

高速逆流色谱分离纯化蔓荆子中的活性成分

管仁军^{1,2}, 王岱杰², 于宗渊³, 王晓^{2*}, 蓝天凤¹

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东省分析测试中心, 山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室, 山东 济南 250014; 3. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

摘要 :应用高速逆流色谱法(HSCCC)分离纯化蔓荆子中的活性成分。以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为3:6:3.6:3)为两相溶剂体系,在转速为800 r/min、流速为1.5 mL/min、检测波长为254 nm的条件下进行分离,所得馏分经高效液相色谱法(HPLC)检测,并经电喷雾电离(ESI)质谱和核磁共振谱(NMR)鉴定化合物的结构。从250 mg蔓荆子粗提物中一次性分离得到4个化合物,分别为23 mg对羟基苯甲酸、15 mg 3,6,7-三甲基槲皮万寿菊素、24 mg蔓荆子黄素和5 mg蒿黄素,其纯度约为93.1%、97.3%、98.7%和98.5%。该法具有简便、快速、重复性好的优点,为分离蔓荆子中的活性成分提供了新的方法。

关键词 :高速逆流色谱;对羟基苯甲酸;3,6,7-三甲基槲皮万寿菊素;蔓荆子黄素;蒿黄素;蔓荆子

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)11-1043-05

Preparative isolation and purification of the active components from *Viticis Fructus* by high-speed counter-current chromatography

GUAN Renjun^{1,2}, WANG Daijie², YU Zongyuan³, WANG Xiao^{2*}, LAN Tianfeng¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Analysis and Test Center, Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instrument of Shandong Province, Jinan 250014, China; 3. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Abstract : *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. is widely distributed in Asia, and its fruits are used as a folk medicine for headaches, colds, migraine, eyepain, etc. In order to effectively separate high-purity active components from the seeds of *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham., a high-speed counter-current chromatography (HSCCC) procedure was performed to separate four components from the crude extract of the fruits. A two-phase solvent system composed of light petroleum-ethyl acetate-methanol-water (3:6:3.6:3, v/v/v/v) was used. Within 230 min, 23 mg of 4-hydroxybenzoic acid, 15 mg of 3,6,7-trimethylquercetagenin, 24 mg of casticin and 5 mg of artemetin were obtained from 250 mg of the crude extract of *Viticis Fructus* in one-step elution under the conditions of a flow rate of 1.5 mL/min, 800 r/min and the detection wavelength of 254 nm. The purities of the four fractions were 93.1%, 97.3%, 98.7% and 98.5%, respectively. The obtained fractions were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), and identified by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) and ¹³C-NMR. The results indicate that HSCCC is a powerful technique for the purification of active components from *Viticis Fructus*.

Key words : high-speed counter-current chromatography (HSCCC); 4-hydroxybenzoic acid; 3,6,7-trimethylquercetagenin; casticin; artemetin; *Viticis Fructus*

* 通讯联系人: 王晓, 博士, 研究员. Tel: (0531) 82605319, E-mail: wangx@keylab.net.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20872083)、山东省科技攻关项目(No. 2010GSF10287)和济南市高等院所自主创新计划项目(No. 201004010).

收稿日期: 2010-07-12

蔓荆子为马鞭草科牡荆属多年生落叶灌木单叶蔓荆(*Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham.)的干燥成熟果实^[1],主要产于山东、广西、广东、福建、江西、浙江、福建等地。蔓荆子属常用中药,具有疏散风热、清利头目、止痛的功效。蔓荆子中主要化学成分为黄酮类和萜类,同时含有挥发油和有机酸等其他化学成分。现代药理研究表明,蔓荆子中的黄酮类化合物如蔓荆子黄素具有镇痛、抗炎、抗肿瘤的作用^[2,3],蒿黄素具有扩张血管的作用,萜类化合物如松烷二萜类具有抗衰老的作用^[4],酚类化合物如对羟基苯甲酸对豇豆枯萎病菌有抑制作用^[5]。因此,建立相关成分的高效分离纯化方法具有重要意义。

目前对蔓荆子中的化学成分的分离纯化主要采用薄层色谱、硅胶柱色谱、凝胶柱色谱等传统的分离纯化方法^[6,7]。这些方法存在耗时长、容易造成样品的不可逆吸附、变性及样品回收率低等缺点。高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)是不使用固态载体的液-液分配色谱,根据样品在两相溶剂中分配系数的不同实现样品的分离,避免了固相载体对样品的死吸附、变性等缺点,已广泛应用于天然产物的分离纯化领域^[8,9]。

本研究采用 HSCCC 对蔓荆子粗提物进行了分离纯化,通过一步分离能够同时得到 4 种高纯度的化合物(结构如图 1),分别为对羟基苯甲酸、3,6,7-三甲基槲皮万寿菊素、蔓荆子黄素和蒿黄素。

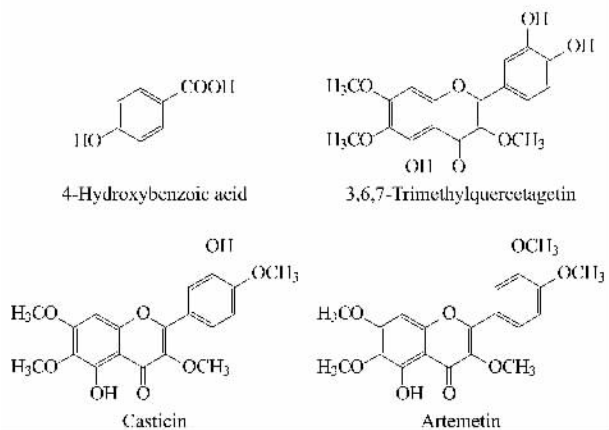


图 1 蔓荆子中 4 种化合物的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of the 4 compounds in *Vitex Fructus*

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

GS10A 型高速逆流色谱仪(北京艾美林科技有

限公司)、多层聚四氟乙烯螺旋管(直径 2.3 mm,分离体积 230 mL, β 值为 0.5 ~ 0.8)、TBP5002 泵(上海同田生物技术有限公司)、8823B-紫外检测器(北京宾达英创科技有限公司)、3057-11 记录仪(重庆川仪总厂有限公司)、Agilent 1120 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)、Varian INOVA-600 核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司)、Agilent 1100 series 6320 ion-trap 质谱仪(美国 Agilent 公司)。

甲醇、石油醚和乙酸乙酯均为分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司);甲醇为色谱纯(美国天地公司);实验用水为过滤蒸馏水及乐百氏纯净水。蔓荆子药材购自山东中医药大学中鲁医院,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为单叶蔓荆(*Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham.)。

1.2 蔓荆子粗提物的制备

取蔓荆子药材 500 g 粉碎,过 40 目筛,加甲醇 2 L,回流提取 2 h,过滤,重复 3 次,合并滤液,减压浓缩。将浓缩液用水稀释至 500 mL,依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次。将乙酸乙酯萃取液减压浓缩得浸膏,得 10.2 g 粗提物,冰箱保存备用。

1.3 两相溶剂体系及样品溶液的制备

本实验所用溶剂体系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 3:6:3.6:3),按比例配制于分液漏斗中,剧烈振荡使溶液充分混合,室温下静置过夜,分出上下相,使用前超声波脱气 30 min,备用。

称取蔓荆子粗提物 250 mg,加入上下相各 5 mL,振荡使其完全溶解,用于 HSCCC 分离。

1.4 分配系数(K_D)的测定

取少量样品置于 10 mL 试管中,加入等量的上下相各 2 mL,剧烈振荡 1 min,使样品充分溶解,静置分层,取上下相各 5 μ L 分别用高效液相色谱(HPLC)进行检测,上相峰面积为 A_1 ,下相峰面积为 A_2 ,分配系数 $K_D = A_1/A_2$ 。

1.5 HSCCC 法分离制备过程

将两相溶剂体系中已超声脱气的上相(固定相)以 20 mL/min 流速泵入 HSCCC 螺旋管中,待上相充满整个螺旋管后,缓慢调节主机转速至 800 r/min,顺时针旋转,待转速稳定后,接泵自 HSCCC 首端以 1.5 mL/min 流速泵入下相,同时开启紫外检测器,检测波长为 254 nm,待上下相平衡后,将 10 mL 样品通过六通进样阀注入 HSCCC 仪,根据色谱图收集各色谱峰馏分。

1.6 HPLC 条件

蔓荆子粗提物和 HSCCC 分离各馏分用 HPLC 分析。色谱柱:Inertsil ODS-SP(250 mm \times 4.6

mm, 5 μ m), 柱温 25 $^{\circ}$ C。检测波长 254 nm。流动相 A 为 0.2% 乙酸水溶液, B 为甲醇。梯度洗脱程序: 0 ~ 15 min, 30% B ~ 50% B; 15 ~ 30 min, 50% B; 30 ~ 35 min, 50% B ~ 60% B; 35 ~ 60 min, 60% B。流速 1.0 mL/min。进样量 20 μ L。

1.7 质谱 (MS) 条件

电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式检测, 样品通过流动注射泵进样, 流速 0.2 mL/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}$ C, 干燥气流量 9.0 L/min, 雾化气压力 2.38 mPa, 毛细管电压 4 kV。质量扫描范围 m/z 50 ~ 1 200, 实验前质量数经过校正。

2 结果与讨论

2.1 HSCCC 分离条件的优化

溶剂体系的选择是 HSCCC 分离中的首要和关键环节, 溶剂体系合适与否是由目标化合物在其中的 K_D 来衡量的。本实验测定了目标化合物在氯仿-甲醇-水、乙酸乙酯-水和石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水等溶剂体系中的 K_D 。结果表明, 当采用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水为两相溶剂体系时, 可实现目标化合物的分离。目标化合物在不同比例的石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水体系中的 K_D 见表 1。由表 1 可看出石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水的体积比为 3:6:3:3.6、3:6:3.3:3.2 和 2:7:3.3:3.2 时, 4 种化合物的 K_D 差异较大, 能保证各组分间具有较好的分离度, 但同时各物质在固定相中的分配较多且蒿黄素在固定相中的 K_D 偏大, 若采用这 3 种溶剂体系会使整体的分离时间过长, 蒿黄素有可能不出峰, 影响分离效率, 因此不适合蔓荆子粗提取物中各物质的分离纯化。在其他实验参数相同的条件下, 分别应用体积比为 3:6:3.6:3 与 2:7:3.5:3 的石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水的体系对蔓荆子粗提取物进行分离纯化。结果表明, 上述两种溶剂体系分别在 230、300 min 内实现 4 种化合物的分离纯化。因此本实验最终选择溶剂体系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (体积比为 3:6:3.6:3), 并且该体系的固定相保留率也较高。

表 1 蔓荆子粗提取物中 4 种化合物在不同比例溶剂体系中的 K_D
Table 1 Partition coefficients (K_D) of the 4 components from the *Viticis Fructus* in different proportion solvent systems

Petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (v/v/v/v)	I	II	III	IV
3:6:3:3.6	1.11	2.40	3.85	5.57
3:6:3.6:3	0.33	0.74	1.25	2.37
2:7:3.5:3	0.40	0.88	1.46	2.62
3:6:3.3:3.2	0.90	1.76	2.77	4.64
2:7:3.3:3.2	1.35	2.94	4.11	6.88

2.2 HSCCC 分离纯化的结果

以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (体积比为 3:6:3.6:3) 为两相溶剂体系, 按照 1.5 节所述的方法对蔓荆子粗提取物进行分离纯化。将 250 mg 样品溶于 10 mL 等体积上相和下相混合溶液中进行 HSCCC 分离, 分离谱图见图 2。根据图 2 进行手动分段收集, 得到馏分 I ~ IV, 将各馏分减压浓缩干燥, 其质量依次为 23、15、24、5 mg。经过 HPLC 分析并应用面积归一法测定 I、II、III、IV 4 个馏分的纯度分别约为 93.1%、97.3%、98.7% 和 98.5%。

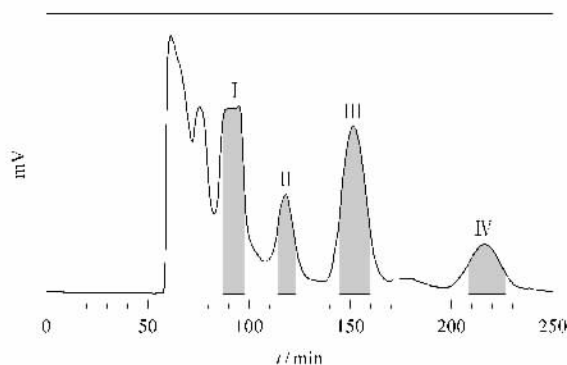


图 2 蔓荆子粗提取物的高速逆流色谱谱图

Fig. 2 Chromatogram of the crude extract from the *Viticis Fructus*

HSCCC conditions: solvent system, petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (3:6:3.6:3, v/v/v/v); flow rate, 1.5 mL/min; rotation speed, 800 r/min; detection wavelength, 254 nm.

The I - IV components are the analytes.

2.3 HPLC 条件的优化

本实验在 HPLC 分析蔓荆子粗提取物过程中, 尝试了用不同比例的甲醇-水、乙腈-水作为流动相, 结果表明: 当采用 0.2% 乙酸水溶液-甲醇作为流动相在 60 min 内进行梯度洗脱, 粗提取物中的主要组分可以得到良好分离。

根据 1.6 节所述条件, 对蔓荆子粗提取物及 HSCCC 分离所得 4 个馏分进行检测分析, 所得 HPLC 谱图见图 3。

2.4 HSCCC 分离所得化合物的结构鉴定

HSCCC 各馏分结构根据 ESI-MS、核磁共振氢谱 (1 H-NMR) 和核磁共振碳谱 (13 C-NMR) 的数据进行鉴定。

组分 I: 无色斜方形结晶。ESI-MS 测定: m/z 138 ($[M+H]^+$)。 1 H-NMR (600 MHz, DMSO) 测定 (δ): 6.82 (3H, d, J = 8.7 Hz, 2-H, 3-H, 5-H), 7.82 (3H, d, J = 8.7 Hz, 2H, 2-H, 6-H)。 13 C-NMR (150 MHz, DMSO) 测定 (δ): 115.72 (d, C-3, C-5), 122.72 (s, C-1), 132.73 (d, C-

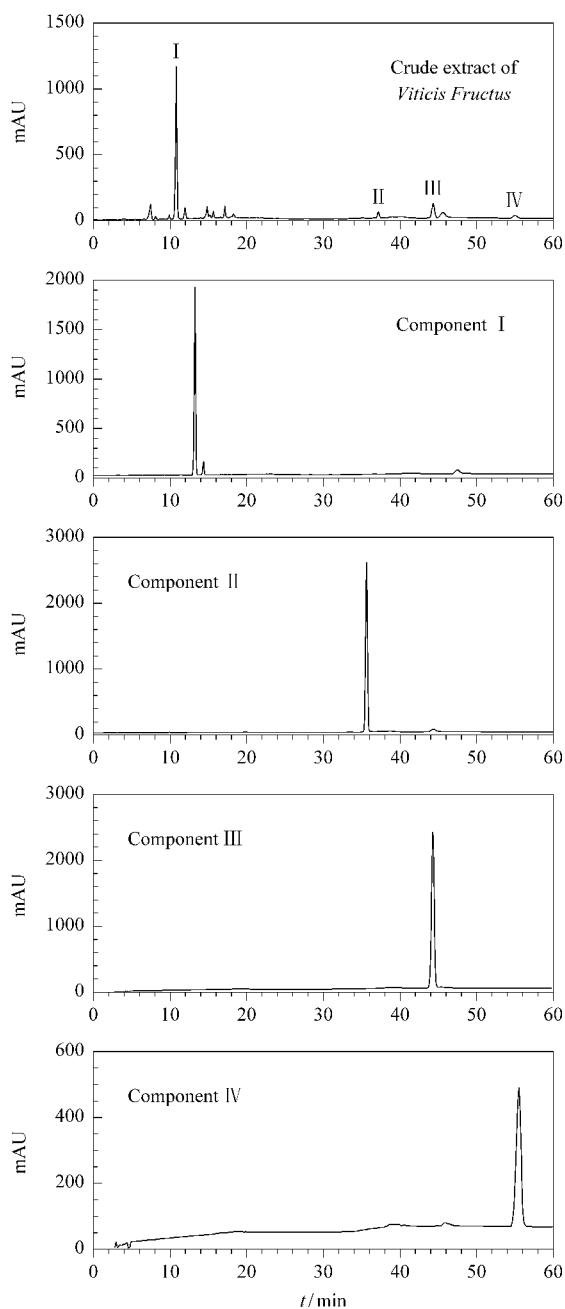


图 3 蔓荆子粗提物及图 2 中 4 个馏分的 HPLC 谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of the crude extract of *Vitis Fructus* and 4 fractions in Fig. 2

Peaks: I. 4-hydroxybenzoic acid; II. 3,6,7-trimethylquercetin; III. casticin; IV. artemetin.

2, C-6), 163.01 (s, C-4), 170.03 (s, C-7)。以上数据与文献 [10] 报道基本一致, 故鉴定馏分 I 为对羟基苯甲酸。

组分 II: 黄色细针状结晶。ESI-MS 测定: m/z 361 ($[M + H]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) 测定 (δ): 3.37, 3.80, 3.92 (9H, s, $OCH_3 \times 3$); 6.68 (1H, s, 8-H); 6.92 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, 5'-H); 7.49 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 6'-H); 7.60 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 2'-H); 9.36, 9.79, 12.64

(s) 各一羟基上活泼氢, 重水交换后消失。以上数据与文献 [11] 报道一致, 故鉴定馏分 II 为 3,6,7-三甲基槲皮万寿菊素。

组分 III: 黄色结晶。ESI-MS 测定: m/z 375 ($[M + H]^+$)。 1H -NMR (600 MHz, DMSO) 测定 (δ): 3.74, 3.81, 3.88, 3.93 (2H, s, $OCH_3 \times 4$); 6.88 (1H, s, 8-H); 7.60 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, 2'-H); 6.87 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, 5'-H); 7.56 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, 1.9 Hz, 6'-H); 12.61 (1H, s, 5-OH); 5.83 (1H, s, 3'-OH)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO) 测定 (δ): 138.02 (C-2), 132.33 (C-3), 178.97 (C-4), 152.75 (C-5), 155.53 (C-6), 158.82 (C-7), 90.37 (C-8), 149.31 (C-9), 104.41 (C-10), 114.34 (C-1'), 123.65 (C-2'), 145.56 (C-3'), 152.34 (C-4'), 110.43 (C-5'), 121.55 (C-6'), 60.85 (7- OCH_3), 60.14 (6- OCH_3), 56.29 (4'- OCH_3), 56.05 (3- OCH_3)。上述数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定馏分 III 为蔓荆子黄素。

组分 IV: 黄色结晶。ESI-MS 测定: m/z 389 ($[M + H]^+$)。 1H -NMR (600 Mz, DMSO) 测定 (δ): 6.51 (1H, s, H-8), 6.96 (1H, d, $J = 9$ Hz, H-5), 7.75 (2H, m, H-2', H-6'), 3.96 (9H, s, $OCH_3 \times 3$), 3.94 (3H, s, OCH_3), 3.87 (3H, s, OCH_3), 12.61 (1H, s, 5-OH)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO) 测定 (δ): 139.96 (C-2), 131.62 (C-3), 178.12 (C-4), 151.64 (C-5), 155.31 (C-6), 158.62 (C-7), 91.33 (C-8), 151.34 (C-9), 105.49 (C-10), 111.56 (C-1'), 122.05 (C-2'), 148.45 (C-3'), 151.53 (C-4'), 111.48 (C-5'), 59.88 (7- OCH_3), 59.61 (6- OCH_3), 56.33 (3- OCH_3), 55.65 (4- OCH_3), 55.57 (3- OCH_3)。以上数据与文献 [13] 对照基本一致, 鉴定馏分 IV 为蒿黄素。

3 结语

本实验采用 HSCCC 法对蔓荆子的活性成分进行分离纯化, 并建立了蔓荆子乙酸乙酯提取物中 4 种单体化合物的分离纯化方法。经过溶剂体系的选择, 最终应用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (体积比为 3:6:3:6:3) 作为两相溶剂体系分离得到了对羟基苯甲酸、3,6,7-三甲基槲皮万寿菊素、蔓荆子黄素、蒿黄素, 经 HPLC 检测纯度约为 93.1%, 97.3%, 98.7%, 98.5%。本方法简便、快速、节省溶剂, 具有较好的实际应用价值。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People 's Republic of China. Pharmacopoeia of People 's Republic of China. Part 1. Beijing : Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京 : 化学工业出版社), 2005 : 252
- [2] Sun R , Guo C Q , Gao H C , et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (孙蓉, 郭长强, 高洪常, 等. 中草药), 1997 , 29(1) : 32
- [3] Wang H Y , Cai B , Cui C B , et al. Acta Pharmaceutica Sinica (王海燕, 蔡兵, 崔承彬, 等. 药学报), 2005 , 40(1) : 27
- [4] Ono M , Yamamoto M , Masuoka C , et al. J Nat Prod , 1999 , 62(11) : 1532
- [5] Zhao X J , Zhang Y R. China Vegetables (赵秀娟, 张衍荣. 中国蔬菜), 2009(18) : 38
- [6] Ono M , Yamamoto M , Yanaka T , et al. Chem Pharm Bull , 2001 , 49(1) : 82
- [7] Chen L S , Kang D L. Strait Pharmaceutical Journal (陈柳生, 康大力. 海峡药学), 2008 , 20(7) : 90
- [8] Zheng Z J , Wang M L , Wang D J , et al. J Chromatogr B , 2010 , 878(19) : 1647
- [9] Wang X , Shi X G , Li F W , et al. Phytochem Anal , 2008 , 19(3) : 193
- [10] Yoshioka T , Inokuchi T , Fujioka S , et al. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung C , 2004 , 59c : 509
- [11] Zeng X Y , Fang Z P , Wu Y Z , et al. China Journal of Chinese Materia Medica (曾宪仪, 方乍浦, 吴永忠, 等. 中国中药杂志), 1996 , 21(3) : 167
- [12] Yan L H , Xu L Z , Lin J , et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (闫利华, 徐丽珍, 林佳, 等. 中草药), 2009 , 40(4) : 531
- [13] Xin H L , Hu Y , Zhang Q Y , et al. Academic Journal of Second Military Medical University (辛海量, 胡园, 张巧艳, 等. 第二军医大学学报), 2006 , 27(9) : 1038