

利用高速逆流色谱法同时纯化藤茶中的二氢杨梅素和杨梅素

张友胜, 施英, 徐玉娟, 肖更生, 刘学铭

(广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510610)

摘要:采用GS10A型逆流色谱仪和AKTAprime plus层析系统共同组成的高速逆流色谱联用系统对藤茶提取物中的二氢杨梅素和杨梅素进行了同时纯化。选用溶剂系统为石油醚/乙酸乙酯/甲醇/水/三氯乙酸(体积比1:3:2:2:0.05),在逆流色谱仪转速为700~800 r/min,进样体积为2~50 mL、流速为1.5~2.5 mL/min的条件下,在5 h内能同时将粗提物中的二氢杨梅素和杨梅素提纯到99%以上,50 g粗藤茶样品连续分离其分离得率分别为85.5%和87.6%。重复使用溶剂对分离效果无明显影响。

关键词:藤茶;高速逆流色谱;纯化;二氢杨梅素;杨梅素

中图分类号:O652.63

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2008)03-0044-03

Simultaneous purification of dihydromyricetin and myricetin from extract of *Ampelopsis grossedentata* by high-speed countercurrent chromatography

ZHANG You-sheng, SHI Ying, XU Yu-juan, XIAO Geng-sheng, LIU Xue-ming

(Research Institute of Sericulture and Farm Products Processing, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510610, China)

Abstract: A combined AKTA-HSCCC system (GS10A-Countercurrent Chromatography and AKTAprime plus detection system) is used to purify dihydromyricetin and myricetin from extract of *Ampelopsis grossedentata* in this paper. The results show that, with a solvent system composed of mineral ether/ethyl acetate/methanol/water/trichloroacetic acid (1:3:3:2:0.05, v/v), dihydromyricetin and myricetin from extract of *Ampelopsis grossedentata* can be purified into over 99% purity at the same time. Under the separation conditions determined as 700 to 800 r/min of rotation rate, 2 to 50 mL of injection volume, 1.5 to 2.5 mL/min of flow rate and 5 h of separation time, 26.5 g dihydromyricetin and 9.6 g myricetin can be obtained at a high purity of over 99%, with separation rate of 85.5% and 87.6%, respectively, from 50 g extract of *Ampelopsis grossedentata*. Reusing the solvent has no obvious negative effect in the separation process.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; HSCCC; purification; dihydromyricetin; myricetin

藤茶是一种葡萄科蛇葡萄属中的显齿蛇葡萄(*Ampelopsis grossedentata*)植物,为粤蛇葡萄的变种(*A. cantoniensis* (H. et A.) pl. var. *grossedentata* Hand-Mazz.)。藤茶幼嫩茎叶中的主要活性成分为黄酮类化合物中的二氢杨梅素和杨梅素^[1]。由于二氢杨梅素和杨梅素的性质相近,用常规分离方法难以将其分开,尤其对杨梅素而言,想要大规模得到纯度高的单体并非易事。高速逆流色谱法(HSCCC)是目前分离性质相近、容易变性的化合物的一种较好的方法^[2],应用高速逆流色谱法分离藤茶粗提物中的二氢杨梅素已有报道^[3],但没有从藤茶粗提物中同时分离二氢杨梅素和杨梅素单体的报道;在分离过程中,更没有使用重复溶剂进行分离的报道。笔者利用高速逆流色谱联用系统对藤茶中的提取物进行了

纯化,纯化过程中重复使用分离溶液,同时制备了高纯度的二氢杨梅素和杨梅素。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GS10A型逆流色谱仪,由速度控制系统和逆流系统组成,聚四氟乙烯分离管柱,总柱容积为210 mL,管柱最大压力为1 MPa,北京天宝物华生物技术有限公司;AKTAprime plus层析系统(GE Healthcare Amersham Biosciences AB),带Primeview 5.0在线监测软件,带溶液自动泵入系统、溶液自动收集系统和紫外、压力、压强、电导率等自动检测系统。二者共同组成的高速逆流色谱联用系统。Agilent高效液相色谱仪,Eclipse XDB-C18 5 μ m, 4.6 \times 250 nm。所用

收稿日期:2007-12-09

基金项目:国家自然科学基金(30570186);广东省自然科学基金(04300761)资助

作者简介:张友胜(1965-),男,博士,研究员,主要从事天然产物和食品方面的研究,020-87237279, youshengzhang@263.net。

试剂均为分析纯。

1.2 联用设备的设置及溶剂系统的注入

将 GS10A 型逆流色谱仪的进液管和出液管分别与 AKTAprime plus 层析系统的进液管和出液管相连,组成 GS10A-AKTAprime plus 高速逆流色谱联用系统;分离方法的设置在 AKTAprime plus 系统上操作,转速设置在 GS10A 上操作。

首先按所选择的溶剂系统,按比例配制 2 000 mL 溶剂,待分层后将上下两相分开备用。操作 AKTAprime plus 系统,将溶剂系统的固定相(上相)用泵以 25 mL/min 的流量灌满 GS10A 的聚四氟乙烯分离管柱,然后开启 GS10A 的速度控制器,使 GS10A 螺旋管柱按顺时针方向旋转。当转速达到 750 r/min 时,通过 AKTAprime plus 系统开始以 2.5 mL/min 的流速泵入流动相(下相),待流动相开始流出色谱柱时,即可通过六通进样阀进样,进入样品分离状态。同时设置紫外检测波长为 280 nm,调节自动部分收集器进行分离馏分的收集。样品分离时,打开 primeview 5.0 在线监测软件对分离状态进行监测。样品分离结束后,依据在线监测系统所示的管号分别对应收集相应的成分,进行 HPLC 分析和结构鉴定。

1.3 样品及样品溶液的准备

用市售干藤茶样品(广州)用水按 1:20 固液比提取 3 次(95~100℃),每次 30 min,过滤,去滤渣,合并提取液,将滤液直接放入 0~4℃ 的冷库中静置 48 h,取沉淀干燥即得藤茶粗提物样品。用上述准备的溶剂系列中的下相将待分离的样品充分溶解,制成 10%~20% 溶液,用于进样。

1.4 分离溶剂系统组成与重复使用

依据参考文献[3],将溶剂系统组成调整为(石油醚/乙酸乙酯/甲醇/水/三氯乙酸体积比 1:3:2:2:0.05)。按上述组成配制 2 000 mL 溶剂,待分层后将上下两相分开,上相作为固定相,下相作为流动相。每次分离过程中或结束后,依据在线监测系统所示的管号,收集无紫外显示的管中的溶剂,分层后分别将其作为上、下相重复使用。

1.5 分析方法

高效液相色谱(HPLC):检测波长为 UV-290 nm,色谱柱为 Eclipse XDB-C18 4.6×250 m;流动相为甲醇/水体积比 36:64(用磷酸调 pH 至 3.0);流速为 1.0 mL/min;进样量为 10 μL;柱温为 35℃。

质谱(MS)和核磁共振(NMR):将检测样品用 MAT-711 质谱仪和 Brüker-AM300 核磁共振仪进行

MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 分析。

1.6 规模化样品纯化

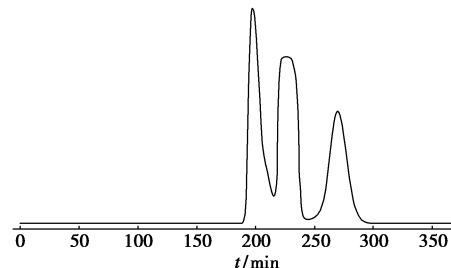
将 50 g 按 1.3 方法制备的藤茶粗提物,用 500 g 蒸馏水加热溶解,趁热过滤,滤液浓缩至 300 mL。按 1.4 的方法配制 2 000 mL 上、下相溶液,用 50 mL 的进样管饱和进样。每次分离逆流色谱仪的设置转速为 750 r/min,流速为 2.5 mL/min,进样体积为 50 mL,分离时间为 4.5 h。分离过程中,重复使用上、下相溶剂,连续分离 6 次,合并相对应的组分溶液。

2 结果与讨论

2.1 高速逆流色谱分离效果

实验结果由 7 个独立分离实验得出,其中第 1 次至第 3 次使用新配制的溶剂,第 4 次至第 7 次均按 1.4 的方法重复使用溶剂。在进行单个独立分离实验时,同时分别调整逆流色谱仪转速(700、750、800 r/min),进样体积(2、10、50 mL),流速(1.5、2.0、2.5 mL/min),以此观察逆流色谱仪转速、进样量、流动相流速等因素的变化对分离效果的影响。

结果表明,使用 GS10A-AKTAprime plus 高速逆流色谱联用设备,采用石油醚/乙酸乙酯/甲醇/水/三氯乙酸五元溶剂系统,当进样体积为 2~50 mL(样品量为 300 mg 或 6 g)、转速为 700~800 r/min、流速为 1.5~2.5 mL/min 时,5 h 内均可将藤茶粗提物有效分成 A、B、C 3 个部分,其中 A 部分分离时间为 190~220 min, B 部分分离时间为 230~250 min, C 部分分离时间为 260~290 min(图 1, A、B、C 部分依次为图中从左至右排列,下同)。就本实验而言,调整逆流色谱仪转速、进样量、流动相流速等因素,除各峰保留体积和分离所需的时间略为增加或减少外,分离效果没有明显变化,如果将相邻组分的管号去掉,则不影响分离效果。

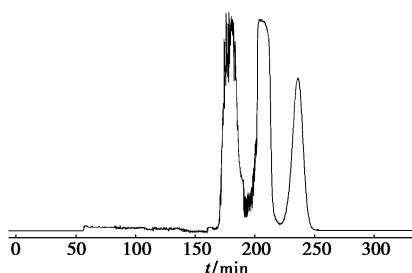


进样量 2 mL,进样速度 2.0 mL/min,转速 800 r/min

图 1 第 2 次 HSCCC 分离色谱图

实验结果同时表明(图 2),在分离过程中,重复使用溶剂系统中的上、下相时,对组分 B、C 的分离

效果没有明显区别,但组分 A 表现出明显的纯度降低,空白管中杂质明显增多。



进样量 10 mL,进样速度 2.5 mL/min,转速 700 r/min

图 2 第 7 次 HSCCC 分离色谱图

2.2 样品纯度分析与结构鉴定

将分离得到的 A、B、C 3 个组分相对应的管中溶液分别收集到一起,浓缩至原体积的 1/3 ~ 1/2,冷却结晶。结果表明,A 组分不产生晶体,B 组分呈现大量白色针状细晶,C 组分呈现大量绿色针状细晶。分别将 A 组分溶液、B 组分和 C 组分晶体用 HPLC 检测,结果表明 A 组分为 4 ~ 5 个峰的混合物,B 和 C 为纯度超过 99% 以上的单一物质。

同时将组分 B 和 C 分别进行 MS 和 NMR 分析。B 组分的 MS 图谱表明 $m/z = 320$ 是 M^+ , 319 是 $[M - H]^+$, 639 是 $[2M - H]^+$, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 谱和 D_2O 交换谱数据(表 1)可确证组分 B 为二氢杨梅素(3,5,7,3',4',5'-六羟基 2,3-双氢黄酮)。C 组分的 MS 图谱表明 $m/z = 318$ 是 M^+ , 317 是 $[M - H]^+$, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 谱(表 2)可确证组分 C 为和杨梅素(3,5,7,3',4',5'-六羟基黄酮)。结构鉴定的结果与文献[4]一致。

表 1 组分 B 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱和 D_2O 交换谱数据

C 位	$^1\text{H-NMR}(\delta)$	$^1\text{H-NMR} + \text{D}_2\text{O}$	C-H 或 C-OH
2	4.90(1H, d, $J = 10.74$ Hz)	峰存在	$\text{C}_2\text{-H}$
3	5.77(1H, d, $J = 5.86$ Hz)	峰消失	$\text{C}_3\text{-OH}$
	4.42(1H, dd, $J = 5.86$ Hz, 10.74 Hz)	峰存在	$\text{C}_3\text{-H}$
5	11.90(1H, S)	峰消失	$\text{C}_5\text{-OH}$
6	5.86(1H, d, $J = 1.95$ Hz)	峰存在	$\text{C}_6\text{-H}$
7	10.85(1H, S)	峰消失	$\text{C}_7\text{-OH}$
8	5.90(1H, d, $J = 1.95$ Hz)	峰存在	$\text{C}_8\text{-H}$
2',6'	6.40(2H, S)	峰存在	$\text{C}_2'\text{-H}$ 和 $\text{C}_6'\text{-H}$
3',5'	8.92(2H, S)	峰存在	$\text{C}_3'\text{-H}$ 和 $\text{C}_5'\text{-H}$
4'	8.22(1H, S)	峰消失	$\text{C}_4'\text{-OH}$

表 2 组分 C 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱数据

C 位	C 位 (δ)	C-H 或 C-OH
5	12.78(1H, S)	$\text{C}_5\text{-OH}$
7	10.73(1H, S)	$\text{C}_7\text{-OH}$
4'	9.27(1H, S)	$\text{C}_4'\text{-OH}$
3',5'	9.16(2H, S)	$\text{C}_3'\text{-OH}$ 和 $\text{C}_5'\text{-OH}$
8	6.36(1H, d, $J = 2.4$ Hz)	$\text{C}_8\text{-OH}$
6	6.18(1H, d, $J = 2.4$ Hz)	$\text{C}_6\text{-OH}$

2.3 规模化样品纯化结果

将 50 g 粗藤茶样品按 1.6 方法进行分离后,可同时分离得到二氢杨梅素 26.5 g 和杨梅素 9.6 g(纯度大于 99%)。对比粗藤茶样品中二氢杨梅素和杨梅素的含量,分离得率分别为 85.5% 和 87.6%。

3 讨论

HSCCC 无需任何固态载体而是借助螺旋管的同轴行星式运动实现固定相的高保留以充分分配分离,可避免分离样品与固态载体表面发生化学反应而变性以及不可逆吸附等缺陷;同时,可根据分离样品的目的,取舍流动相流出液中各相邻成分,使其产品纯度较容易达到实验的要求。对研究而言,HSCCC 较容易实现全自动或半自动操作,劳动强度小,但由于 HSCCC 每次分离所用溶剂较多,如果制备数量较大的样品,成本花费过高,且难以处理剩余溶剂,不利环保,所以在分离同一样品过程中重复使用溶剂是一个好选择。另外,在重复使用溶剂过程中,或多或少会给样品的纯度带来一定的影响,如果采用“去头截尾”的办法,又不利于保持目的组分较高的分离得率,而采用“分离 + 结晶”的办法,则可以解决这一问题。本实验中如果分离结束后采用真空冷冻干燥,二氢杨梅素的纯度只能保持 98% 以上,杨梅素的纯度只可保持 95% 以上。因此 HSCCC 法在应用于化学成分分离提纯时,应尽可能地与其他常用分离方法互补进行。

参考文献

- [1] 张友胜, 宁正祥, 杨伟丽. 藤茶学[M]. 广东: 广东科学出版社, 2003: 164 - 165.
- [2] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1991: 196.
- [3] Du Qizhen, Cai Weijian, Xiao Ming, et al. Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns[J]. Journal of Chromatography: A, 2002, 973: 217 - 220.
- [4] 张友胜, 杨伟丽, 崔春. 显齿蛇葡萄化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(5): 402 - 403. ■