

抗肿瘤作用( $P < 0.05$ ) 这说明 5F 制成 5F-Na 盐注射液后仍然能保持其原有的抗肿瘤活性,且对体内荷瘤小鼠的肿瘤生长有明显的抑制作用。

#### 参考文献:

- [1] 张晓, 崔燎, 梁念慈, 等. 半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(1): 37.
- [2] Liu ZM, Chen GG, Vlantis AC, et al. Cell death induced by ent-11 $\alpha$ -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid in anaplastic thyroid carcinoma cells is via a mitochondrial-mediated pathway[J]. Apoptosis, 2005, 10(6): 1345.
- [3] Liu Z, Ng EK, Liang NC, et al. Cell death induced by Pteris semipinnata L. is associated with p53 and oxidant stress in gastric cancer cells[J]. FEBS Lett, 2005, 28, 579(6): 1477.
- [4] 何太平, 吴科锋, 梁念慈, 等. 半边旗二萜类化合物 5F 对高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞中癌相关基因表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 117.
- [5] 刘义, 吴科锋, 李立. 半边旗提取物 5F 对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞生长的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(1): 9.
- [6] 李华龙, 尹东东, 王杏林. 难溶性药物的制剂增溶技术及应用[J]. 天津药学, 2010, 22(1): 61.

## 玄参中苯乙醇苷类化合物的高效逆流色谱技术分离

刘质净<sup>2</sup>, 李丽<sup>1</sup>, 桂语歌<sup>1</sup>, 闫静<sup>2</sup>, 刘春明<sup>1\*</sup>

(1. 长春师范学院, 吉林 长春 130032; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** 目的 应用高效逆流色谱技术分离玄参中的苯乙醇苷类化合物。方法 采用高效逆流色谱, 以醋酸乙酯: 正丁醇: 乙醇: 水(1: 1: 0.1: 2) 为溶剂体系, 分离玄参中的苯乙醇苷类化合物, 流速 3 ml/min, 检测波长 320 nm。结果 分离得到麦角甾苷和安格洛苷 C 化合物纯度达 90% 以上。结论 应用高效液相色谱技术和电喷雾质谱可快速鉴定化合物结构。

**关键词:** 高效逆流色谱; 玄参; 苯乙醇苷类化合物

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.03.012

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2011)03-0549-03

### Isolation and Purification of Phenylethanoid Glycosides from the *Scrophularia ningpoensis* by High-performance Counter-current Chromatography

LIU Zhi-jing<sup>2</sup>, LI Li<sup>1</sup>, GUI Yu-ge<sup>1</sup>, YAN Jing<sup>2</sup>, LIU Chun-ming<sup>1\*</sup>

(1. The Central Laboratory, Changchun Normal University, Changchun 130032, China; 2. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**Abstract:** **Objective** To isolate and purify two phenylethanoid glycosides, acteoside and angroside C from the *Scrophularia ningpoensis* by high-performance counter-current chromatography (HPCCC). **Methods** The HPCCC solvent system was consisted of ethyl acetate - n-butanol - ethanol - water (1: 1: 0.1: 2, v: v: v: v), the flow rate was at 3.0 ml/min, and the effluent was detected at 320nm. **Results** Acteoside and angroside were isolated with purity at over 90%. **Conclusion** The structures can be identified by HPLC and ESI-MS<sup>n</sup> in the negative mode.

**Key words:** HPCCC; *S. ningpoensis*; Phenylethanoid glycosides

玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 是常用的传统道地药材之一<sup>[1]</sup>。玄参又名元参、黑参、浙玄参, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 性微寒, 味甘、苦、咸, 归肺、脾、肾经, 具有凉血滋阴、泄火解毒等功效, 可用于热病烦渴, 发斑, 骨蒸劳热, 夜寐不宁, 自汗盗汗, 津伤便秘, 吐血衄血, 喉蛾肿痛, 痈肿, 瘰疬等症<sup>[2]</sup>。

高效逆流色谱技术 (High-performance counter-current chromatography, HPCCC) 是一种新型的液液色谱技术, 可以在短时间内实现目标化合物的高效分离和制备, 并且可以达到几千个理论塔板数<sup>[3, 4]</sup>。由于其不同于高效液相色谱, 不使用固相载体作为固定相, 从而克服了固相载体带来的样品吸附、损失、污染和峰形

脱尾等缺点<sup>[5]</sup>, 具有回收率高, 制备量大等优点, 是一种理想的制备分离手段<sup>[6]</sup>。目前尚未见应用高效逆流色谱技术分离玄参中苯乙醇苷类化合物的报道。本文采用高效逆流色谱技术分离了玄参中的两种苯乙醇苷类化合物, 即麦角甾苷和安格洛苷 C, 并根据液相色谱的保留时间和电喷雾质谱碎裂规律鉴定了化合物的结构。

#### 1 试剂与仪器

玄参 *Scrophularia ningpoensis* 药材购于北京同仁堂药店 (长春分店); HPCCC 所用试剂均为分析纯试剂, 购于北京北化精细化学品有限责任公司; HPLC 所用试剂为色谱纯试剂 (LaboratoriesL, 加拿大); 麦角甾苷 (Acteoside) 从车前子药材中分离制备<sup>[7]</sup>; 水为超纯水 (18.2  $\Omega$ Pa), 0.45  $\mu$ m 滤膜 (安捷伦公司)。

高效逆流色谱 (Spectrum HPCCC, England, Dynamic extraction); 逆流色谱泵 (Smartline Pump 100, Germany, KNAUER); 检测器 (Smartline UV Detector 2500, Germany, KNAUER)。高效液相色谱实验采用 Agilent Technology 1100 Series HPLC 系统, 二极管阵列检测器 (photodiode array detector, DAD); Phenomenex ODS-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) 和 C<sub>18</sub> 保护柱。质谱分析采用 Finnigan LCQ ion-trap 电喷雾离子阱质谱 (MAT, San Jose, CA, USA)。

收稿日期: 2010-05-19; 修订日期: 2010-10-25

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30873364);

吉林省科技厅科研项目 (No. 200905109);

吉林省教育厅“十一五”科研项目 (No. 2008-167, 2008-170)

作者简介: 刘质净 (1983-) 女 (汉族), 黑龙江齐齐哈尔人, 现为黑龙江中医药大学在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事天然产物化学研究工作。

\* 通讯作者简介: 刘春明 (1964-) 女 (汉族), 吉林通化人, 现任长春师范学院教授, 博士学位, 主要从事天然产物化学研究工作。

## 2 方法

**2.1 样品制备** 称取玄参药材粉末 500 g, 用 1 500 ml 80% 乙醇室温下浸泡提取 5 次, 每次提取 12 h。将 80% 乙醇提取液过滤, 合并滤液。减压回收乙醇溶液, 蒸至 300 ml(水液)。水液部分用正己烷脱脂 2 次, 300 ml/次, 弃去正己烷溶液, 水液部分再用水饱和正丁醇萃取 5 次, 300 ml/次, 合并正丁醇层, 减压回收至干(<40℃), 得到正丁醇提取物 6.724 g。取出 150 mg 进逆流色谱, 用醋酸乙酯-正丁醇-乙醇-水(1:1:0.1:2, V:V:V:V) 溶剂系统洗脱, 流出物用于 HPLC 和 ESI-MS<sup>n</sup> 分析。

**2.2 HPLC 溶剂体系的选择** 根据苯乙醇苷类化合物化学性质选择了 6 种溶剂系统。称取大约 1 mg 玄参正丁醇提取物(6 份), 分别加入到 6 个 10 ml 试管中, 加入 2 ml 的固定相和流动相(V:V, 1:1), 振摇 1 min 后静置, 待分层后, 分别取出 100 μl 上层和 100 μl 下层溶剂, 减压蒸干后(<40℃), 用 500 μl 甲醇溶解后过滤, 通过 HPLC-DAD 测量溶质在两相中的质量浓度之比, 得到目标化合物的分配系数 K, 列于表 1。

表 1 化合物在不同溶剂体系中的 K 值

| 溶解系统                                   | 1    | 2    | 3    | 4    |
|----------------------------------------|------|------|------|------|
| 醋酸乙酯-正丁醇-乙醇-水<br>(4:0.6:0.6:5)         | 0.86 | -    | 0.16 | 0.18 |
| 醋酸乙酯-乙醇-水(5:0.5:4.5)                   | 0.20 | 0.34 | 0.05 | 0.15 |
| 醋酸乙酯-正丁醇-乙醇-水(1:1:0.1:2)               | 1.98 | 1.89 | 1.67 | 1.59 |
| 醋酸乙酯-正丁醇-乙醇-水<br>(0.2:0.8:0.1:1)       | 3.66 | 3.36 | 2.12 | 2.05 |
| 正乙烷-醋酸乙酯-正丁醇-乙醇-水<br>(0.5:0.5:1:0.1:2) | 1.13 | 0.61 | 0.33 | 0.40 |
| 醋酸乙酯-正丁醇-水(4:1:5)                      | 0.33 | 0.2  | 0.22 | 0.27 |

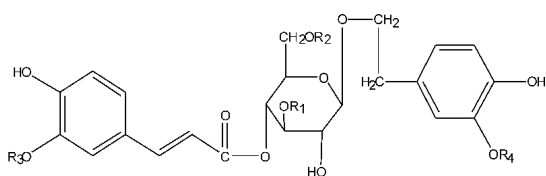
根据表 1, 醋酸乙酯:正丁醇:乙醇:水(1:1:0.1:2, V:V:V:V) 溶剂体系, 大致满足高效逆流色谱溶剂体系对分配系数 0.5~2.5 之间的要求, 所以选用醋酸乙酯:正丁醇:乙醇:水(1:1:0.1:2, V:V:V:V) 溶剂体系。

**2.3 HPLC 分析条件** 实验采用二元线性梯度洗脱, 流动相组成为已腈(A)、0.5% 的醋酸水溶液(B), 梯度洗脱程序:0~1 min, 90%~90%B; 1~30 min, 90%~70%B; 30~35 min, 70%~30%B; 35~40 min, 30%~90%B。流速为 0.8 ml/min, 样品分析时间为 40 min。检测波长为 320 nm, 柱温为 25℃。样品进样量为 10 μl。

**2.4 质谱分析条件** 质量范围 50~2000, 实验前质量数经过校正; 实验中采用负离子模式, 样品通过流动注射泵进样, 流速 5 μl/min, 喷雾电压为 4 kV, 毛细管温度为 200℃; 鞘气为氮气, 碰撞气为氮气; 碰撞诱导解离(CID)的碰撞能量为 20%~28%。

## 3 结果与讨论

### 3.1 高效逆流色谱分离



(1) R1 = Rham, R2 = H, R3 = H, R4 = H;  
(2) R1 = Rham, R2 = arabinosyl, R3 = Me, R4 = Me  
(1) Acteoside (2) Angroside C  
图 1 麦角甾苷(1) 安格洛苷 C(2) 化合物结构式

醋酸乙酯:正丁醇:乙醇:水(1:1:0.1:2, V:V:V:V) 充分混合并在分液漏斗中达到平衡后, 取上层溶液作为固定相, 以 9 ml/min 的速度泵入螺旋管使之充满。之后调节逆流色谱转速为 1 500 r/min, 之后以 3 ml/min 的速度泵入水液(从柱

头到柱尾), 作为逆流色谱分离的流动相。当流动相从柱出口流出, 两相达到平衡状态后, 称取 150 mg 玄参粗提物溶解在 4 ml 醋酸乙酯:正丁醇:乙醇:水(1:1:0.1:2, V:V:V:V) 混合溶剂中, 通过进样阀注射到样品管中。样品经过 HSCCC 分离, 流出液经紫外检测器(UV detector, 320 nm) 根据液相色谱保留时间, 合并相同的组分。将含有相同化合物的峰合并, 旋转蒸发至干, 经高效逆流色谱设备进行二次分离, 纯化。得到的纯化物用 HPLC 和 ESI-MS 分析。检测玄参正丁醇提取物的 HPLC-UV 色谱分离效果如图 2 所示。

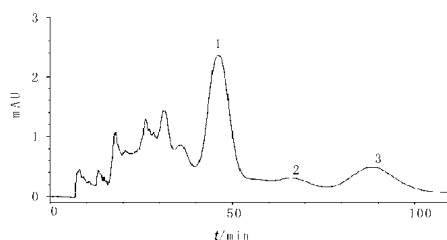


图 2 玄参正丁醇提取物的 HSCCC-UV 谱图

**3.2 化合物结构鉴定** 应用高效液相色谱技术结合二极管阵列检测器分别对高效逆流色谱分离出的每个峰进行检测, 并与玄参粗提物和混合标准品样品的色谱图比较, 如图 3~4 所示。检测结果为图 4 中的峰 1 和峰 3 一次分离纯度可达到 80% 以上。峰 3 浓缩物再经 HPLC 用相同的溶剂系统纯化后, 纯度可达到 95% 以上, 而峰 1 浓缩物再采用高效逆流色谱用正己烷:醋酸乙酯:正丁醇:乙醇:水(0.5:0.5:1:0.1:2) 溶剂系统纯化, 纯度可达到 91% 以上。根据图 3 中麦角甾苷标准品与 3 号峰的保留时间可推断 3 号峰可能为麦角甾苷。

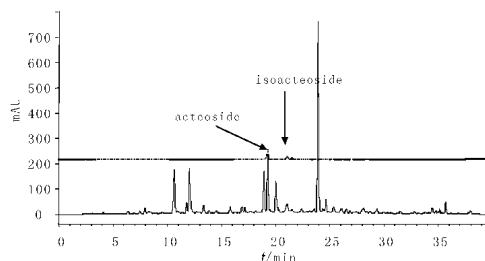


图 3 玄参粗提物和 acteoside, isoacteoside 对照品的 HPLC 图

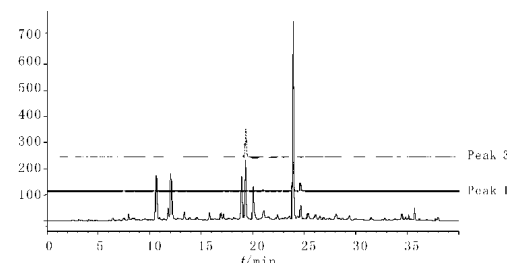


图 4 应用 HPLC 分离得到的 2 个峰和玄参正丁醇提取物的色谱图

对合并峰 1 得到的较纯化合物和合并峰 3 得到的较纯化合物(图 2) 以及 acteoside 和 isoacteoside 两种标准化合物进行了串联质谱研究, ESI-MS<sup>n</sup> 分析结果见表 2。

从表 2 可以看出, 这些化合物在多级串联质谱中表现出一些类似的质谱研究, 如水分子(分子量 18)、咖啡酰基或端基六碳糖基(分子量 162) 或端基脱氧六碳糖(分子量 146) 等中性碎片的丢失, 另外还容易产生苯乙醇苷脱氢离子等, 这些特征中性碎片的丢失和产生的一些特征的碎片离子为有效鉴定该类化合物提供了重要的结构信息。

峰 1 化合物在 ESI 一级全扫描负离子模式下, 得到  $m/z$  783

( $[M-H]^-$ ) 准分子离子,可推断其分子量为 784。在  $MS^2$  谱中可以观察到两个主要的碎片离子峰,分别为  $m/z$  607, 589 (图 5A)。 $m/z$  607 离子是  $m/z$  783( $[M-H]^-$ ) 离子丢失 176 的中性碎片(阿魏酰基)形成的。 $m/z$  589 离子可能是由  $m/z$  783 离子先丢失 176 的中性碎片,再继续丢失质量数为 18 的碎片形成。在  $MS^3$  负离子谱中(图 5B)  $m/z$  607 离子继续碎裂生成  $m/z$  461 和 443 的离子峰。其中  $m/z$  461 离子为基峰,是由  $m/z$  607 离子丢失 146 的中性碎片(端基脱氧六碳糖基)产生的。 $m/z$  443 离子可能是由  $m/z$  607 先丢失 146,再丢失 18( $H_2O$ )的中性碎片生成。根据峰 1 在质谱中获得的分子量数据及其  $MS^n$  碎裂规律与文献中 angroside C 的分子量<sup>[8,11,13]</sup>及结构式[图 1(2)]对比分析,可推断化合物 1 为 angroside C。

表 2 化合物 1 2 在峰 1 和峰 3 中的电喷雾质谱碎裂规律

| compounds | $[M-H]^-$ | 分子量 | $MS^2$ | $MS^3$                  |
|-----------|-----------|-----|--------|-------------------------|
| 麦角甾苷      | 623       | 624 | 461    | 315 ,161 ,135           |
| 异麦角甾苷     | 623       | 624 | 461    | 315 ,161                |
| 峰 1       | 783       | 784 | 607    | 461 ,443                |
|           |           |     | 589    | 461 ,443                |
| 峰 3       | 623       | 624 | 461    | 315 ,297 ,179 ,161 ,135 |

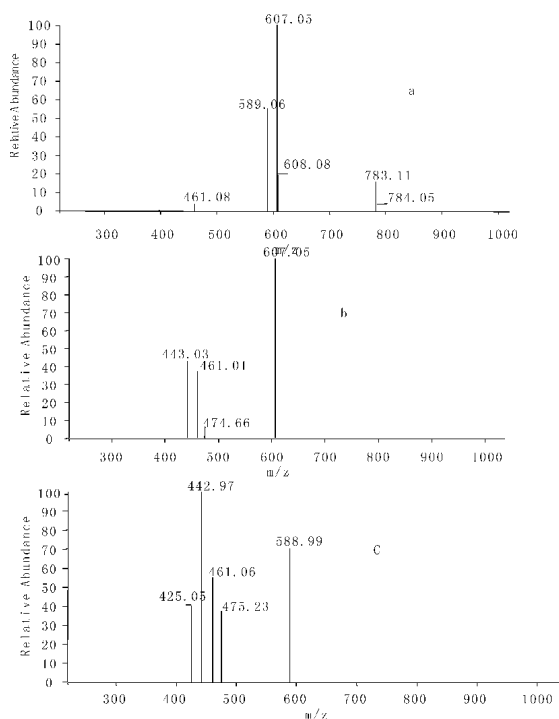
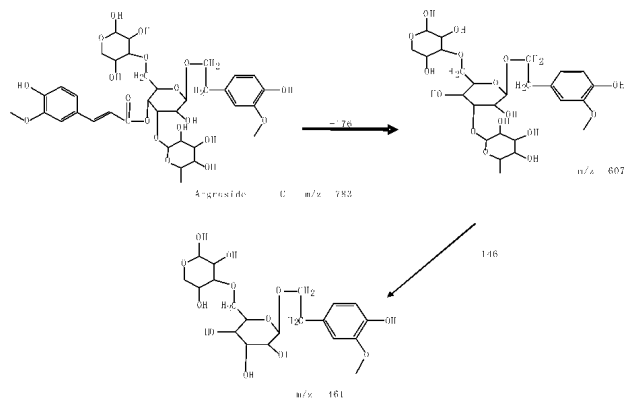


图 5  $m/z$  783 的二级串联(a)  
 $m/z$  607 离子的三级串联(b)  
 $m/z$  589 的三级串联(c)质谱图

$M/z$  783 离子可能的碎裂机理见图 6。

峰 3 化合物在电喷雾质谱一级全扫描负离子模式下,以  $m/z$  623( $[M-H]^-$ ) 准分子离子存在,可推断其分子量为 624。在  $MS-MS$  的负离子谱中  $m/z$  623 离子丢失 162Da 的中性碎片(咖啡酰基)生成质荷比为  $m/z$  461 离子。在  $MS^3$  的负离子谱中  $m/z$  461 离子进一步碎裂生成碎片离子  $m/z$  315, 297, 161, 135。其中  $m/z$  315 离子为基峰,是由  $m/z$  461 离子丢失 146Da 的中性碎片(脱氧六碳糖基)产生的。 $m/z$  297 离子是由  $m/z$  461 离子丢失

146Da 的中性碎片的同时丢失一分子水形成的。 $m/z$  161 离子可能是葡萄糖残基脱氢离子, $m/z$  135 离子是苯乙醇苷脱水离子。根据质谱中获得的分子量信息及  $MS^n$  碎裂规律<sup>[7,9,11,12]</sup>与对照品麦角甾苷的碎裂规律对比,确定峰 3 化合物可能为麦角甾苷或异麦角甾苷,结合液相色谱的结果,最后确定峰 3 化合物为麦角甾苷。

图 6  $m/z$  783 离子的电喷雾质谱碎裂图

#### 4 结论

本文首次应用高效逆流色谱分离玄参中的苯乙醇苷类化合物,成功地在短时间内分离得到了较纯的安格洛苷 C 和麦角甾苷单体化合物,说明该方法是分离天然产物的一种好方法。随着分离技术的不断完善,高效逆流色谱在天然产物的分离提取中将具有更加广泛的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典, I 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 76.
- [2] 清·黄爽(辑). 神农本草经[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1982: 175.
- [3] Y. Ito, in N. B. Madava and Y. Ito (Editors), Countercurrent Chromatography, Theory and Practice, Marcel Dekker, New York, 1988, Ch. 3, pp. 79.
- [4] Ito Y. Efficient preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge[J]. J Chromatogr, 1981, 214: 122.
- [5] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1991: 267.
- [6] 祝顺琴, 谈 锋. 高速逆流色谱在天然产物分离中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(12): 788.
- [7] Li Li, Rong Tsao, Zhiqiang Liu, et al. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from Plantago psyllium L. by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1063: 161.
- [8] T. Kajimoto, M. Hidaka, K. Shoyama, et al. Iridoids from Scrophularia ningpoensis[J]. Phytochemistry, 1989, 28: 2701.
- [9] H. Ravn, S. Nishibe, M. Sasahara, et al. Phenolic compounds from Plantago asiatica[J]. Phytochemistry, 1990, 29: 3627.
- [10] T. Miyase, M. Ishino, C. Akahori, et al. Phenylethanoid glycosides from plantago asiatica[J]. Phytochemistry, 1991, 30: 2015.
- [11] I. Calis, G. A. Gross, O. Sticher. Phenylpropanoid glycosides isolated from Scrophularia scopoli[J]. Phytochemistry, 1987, 26: 2057.
- [12] L. Li, R. Tsao, R. Yang, et al. Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from Cistanche deserticola by high-speed counter-current chromatography[J]. Food Chemistry, 2008, 108: 702.