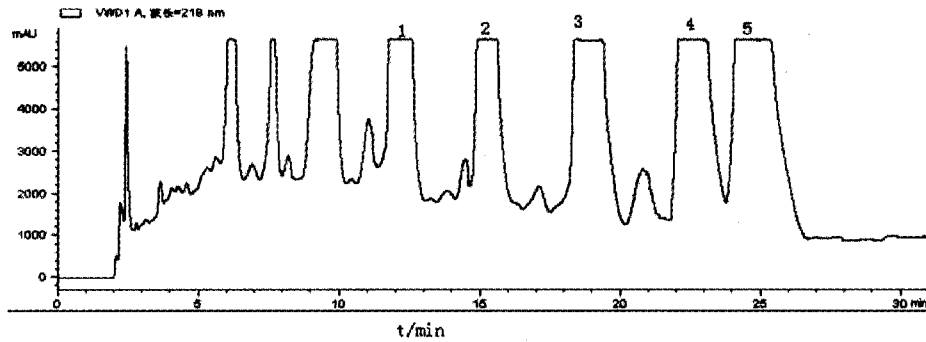


图 1 样品的半制备 HPLC 色谱图

Fig. 1 Semi-preparative HPLC chromatograms of sample

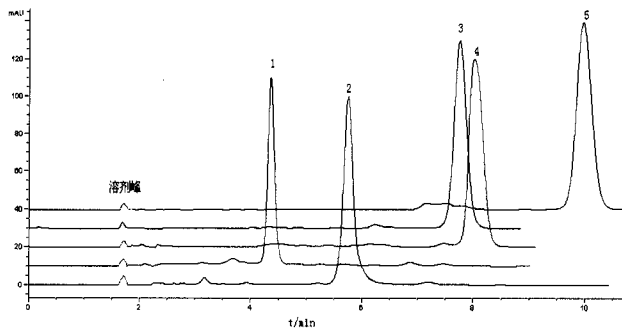


图 2 5 种苯乙醇苷类化合物的分析型 HPLC 色谱图

Fig. 2 Analytical HPLC chromatograms of five phenylethanoid glycoside components

流速: 0.8 mL/min; 柱温: 30 °C; ELSD 漂移管温度: 100 °C; 空气流速: 2.7 L/min.

3 结果与讨论

3.1 HPLC 法对制备的样品进行纯度测定

按分析型的色谱条件, 分别把 1-5 组分溶液注入分析型 HPLC 中检测, 得到 1-5 组分色谱图, 均为单一色谱峰, 如图 2 所示, 化合物 1-5 的保留时间分别为: 化合物 1 (4.810 min), 化合物 2 (5.707 min), 化合物 3 (7.705 min), 化合物 4 (7.970 min), 化合物 5 (9.921 min)。通过采用面积归一化法计算 1-5 组分的纯度, 其纯度均高于 98%。为了进一步验证 1-5 组分的纯度, 分别把 1-5 组分溶液注入连接有 ELSD 2000ES (蒸发光散射检测器) 的分析型 HPLC 中检测, 得到 1-5 组分色谱图也均为单一色谱峰 (图 3)。通过面积归一化法计算 1-5 组分的纯度均高于 99.0%, 故确定利用半制备色谱法制备的 1-5 组分均为纯品。

3.2 结构鉴定

化合物 1 黄白色无定形粉末, 具吸湿性, 易溶

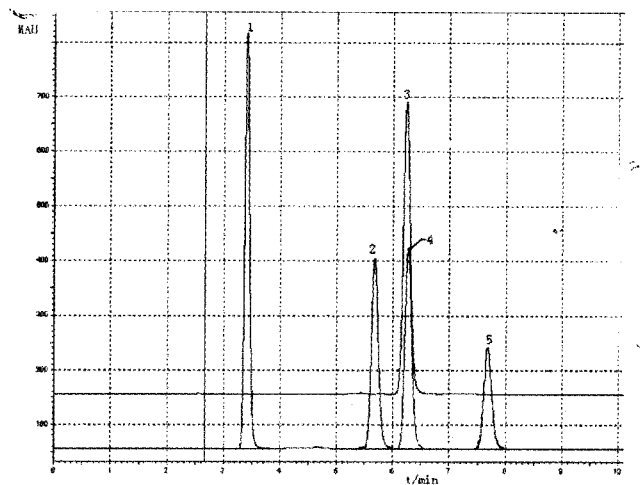


图 3 5 种苯乙醇苷类化合物的蒸发光散射检测色谱图

Fig. 3 Evaporative light scattering detection chromatograms of five phenylethanoid glycoside components

于甲醇。遇 $\text{FeCl}_3\text{-K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 试剂显蓝色, 示为酚性物质。EI-MS m/z : 479 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) 数据与 Miyase 等 (1991) 报道的 plantainoside A 数据一致。故鉴定该化合物为: 3,4-二羟基苯乙醇-3-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷 (plantainoside A)。

化合物 2 黄白色无定形粉末, 具吸湿性, 易溶于甲醇。遇 $\text{FeCl}_3\text{-K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 试剂显蓝色, 示为酚性物质。ESI-MS m/z : 641 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) 数据与 Damtoft 等 (1994) 报道的 chiritoside C 数据一致。故鉴定该化合物为: 3,4-二羟基苯乙醇-6-O-葡萄糖咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷 (chiritoside C)。

化合物 3 黄白色无定形粉末, 具吸湿性, 易溶

于甲醇。遇 $\text{FeCl}_3\text{-K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 试剂显蓝色, 示为酚性物质。ESI-MS m/z : 479 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) 和 $^{13}\text{CNMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) 数据与 Miyase 等(1991)报道的 plantaninoside B 数据一致。故鉴定该化合物为: 3,4-二羟基苯乙醇-2-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷 (plantaninoside B)。

化合物 4 黄白色无定形粉末, 具吸湿性, 易溶于甲醇。遇 $\text{FeCl}_3\text{-K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 试剂显蓝色, 示为酚性物质。ESI-MS m/z : 641 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) 和 $^{13}\text{CNMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) 数据与 Henrik 等(1998)报道的 plantamajoside 数据一致, 故鉴定该化合物为: 3,4-二羟基苯乙醇- β -D-葡萄糖(1 \rightarrow 3)-4-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷 (plantamajoside)。

化合物 5 黄白色无定形粉末, 具吸湿性, 易溶于甲醇。遇 $\text{FeCl}_3\text{-K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 试剂显蓝色, 示为酚性物质。ESI-MS m/z : 479 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) 和 $^{13}\text{CNMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) 数据与 Shimomura 等(1987)报道的 desrhamnosylverbascoside 数据一致。故鉴定该化合物为: 3,4-二羟基苯乙醇-4-O-咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷 (desrhamnosylverbascoside)。

3.3 半制备色谱条件的建立

本实验选用乙腈-水和甲醇-水作为流动相进行分离制备, 结果表明, 两种流动相的分离效果相似。从研究成本方面考虑, 本文采用甲醇-水系统作为流动相进行制备, 采用乙腈-水系统进行分析。

流动相确立后, 本实验考察了 2、3、4 mL/min 的流速对 1-5 组分分离效果的影响(图 4)。结果表明, 低流速时, 样品分离度较好, 但出峰时间推迟, 分离时间较长(流速为 2 mL/min 时需要 50 min 才完成一个洗脱单元), 且峰形变宽; 流速加大, 分离时间缩短, 但样品与杂质分离度下降。在保证一定的分离度的情况下, 流速的加大能缩短分离时间, 故经综合考虑本文采用 4 mL/min 的流速。

在流速为 4 mL/min 时分别考察进样量 4、8、12、16、20 mg 的分离效果。结果表明, 进样量在 4~16 mg 范围内变化, 对保留时间影响不大, 但随着进样量的增加, 谱峰逐渐变宽, 分辨率逐渐降低, 分离度减小, 尤其对化合物 4 和 5 分离效果影响最大, 当进样量增至 20 mg 后, 谱峰展宽和拖尾现象严重, 色谱分辨率和分离效果急剧下降, 说明进样量已超出等温吸附的线性范围, 因此进样量选择为 16 mg。

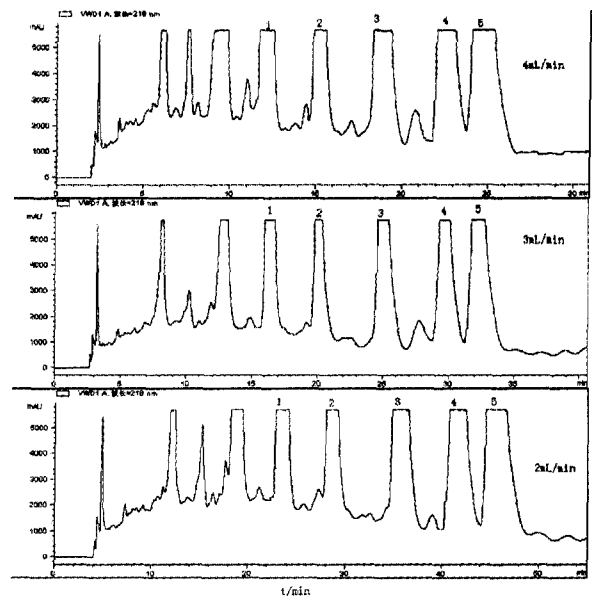


图 4 不同流速对 5 种苯乙醇苷类化合物的分离色谱图
Fig. 4 Isolation chromatograms of five phenylethanoid glycoside components by different flow rates

在流速为 4 mL/min、进样量为 16 mg 时进行洗脱条件的考察。本实验先考察 20%、25%、30%、40% 甲醇恒比例的流动相对 1-5 组分的分离情况。结果表明, 20% MeOH 恒比例的流动相洗脱 30 min 尚不能把 1-5 组分洗脱下来; 25% MeOH 恒比例开始 10 min 分离效果很好, 能把前面的杂质与 1 组分拉开 2 min 左右, 但 1-5 组分出峰时间很慢, 峰形也不对称, 故 25% MeOH 恒比例也不能用于制备; 30% MeOH 恒比例的流动相对 1-5 组分分离效果不理想, 1、2 组分汇合成一个峰, 3、4、5 组分连在一起, 之间没有间隔, 证明 30% MeOH 的极性大了。40% MeOH 恒比例的流动相在 8 min 内就把所有物质冲下来, 1-5 组分完全没有分离开。故本实验采用梯度洗脱, 根据试验的几个恒比例, 确定初始比例为 25% MeOH, 梯度在 30% MeOH 以内缓慢变化, 梯度条件如前 2.1 所述。

4 结论

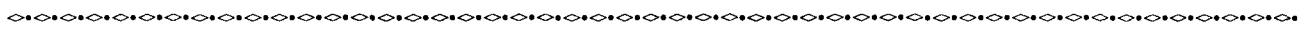
粗提物经 MCI 柱层析预处理富集苯乙醇苷类混合物, 降低了半制备高效液相色谱的分离难度, 简化了分离条件和提高了分离效能。本实验通过 MCI 柱层析的前期处理, 在 Eclipse XDB-C18(9.4

mm×250 mm, 5 μm)半制备色谱柱上,以甲醇-水为流动相,流速为 4 mL/min,采用梯度洗脱方式,在较短的时间内(26 min)一次可从牛耳朵中制备分离得到 5 种苯乙醇苷类单体,高效液相色谱分析表明所制备的 5 种化合物的纯度均高于 98%。该方法具有操作方便、高效、经济的特点,制备的 5 种苯乙醇苷类单体均可作为对照品。

参考文献:

广西壮族自治区中医药研究所. 1986. 广西药用植物名录[M]. 南宁:广西人民出版社
 江苏新医学院. 1977. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社
 Damtoft S, Jensen SR. 1994. Three phenylethanoid glucosides of unusual structure from *Chirita sinensis* (Gesneriaceae)[J]. *Phytochemistry*, **37**(2):441-443
 He ZD(贺震旦), Yang CR(杨崇仁). 1989. The advances of phenylpropanoid glycosides in plants(植物中苯丙素甙类成分的研究进展)[J]. *Nat Prod Res Develop*(天然产物与开发), **2**:29-41
 Henrik F, Tommy LH, Søren RJ. 1998. A caffeoyl phenylethanoid glycoside from *Plantago myosuroides*[J]. *Phytochemistry*, **47**(6): 1 161-1 162
 Jing H(靖会), Zuo JF(佐建锋), Li JS(李教社). 2006. The ad-

vances in study on pharmacological of phenylpropanoid glycosides (苯乙醇苷类化合物的药理研究进展)[J]. *Lishizhen Medicine Materia Medica Res*(时珍国医国药), **17**(3):440-441
 Lei L, Yang FQ, Zhang TY, et al. 2001. Preparative isolation and purification of acteoside and 2'-acetylacteoside from *Cistanches salsa* (C. A. Mey) G. Beck by counter current chromatography [J]. *J Chromatography A*, **912**:181-185
 Li L, Tsao R, Liu ZQ, et al. 2005. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* by high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatography A*, **1 063**:161-169
 Li L, Tsao R, Yang R, et al. 2008. Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Food Chemistry*, **108**:702-710
 Miyase T, Ishino M, Akahori C, et al. 1991. Phenylethanoid glycosides from *Plantago asiatica*[J]. *Phytochemistry*, **30**(6):2 015-2 018
 Nan HH(南海函), Yin H(尹浩), Zhang X(张偲). 2008. Phenylethanoid glycosides from *Clerodendrum inerme* (许树中苯乙醇苷类化合物的研究)[J]. *Nat Product Res Develop*(天然产物与开发), **20**:1 008-1 011
 Shimomura H, Sashida Y, Ogawa K. 1987. Iridoid glucosides and phenylethanoid glycosides in *Ajuga* species of Japan[J]. *Phytochemistry*, **26**(7):1 981-1 983



(上接第 260 页 Continue from page 260)

及始花节位的基因定位[J]. 自然科学进展, **15**(2):167-172
 Budak H, Shearman RC, Gaussoin RE, et al. 2004. Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of Turfgrass species[J]. *Hort Sci*, **39**:955-958
 Chen JL(陈京荔), Huang LQ(黄璐琦), Shao AJ(邵爱娟), et al. 2002. RAPD analysis on different varieties of *Rehmannia glutinosa* (地黄不同品种的 RAPD 分析)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **27**(7):505-507
 Fan HH(樊洪泓), Li TC(李廷春), Qiu J(邱婧), et al. 2008. Studies on genetic diversity of medicinal *Dendrobium* by SRAP(药用石斛遗传多样性的 SRAP 标记研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **339**(1):6-10
 Li G, Quiros CF. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical Applied Genetics*, **103**:455-461
 Ren Y(任羽), Wang DY(王得元), Zhang YD(张银东), et al. 2004. Optimization of SRAP-PCR in hot pepper (*Capsicum annuum*) (辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化)[J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), **2**(5):689-693
 Wu ZP(武志朴), Yang WX(杨文香), Liu DQ(刘大群), et al. 2005. Establishment of SRAP technique system in wheat genome (小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究)[J]. *J Agric Univ Hebei*(河北农业大学学报), **28**(3):665-669
 Xu XY(许晓燕), Yu MY(余梦瑶), Luo X(罗霞), et al. 2008.

Molecular diversity of *Auricularia polytricha* revealed by AFLP and SRAP(利用 AFLP 和 SRAP 标记分析 19 株木木耳的遗传多样性)[J]. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报), **21**(1):121-124
 Xu Q(徐晴), Zhang GH(张桂华), Han YK(韩毅科), et al. 2008. Construction and analysis of the molecular genetic linkage map for cucumber(黄瓜远缘群体分子遗传连锁图谱的构建和分析)[J]. *Agric Boreal Sin*(华北农学报), **23**(1):45-49
 Zhou JY(周俊英). 2002. Chromosome studies of *Rehmannia glutinosa* of traditional Chinese medicine(中药地黄的染色体研究)[J]. *Shandong Sci*(山东科学), **15**(1):20-22
 Zhou YQ(周延清), Jing JZ(景建洲), Li ZY(李振勇), et al. 2004a. Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* germplasm detected by RAPDS and ISSRS(利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性)[J]. *Hereditas*(遗传), **26**(6):922-928
 Zhou YQ(周延清), Jing JZ(景建洲), Li ZY(李振勇), et al. 2004b. Optimization of ISSR-PCR amplification in *Huai Rehmannia glutinosa* (怀地黄 ISSR 扩增条件优化的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **24**(1):6-11
 Zhou YQ(周延清), Jing JZ(景建洲), Li ZY(李振勇), et al. 2005. ISSR identification of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* in Huai zone(怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), **36**(2):257-261