

中压制备色谱法分离制备油橄榄叶中多酚类化合物

夏雅俊^{1,2}, 刘永峰¹, 裴栋¹, 邸多隆^{1*}

1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室和甘肃省天然药物重点实验室, 甘肃兰州 730000

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 目的 研究油橄榄 *Olea europaea* 叶抗糖尿病有效部位的药效物质基础。方法 利用反相中压制备液相色谱技术进行分离纯化, 并应用现代波谱技术鉴定化合物的结构。结果 从油橄榄叶抗糖尿病活性部位中分离并鉴定得到的5个化合物均为多酚类化合物, 分别为脱咖啡酰基毛蕊糖苷(1)、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷(2)、6"-O-β-D-吡喃葡萄糖-橄榄苦苷(3)、裂环马钱子苷(4)、橄榄苦苷(5)。结论 化合物1为首次从该植物中分离得到。5种化合物经HPLC检测, 按照归一化法计算其质量分数均大于90%, 为以油橄榄叶为原料的新药开发提供技术支撑。

关键词: 中压制备色谱; 油橄榄; 抗糖尿病; 多酚; 脱咖啡酰基毛蕊糖苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1689-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.006

Separation and preparation of polyphenols from leaves of *Olea europaea* by preparative medium pressure liquid chromatography

XIA Ya-jun^{1,2}, LIU Yong-feng¹, PEI Dong¹, DI Duo-long¹

1. Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources & Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To study the material basis of the anti-diabetic effective fraction in the leaves of *Olea europaea*. **Methods** Preparative medium pressure liquid chromatography (PMPLC) was used for the separation and purification of the compounds. Their structures were elucidated by spectral analyses. **Results** The structures of the compounds were identified by various spectroscopic methods combined with the data from some published literatures. There were five compounds which were extracted from the anti-diabetic effective fraction in the leaves of *O. europaea* and identified as decaffeoylverbascoside (1), luteolin-7-O-β-D-glucoside (2), 6"-O-β-D-glucopyranosyl oleuropein (3), oleuroside (4), and oleuropein (5). Additionally, decaffeoylverbascoside is isolated from this plant for the first time and the purities of the five compounds were all above 90% by HPLC detection. **Conclusion** This research provides technological support for the development of new drug based on the leaves of *O. europaea*.

Key words: preparative medium pressure liquid chromatography; *Olea europaea* L; anti-diabetic; polyphenols; decaffeoylverbascoside

油橄榄叶为木犀科(Oleaceae)木犀榄属 *Olea* Linn. 植物油橄榄 *Olea europaea* L. 的叶, 其化学成分包括裂环烯醚萜类、黄酮类、游离醇、甾醇、烷烃类等^[1-2]。季崇敏等^[3]对油橄榄叶抗糖尿病的作用进行了研究, 结果表明油橄榄叶乙醇及醋酸乙酯提取物均具有降血糖和调血脂的作用。张佳等^[4]和卜

令娜等^[5]利用体内活性评价方法从油橄榄叶不同提取部位中筛选出抗糖尿病活性部位。在此基础上, 为研发以油橄榄叶抗糖尿病有效部位为原料的中药新药“扶糖平”, 本实验开展了以油橄榄叶抗糖尿病活性部位中主要有效成分分离制备的研究, 以期阐明其作用机制及建立质量标准奠定基础。

收稿日期: 2013-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20974116); 中国科学院“百人计划”资助项目

作者简介: 夏雅俊(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为基于复杂体系的分离分析新技术与新方法研究。

Tel: 15101282563 E-mail: xiayajun@yeah.net

*通信作者 邸多隆, 博士生导师。Tel: (0931)4968248 E-mail: didl@licp.ac.cn

王晓飞等^[2]采用硅胶色谱柱技术,从油橄榄叶醋酸乙酯提取物中分离得到15个多酚类化合物。Li等^[6]利用大孔吸附树脂技术,建立了一种从油橄榄叶中同步分离制备橄榄苦苷和总黄酮的方法,其纯度分别提高了7.5和13.2倍,回收率分别达到85.6%和87.9%。然而,利用制备色谱技术分离制备油橄榄叶中化合物的研究,尚未见文献报道。

前期的研究表明,油橄榄叶中抗糖尿病主要活性成分是多酚类化合物^[7-8],本研究利用反相中压制备液相色谱技术从油橄榄叶抗糖尿病有效部位中分离制备多酚类化合物,得到的5个化合物分别鉴定为脱咖啡酰基毛蕊糖苷(decaffeoylverbascoside, **1**)、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(luteolin-7-*O*- β -*D*-glucoside, **2**)、6''-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖-橄榄苦苷(6''-*O*- β -*D*-glucopyranosyl oleuropein, **3**)、裂环马钱子苷(oleurosides, **4**)、橄榄苦苷(oleuropein, **5**)。其中,化合物**1**为首次从该植物中分离得到。上述5种化合物经HPLC检测,按照归一化法计算其质量分数均大于90%。

1 仪器与材料

中压制备液相色谱系统(汉邦 NP7010C 二元泵,汉邦 NU3000C 检测器,EasyChrom-1000 色谱工作站,江苏汉邦科技有限公司);Dubhe C₁₈中压制备色谱柱(250 mm×20 mm, 10 μ m, 江苏汉邦科技有限公司);DAC-HB 动态轴向压缩柱(650 mm×50 mm, 10 μ m, 江苏汉邦科技有限公司);Agilent1200 型高效液相色谱系统(G1311A 二元泵, G1315D DAD 检测器, ChemStation 色谱工作站, Agilent 公司, 美国);AT-900 柱温箱(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);Sz-1 大孔吸附树脂(西安蓝晓科技有限公司)。甲醇(色谱纯, 山东禹王集团)。

油橄榄叶于2011年10月采自甘肃省陇南市,经中国科学院兰州化学物理研究所戚欢阳副研究员鉴定为木犀榄属植物油橄榄 *Olea europaea* L. 的叶。

2 方法与结果

2.1 样品溶液制备

参考文献报道^[4,6],提取油橄榄叶抗糖尿病活性部位。准确称取油橄榄叶抗糖尿病有效部位适量,以1:15的料液比加入60%甲醇溶液,超声使其溶解,溶液过0.45 μ m滤膜,滤液作为进样液备用。

2.2 色谱条件优化

2.2.1 第1次色谱条件优化

首先采用Dubhe C₁₈柱(250 mm×20 mm, 10 μ m)进行初步优化;柱温25 $^{\circ}$ C;检测波长270 nm;体积流量10 mL/min;柱压5.3 MPa;进样量1 mL。以水(A)-甲醇(B)为流动相,分别考察6种洗脱系统(表1)对分离效果的影响,以出峰的个数和分离度为评价指标,最终优化的洗脱条件:0~8 min, 60% B; 8~8.5 min, 60%~40% B; 8.5~11 min, 40% B; 进样质量浓度为50 mg/mL。

表1 不同的梯度洗脱程序

编号	梯度条件	料液比
1	50% B	样品-水 1:100
2	55% B	样品-60%甲醇溶液 1:20
3	60% B	样品-60%甲醇溶液 1:20
4	65% B	样品-60%甲醇溶液 1:20
5	0~8 min, 60% B; 8~8.5 min, 60%~55% B; 8.5~10 min, 55% B; 10~11 min, 55%~50% B; 11~12 min, 50% B	样品-60%甲醇溶液 1:20
6	0~8 min, 60% B; 8~8.5 min, 60%~40% B; 8.5~11 min, 40% B	样品-60%甲醇溶液 1:20

为了规模化制备,将上述优化的色谱条件在DAC-HB 动态轴向压缩柱(650 mm×50 mm, 10 μ m)上进行进一步优化,色谱条件:柱温25 $^{\circ}$ C;检测波长270 nm;体积流量50 mL/min;进样量17 mL;进样质量浓度50 mg/mL;柱压13.6 MPa。在此条件下,最终优化的洗脱条件为:水(A)-甲醇(B)梯度洗脱,0~11 min, 60% B; 11~11.5 min, 60%~40% B; 11.5~14.5 min, 40% B。在优选的色谱条件下,共分离得到8个组分,见图1。经减压蒸馏浓缩至近干(70 $^{\circ}$ C, -0.08 MPa),残渣转移至蒸发皿中,在减压真空干燥箱中(50 $^{\circ}$ C, -0.08 MPa)至恒定质量,备用。

2.2.2 第2次色谱条件优化 为了进一步分离纯化化合物,将“2.2.1”项分离得到的8个组分各0.8 g,在60%甲醇溶液以1:8的料液比超声溶解,溶液过0.45 μ m滤膜,滤液作为进样液备用。样品溶液分别在Dubhe C₁₈柱(250 mm×20 mm, 10 μ m)上进行纯化制备,流动相为水(A)-甲醇(B)。经过优化制备色谱条件,对第1次制备得到的组分进行2次制备,共分离纯化得到质量分数较高的5个化

合物。各化合物最终的分离制备的梯度洗脱程序见表2。分别收集5个化合物洗脱液,经减压蒸馏浓缩至近干(65℃, -0.08 MPa),残渣转移至蒸发皿中,在减压真空干燥箱中至恒定质量(50℃, -0.08 MPa),分别得到化合物1(21.6 mg)、2(17.5 mg)、3(31 mg)、4(62 mg)和5(24.8 mg)。

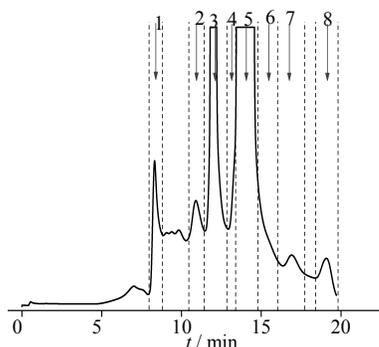


图1 第1次 Pr-HPLC 色谱图

Fig. 1 Pr-HPLC at first round

表2 第2次制备时不同的梯度洗脱程序

Table 2 Different elution programs at second round

化合物	梯度条件	进样量 / 体积流量 / mL	(mL·min ⁻¹)
1	20% B	1.0	18
2	42% B	0.4	18
3	60% B	0.5	18
4	50% B	0.8	18
5	0~8 min, 45% B; 8~9 min, 45%~60% B; 9~18 min, 60% B	0.5	18

2.2.3 化合物纯度检测 参考文献报道^[9],将“2.2.2”项分离制备得到的5个化合物,在HPLC上利用归一化法进行质量分数检测,色谱图见图2。

在研究中发现,在中压制备色谱上1次分离后,只能得到8个组分而未分离得到纯化合物。因此,进行2次分离,从中分离鉴定出5个质量分数较高的多酚类化合物。在HPLC上利用归一化法进行质量分数检测,经计算,5个化合物的质量分数均大于90%,其得率分别为2.7%、2.19%、3.88%、7.75%和3.1%。

2.2.4 结构表征 将分离制备所得5个化合物,应用波谱技术(¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT)对其结构进行表征。

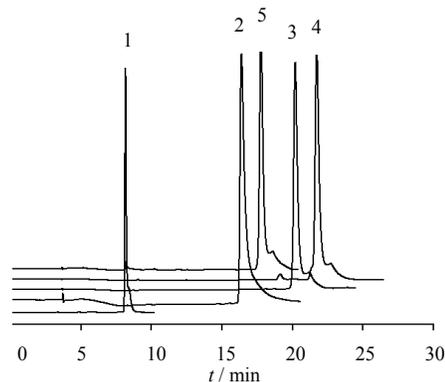


图2 5个化合物 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC of five compounds

化合物 1: 棕色胶状固体。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.63 (1H, s, H-2), 6.62 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 6.47 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6), 4.43~4.53 (2H, m, H-α), 3.09~3.17 (2H, m, H-β), 4.20 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Glc-H-1'), 5.01 (1H, s, Rha-H-1''), 1.09 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, Rha-H-6''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 70.5 (C-α), 35.5 (C-β), 129.7 (C-1), 116.8 (C-2), 144.0 (C-3), 145.5 (C-4), 115.9 (C-5), 120.0 (C-6), 103.0 (C-1'), 74.6 (C-2'), 82.2 (C-3'), 69.1 (C-4'), 77.2 (C-5'), 61.6 (C-6'), 101.1 (C-1''), 71.2 (C-2''), 71.1 (C-3''), 72.6 (C-4''), 68.6 (C-5''), 18.3 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[10],故鉴定化合物1为脱咖啡酰基毛蕊糖苷。

化合物 2: 黄色粉末。¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ: 6.6 (2H, m, H-2', 6'), 6.05 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 5.94 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-8), 5.90 (1H, s, H-3'), 5.59 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-6), 4.55 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Glc-H-1'), 2.85~3.75 (7H, m, Glc-H-2'~6'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ: 165.0 (C-2), 103.7 (C-3), 182.4 (C-4), 161.6 (C-5), 100.0 (C-6), 163.4 (C-7), 95.2 (C-8), 157.4 (C-9), 105.8 (C-10), 121.9 (C-1'), 114.1 (C-2'), 146.3 (C-3'), 150.4 (C-4'), 116.5 (C-5'), 119.6 (C-6'), 100.4 (C-1''), 73.6 (C-2''), 76.9 (C-3''), 70.1 (C-4''), 77.7 (C-5''), 61.1 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[2],故鉴定化合物2为木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷。

化合物 3: 黄棕色胶状物。¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ: 5.45 (1H, s, H-1), 7.41 (1H, s, H-3), 3.81 (1H, dd, *J* = 4.8, 7.6 Hz, H-5), 2.58~2.64 (2H, m, H-6), 5.77 (1H, m, H-8), 1.56 (3H, d, *J* = 6.4 Hz,

H-10), 3.65 (3H, s, -OCH₃), 4.01~4.17 (2H, m, H-1'), 2.58 (2H, m, H-2'), 6.62 (1H, s, H-4'), 6.51 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7'), 5.70 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-8'), 4.54 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc-H-1''), 2.98~3.49 (7H, m, Glc-H-2''~6''), 3.81 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, Glc-H-1'''), 3.16~3.81 (7H, m, Glc-H-2'''~6'''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ : 93.3 (C-1), 152.7 (C-3), 108.4 (C-4), 28.2 (C-5), 38.9 (C-6), 173.1 (C-7), 124.9 (C-8), 129.5 (C-9), 12.0 (C-10), 167.3 (C-11), 51.3 (-OCH₃), 65.7 (C-1'), 34.0 (C-2'), 129.6 (C-3'), 115.8 (C-4'), 144.8 (C-5'), 143.6 (C-6'), 115.1 (C-7'), 119.9 (C-8'), 98.7 (C-1''), 73.3 (C-2''), 73.8 (C-3''), 70.2 (C-4''), 76.6 (C-5''), 61.3 (C-6''), 102.4 (C-1'''), 73.8 (C-2'''), 77.0 (C-3'''), 70.0 (C-4'''), 77.0 (C-5'''), 61.4 (C-6'''). 以上数据与文献报道基本一致^[2], 故鉴定化合物 **3** 为 6''-O- β -D-吡喃葡萄糖-橄榄苦苷。

化合物 **4**: 黄棕色胶状物。¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 5.45 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 7.40 (1H, s, H-3), 3.18 (1H, m, H-5), 2.78~2.83 (2H, m, H-6), 5.56 (1H, m, H-8), 2.27 (1H, m, H-9), 5.11 (2H, m, H-10), 3.59 (3H, s, -OCH₃), 4.11~4.13 (2H, m, H-1'), 2.58~2.83 (2H, m, H-2'), 6.49 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-4'), 6.51 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7'), 5.70 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-8'), 4.61 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc-H-1''), 2.65~3.85 (7H, m, Glc-H-2''~6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ : 96.1 (C-1), 152.3 (C-3), 108.6 (C-4), 27.7 (C-5), 34.0 (C-6), 172.9 (C-7), 133.0 (C-8), 43.9 (C-9), 119.1 (C-10), 167.4 (C-11), 50.5 (-OCH₃), 65.2 (C-1'), 34.1 (C-2'), 129.5 (C-3'), 115.6 (C-4'), 143.5 (C-5'), 144.8 (C-6'), 115.1 (C-7'), 119.9 (C-8'), 98.6 (C-1''), 73.3 (C-2''), 76.7 (C-3''), 70.1 (C-4''), 77.0 (C-5''), 61.4 (C-6''). 以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **4** 为裂环马钱子苷。

化合物 **5**: 黄棕色胶状物。¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 5.03 (1H, s, H-1), 7.28 (1H, s, H-3), 3.82 (1H, m, H-5), 2.30~2.41 (2H, m, H-6), 5.81 (1H, m, H-8), 5.11 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, H-10), 3.64 (3H, s, -OCH₃), 4.14~4.31 (2H, m, H-1'), 2.75~2.88 (2H, m, H-2'), 6.68 (1H, s, H-4'), 6.66 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7'), 6.55 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-8'), 4.32 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, Glc-H-1''), 2.30~3.64 (7H, m, Glc-H-2''~6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ : 93.5 (C-1), 153.9

(C-3), 108.2 (C-4), 30.6 (C-5), 39.4 (C-6), 171.1 (C-7), 123.5 (C-8), 128.9 (C-9), 13.4 (C-10), 166.6 (C-11), 51.7 (-OCH₃), 65.5 (C-1'), 34.2 (C-2'), 129.7 (C-3'), 116.7 (C-4'), 145.6 (C-5'), 144.2 (C-6'), 116.0 (C-7'), 112.0 (C-8'), 99.6 (C-1''), 73.8 (C-2''), 77.0 (C-3''), 70.5 (C-4''), 77.8 (C-5''), 61.6 (C-6''). 以上数据与文献报道基本一致^[2], 故鉴定化合物 **5** 为橄榄苦苷。

3 讨论

本研究为阐明油橄榄叶抗糖尿病活性的物质基础, 利用反相中压制备液相色谱技术分离、纯化化合物, 并对制备条件进行了优化, 同时应用现代波谱技术鉴定化合物结构, 5个化合物的结构表征结果均为多酚类化合物。其研究结果为以油橄榄叶为原料的新药开发和质量标准的建立提供了理论依据。

参考文献

- [1] Wang X F, Li C, Liu Y W, *et al.* Efficient method for screening and identification of radical scavengers in the leaves of *Olea europaea* L [J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(3): 373-380.
- [2] 王晓飞, 李辰, 邸多隆, 等. 油橄榄叶多酚类成分研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 848-851.
- [3] 季崇敏, 吴国球, 沈子龙. 橄榄叶提取物对正常及糖尿病小鼠血糖和血脂水平的影响 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2003, 22(4): 236-238.
- [4] 张佳, 任远, 邸多隆, 等. 油橄榄叶抗糖尿病活性部位筛选 [J]. *中草药*, 2013, 44(13): 1807-1810.
- [5] 卜令娜, 马姝雯, 邸多隆, 等. 油橄榄叶不同提取部位对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响 [J]. *食品科技*, 2012, 37(12): 222-226.
- [6] Li C, Zheng Y Y, Di D L, *et al.* Simultaneous separation and purification of flavonoids and oleuropein from *Olea europaea* L. (Olive) leaves using macroporous resin [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(15): 2826-2834.
- [7] Al-Azzawie H F, Alhamdani M S S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits [J]. *Life Sci*, 2006, 78(12): 1371-1377.
- [8] 李辰, 郑媛媛, 黄新异, 等. UV-Vis 光谱差减法测定油橄榄叶中橄榄苦苷含量初探 [J]. *分析测试学报*, 2011, 30(3): 242-247.
- [9] 卜令娜, 张佳, 邸多隆, 等. 油橄榄叶清除自由基活性部位筛选 [J]. *食品工业*, 2013, 34(6): 131-134.
- [10] Kanchanapoom T, Kasai R, Yamasaki K. Phenolic glycosides from *Markhamia stipulata* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(5): 557-563.
- [11] Kuwajima H, Vetuira T, Takaishi K, *et al.* A secoiridoid glucoside from *Olea europaea* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(6): 1757-1759.