制备色谱分离竹叶黄酮中异荭草苷和荭草苷

许　将，范康梅，钱俊青*
浙江工业大学药学院，浙江 杭州　310014

摘　要：目的　建立制备型高效液相色谱（PHPLC）分离竹叶黄酮中异荭草苷和荭草苷的方法。**方法**　竹叶黄酮经 AB-8 树脂吸附洗脱纯化后，采用 PHPLC 分离异荭草苷和荭草苷，制备色谱条件：流动相为甲醇-0.3%乙酸水溶液（32∶68），体积流量为 5 mL/min，柱温为 20 ℃，检测波长 330 nm，进样体积为 400 μL，上样质量浓度为 15.3 mg/mL。**结果**　HPLC 检测表明，异荭草苷的质量分数＞99%，荭草苷的质量分数＞93%，加样回收率分别为（92.7±2.92）%和（85.1±3.45）%。单体结构通过核磁共振碳谱和氢谱鉴定，确定为异荭草苷和荭草苷。**结论**　该法分离效果较好，低毒，回收率高，可用于竹叶黄酮中 2 种黄酮苷的分离制备。

关键词：竹叶黄酮；异荭草苷；荭草苷；制备色谱；分离纯化
中图分类号：R284.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2014)15 - 2184 - 05
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.012

Isolation of isoorientin and orientin from bamboo leaf flavones using preparative high-performance liquid chromatography

XU Jiang, FAN Kang-mei, QIAN Jun-qing
College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: Objective　To establish a method for preparation of orientin and isoorientin from bamboo leaf flavones (BLF) using preparative high-performance liquid chromatography (PHPLC). **Methods**　After BLF was purified by AB-8 resin-based column chromatography, PHPLC was employed to isolate orientin and isoorientin, using a mobile phase consisting of methyl alcohol-water with 0.3% acetic acid (32 : 68). The flow rate was 5 mL/min while the column temperature was maintained at 20 ℃. The injection volume was 400 μL and the concentration of sample was 15.3 mg/mL. Signal was monitored at 330 nm with the diode array detector. **Results**　HPLC analysis showed that the purities of isoorientin and orientin were > 99% and > 93%, respectively, and the recovery rates were (92.7 ± 2.92)% and (85.1 ± 3.45)%, respectively. The confirmation of chemical structures was performed by ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR. **Conclusion**　The method is simple, with low toxicity but high recovery rate, and can be applied to the separation and preparation of isoorientin and orientin.

Key words: bamboo leaf flavones; isoorientin; orientin; preparative high performance liquid chromatography; isolation and purification

竹叶抗氧化物是《食品添加剂使用标准》GB 2760—2011 中允许使用的一种天然食品添加剂，因具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抗肿瘤、抗菌及保护心脑血管的作用[1-7]而被广泛应用于食品、医药和化妆品当中，已经受到国内外市场的广泛关注。

竹叶黄酮中主要包括黄酮、内酯和苯酚类物质[8-9]，其中黄酮类的 2 种主要成分是荭草苷和异荭草苷[10]。由于竹叶黄酮中单体的价格极为昂贵，对进一步定性定量研究其生理活性及结构修饰造成了不便。异荭草苷和荭草苷是一对同分异构体。Zhang 等[10]曾使用树脂吸附洗脱，制备型高效液相色谱（PHPLC）分离和结晶 3 步来分离竹叶黄酮中的 4 种碳苷黄酮，其中，PHPLC 分离选择了较低体积分数的乙腈水梯度洗脱，分离时间较长，且分离纯度不理想（仍需进一步结晶纯化）。本实验考察了甲醇水比例，进行等度洗脱，并做了单因素条件的优化，分离时间大大缩短，且分离所得单体的质量分数和回收率都达到了理想的结果。

收稿日期：2014-02-19
基金项目：浙江省重点科技创新团队项目（2010R50032）
作者简介：许　将（1984—），男，硕士。Tel: (0571)88320903　13989476321　E-mail: coolxjly@163.com
***通信作者**　钱俊青，教授，博士生导师。Tel: (0571)88320903　E-mail: qjq@zjut.edu.cn

1 仪器与材料

Waters^{TM} 600 型制备液相色谱仪，Waters 2487 双波长紫外检测器，六通进样阀，美国 Waters 公司；Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪，安捷伦科技公司；核磁共振波谱仪 AVANCE III 500 MHz，瑞士 Bruker 公司；BS124S 电子分析天平，赛多利斯科学仪器有限公司；KQ—2200 超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；ULUP—I 微量分析型超纯水机，成都超纯科技有限公司；R—201 旋转蒸发仪，上海申生科技有限公司。

AB-8 树脂，南开大学化工部，颗粒粒径：0.3～1.25 mm；竹叶黄酮，由浙江圣氏生物公司提供，批号 20121114，荭草苷和异荭草苷的质量分数分别为 3.7%和 1.6%；异荭草苷对照品（批号 110120）、荭草苷对照品（批号 110319），质量分数均＞98%，上海融禾医药科技发展有限公司；乙腈，色谱纯，Promptar 有限责任公司；水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析条件：采用 C_{18} 反相色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm，Sigma），柱温 30 ℃，流动相为乙腈-0.3%乙酸水溶液，梯度洗脱条件：0～16 min，11%乙腈；16～18 min，11%～13%乙腈；18～40 min，13%～16%乙腈；40～42 min，16%～18%乙腈；42～60 min，18%～100%乙腈；60～65 min，100%～11%乙腈；进样量为 20 μL，体积流量为 0.7 mL/min，检测波长为 330 nm，运行时间为 70 min。

PHPLC 条件：使用 C_{18} 反相半制备色谱柱（250 mm×10 mm，5 μm，SunFire^{TM}），柱温为 20 ℃，甲醇-0.3%乙酸水溶液（33∶67），进样体积 400 μL，体积流量 5 mL/min，检测波长 330 nm，运行时间为 40 min。

2.2 样品的吸附洗脱

称取 50 g 的竹叶黄酮（HPLC 检测见图 1-a），使用 500 mL 无水乙醇溶解，真空抽滤除去极性大的多糖类物质，然后将清液旋干，再使用 1 L 纯水溶解，真空抽滤除去极性小的黄酮内酯类的物质。将处理好的样品用超纯水稀释至 4 L（质量浓度约为 8 g/L），并调节 pH 值为 5，上样于装好 AB-8 树脂的常压玻璃柱中（10 cm×60 cm）[11]，依次使用 1.5 BV 的 0、10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%乙醇溶液洗脱，收集时每 500 毫升为 1 瓶，其中 40%乙醇洗脱条件下，得到异荭草苷（质量分数 18.0%）和荭草苷（质量分数 10.1%）的洗脱液（HPLC 检测见图 1-b）。

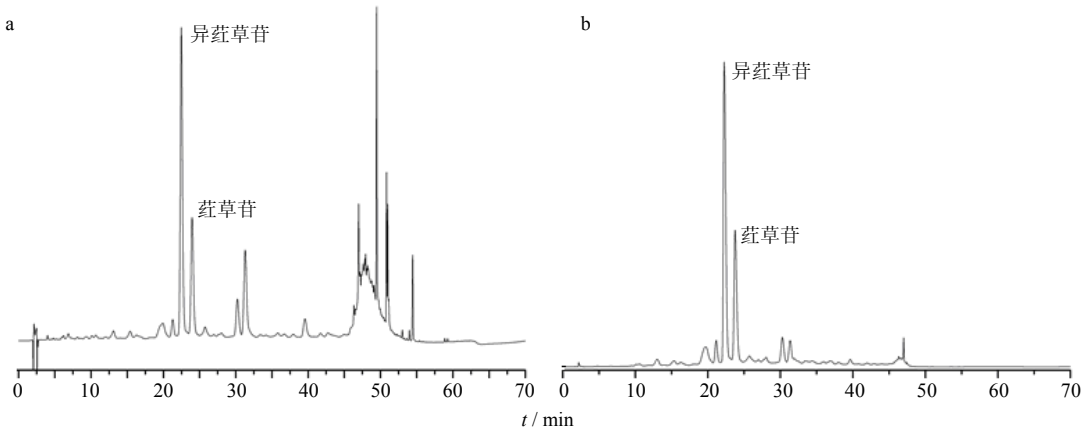

图 1 竹叶黄酮色谱图 (a) 和 40%乙醇洗脱后的竹叶黄酮色谱图 (b)

Fig. 1 HPLC of original BLF (a) and 40% ethanol fraction of BLF (b)

2.3 荭草苷和异荭草苷单体的 PHPLC 分离

将“2.2”项所得的洗脱液（质量浓度为 4.2 mg/mL），按“2.1”项中的 PHPLC 条件进行单体分离。分别收集组分 1、2，经一步分离即可得到高质量分数的荭草苷和异荭草苷单体，通过减压蒸馏，真空干燥得到产品粉末，竹叶黄酮苷类化合物的 PHPLC 图见图 2。

2.4 PHPLC 单因素的考察

2.4.1 流动相的选择 在柱温 15 ℃，体积流量为 3 mL/min，上样质量浓度为 4.2 mg/mL，上样体积为 200 μL 的条件下，考察了不同比例的甲醇和水对黄酮苷的分离效果的影响，从相邻峰的分离度和收集馏分的效率综合分析，选取了甲醇-0.3%乙酸水溶液 33∶67 作为流动相的比例，结果见表 1。

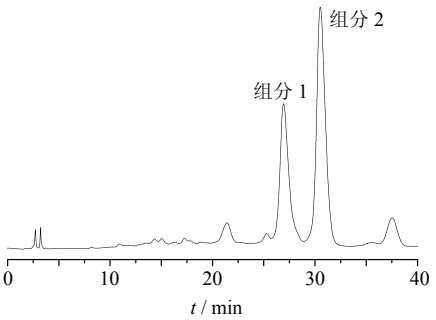

图 2　PHPLC 分离竹叶黄酮的色谱图

Fig. 2　PHPLC of BLF

表 1　流动相组成对分离的影响 ($\bar{x}$ ±s, n=2)

Table 1　Effect of composition of mobile phase on separation ($\bar{x}$ ±s, n=2)

甲醇-0.3%乙酸水溶液	分离度	t_R / min	
		荭草苷	异荭草苷
25∶75	＞2.5	＞90	＞90
30∶70	＞2.5	＞90	＞90
33∶67	2.34±0.03	39.01±0.02	43.79±0.02
35∶65	1.95±0.02	33.76±0.01	37.57±0.01
37∶63	1.37±0.01	22.13±0.02	23.89±0.03
40∶60	0.95±0.06	16.89±0.05	17.86±0.04
50∶50	0	4.30±0.02	4.30±0.02

2.4.2　流动相体积流量的影响　在柱温 15 ℃，上样浓度为 4.2 mg/mL，上样体积为 200 μL 的条件下，以甲醇-0.3%乙酸水溶液（33∶67）作为流动相，由于体积流量超过 5 mL/min 时，压力超过 27.58 kPa，制备柱会渗漏，故本实验只考察了 3、5 mL/min 对黄酮苷分离效果的影响，结果见表 2。

表 2　流动相的体积流量对分离的影响 ($\bar{x}$ ±s, n=2)

Table 2　Effect of current velocity of mobile phase on separation ($\bar{x}$ ±s, n=2)

体积流量 / (mL·min^{-1})	分离度	t_R / min	
		荭草苷	异荭草苷
3	2.34±0.03	39.01±0.02	43.79±0.02
5	2.29±0.01	26.93±0.02	30.51±0.01

2.4.3　柱温的影响　在体积流量为 5 mL/min，上样质量浓度为 4.2 mg/mL，上样体积为 200 μL 的条件下，以甲醇-0.3%乙酸水溶液（33∶67）作为流动相，考察了不同柱温对黄酮苷分离效果的影响，结果见表 3，本实验选择了 20 ℃作为分离的柱温。

2.4.4　上样量的考察　在柱温为 20 ℃，体积流量为 5 mL/min 的条件下，以甲醇-0.3%乙酸水溶液（33∶67）作为流动相，考察了不同上样量对分离效果的影响，结果见表 4。

表 3　柱温对分离的影响 ($\bar{x}$ ±s, n=2)

Table 3　Effect of column temperature on separation ($\bar{x}$ ±s, n=2)

温度 / ℃	分离度	t_R / min	
		异荭草苷	荭草苷
15	2.31±0.01	28.90±0.02	32.16±0.03
20	2.32±0.03	27.27±0.01	30.79±0.06
30	1.38±0.05	25.24±0.06	28.57±0.05

表 4　进样量对分离的影响 ($\bar{x}$ ±s, n=2)

Table 4　Effect of loading quantity of sample on separation ($\bar{x}$ ±s, n=2)

质量浓度 / (mg·mL^{-1})	进样体积 / μL	分离度	t_R / min	
			荭草苷	异荭草苷
4.2	200	2.58±0.02	26.93±0.03	30.52±0.02
30.7	200	无法分离		
30.7	100	无法分离		
20.5	200	2.28±0.10	27.78±0.02	32.45±0.01
20.5	300	1.92±0.00	28.11±0.07	33.70±0.08
20.5	400	无法分离		
15.3	400	2.73±0.01	27.87±0.05	32.91±0.05

2.5　产品质量分数分析和回收率计算

用外标法定量，异荭草苷的进样质量浓度为 39.3～275.3 μg/mL，荭草苷的进样质量浓度为 50.4～402.5 μg/mL 时，进样质量浓度（X，μg/mL）与峰面积（Y）呈良好的线性关系。线性回归方程分别为异荭草苷 Y=0.017 7 X+0.096 1，R^2=0.999 8；荭草苷 Y=0.016 0 X−3.125 4，R^2=0.999 7。

分离得到荭草苷和异荭草苷的 HPLC 图谱见图 3，荭草苷和异荭草苷的质量分数通过面积归一法计算分别为（93.38±0.33）%，（99.44±0.37）%；回收率通过外标法计算分别为（85.1±3.45）%，（92.7±2.92）%。

2.6　产品结构表征

组分 1（荭草苷）溶液除去溶剂后溶解于氘代 DMSO 中，做核磁共振分析，与文献报道[12-13]比对后，氢谱和碳谱核磁数据归属如下。^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO) δ: 182.45 (C-4), 164.46 (C-2), 162.20 (C-7), 159.93 (C-5), 156.97 (C-9), 148.43 (C-4′), 146.46 (C-3′), 122.44 (C-1′), 119.44 (C-6′), 116.14

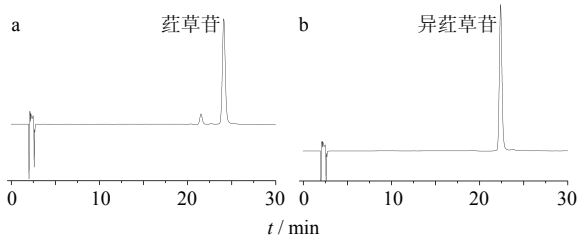

图 3 组分 1 (a) 和组分 2 (b) 的检测色谱图

Fig. 3 Aanalytical HPLC of fractions 1 (a) and 2 (b)

(C-5′), 113.67 (C-2′), 109.44 (C-8), 104.67 (C-10), 102.37 (C-3), 98.67 (C-6), 83.66 (C-5″), 80.65 (C-3″), 75.37 (C-l″), 73.38 (C-2″), 72.91 (C-4″), 62.11 (C-6″)；^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO) δ: 13.18 (1H, s, 5-OH) 7.54 (1H, dd, J = 2.0, 8.4 Hz, H-6′), 7.47 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2′), 6.87 (1H, d, J = 8.4 Hz, 5′-H), 6.65 (1H, s, 3-H), 6.25 (1H, s, 6-H), 4.70 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-1″), 3.72 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-6a″), 3.46 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-6b″), 3.17～3.46 (3H, m, H-3″, 4″, 5″)。

组分 2（异荭草苷）溶液除去溶剂后溶解于氘代甲醇中，做核磁共振分析，氢谱和碳谱核磁数据归属如下。^{13}C-NMR (126 MHz, CD_3OD) δ: 184.40 (C-4), 166.62 (C-2), 164.99 (C-7), 162.15 (C-5), 159.45 (C-9), 151.10 (C-4′), 147.09 (C-3′), 123.47 (C-1′), 120.38 (C-6′), 116.86 (C-5′), 114.23 (C-2′), 109.23 (C-6), 105.25 (C-10), 103.98 (C-3), 95.30 (C-8), 82.65 (C-5″), 80.18 (C-3″), 75.38 (C-1″), 72.69 (C-4″), 71.83 (C-2″), 62.89 (C-6″)；^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 7.36 (1H, dd, J = 2.0, 8.4 Hz, H-6′), 7.36 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2′), 6.90 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5′), 6.53 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, s, H-8), 4.64 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-1″), 3.85 (1H, m, H-2″), 3.73 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-6a″), 3.43 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-6b″), 3.30～3.31 (3H, m, H-3″, 4″, 5″)。

3 讨论

与分析色谱比较，PHPLC 要求在尽可能短的时间内获得更多的目标产物，属于非线性色谱。目标产物的质量分数、产量、消耗时间和成本等往往是 PHPLC 的主要考虑因素[14]。本实验以 2 种组分的分离度和保留时间作为考察指标来综合评价分离质量和分离效率，分别考察了流动相的比例和体积流量、温度、上样量对色谱分离的影响。

本实验室曾选择乙腈体系分离，分离纯度和分离效率都比较理想（2 种单体质量分数都可达到 99%），与甲醇体系洗脱比较，荭草苷和异荭草苷在 2 种体系的出峰时间顺序正好相反，且在甲醇体系中靠近荭草苷的一点杂质（可能为荭草素-2″-*O*-β-*L*-半乳糖苷）仅旋光性与之不同，故很难分开，而乙腈则有一定的手性拆分能力[15]，所以乙腈体系可以得到高质量分数的荭草苷。但考虑到乙腈毒性大，选择了甲醇体系作为流动相。

对于半制备色谱，其他色谱条件确定后，进样量是最重要的参数，它直接决定生产量的大小和制备单体的质量分数。实验结果表明，当样品质量浓度达到 30 mg/mL，色谱分辨率急剧下降，即使减少上样体积，也不能实现理想的分离，以 20 mg/mL 作为上样质量浓度，上样体积超过 400 μL 时，出现峰形不对称，表明上样量已超过等温吸附的线性范围。确定上样量为 6 mg 后，进一步将上样质量浓度减小为 15.3 mg/mL 时，可以得到更理想的分离度，最终确定上样质量浓度 15.3 mg/mL，上样体积 400 μL，单次上样量为 6.12 mg。

本实验通过单次 PHPLC 分离，即可得到异荭草苷和荭草苷单体，整个过程用时短（仅需 40 min），毒性低，分离效果较好，可连续进样制备。分离所得的产品异荭草苷的质量分数＞99%，荭草苷的质量分数＞93%，适于新药研发的分析样品。

参考文献

[1] An F, Yang G, Tian J, *et al*. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in *D*-galactose-aged mice [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 33(7): 2565-2575.

[2] 方 菊. 竹叶黄酮的提取分离及抑菌效果研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.

[3] Salas M P, Céliz G, Geronazzo H, *et al*. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species [J]. *Food Chem*, 2011, 124(4): 1411-1415.

[4] Wong K. Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway [J]. *Recent Pat Anti-Canc*, 2009, 4(1): 28-35.

[5] 陆柏益, 张 英, 吴晓琴. 竹叶黄酮的抗氧化性及其心脑血管药理活性研究进展 [J]. 林产化学与工业, 2005, 25(3): 120-124.

[6] Kim H P, Son K H, Chang H W, *et al*. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 96(3): 229-245.

[7] Hu C, Zhang Y, Kitts D D. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *henonis* leaf extract *in vitro* [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(8): 3170-3176.

[8] 张慧艳, 汤 锋, 王春梅, 等. 淡竹叶化学成分研究 [J]. 安徽农业大学报, 2011, 38(4): 540-542.

[9] 张 靖, 王 英, 张晓琦, 等. 淡竹叶化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(6): 428-431.

[10] Zhang Y, Jiao J, Liu C, *et al*. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2008, 107(3): 1326-1336.

[11] Ma X, Yan R, Yu S, *et al*. Enzymatic acylation of isoorientin and isovitexin from bamboo-leaf extracts with fatty acids and antiradical activity of the acylated derivatives [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(43): 10844-10849.

[12] Rayyan S, Fossen T, Nateland H S, *et al*. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug ‘crataegi folium cum flore’ (hawthorn) [J]. *Phytochem Anal*, 2005, 16(5): 334-341.

[13] Wang R, Yang X, Ma C, *et al*. Trollioside, a new compound from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6(2): 139-144.

[14] 赵维民, 张天佑, 徐任生. 制备色谱技术在天然产物分离中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.

[15] 陈立仁. 液相色谱手性分离 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.