

虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇甙的高速逆流色谱分离提纯及其分析

陈 雷¹, 杨福全², 张天佑², 韩雅珊¹, 陈尚武¹

(1. 中国农业大学 食品学院, 北京 100094; 2. 北京市新技术应用研究所, 北京 100035)

摘 要: 采用高速逆流色谱技术分离提纯中药虎杖中的活性多酚成分白藜芦醇和白藜芦醇甙。确定了样品前处理方法, 选择了逆流色谱流动相体系, 经高效液相色谱检验纯度, ¹HNMR 及质谱判定结构, 证实所得样品为白藜芦醇和白藜芦醇甙, 得率分别为 2.18% 和 1.07%。

关键词: 白藜芦醇; 白藜芦醇甙; 高速逆流色谱; 虎杖

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2000)04-0060-03

白藜芦醇(3,4,5-三羟基二苯乙烯)、白藜芦醇甙(3,4,5-三羟基二苯乙烯-3-β-D-葡萄糖甙, 又称虎杖甙、云杉新甙)是一类活性多酚物质, 在虎杖、葡萄、花生、松树等植物中存在, 其中以虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sied. et Zucc.) 中的含量最丰富。虎杖作为一味传统中药, 用于治疗皮炎、脓肿等。白藜芦醇和白藜芦醇甙对人体健康的作用, 主要源于其具有以下功能: 抗血小板凝集、降低低密度脂蛋白的氧化, 从而预防动脉硬化, 防止冠心病; 降低血清和肝脏的脂质, 保护肝脏; 对癌变过程中细胞和组织变异的 3 个主要阶段(诱导、起始和发展)都有抑制作用, 成为抑制和治疗组织癌变和肿瘤发生最有前途的药物之一^[1, 2]。

植物中白藜芦醇及其甙的提取主要采用高效液相色谱与硅胶柱层析的方法, 但操作繁琐、得率较低^[3]。逆流色谱是一种不用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术^[4]。本实验采用这种具有连续有效的分配分离功能的实用分离技术, 分离提纯了虎杖中的白藜芦醇和白藜芦醇甙, 获得了较好的得率。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试 剂 乙酸乙酯、乙醇、氯仿、甲醇、正己烷、甲酸、乙酸、磷酸均为国产分析纯。高效液相色谱中使用的甲醇为色谱纯(Fisher 公司), 水为重蒸蒸馏水。反式白藜芦醇对照品(Sigma 公司)。

1.1.2 仪 器 GS10A2 型高速逆流色谱仪, 8823A 型紫外检测器, Yokogawa 3057 记录仪, 速度控制器, NS-1007 泵, 以上由北京新技术应用研究所制造。高效液相色谱仪为 LKB 公司 2150 型。核磁共振仪为 Bruker 公司 BPX300 型。质谱仪为 EsquireLc 公司 00054 型。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的前处理 虎杖干样经粉碎, 称取 20 g, 甲醇浸提(超声波浴), 过滤, 滤液经石油醚洗涤后, 40℃下减压浓缩至干, 干物质溶于 20 mL 乙酸乙酯和 20 mL 水, 白藜芦醇分布于乙酸乙酯中, 而白藜芦醇甙存于水相。分别减压浓缩, 得到 1.512 2 g 乙酸乙酯提取物和 1.880 1 g 水提取物。

1.2.2 高速逆流色谱(HSCCC)分离提纯白藜芦醇 上下相组成为氯仿-甲醇-水(体积比 4:3:2), 进样量为 252 mg, 流速为 2.0 mL/min, 转速为 800 r/min, 紫外检测波长为 254 nm。记录纸上呈现 5 个峰(图 1), 取 1~5 号峰样品分别进行薄层层析, 经与白藜芦醇标准样品对照, 判断 5 号峰为白藜芦醇。将收集的 5 号峰溶液减压浓缩得到 72.5 mg 的白藜芦醇。

1.2.3 高速逆流色谱分离提纯白藜芦醇甙 首先选用乙酸乙酯-乙醇-水(体积比 10:1:10)为上下相, 进样量为 310 mg, 得到 5 部分(图 2A), 分别进行薄层层析, 判断部分 2 中含有白藜芦醇甙, 但混有杂质。将收集的 2 号峰溶液减压浓缩得到 58.59 mg 的干物质, 以乙酸乙酯-乙醇-水(体积比 70:1:70)为上下相进一步纯化(图 2B), 得到高纯度的白藜芦醇甙。将收集的溶液减压浓缩得到 35.45 mg 的白藜芦醇甙。

收稿日期: 1999-11-29; 修订日期: 2000-05-29

作者简介: 陈 雷(1975-), 女, 上海人, 硕士研究生。

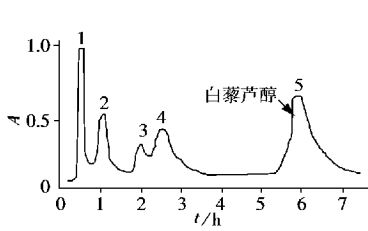


图1 虎杖中乙酸乙酯提取物的高速逆流色谱图
Fig. 1 HSCCC chromatogram of ethyl acetate extractive from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.

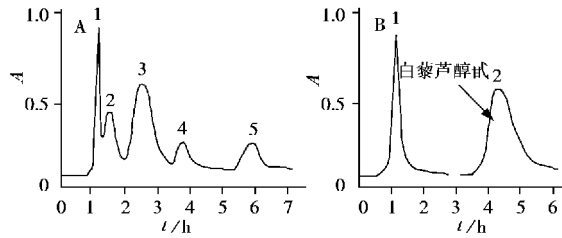


图2 虎杖中水相提取物(A)和该图中峰2组分(B)的高速逆流色谱图
Fig. 2 HSCCC chromatograms of H₂O extractive from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. (A) and peak 2 (B) in fig. 2A

2 结果与讨论

2.1 薄层色谱条件的选择

2.1.1 白藜芦醇的薄层色谱条件的选择 使用5 cm×10 cm的GF254薄板, 首先选用展开剂为氯仿-丙酮-甲酸-水(体积比4:4:0.5:0.2), 展开剂极性太大, 且白藜芦醇与虎杖中的大黄素等难以分开。改用正己烷-乙酸乙酯-甲酸(体积比30:10:0.5)为展开剂, 白藜芦醇的比移值为0.18。

2.1.2 白藜芦醇甙的薄层色谱条件的选择 展开剂正己烷-乙酸乙酯-甲酸(体积比30:10:0.5), 不适合分离白藜芦醇甙, 调节正己烷和乙酸乙酯的比例至乙酸乙酯-正己烷-乙酸体积比为8:1:1^[6], 254 nm下观察, 白藜芦醇甙的比移值为0.46。为观察方便, 以10% (φ) 磷钼酸无水乙醇溶液为显色剂, 喷后110℃下加热3 min, 比移值0.46处有棕黄色斑点。

2.2 虎杖中提取白藜芦醇和白藜芦醇甙的得率

20 g虎杖得到1.512 g乙酸乙酯粗提物, 以252 mg进样, 得到72.5 mg白藜芦醇, 因此虎杖中提取白藜芦醇的得率为2.18%。20 g虎杖得到1.880 g水粗提物, 以310 mg进样, 经二次逆流色谱分配, 得到35.45 mg的白藜芦醇甙, 因此虎杖中提取白藜芦醇甙的得率为1.07%。

2.3 白藜芦醇和白藜芦醇甙的HPLC分析

色谱柱为Nova-Pak C₁₈(300 mm×3.9 mm), 流动相组成: 溶剂A为10% (φ) 的甲醇水溶液, 溶剂B为90% (φ) 的甲醇水溶液, 25 min内溶剂B以线性梯度从0%变化到90%; 流速为0.60 mL/min, 紫外波长306 nm下检测。在13.25 min和15.75 min时分别得到反式白藜芦醇甙和反式白藜芦醇^[5]。经与反式白藜芦醇对照品比较, 所得两种物质的纯度均达到99%。

2.4 ¹HNMR分析

在中国农业大学应用化学系完成白藜芦醇和白藜芦醇甙的¹HNMR分析, 以氘代二甲基亚砜(DMSO)为溶剂, 得到以下化学位移数据(图3)。白藜芦醇: 6.11 (d, 1H)、6.37 (d, 2H)、6.72 (d, 2H)、6.90 (d, 1H)、6.92 (d,

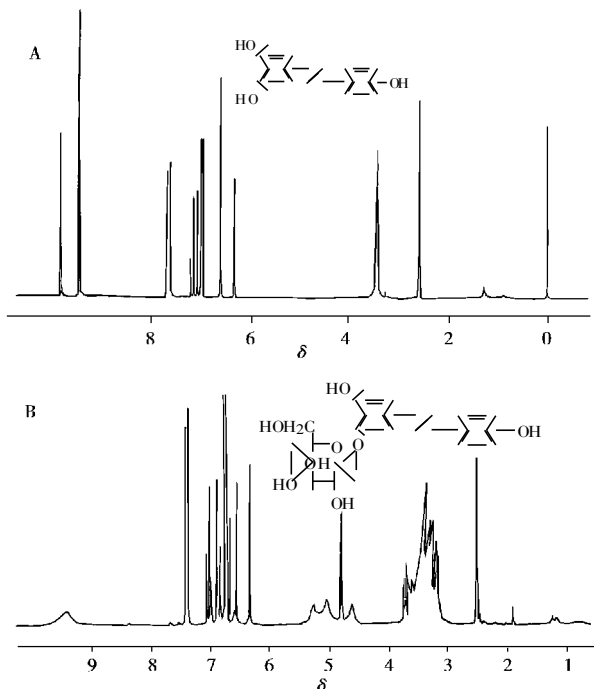


图3 反式白藜芦醇(A)和反式白藜芦醇甙(B)的¹HNMR谱
Fig. 3 ¹HNMR spectra of *trans*-resveratrol (A) and *trans*-piceid (B)

1H)、7.39 (d, 2H)、9.17 (s, 2H)、9.52 (s, 1H)。白藜芦醇甙: 3.16~ 3.70 (糖甙碳环氢), 4.62~ 5.27 (糖甙羟基氢), 6.33 (d, 1H)、6.56 (s, 1H)、6.72 (d, 1H)、6.76 (d, 2H)、6.86 (d, 1H)、7.03 (d, 1H)、7.40 (d, 2H)、9.46 (s, 2H)。比较白藜芦醇和白藜芦醇甙的 ^1H NMR 图谱可以发现, 白藜芦醇的羟基被糖甙结构取代后, 白藜芦醇甙中与糖甙基处于邻对位的苯环氢的化学位移向低场移动。

2.5 质谱分析

白藜芦醇甙的 ^1H NMR 谱中, 糖甙碳环氢和糖甙羟基氢的位移聚集在 3.1~ 5.3 附近, 难以一一指认, 因此进行质谱分析, 由北京市微量化学研究所完成(图 4, 质谱条件: 电喷雾质谱, 出口处电压 60.0 V, 扫描范围 50.0~ 1 600.0 m/z , 时间 4 966 μs)。得到以下数据, m/z : 391.1 ($M+1$), 229.1 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_3^+$), 而白藜芦醇甙的相对分子质量为 390, 因此判断该物质为白藜芦醇甙。

参考文献:

- [1] JANG Mei_shiang, CAI Li_ning, UDEANIG O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275: 218.
- [2] FRANKEL E N, BOSANEK C A, MEYER A S, et al. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low_density_lipoproteins[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(3): 834.
- [3] JAYATILAKE G S, JAYASURIYA H, LEE E S, et al. Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*[J]. J Natural Products, 1993, 56(10): 1805.
- [4] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1991. 1~ 5.
- [5] CHEN Lei, HAN Ya_shan, CHEN Shang_wu. Comparison of resveratrol in different grapevines and *Polygonum cuspidatum*[A]. China Association of Agricultural Science Societies. Research progress in plant protection and plant nutrition[C]. Beijing: China agriculture press, 1999. 57~ 60.
- [6] ROBERT H C, SAMIR A K. Biotransformation of resveratrol to piceid by *Bacillus cereus*[J]. J Nat Prod, 1998, 61(10): 1313.

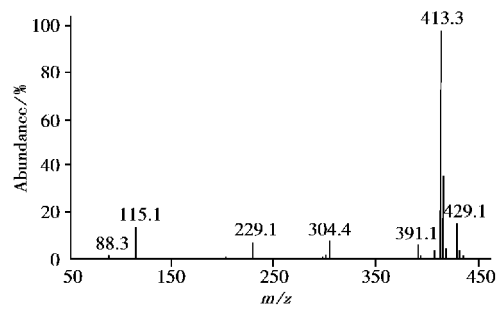


图 4 反式白藜芦醇甙的质谱图
Fig. 4 Mass spectrum of *trans_piceid*

Separation and Analysis of Resveratrol and Piceid in *Polygonum Cuspidatum* Sieb. et Zucc.

CHEN Lei¹, YANG Fu_quan², ZHANG Tian_you², HAN Ya_shan¹, CHEN Shang_wu¹

(1. China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Beijing Institute of New Technology Application, Beijing 100035, China)

Abstract: High_speed countercurrent chromatography (HSCCC) was applied to the separation and purification of resveratrol and piceid in *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.. Pretreatment of samples was studied. The solvent system used for HSCCC was selected. The resveratrol and piceid yield are 2.18% and 1.07%, respectively. The purified resveratrol and piceid were identified and analyzed by TLC, HPLC, ^1H NMR and MS.

Keyword: Resveratrol; Piceid; High_speed countercurrent chromatography; *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.