

高速逆流色谱法从小叶金钱草中分离四种黄酮苷类化合物

宋道光, 陈 志

Separation of Four Flavonoid Glycosides from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by High-speed Counter-current Chromatography

SONG Daoguang and CHEN Zhi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030223>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高速逆流色谱法从小叶金钱草中分离制备三种黄酮苷类化合物

Preparation of Three Flavonoid Glycosides Compounds from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by High Speed Counter Current Chromatography

食品工业科技. 2019, 40(13): 29-33,39

高速逆流色谱法分离制备小叶金钱草中杨梅苷与槲皮苷

Isolation and Preparation of Myricitrin and Quercitrin from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by High-speed Counter-current Chromatography

食品工业科技. 2019, 40(11): 265-269,283

高速逆流色谱法分离制备金银木叶中芦丁

Isolation and preparation of rutin from *Lonicera maackii* Maxim leaves by high speed counter current chromatography

食品工业科技. 2017(21): 237-240

高速逆流色谱分离纯化脂肪酸的研究进展

Research progress in separation and purification of fatty acids by high-speed countercurrent chromatography

食品工业科技. 2017(13): 319-323

大孔吸附树脂-高速逆流色谱法分离纯化苦水玫瑰花渣中的鞣花酸

Separation and Purification of Ellagic Acid from *Rosa setata* x *Rosa rugosa* Waste by Macroporous Resin and High-speed Countercurrent Chromatography

食品工业科技. 2021, 42(5): 182-187

牡丹花中三种活性成分的快速分离方法

Rapid isolation of three bioactive components from the flowers of *Paeonia suffruticosa* Andr.

食品工业科技. 2017(14): 188-191



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

宋道光, 陈志. 高速逆流色谱法从小叶金钱草中分离四种黄酮苷类化合物 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 93–101. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030223

SONG Daoguang, CHEN Zhi. Separation of Four Flavonoid Glycosides from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by High-speed Counter-current Chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 93–101. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030223

· 研究与探讨 ·

高速逆流色谱法从小叶金钱草中分离 四种黄酮苷类化合物

宋道光^{1,2}, 陈 志^{1,2,*}

(1. 青海师范大学地理科学学院, 青海西宁 810008;

2. 青海师范大学, 青藏高原药用动植物资源重点实验室, 青海西宁 810008)

摘 要: 为研究小叶金钱草中大极性黄酮苷类化合物, 采用正丁醇萃取、DM 301 大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶、反相硅胶柱层析纯化, 得到大极性黄酮苷类组分。结合离线二维高速逆流色谱, 分别以正己烷/正丁醇/水/冰乙酸 (系统 I: 1:2:1:0.1, v/v/v/v 和系统 II: 1:1:1:0.1, v/v/v/v) 为溶剂系统, 在主机转速 900 r/min、流速 2 mL/min、254 nm 检测波长条件下进行分离。结果表明, 从小叶金钱草正丁醇组分中分离得到四种黄酮苷类化合物, 经¹H、¹³C NMR 鉴定为杨梅素 3,3'-二- α -L-鼠李糖苷 (1)、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (2)、槲皮素 3,3'-二- α -L-鼠李糖苷 (3) 和芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (4), 高效液相色谱分析其纯度均大于 95%。化合物 3 为首次从小叶金钱草中分离得到, 本研究为小叶金钱草的化学成分研究提供依据。

关键词: 小叶金钱草, 槲皮素鼠李糖苷, 黄酮苷, 高速逆流色谱, 梯度洗脱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)24-0093-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030223

本文网刊:



Separation of Four Flavonoid Glycosides from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by High-speed Counter-current Chromatography

SONG Daoguang^{1,2}, CHEN Zhi^{1,2,*}

(1. School of Geography Science, Qinghai Normal University, Xining 810008, China;

2. Key Laboratory of Medicinal Animal and Plant Resources of the Qinghai-Tibetan Plateau, Qinghai Normal University, Xining 810008, China)

Abstract: For an improved study of flavonoid glycosides of great polarity from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam (HSL), the large polar flavonoid glycosides were extracted with n-BuOH, purified by DM 301 macroporous resin, Sephadex LH-20 and reversed-phase silica gel (ODS/RP-18). Combined with offline two-dimensional high-speed counter-current chromatography (HSCCC), the fraction with the target compounds was purified by HSCCC adopting a two-phase solvent system consisting of n-hexane/n-BuOH/water/glacial acetic acid (system I: 1:2:1:0.1, v/v/v/v and system II: 1:1:1:0.1, v/v/v/v). Additionally, the rotation velocity, and flow rate in conjunction with detection wavelength were adjusted to 2.0 mL/min, 900 r/min, and 254 nm respectively. The results demonstrated that four compounds were isolated from HSL, whose structures were determined as myricetin 3,3'-di- α -L-rhamnopyranoside (1), luteolin-7-O- β -D-glucuronide (2), quercetin 3,3'-di- α -L-rhamnopyranoside (3) and apigenin 7-O- β -D-glucuronide (4) operating ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy. The purity of the four compounds were above 95% by HPLC analysis, and compound 3 was isolated from the HSL for the first time. Thus, this work would provide a basis for the study of the chemical constituents of HSL.

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 青藏高原药用动植物资源重点实验室 (2017-ZJ-Y13)。

作者简介: 宋道光 (1994-), 男, 博士研究生, 研究方向: 生物地理学, E-mail: 269293045@qq.com。

* 通信作者: 陈志 (1963-), 男, 教授, 研究方向: 天然产物分离及药理学方向的研究, E-mail: czi58@163.com。

Key words: *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.; quercetin rhamnopyranoside; flavonoid glycosides; high-speed counter-current chromatography(HSCCC); stepwise elution

小叶金钱草(*Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.)为伞形科天胡荽属植物,中国传统中药之一^[1]。可全草药,具有清热解毒、利湿退黄、跌打淤肿以及抗菌等功效,民间及临床上常用于治疗黄疸型肝炎、结石及胆囊炎等病症,但尚未被国家药食同源性中药材及保健食品目录收录。化学成分方面,文献报道小叶金钱草化学成分主要集中在黄酮及其苷类、萜类、甾醇、氨基酸、挥发油、香豆素类等化合物中^[2-3]。药理研究方面,小叶金钱草除具有极低的毒性外^[4],具有降血糖^[5]、神经保护^[6]、抗氧化^[7]、抗癌^[8]以及肝损伤保护^[9]等药理活性。上述药理活性与其中所含的多种生物活性物质密切相关,例如黄酮类、三萜类和挥发油等,其中黄酮类化合物是其中一类非常重要的生物活性物质,在自然界中分布广泛,且具有抗癌、抑菌、抗衰老等多种生物活性^[10],能与食品中的一些成分发生相互作用继而影响食品的品质^[11],并应用于减肥等保健食品中^[12-13]。以上研究表明,金钱草中的黄酮类化合物是一类重要的活性成分。

熊峻等^[3]对金钱草及其同属植物中的黄酮类成分进行了归纳总结,但文献中对黄酮类成分的分离研究还局限在柱层析(硅胶、凝胶、MCI)及重结晶等传统手段。为了更好的研究金钱草中的化学成分,通常会借助一些其他手段如响应面法辅助以超声提取,能够优化提取工艺达到更好的提取有效成分的目的^[14],此外高效液相色谱(HPLC)^[15]、气相色谱质谱(GC-MS)^[5]、超高效液相色谱质谱(UPLC-MS)^[7]也应用于分析金钱草化学成分。因此,借助现代仪器分析手段能更好的对中药中的化学成分进行研究。截至2020版药典,小叶金钱草仍未被收录,因此对小叶金钱草化学成分进行深入研究具有重要意义。

虽然已有诸多学者对金钱草中黄酮类成分进行研究,但大多还局限于传统手段,少有通过高速逆流色谱对金钱草化学成分进行研究的报道,传统植化分离手段大多存在分离时间长、效率低下、溶剂使用量大及部分分离物质死吸附等缺点。高速逆流色谱(High-speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)是1982年由美国国立卫生院 Ito 博士研发的一种新型、连续高效的液液分配色谱技术,即按照某样品在两相不互溶的溶剂之间分配的一种技术^[16]。除节约溶剂、缩短分离时间外,还可有效解决传统柱色谱在分离时产生的不可逆吸附以及样品在分离过程中遇到的变性问题^[17]。占颖等^[18]对高速逆流色谱在黄酮类天然产物的分离应用进行了总结分析,包括适合分离黄酮及其苷类的溶剂系统、分配系数、辅助添加剂、洗脱方式以及与传统分离手段的结合情况等。本研究在前期对小叶金钱草乙酸乙酯萃取物研究的工作基础上,采用 HSCCC 手段对小叶金

钱草正丁醇萃取物中的黄酮苷类成分进行进一步分离研究,通过调整不同溶剂系统,采取梯度洗脱方式并结合前期总结的 HSCCC 样品出峰经验公式,优化分离条件,为进一步研究小叶金钱草的化学成分提供分离方法及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小叶金钱草 西宁城北百信大药房,青海师范大学陈志教授鉴定为天胡荽属植物天胡荽(*Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.); DM 301 型大孔吸附树脂 安徽三星树脂科技有限公司;葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)、反相硅胶(ODS/RP-18) 安徽博美生物科技有限公司;正己烷、正丁醇、乙醇、甲酸 分析纯,天津市百世化工有限公司;乙腈 色谱纯,天津星马克科技发展有限公司;水 二次蒸馏水;核磁管(外径 5 mm,长 7 英寸) 美国 Wilmad 公司;DMSO-d₆ 宁波旋光医药科技有限公司。

EV400 旋转蒸发器 北京莱伯泰科仪器股份有限公司;KJ-11030AL 型超声波清洗器 深圳市科洁超声科技有限公司;Waters 600 高效液相色谱仪、真空脱气过滤装置、Waters 2998 PAD 二极管阵列检测器 美国 Waters 公司;HSCCC TBE-300B 型高速逆流色谱仪 中国上海同田生化技术有限公司;N2000 双通道色谱工作站 浙江大学智达信息工程有限公司;Bruker-500 MHz NMR(AVANCE III HD) 核磁共振仪 瑞士 Bruker 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小叶金钱草正丁醇萃取物的制备 将购买的小叶金钱草全草粉碎后过 40 目筛。提取方法参考课题组前期工作^[19],称取 20 kg 药材粉末分次置于 KJ-11030AL 型超声波清洗器中,放置药材前按液料比 10:1 加入 70%(v/v)乙醇溶液,于 600 W、40 kHz、60 ℃ 条件下超声提取 1 h,过滤所得药渣再按以上方式继续提取三次,总计提取 4 次。过滤液经减压浓缩后得棕褐色黏稠浸膏。浸膏加入蒸馏水 20 L 并在加热条件下(60 ℃)超声溶解,然后所得溶液依次用 10 倍体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 5 次。浓缩正丁醇萃取液,冻干得正丁醇萃取物,4 ℃ 避光保存备用。

1.2.2 小叶金钱草正丁醇萃取物各分离样品的制备

取正丁醇萃取物 255 g,用 5 L 蒸馏水超声溶解,DM 301 型大孔吸附树脂柱(10×50 cm)进行富集并静置过夜,使用乙醇/水(0:100、30:70、50:50、75:25、100:0)进行洗脱,每个梯度各用五倍柱体积洗脱,20.0 mL/min 流速洗脱。收集 50% 乙醇/水洗脱液,旋蒸除去溶剂并于-70 ℃ 冷冻干燥 24 h,得大孔树

脂富集样品。

取大孔树脂富集样品(10 g)加入 100 mL 蒸馏水溶解并过 0.45 μm 滤膜, Sephadex LH-20 柱(3 $\times$ 100 cm)柱层析分离, 分别用甲醇/水(0:100、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、75:25、100:0)洗脱, 每个比例洗脱 2 个柱体积^[19], 1/20 柱体积为一馏分, 1.0 mL/min 流速洗脱, 收集 40% 甲醇洗脱组分, 旋蒸除去溶剂并于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 24 h, 得 Sephadex LH-20 分离样品。

Sephadex LH-20 分离样品(1 g)加入 10 mL 蒸馏水超声溶解并过 0.45 μm 滤膜, ODS 柱(2 $\times$ 100 cm)柱层析分离, 分别用甲醇/水(0:100、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、75:25、100:0)洗脱, 每个比例洗脱 2 个柱体积, 1/20 柱体积为一馏分, 1.0 mL/min 流速洗脱, 旋蒸除去溶剂并于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 24 h, 得 ODS 分离样品, 所得单体化合物经 HPLC 检测其纯度。

1.2.3 分离样品的高效液相色谱检测 取一定量正丁醇萃取物(20 mg)、大孔树脂富集样品(6.5 mg)、Sephadex LH-20 分离样品(4 mg)、ODS 分离样品(2 mg), 用 1 mL 乙腈溶解, 0.45 μm 滤膜过滤后, 进行 HPLC 分析, 样品纯度按面积归一化法计算。

色谱柱: Waters 600 SunFire™ C₁₈ 柱(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸(15~30% 乙腈, 0~70 min), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254 nm, 进样 10 μL 分析。高效液相色谱(HPLC-PAD)紫外光谱扫描范围: 200~400 nm。

1.2.4 高速逆流色谱溶剂系统的选择

1.2.4.1 溶剂系统的确定 参考高速逆流色谱分离黄酮苷类化合物溶剂系统^[20-21]。按照溶剂极性的不同, 配制乙酸乙酯-正丁醇-水溶剂系统(体积比为 1:1:1、2:1:2、4:1:4), 正己烷-正丁醇-水溶剂系统(体积比为 1:1:1、1:2:2、1:2:1)和正己烷-正丁醇-水-冰乙酸溶剂系统(体积比为 1:2:1:0.1、1:1:1:0.1), 考察乙酸乙酯、正己烷、正丁醇和冰乙酸对分配系数(k)的影响。

1.2.4.2 k 值的测定 k 值及分离度(α)的测定方法、参考值范围参照文献^[19]。k 值定义为: 样品溶解在不互溶的两相溶剂中, 上相中目标化合物的色谱峰面积($S_{\text{上}}$)除以下相中目标化合物的色谱峰面积($S_{\text{下}}$) ($k=S_{\text{上}}/S_{\text{下}}$), 其中 k 的范围为 0.2~5.0, α 的定义为 $\alpha=k_1/k_2$ ($k_1>k_2$), 且 $\alpha>1.5$ 。

1.2.5 高速逆流色谱法分离制备小叶金钱草中的黄酮苷 配制溶剂系统 I: 正己烷-正丁醇-水-冰乙酸(1:2:1:0.1, v/v/v/v)和系统 II: 正己烷-正丁醇-水-冰乙酸(1:1:1:0.1, v/v/v/v), 于分液漏斗中充分振摇后在室温下静置过夜, 分别将系统 I、系统 II 的上下相分离并超声脱气 20 min, 以系统 I 的上相为固定相, 系统 I 的下相为流动相。仪器参数如下: 循环水温

度 45 $^{\circ}\text{C}$, 主机正转模式, 转速 900 r/min, 流动相流速 2 mL/min, 检测波长为 254 nm, 其余操作步骤同文献^[19]。固定相保留率(S_{F})计算方法为: $S_{\text{F}}(\%)=[(\text{螺旋管体积}-\text{流出固定相体积})/\text{螺旋管体积}]\times 100$ 。其中溶剂系统 I 固定相保留率为, $S_{\text{F1}}(\%)=[(300-110)]/300\times 100=63.3\%$, 系统 II 的固定相保留率 $S_{\text{F2}}(\%)=[(300-115)]/300\times 100=61.6\%$ 。

开启 TBD 2000 检测系统, 设置采集数据。取 1.2.2 中 ODS 分离样品 324 mg, 用 10 mL 系统 I 上相液体溶解, 由进样阀进样, 记录 HSCCC 色谱图并收集分离组分。当第一组色谱峰流出检测器后, 上相固定相不变, 下相流动相迅速切换为系统 II 的下相作为流动相, 继续洗脱, 继续收集分离组分。

1.2.6 化合物核磁共振波谱表征 取单体化合物各 10 mg, 用 0.5 mL DMSO- d_6 溶解, 移入核磁管。通过核磁共振波谱仪对已分离化合物进行波谱鉴定 (^1H NMR、 ^{13}C NMR)。 ^1H NMR 参数: 扫场范围=-3.8247~16.1698 ppm, TD=65536, NS=8, DS=2, SWH=10000.000 Hz, FIDRES=0.152588 Hz, AQ=3.2767999 sec, RG=106.4, DW=50.000 usec, DE=6.50 usec, TE=298.0 K, D1=1.00000000 sec; ^{13}C NMR 参数: 扫场范围=-18.3314~218.3255 ppm, TD=65536, NS=160, DS=4, SWH=29761.904 Hz, FIDRES=0.454131 Hz, AQ=1.1010048 sec, RG=192.1, DW=16.800 usec, DE=6.50 usec, TE=298.0 K, D1=2.00000000 sec, D11=0.03000000 sec。四甲基硅烷(TMS)定标。

1.3 数据处理

^1H NMR、 ^{13}C NMR 图谱在 MestReNova 6.1.0 软件中处理, 并进行 ^1H NMR 化学位移积分和计算偶和常数(J), J 的计算方法参照文献^[19]。通过与文献中化合物核磁数据进行比对, 比对一致即确定化合物结构, 结构式通过 ChemBioDraw 14.0 画出。

2 结果与分析

2.1 小叶金钱草各分离样品 HPLC 分析

按照 1.2.3 方法分析样品, 正丁醇萃取物、DM 301 大孔吸附树脂富集样品、Sephadex LH-20 分离样品以及 ODS 分离样品的 HPLC 结果分别为图 1a~图 1d。由图 1a 可知, 正丁醇萃取物中大极性杂质较多导致其他组分色谱峰并不明显。而由图 1b 可知, 正丁醇萃取物经 DM 301 大孔树脂富集后, 主要成分被明显富集, 但所包含的其它杂质仍较多且复杂。经 Sephadex LH-20 进行纯化后分析结果见图 1c, 可知经前期萃取富集和柱层析纯化后, 4 个主要成分进一步得到纯化, 其保留时间分别为: 22.859, 29.109, 34.157 和 42.910 min。由 1.2.3 所述的色谱条件可知, 正丁醇萃取物主要成分极性较大, 因此大孔吸附树脂富集样品经 Sephadex LH-20 纯化后, 选择 ODS 进行进一步分离, 得到两种单体化合物 2、3 和一组混合物, 即 ODS 分离样品。单体化合物纯度分

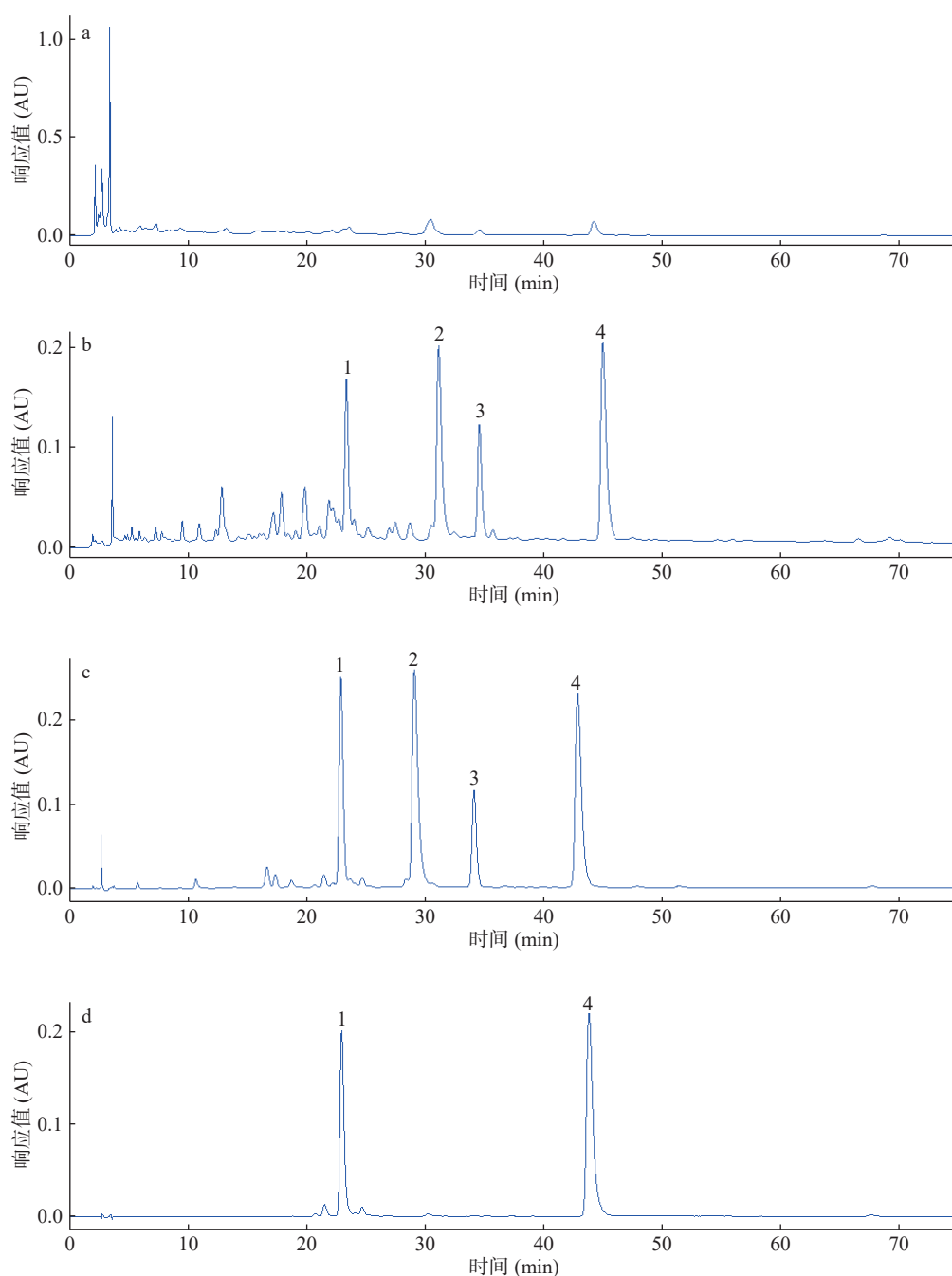


图1 不同萃取物的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of different fractions

注: a: 正丁醇; b: DM 301 大孔吸附树脂; c: Sephadex LH-20; d: ODS。

析见 2.4, ODS 分离样品分析见图 1d, 峰 1、峰 4 为高速逆流色谱目标分离成分。

2.2 HSCCC 溶剂系统的优化及确定

2.2.1 溶剂系统的确定 不同逆流色谱溶剂系统的 k 值变化如表 1。根据 HPLC 分析及试验发现, ODS 分离样品中的待分离目标化合物极性较大且易溶于正丁醇和水, 而逆流色谱中包含正丁醇的溶剂系统常被用于分离大极性化合物^[22]。从表 1 可以看出, 在包含乙酸乙酯的溶剂系统中(系统 1、2、3), 4 号化合物的 k 均较大, 不符合 k 的最适范围, 另一方面, 包含乙酸乙酯的溶剂系统具有更长的两相分层时间, 在 HSCCC 分离过程中两相溶剂分层时间过长将不

利于分离效果, 因此不适合用作 HSCCC 分离的溶剂系统。

当用正己烷替换溶剂系统中乙酸乙酯后(系统 1 和 4), 化合物的分配系数明显减小而分离度明显增加。当正己烷比例减小或正丁醇比例增加时(系统 4 与 5、6), 化合物分配系数增加而分离度减小, 但 1 号化合物的 k 太小而不利于分离, 因此系统 4、5、6 不适合用作 HSCCC 分离的溶剂系统。据文献报道, Chen 等^[23] 向溶剂系统中添加冰乙酸来改善化合物的分离。因此在正己烷-正丁醇-水溶剂系统中加入冰乙酸来改善 1 号和 4 号化合物的分离, 进一步探索正己烷-正丁醇-水-冰乙酸溶剂比例。

表 1 ODS 分离样品在不同溶剂体系中的分配系数
Table 1 Partition coefficients (K) of the reversed-phase silica gel sample in different two phase solvent systems

编号	溶剂系统	比例(v/v/v)	分配系数	分离度
1	乙酸乙酯:正丁醇:水	1:1:1	$k_1=13.57; k_4=44.51$	3.28
2		2:1:2	$k_1=6.69; k_4=32.93$	4.92
3		4:1:4	$k_1=1.44; k_4=12.95$	8.99
4		1:1:1	$k_1=0.068; k_4=0.66$	9.70
5	正己烷:正丁醇:水	1:2:2	$k_1=0.18; k_4=1.61$	8.94
6		1:2:1	$k_1=0.29; k_4=2.54$	8.75
7	正己烷:正丁醇:水:冰乙酸	1:1:1:0.1	$k_1=0.12; k_4=1.17$	9.75
8		1:2:1:0.1	$k_1=0.53; k_4=4.68$	8.83

2.2.2 正己烷-正丁醇-水-冰乙酸比例的确定 表 1 中(系统 4 和 7, 系统 6 和 8)可以发现, 溶剂系统中添加冰乙酸对化合物的分离度几乎没有影响, 但却有效地增加了目标化合物的分配系数。研究发现, 系统 7(系统 I)最适合分离 1 号化合物, 系统 8(系统 II)最适合分离 4 号化合物。单一的一种溶剂系统难以做到同时 1 号和 4 号化合物, 而 HSCCC 梯度洗脱方式能在确保 1 号化合物纯度的情况下, 在最短时间内分离并节省 4 号化合物的分离时间, 避免目标化合物过早的与杂质流出以确保化合物的纯度, 因此选取上述两种溶剂系统并以梯度洗脱方式分离目标化合物。

2.3 HSCCC 分离结果

参照 1.2.5 中并对 ODS 样品进行高速逆流色谱分离, 得到 2 个分离组分(图 2)并进行 HPLC 分析。收集图 2 中 88~102 min(组分 I)及 310~330 min(组分 II)两组分进行 HPLC 分析, HPLC 分析结果见 2.4。

2.4 单体化合物 HPLC 分析

按 1.2.3 的 HPLC 方法分析样品, HSCCC 中组分 I 对应图 3a 中 1 号化合物, $R_t=22.859$ min, 纯度 97.7%, 对应图 1 中 1 号色谱峰。HSCCC 中组分 II 对应图 3d 中 4 号化合物, $R_t=42.910$ min, 纯度 95.3%, 对应图 1 中 4 号色谱峰。2.1 中经 ODS 分离得到的两个单体化合物分别对应图 3b 中 2 号化合物, $R_t=29.109$ min, 纯度 96.8%, 即图 1 中 2 号色谱峰。图 3c 中 3 号化合物, $R_t=34.157$ min, 纯度 95.7%, 对

应图 1 中 3 号色谱峰。将柱层析与高速逆流色谱所分离得到化合物经冷冻干燥后称重得 1 号化合物(100.23 mg)、2 号化合物(150.29 mg)、3 号化合物(128.43 mg)和 4 号化合物(105.49 mg)。各色谱图中小图对应各色谱峰的紫外吸收光谱, 由紫外光谱分析得知, 色谱峰紫外吸收在峰带 I, 300~400 nm 及峰带 II, 220~280 nm 有明显紫外吸收, 符合黄酮类化合物紫外光谱吸收特征, 故所分离得到的化合物为黄酮类化合物^[24]。

2.5 高速逆流色谱出峰经验公式

为了验证 HSCCC 梯度洗脱是否真正起到了缩短分离时间的作用, 对课题组前期实验进行归纳, 总结高速逆流色谱出峰经验公式, 当 $k \geq 1$ 时, 有如下公式:

$$t = \frac{V_c}{F} [S_f(k-1)+1] (k \geq 1)$$

式中, t 为高速逆流色谱色谱峰出峰时间(min); V_c 为螺旋管体积(mL); F 为流动相流速(mL/min); S_f 为固定相保留率(%); k 为分配系数。

据此公式 1 估算溶剂系统 I 中化合物 4 的出峰时间, $t=300/2[0.633(4.68-1)+1]=499.416$ min, 小于化合物 4 实际分离时间(约 300~310 min)。根据系统 I 切换系统 II 的时间(150 min), 以此为基点计算系统 II 条件下, 估算化合物 4 的出峰时间。 $t=300/2[0.616(1.17-1)+1]=165.708$ min, 以及基点时间 150 min 预计分离时间 315 min 左右, 与实际分离时间较为接近。

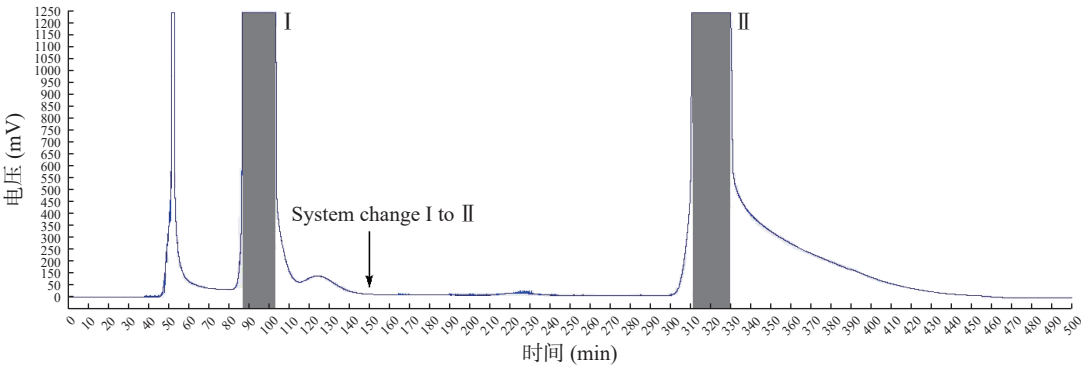


图 2 ODS 分离样品的高速逆流色谱图
Fig.2 HSCCC chromatogram of the ODS sample

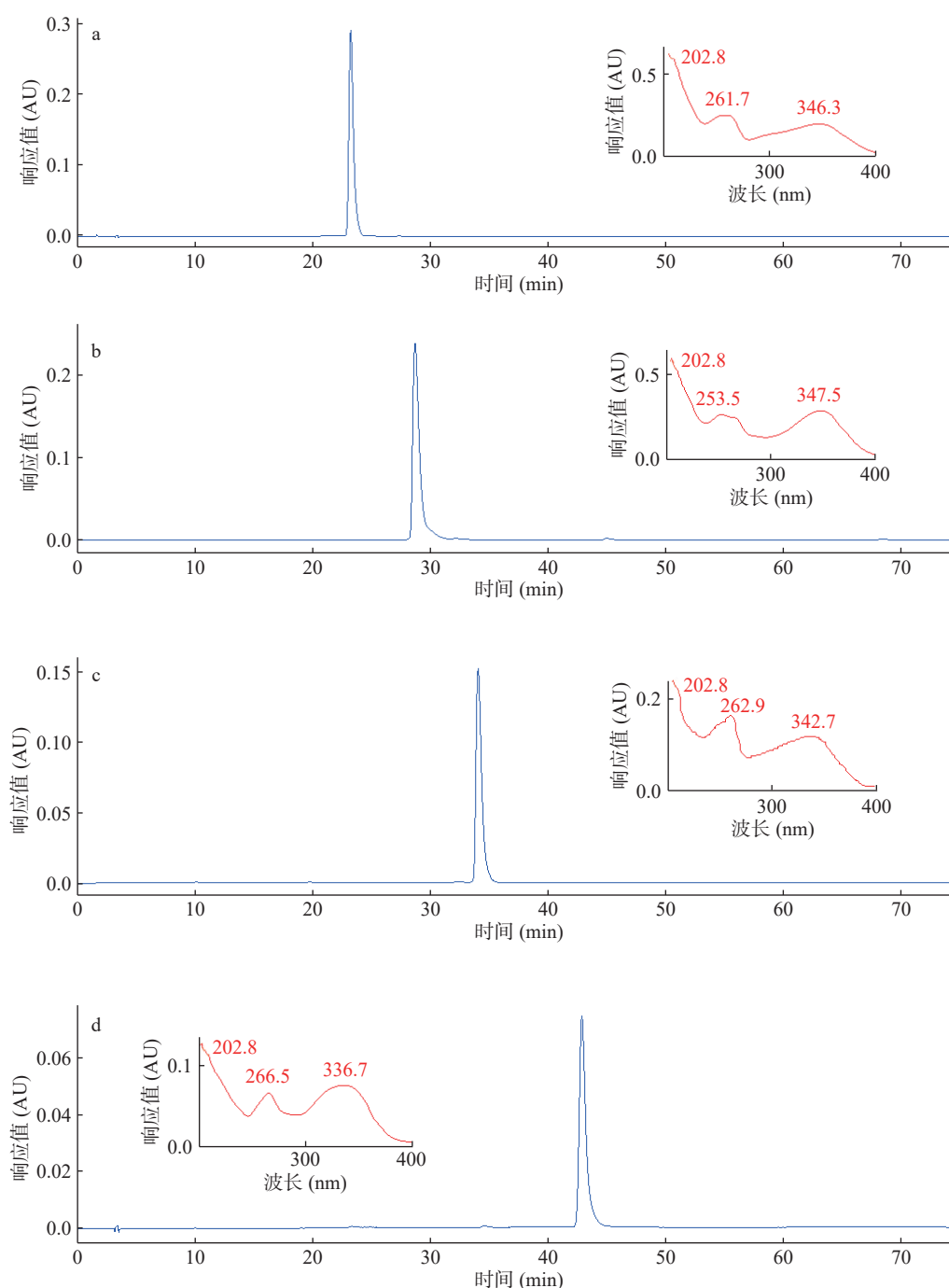


图3 HSCCC及反相硅胶分离化合物的HPLC色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of the targeted compounds purified by HSCCC and reversed-phase silica gel.

2.6 结构表征

1、2和4号化合物的 ^1H NMR和 ^{13}C NMR信息与前期实验工作所得化合物信息相同^[25], 鉴定为杨梅素 3,3'-二- α -L-鼠李糖苷(1号化合物)、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷(2号化合物)和芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷(4号化合物)。化合物3前期实验尚未分离得到, 核磁信息如下, 1~4号化合物结构式见图4。

3号化合物: ^1H NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz, ppm): δ 7.53(1H, d, $J=2.1$ Hz, 2'-H), 7.46(1H, dd, $J=2.1$ Hz, 2.1 Hz, 6'-H), 6.97(1H, d, $J=8.4$ Hz, 5'-H), 6.27(1H, d, $J=1.9$ Hz, 8-H), 6.11(1H, d, $J=1.9$ Hz, 6-H),

5.30(1H, s, 3-rha-1-H), 5.26(1H, s, 3'-rha-1-H), 3.47-3.97(4H, m, 3-rha-2,3,4,5), 3.11-3.96(4H, m, 3'-rha-2,3,4,5), 1.17(3H, d, $J=6.2$ Hz, 3'-rha- CH_3), 0.81(3H, d, $J=6.2$ Hz, 3-rha- CH_3)。 ^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 125 MHz, ppm): δ 177.70(C-4), 167.84(C-7), 161.65(C-5), 157.16(C-8a), 156.81(C-2), 144.78(C-3'), 116.76(C-5'), 119.35(C-2'), 151.79(C-4'), 134.38(C-3), 121.05(C-1'), 125.25(C-6'), 103.45(C-4a), 102.05(C-1''), 100.95(C-1'''), 99.97(C-6), 94.46(C-8), 72.41(C-4''), 71.63(C-4'''), 71.04(C-3''), 70.86(C-3'''), 70.80(C-2''), 70.60(C-2'''), 70.49(C-5''), 70.06(C-5'''), 18.38(C-6'''), 17.95(C-6'')。通过与文

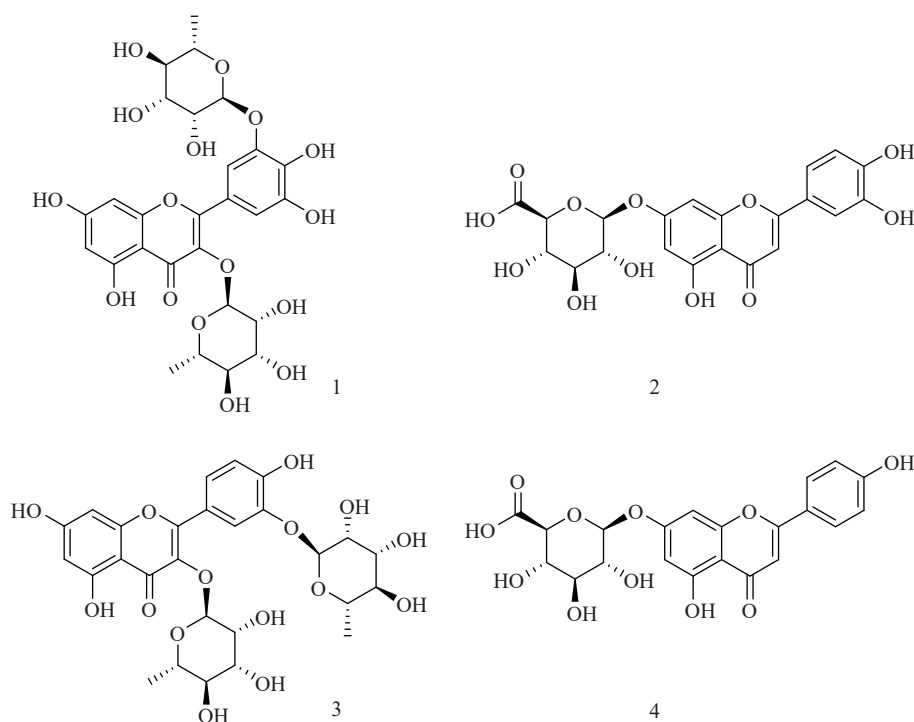


图4 1~4号化合物的化学结构

Fig.4 Chemical structure of Compound 1~4

献[26]对比, 鉴定化合物3为槲皮素 3,3'-二- α -L-鼠李糖苷(Quercetin 3,3'-di- α -L-rhamnopyranoside)。

从化合物的来源来看, 上述四种化合物在其他植物中也有报道, 其中化合物1、3只在大金钱草(*Lysimachia christinae* Hance)中[26]分离得到, 目前还没有关于这两种化合物活性方面的报道。化合物2和4除在前期工作中分离得到外, 也广泛分布在其他植物中, 如穿心莲(*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees.)[27]、鹅不食草(*Centipeda minima* (L.) A. Br. et Aschers.)[28]及独脚金(*Striga asiatica* (L.) O. Kuntze)[29]等。活性方面化合物2和4具有抗氧化活性、降糖活性[30]、抗心肌缺血活性[31]、抗癌及抗炎[32]等药理活性。而从小叶金钱草中分离得到的黄酮苷类成分则进一步丰富了上述四种化合物的植物来源, 为进一步研究药理活性奠定了基础。

3 结论

本文采用柱层析与高速逆流色谱结合的方式分离制备小叶金钱草中四种黄酮苷类成分, 以正己烷-正丁醇-水-冰乙酸(系统 I: 1:2:1:0.1, v/v/v/v)及正己烷-正丁醇-水-冰乙酸(系统 II: 1:1:1:0.1, v/v/v/v)为溶剂系统, 在转速 900 r/min、流速 2 mL/min 的条件下, 以梯度洗脱方式分离制备分配系数差异较大的黄酮苷类化合物, 并辅以高速逆流色谱出峰经验公式验证洗脱效果。分离化合物经 ^1H NMR和 ^{13}C NMR鉴定为杨梅素 3,3'-二- α -L-鼠李糖苷(1)、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷(2)、槲皮素 3,3'-二- α -L-鼠李糖苷(3)和芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷(4), 纯度均高于 95%, 其中化合物3为首次从小叶

金钱草中分离得到, 为进一步研究小叶金钱草的化学成分、药效以及综合利用奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第55卷第1册伞形科[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 17-18.
- [2] 许玉芬, 陈燕惠, 杨尚彪. 天胡荽属植物的化学成分及其药理作用综述[J]. 福建热作科技, 2013, 38(3): 59-61. [XU Yufen, CHEN Yanhui, YANG Shangpang. Overview on chemical constituents and pharmacological effects of *Hydrocotyle* genus[J]. *Fujian Science and Technology of Tropical Crops*, 2013, 38(3): 59-61.]
- [3] 熊峻, 余金明, 刘宏伟, 等. 天胡荽属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(11): 179-183. [XIONG Jun, SHE Jinming, LIU Hongwei, et al. Advance of chemical constituents and pharmacological effects of *Hydrocotyle* genus[J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2019, 15(11): 179-183.]
- [4] HAZARIKA I, GEETHA K M, SUNDARI S P, et al. Acute oral toxicity evaluation of extracts of *Hydrocotyle sibthorpioides* in wister albino rats as per OECD 425 TG[J]. *Toxicology Reports*, 2019, 6: 321-328.
- [5] SWARGIARY A, DAIMARI M. GC-MS analysis of phyto-compounds and antihyperglycemic property of *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.[J]. *SN Applied Sciences*, 2021, 3(1): 36.
- [6] HAZARIKA I, MUKUNDAN G K, SUNDARI S P, et al. The modulatory effect of *Hydrocotyle sibthorpioides* in attenuating the aluminium chloride induced neurotoxicity in rat brain[J]. *Advances in Traditional Medicine*, 2022, 22: 207-219.
- [7] KUMARI S, ELANCHERAN R, KOTOKY J, et al. Rapid

- screening and identification of phenolic antioxidants in *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by UPLC-ESI-MS/MS[J]. *Food Chemistry*, 2016, 203: 521–529.
- [8] 蒲首丞. 天胡荽抗肿瘤活性成分研究[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(11): 3238–3239. [PU S C. Study on anti-tumor active components of coriander[J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(11): 3238–3239.]
- [9] LIN X, ZHANG S J, HUANG R B, et al. Protective effect of genistein on lipopolysaccharide/D-galactosamine- induced hepatic failure in mice[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 37(4): 625–632.
- [10] 王倩, 常丽新, 唐红梅. 黄酮类化合物的提取分离及其生物活性研究进展[J]. 河北理工大学学报(自然科学版), 2011, 33(1): 110–115. [WANG Qian, CHANG Lixin, TANG Hongmei. Present situation in research of flavonoids bioactivities and its extraction and separation technology[J]. *Journal of Hebei Politechnic University (Natural Science Edition)*, 2011, 33(1): 110–115.]
- [11] 刘霞, 罗芳, 余银, 等. 黄酮类化合物与食品成分相互作用研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(10): 1009–1015. [LIU Xia, LUO Fang, SHE Yin, et al. Research process of interaction between flavonoids and food ingredients[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2017, 36(10): 1009–1015.]
- [12] 刘齐, 杜勇, 杨玲, 等. 国产减肥保健食品现状分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(1): 209–213. [LIU Qi, DU Yong, YANG Ling, et al. Analysis of the status in domestic registered weight-reduction health foods[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(1): 209–213.]
- [13] 王翔林, 张景. 保健食品中总黄酮的测定[J]. 食品安全导刊, 2016, 3: 121–122. [WANG Xulin, ZHANG Jing. Determination of total flavonoids in health food[J]. *China Food Safety Magazine*, 2016, 3: 121–122.]
- [14] 林启凤, 陈仲巍, 林聪炜, 等. 响应面优化天胡荽多酚超声波辅助提取工艺及其抗氧化性[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(10): 3361–3368. [LIN Qihuang, CHEN Zhongwei, LIN Congwei, et al. Optimization of polyphenols from *hydrocotyle sibthorpioides* by ultrasonicassisted extraction using response surface methodology and its antioxidant activities[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(10): 3361–3368.]
- [15] 吴旻. 高效液相色谱法(HPLC)测定天胡荽各器官中的黄酮类物质含量[J]. 生物技术世界, 2015(11): 257. [WU Min. Determination of flavonoids in different organs of *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by high performance liquid chromatography (HPLC)[J]. *Biotech World*, 2015, 11: 257.]
- [16] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 4. [CAO X L. High speed countercurrent chromatographic separation technology and application [M]. Beijing: Chemical Engineering Industrial Press, 2005: 4.]
- [17] YU Y, LI H J, JIANG Y. Separation and preparation of five cyclopamine analogs from rhizomes of *Veratrum oxysepalum* Turcz. by two-step high-speed counter-current chromatography[J]. *Separation Science and Technology*, 2014, 49(17): 2748–2755.
- [18] 占颖, 李朋收, 刘洋洋, 等. 高速逆流色谱应用于黄酮类成分分离与纯化研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(8): 1844–1847. [ZHAN Ying, LI Pengshou, LIU Yangyang, et al. Research progress of application of high-speed counter-current chromatography in separation and purification of flavonoids[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 32(8): 1844–1847.]
- [19] 宋道光, 徐顺连, 樊鑫宇, 等. 高速逆流色谱法分离制备小叶金钱草中杨梅苷与槲皮苷[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 265–269, 283. [SONG Daoguang, XU Shunlian, FAN Xinyu, et al. Isolation and preparation of myricitrin and quercitrin from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by high-speed counter-current chromatography[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(11): 265–269, 283.]
- [20] LIANG Y, HUANG Z F, CHEN H W, et al. Preparative isolation and purification of two closely related glycosidic flavonoids from *Exocarpium citri grandis* by high-speed countercurrent chromatography[J]. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2007, 30(3): 419–430.
- [21] CHEN T, YANG X, WANG S, et al. Separation of five flavone glycosides including two groups with similar polarities from *Dracocephalum tanguticum* by a combination of three high-speed counter-current chromatography modes[J]. *Journal of Separation Science*, 2022, 45(2): 468–476.
- [22] SHI S Y, HUANG K L, ZHANG Y P, et al. Preparative isolation and purification of two flavonoid glycosides from *Taraxacum mongolicum* by high-speed counter-current chromatography[J]. *Separation and Purification Technology*, 2008, 60(1): 81–85.
- [23] CHEN T, WANG P, WANG N N, et al. Separation of three polar compounds from *Rheum tanguticum* by high-speed counter-current chromatography with an ethyl acetate/glacial acetic acid/water system[J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(8): 1775–1780.
- [24] 吴立军. 实用天然有机产物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 886–892. [WU L J. Practical chemistry of natural organic products [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2007: 886–892.]
- [25] 宋道光, 樊鑫宇, 徐顺连, 等. 高速逆流色谱法从小叶金钱草中分离制备三种黄酮苷类化合物[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 29–33, 39. [SONG Daoguang, FAN Xinyu, XU Shunlian, et al. Preparation of three flavonoid glycosides compounds from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by high speed counter current chromatography[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 29–33, 39.]
- [26] GAO F F, ZHAO D, DENG J. New flavonoids from *Lysimachia christinae* Hance[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2013, 96(5): 985–989.
- [27] 靳鑫, 时圣明, 张东方, 等. 穿心莲化学成分的研究[J]. 中草药, 2012, 43(1): 47–50. [JIN Xin, SHI Shengming, ZHANG

- Dongfang, et al. Chemical constituents of *Andrographis paniculata* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2012, 43(1): 47–50.]
- [28] 王嘉欣, 薛鹏辉, 广晨曦, 等. 鹅不食草正丁醇部位化学成分研究 [J]. *天津中医药大学学报*, 2021, 40(2): 253–259. [WANG Jiaxin, XUE Penghui, GUANG Chenxi, et al. Study on chemical constituents from n-BuOH extract of *Centipeda minima* (L.) A. Br. et Aschers [J]. *Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 40(2): 253–259.]
- [29] 钟凤城, 李胜华, 江贤方, 等. 独脚金的化学成分研究 [J]. *湖南林业科技*, 2018, 45(5): 63–67, 72. [ZHONG Feng'e, LI Shenghua, JIANG Xianfang, et al. Chemical constituents of *Striga asiatica* (L.) O. K. [J]. *Hunan Forestry Science and Technology*, 2018, 45(5): 63–67, 72.]
- [30] 古丽妮尔·阿布力克木, 尼格尔热依·亚迪卡尔, 阿吉艾克拜尔·艾萨. 薰衣草残渣化学成分及其生物活性 [J]. *中成药*, 2019, 41(4): 818–822. [GULNIGAR A, NIGARY Y, HAJIAKBER A. Chemical constituents from the residue of *Lavandula angustifolia* and their biological activities [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2019, 41(4): 818–822.]
- [31] 李志红, 颜仁杰, 邢建国, 等. 基于血清药物化学研究香青兰抗心肌缺血活性部位的活性成分 [J]. *中国医药工业杂志*, 2018, 49(8): 1142–1148. [LI Zhihong, YAN Renjie, XING Jianguo, et al. Anti-myocardial ischemia components from *Dracocephalum moldavica* extraction based on serum pharmacochemistry analysis [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2018, 49(8): 1142–1148.]
- [32] 夏鹏飞. 掌叶葶苈的化学成分及药理活性研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009. [XIA P F. Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Sterculia foetida* L. [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2009]