

高速逆流色谱法 分离纯化艾叶中的异绿原酸 A

李 熹¹, 邱细敏^{1,*}, 任达兵², 秦燕华²

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410000;

2. 中南大学化学化工学院, 湖南长沙 410083)

摘要:应用制备型高速逆流色谱法(HSCCC)分离纯化艾叶中的异绿原酸 A。选用弱极性溶剂体系正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(3:7:4:6, V/V)为两相溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 在流速 2 mL/min, 转速 900 r/min, 检测波长 280 nm 的条件下对粗提物进行制备分离, 一次进样 25 mg, 可得到 11 mg 样品。利用高效液相色谱(HPLC)检测样品的纯度为 99.01%。将得到的样品进行高效液相-离子阱-飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)、核磁共振氢谱(¹H-NMR)检测确定其化学结构, 并确定该样品为异绿原酸 A。实验表明制备型高速逆流色谱可以成功地将艾叶中的异绿原酸 A 进行分离纯化, 该方法分离效率高, 对异绿原酸 A 在食品医疗领域的应用具有重要意义。

关键词:艾叶, 异绿原酸 A, 高速逆流色谱法, 分离纯化

Separation and purification of isochlorogenic acid A from *Artemisiae argyi folium* by high-speed counter-current chromatography

LI Xi¹, QIU Xi-min^{1,*}, REN Da-bing², QIN Yan-hua²

(1. College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410000, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: Isochlorogenic acid A was separated and purified from *Artemisiae argyi folium* by preparative high-speed counter-current chromatography (HSCCC) using a weak polarity solvent system consisting of n-hexane-ethyl acetate-ethanol-water (3:7:4:6, v/v/v/v), the upper phase acted as stationary phase and the lower phase served as mobile phase. The separation process was performed at a flow rate of 2 mL/min, the rotation rate of the apparatus was set at 900 r/min, and the effluents were detected at 280 nm, a total of 11 mg of target compound was obtained in one step separation from 25 mg of crude extract. The results from HPLC analysis showed that the compound with 99.01% purity and the chemical structure was characterized as Isochlorogenic A by high performance liquid chromatography-mass spectrum (LCMS-IT-TOF) and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-NMR). It showed that preparative high-speed counter-current chromatography could separate and purify Isochlorogenic acid A successfully from *Artemisiae argyi folium*. The method was of high separation efficiency, and great importance for isochlorogenic acid A applications in the food and medical fields.

Key words: *Artemisiae argyi folium*; isochlorogenic acid A; high-speed counter-current chromatography (HSCCC); preparative isolation

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)10-0295-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.10.051

艾叶 (*Artemisia argyi folium*) 为菊科 (Compositae) 艾属 (*Artemisia*) 多年生草本植物^[1], 又名冰台、遏草、艾青等, 是中医临床常用药之一, 在全国均有生长。《中国药典》记载其具有散寒止痛、温经止血、祛湿止痒之功效^[2]。目前对艾叶化学成分的研究主要集中在挥发油及黄酮类化合物上, 而对酚酸类成分的研究报道甚少。有研究发现, 艾叶中的酚酸类成分——异绿原酸 A 具有多种生物活性, 包括抗溃疡^[3]、抗乙肝^[4]、抗贾第虫^[5]、抗 HIV^[6] 等, 其结构式见图 1。目前, 对异绿原酸 A 的分离纯化主要

研究主要集中在挥发油及黄酮类化合物上, 而对酚酸类成分的研究报道甚少。有研究发现, 艾叶中的酚酸类成分——异绿原酸 A 具有多种生物活性, 包括抗溃疡^[3]、抗乙肝^[4]、抗贾第虫^[5]、抗 HIV^[6] 等, 其结构式见图 1。目前, 对异绿原酸 A 的分离纯化主要

收稿日期: 2015-11-09

作者简介: 李熹 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分析化学, E-mail: sixi4527058@163.com。

* 通讯作者: 邱细敏 (1954-), 女, 教授, 研究方向: 分析化学, E-mail: qiuximin@tom.com。

基金项目: 湖南省科技厅科研专项项目 (2014sk4040); 长沙市科技管理局项目 (K1401010-31)。

采取硅胶柱层析等方法,但其得率低,分离过程耗时复杂,限制了其进一步药理活性及临床研究。

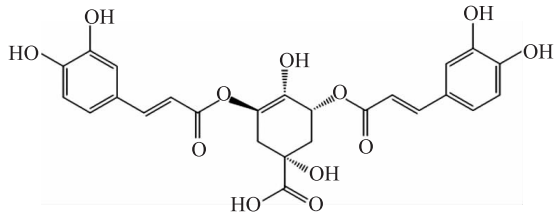


图1 异绿原酸 A 的化学结构

Fig.1 Chemical structure of isochlorogenic acid A

高速逆流色谱 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 是 20 世纪 80 年代发展起来的一种新型液-液分配色谱技术。与传统的固液分配色谱技术相比,它具有制备量大、无固定相的非特异性吸收、样品回收率高、分析时间短、重现性好等显著优点^[7],经过三十多年的发展,已广泛应用于中药成分分离、天然产物化学、保健食品等领域。

本实验通过高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定待测组分在不同溶剂体系中的分配系数 K , 筛选出最佳溶剂体系, 运用高速逆流色谱法分离纯化艾叶中的异绿原酸 A, 为全面研究艾叶中的活性成分提供依据, 以期建立高效快速制备艾叶中异绿原酸 A 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

艾叶 购于北京同仁堂, 湖南师范大学医学院生药教研室鉴定为菊科植物艾 (*Artemisia argyi* Lévl, et Vant) 的干燥叶; 正己烷、乙酸乙酯、乙醇、冰乙酸 (分析纯) 上海泰坦科技股份有限公司; 乙腈 (色谱纯) 瑞典欧普森公司; 水 超纯水; 氘代 DMSO (0.03% TMS) 瑞士 ARMAR 公司。

SHB-III 型循环水式多用真空泵 河南郑州长城科工贸有限公司; KQ5200DE 型数控超声波清洗器

江苏昆山市超声仪器有限公司; TBE300B 型高速逆流色谱仪 (HSCCC, 配有 HX-1050 恒温循环器、TBP-50A 泵、TBD-2000 紫外检测器、BSZ-100 自动部分收集器) 上海同田生化技术有限公司; UltiMate3000 型高效液相色谱仪 (HPLC) 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Spherigel C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 天津市泰斯特仪器有限公司; BOC005 高效液相-离子阱-飞行时间质谱仪 (LCMS-IT-TOF) 岛津企业管理 (中国) 有限公司; AVANCE III 400MHZ 型核磁共振波谱仪 瑞士布鲁克公司

1.2 实验方法

1.2.1 艾叶粗样的提取与纯化 将烘干的艾叶用粉碎机粉碎, 过 60 目筛。精确称取 50 g 粉末, 加入 10 倍体积 80% 的甲醇溶液, 用超声波提取法 (超声功率 200 W, 40 min, 40 °C) 提取 2 次, 合并悬干。用适量水溶解悬干样, 以 1:1 的料液比用正己烷萃取两次脱脂后, 同样以 1:1 的料液比用乙酸乙酯萃取 2 次, 将乙酸乙酯层合并, 在 45 °C 下减压浓缩悬干得到艾叶

粗样, 供高速逆流色谱使用。

1.2.2 高效液相色谱 (HPLC) 条件 HPLC 色谱仪: Thermo Fisher Ultimate 3000; 色谱柱: Spherigel C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min, 进样质量: 2 mg 样品溶于 1 mL 甲醇中; 进样体积: 20 μL; 检测器: 二极管阵列检测器 (Diode array detector, DAD, 200~800 nm); 流动相: A (乙腈), B (0.4% 冰乙酸): 0 min, 10% A; 13 min, 25% A; 20 min, 35% A; 23 min, 40% A。检测波长为 254、280、325、360 nm, 以 280 nm 为输出波长。

1.2.3 分配系数 (K) 的测定 称取 4 mg 粗提样品, 分别溶于不同体积比的正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水体系中, 取等体积的上下相 (2 mL) 悬干, 用等体积 (2 mL) 甲醇溶解后按照 1.2.2 中的 HPLC 方法进行检测, 记录各样品的峰面积, 按照公式 (1) 计算分配系数^[8]。

$$K = \frac{A_U}{A_L} \quad \text{式(1)}$$

式中, K 为分配系数; A_U 为组分在上相的峰面积 (mAU·s); A_L 为组分在下相的峰面积 (mAU·s)。

1.2.4 高速逆流色谱 (HSCCC) 分离纯化异绿原酸 A

根据高速逆流色谱法分离异绿原酸的相关报道^[10-11], 选择 5 种溶剂体系测定目标物的分配系数 K , 结合上机结果选出最优溶剂体系。按照不同的体积比在分液漏斗中配制 1000 mL 溶剂, 充分振摇后静置分层, 以上相为固定相 (有机相), 下相为流动相 (水相), 超声脱气 30 min, 用等体积的上下相 (5 mL) 溶解悬干后的粗样。打开高速逆流色谱系统, 当恒温循环器温度达到设定温度 (25 °C) 时, 以 20.0 mL/min 的流速泵入固定相, 等到色谱柱已充满, 接样尾端流出 20 mL 左右液体时, 开启转速调至 900 r/min, 待稳定后以 2.0 mL/min 的流速泵入流动相, 当接样量筒中出现液体分层, 此时显示已达到流体力学平衡, 把样品注入系统, 在 280 nm 下对流出组分进行检测并根据高速逆流色谱图设定每管 3 min、2 mL/min 对流出液进行自动接样。

1.2.5 纯度检测及结构鉴定 按照 1.2.2 的高效液相色谱条件, 将 HSCCC 分离收集得到的流分用 HPLC 进行检测, 对相同组分进行浓缩合并, 并根据面积归一化法确定化合物的纯度^[10]。采用高效液相-离子阱-飞行时间质谱 (LCMS-IT-TOF)、核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 对分离得到的样品进行结构鉴定, 核磁共振氢谱以氘代二甲基亚砷 (DMSO) 为溶剂, 以四甲基硅烷 (TMS) 为内标物。

2 结果与分析

2.1 分配系数 K 的测定及溶剂系统的选择

研究表明^[9], 若目标化合物在溶剂体系中的 K 值在 0.5~2 之间, 则能得到较好的分离。本文选取应用较为广泛的四元体系正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水, 对不同配比溶剂体系中目标化合物的 K 值进行考察。由表 1 可知, 溶剂体系 1 和 5 的 K 值较小, 目标成分出峰太快, 峰之间的分离度较差; 而溶剂体系 4 的 K 值过大, 出峰太迟, 且峰形易变宽, 溶剂体系 2

和3的K值符合要求。

表1 不同溶剂体系的分配系数
Table 1 Partition coefficient(k) of compound in different solvent systems

体系编号	正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水	上相峰面积 A _u	下相峰面积 A _L	分配系数 K
1	1:1:1:1	7.67	127.28	0.06
2	5:5:4:6	53.64	86.83	0.62
3	3:7:4:6	39.76	74.28	0.54
4	1:9:1:9	135.02	4.64	29.10
5	9:1:9:1	0	121.70	0

根据分配系数的测定结果对体系2和3进行上机实验,通过图2对比可知,在体积比为5:5:4:6时,目标化合物A没有与杂质分开,分离度较差,且基线不平稳;而在体积比为3:7:4:6时,基线平稳,组分A分离较好,所以选择正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(3:7:4:6, V/V)作为分离目标化合物的溶剂体系。

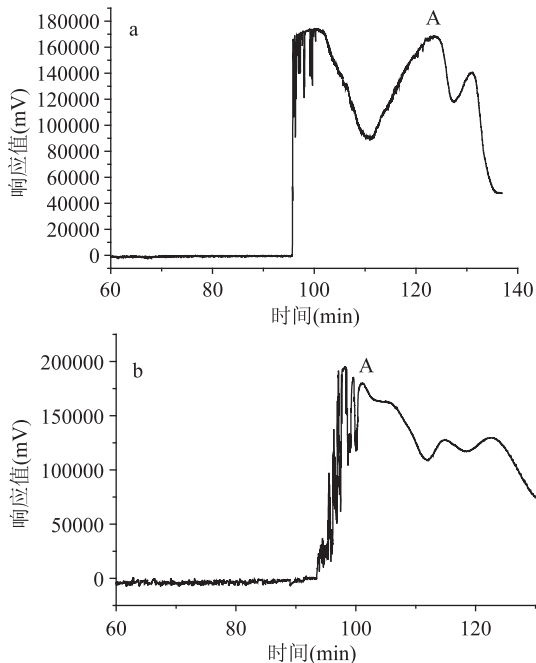


图2 异绿原酸A的高速逆流色谱图

Fig.2 HSCCC chromatograms of crude extract of isochlorogenic acid A

注:a:两相溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(3:7:4:6, V/V); b:两相溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(5:5:4:6, V/V)。

2.2 HSCCC 分离结果及纯度测定

根据方法1.2.4的分离条件,用正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(3:7:4:6, V/V)对目标化合物进行分离纯化,固定相保留率为57.7%。进样25 mg得到目标组分11 mg,进入HPLC中进行分析,DAD检测器在254、280、325、360 nm下都显示所分得产物为单一化合物。对比艾叶粗提物及HSCCC分离得到化合物的HPLC图,可知大量杂质在HSCCC分离过程中已被除去,得到了高纯度的目标化合物,根据面积归一化法测得纯度为99.01%,目标化合物得到了很好的分离。

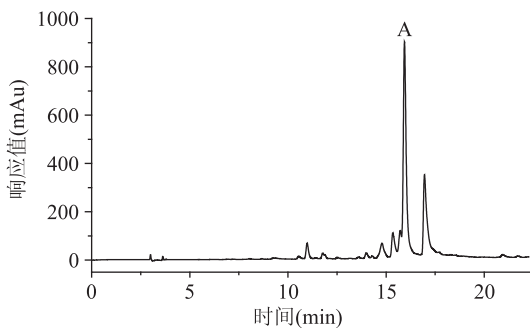


图3 艾叶粗提物的HPLC图谱(280 nm)

Fig.3 HPLC chromatogram of the crude extract from Artemisia argyi(280 nm)

2.3 结构鉴定

将HSCCC分离得到的组分A收集,经冷冻干燥后进行LCMS-IT-TOF、¹H-NMR检测,确定其化学结构。组分A(3,5-di-O-caffeoylquinic acid): MS(Neg) m/z: 515.1 [M-1]⁻, 353.1, 335.1, 191.1, 173.0。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 7.56(1H, d, J = 16.0Hz, H-7'), 7.55(1H, d, J = 16.0Hz, H-7''), 7.06(2H, d, J = 7.5Hz, H-2', H-2''), 7.01(2H, d, J = 7.0Hz, H-6', H-6''), 6.78(2H, d, J = 7.2Hz, H-5', H-5''), 6.37(1H, d, J = 15.6Hz, H-8'), 6.26(1H, d, J = 15.6Hz, H-8''), 5.31(1H, brs, H-3), 5.13(1H, m, H-5), 3.76(1H, m, H-4), 2.10(2H, d, J = 13.0Hz, H-6), 1.85(1H, m, H-2)。质谱与核磁数据与文献[10-11]数据吻合,故鉴定化合物为异绿原酸A。

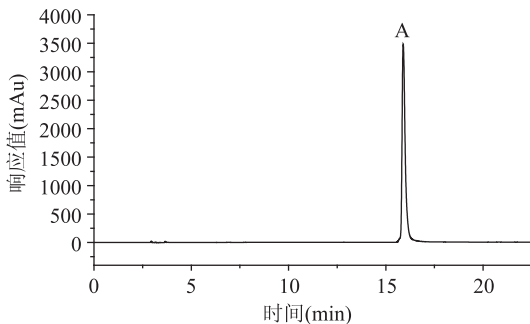


图4 组分A的HPLC色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of peak A

3 结论

采用高速逆流色谱法,通过正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(3:7:4:6, V/V)的溶剂体系从艾叶中分离纯化得到异绿原酸A,该体系固定相保留率较高,一次进样25 mg可得到异绿原酸A 11 mg,产率为44%,经HPLC检测其纯度为99.01%。本实验建立了高速逆流色谱法分离纯化异绿原酸A的方法,与传统的大孔吸附树脂分离方法相比,具有操作简便,重现性高,分离快速,价格低廉等显著优点,可用于异绿原酸A的大量制备。

参考文献

[1] 陈小露,梅全喜.艾叶化学成分研究进展[J].药学进展,2013,23(12):848-851.

(下转第302页)

参考文献

- [1] 张建旺. 板栗花中的黄酮及挥发性物质研究[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2012.
- [2] 王浩然. 板栗花的综合利用研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2010.
- [3] 武首香, 包秀萍. 板栗花粉总黄酮提取及 HPLC 定量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 270-272.
- [4] 张素斌, 廖燕婷. 4 种甜荞麦黄酮提取方法的比较研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 150-152.
- [5] 陈玉琼, 李安琪, 孟燕. 大孔树脂纯化藤茶黄酮及主要成分结构鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 51-55.
- [6] 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.
- [7] Adam M E, Novy S K, Yeshitila A T, et al. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*)[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 41: 392-396.
- [8] 杨芙莲, 王伟娜. 蜂胶总黄酮半仿生提取工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2009(5): 42-44.
- [9] 陈晓娟, 周春山. 酶法及半仿生法提取杜仲叶中绿原酸和黄酮[J]. 精细化工, 2006, 23(3): 257-260.
- [10] 霍丹群, 刘佳. 正交实验优选葛根复方的半仿生提取工艺[J]. 中成药, 2004, 26(2): 96-99.
- [11] 陈丛瑾, 黄克瀛, 李德良. 正交实验法优选香椿叶总黄酮的半仿生提取[J]. 食品科技, 2007(6): 119-121.
- [12] 王英姿, 张兆旺. 用均匀设计优选苦参半仿生提取工艺

(上接第 294 页)

- [12] SABIR S M, AHMAD S D, HAMID A, et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 741-747.
- [13] ZHU K X, LIAN C X, GUO X N, et al. Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1122-1126.
- [14] SMIROFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging

(上接第 297 页)

- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010 年版一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 82-83.
- [3] Juliane Carlotto, Luisa M da Silva, Nessana Dartora, et al. Identification of a dicaffeoylquinic acid isomer from *Arctium lappa* with a potent anti-ulcer activity[J]. Talanta, 2015(135): 50-57.
- [4] Bing - Jie Hao, Yi - Hang Wu, Jian - Guo Wang, et al. Hepatoprotective and antiviral properties of isochlorogenic acid A from *Laggetera alata* against hepatitis B virus infection[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012(144): 190-194.
- [5] Yan - Hong Zhang, Mei - Qin Xue, Yuan - Chao Bai, et al. 3,5-Dicaffeoylquinic acid isolated from *Artemisia argyi* and its ester derivatives exert anti-Leucyl-tRNA synthetase of *Giardia lamblia* (GILeuRS) and potential anti-giardial effects [J]. Fitoterapia, 2012(83): 1281-1285.
- [6] Heino Martin Heyman, François Senejoux, Isabell Seibert, et al. Identification of anti-HIV active dicaffeoylquinic- and tricaffeoylquinic acids in *Helichrysum populifolium* by NMR-based

条件[C]//全国中药创新与研究论坛. 北京: 中华中医药学会制剂分会, 2009: 142-145.

- [13] 丁存宝, 刘海燕, 李桂秋, 等. 月季果黄酮的提取及抑菌效果研究[J]. 食品工业, 2012(1): 107-109.
- [14] 夏文宽. 菜芙蓉花总黄酮的提取与抗氧化活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2007.
- [15] 罗秋水, 黄月胜, 熊建华, 等. 超声波辅助法提取苦荞麦饭中芦丁工艺的优化[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 107-109.
- [16] 刘北林, 董继生, 霍红. 山楂黄酮最佳提取工艺探讨[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 167-169.
- [17] 许瑞波, 曹晓英, 王明艳, 等. 睡莲叶黄酮的提取及其抑菌活性研究[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 190-193.
- [18] 陈运中. 天然色素的生产及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 72-73.
- [19] 陈寒青, 金征宇. 红车轴草异黄酮提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 156-158.
- [20] 刘红英, 高瑞昌, 戚向阳. 食品化学[M]. 北京: 中国质检出版社, 2013: 338-339.
- [21] 诸爱士. 葛根黄酮提取工艺优化[J]. 浙江科技学院学报, 2013, 25(5): 367-368.
- [22] 包秀萍, 郭丽梅, 姚培正, 等. 板栗花粉总黄酮提取工艺的研究[J]. 山东食品发酵, 2009(3): 40-44.
- [23] Xu H X, Lee S F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria [J]. Phytotherapy Research, 2001, 15(1): 39-43.
- [24] 王瑞, 刘晓燕, 马立志, 等. 苗药八爪金龙半仿生提取工艺优化及其提取物抑菌活性研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3092-3095.

activity compatiblesolutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.

- [15] WANG Z J, LIAO D K. Study on the anti-oxidant activity of polysaccharide in *Agrocybe aegerita* [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 50-55.
- [16] 朱丽蓉, 吴萍萍, 杨大伟, 等. 杜仲雄花茶多糖的响应面优化提取及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 199-203.

metabolomic guided fractionation [J]. Fitoterapia, 2015(103): 1155-1164.

- [7] 欧霞, 李劲平, 余志坚, 等. 高速逆流色谱法在天然药物研究中的应用概况[J]. 中南药学, 2014, 12(3): 246-250.
- [8] 朱力杰, 孟宪军, 李斌, 等. 高速逆流色谱分离制备北五味子中科罗素酸[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 1-4.
- [9] A Berthod, N Mekaoui, Distribution Ratio. Distribution Constant and Partition Coefficient Countercurrent Chromatography Retention of Benzoic Acid [J]. Journal of Chromatography A, 2011(1218): 6024-6030.
- [10] 石伯阳, 李佳银, 周桥, 等. 紫甘薯中绿原酸及异绿原酸的高速逆流色谱分离[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 87-90.
- [11] Wei Guo, Liang Wang, Yan Gao, et al. Isolation of isochlorogenic acid isomers in flower buds of *Lonicera japonica* by high-speed counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2015(981): 27-32.