

# 高速逆流色谱分离纯化雪白睡莲花中的酚类成分

买吾拉江·阿不都热衣木<sup>1</sup>, 李晨阳<sup>2</sup>, 李倩<sup>1</sup>, 徐芳<sup>2</sup>, 吉腾飞<sup>3</sup>, 赵军<sup>2\*</sup>

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046; 2. 新疆药物研究所维吾尔药重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830004; 3. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所天然药物活性成分与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要** [目的] 采用高速逆流色谱法(HSCCC)分离纯化雪白睡莲花中的酚类成分。[方法] HSCCC 分离过程分为两步, 分别采用乙酸乙酯: 甲醇: 水(4: 1: 5)和乙酸乙酯: 正丁醇: 水(4: 1: 5)两个体系, 固定相均采用上相, 流动相均采用下相, 流速为 2.0 mL/min, 主机转速设定为 850 r/min, 紫外检测波长为 254 nm。高效液相色谱(HPLC)检测纯度。[结果] 第一步从 200 mg 的睡莲花提取物中分离得到异槲皮苷(I, 41.4 mg)、紫云英苷(II, 40 mg)和一混合物 85 mg; 第二步从混合物中分离纯化得到 isostrictiniin(III, 50.1 mg)和烟花苷(IV, 26.3 mg), 上述 4 种物质的纯度分别为 73.53%、92.42%、82.36% 和 85.65%。[结论] HSCCC 可快速的分离纯化雪白睡莲花中的酚类成分。

**关键词** 雪白睡莲花; 高速逆流色谱; 酚类成分

**中图分类号** S567.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)21-107-03

**Isolation and Purification of Phenolic Compounds from *Nymphaea candida* Presl by High-speed Counter-current Chromatography**  
ABUDUREYIMU Maiwylajiang<sup>1</sup>, LI Chen-yang<sup>2</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>2\*</sup> et al (1. College of Life Sciences & Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046; 2. Xinjiang Key Laboratory for Uighur Medicines, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi, Xinjiang 830004)

**Abstract** [Objective] To isolate and purify phenolic constituents from *Nymphaea candida* Presl by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). [Methods] HSCCC was employed to separate phenolic compounds from *N. candida* with two steps. Two solvent systems were ethyl acetate: methanol: water (4: 1: 5) and ethyl acetate: n-butanol: water (4: 1: 5). HSCCC was executed under the conditions of 2.0 mL/min flow rate, 850 r/min rotation speed and 254 nm detection wavelength. The purities of compounds were determined by HPLC. [Result] In the first separation step, isoquercitrin (I, 41.4 mg), astragalin (II, 40 mg) and mixtures of III and IV (85 mg) were extracted from 200 mg sample. In the second step, mixtures of III and IV were obtained; isostrictiniin (III, 50.1 mg) and nicotiflorin (IV, 26.3 mg). The purities of these compounds were determined as 73.53%, 92.42%, 82.36% and 85.65% by HPLC. [Conclusion] Phenolic compounds from *N. candida* can be quickly isolated and purified by HSCCC.

**Key words** High-speed counter-current chromatography; *Nymphaea candida*; Phenolic compounds

雪白睡莲花为睡莲属多年生水生草本植物雪白睡莲(*Nymphaea candida* Presl)的干燥花蕾, 主要分布于我国新疆的伊犁、阿勒泰和博湖地区。该植物为维吾尔医习用药材, 具有清热解毒、镇静安神之功效, 在临床上主要用于热症引起的头痛、热感咳嗽及小儿急、慢惊风等病症的治疗<sup>[1]</sup>, 收载于《中华人民共和国药品标准维吾尔药分册》等医药文献中<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明, 睡莲属植物具有抗氧化、抗肝炎、降血压、降血糖等多种生物活性<sup>[3-5]</sup>。烟花苷等酚类化合物是该属植物的主要特征性成分<sup>[6]</sup>。然而目前为止对睡莲花中该类成分的快速分离却鲜见文献报道。因此, 为了该药材质量标准及其相关对照品的研究, 需要建立有效成分快速高效的分离纯化方法。高速逆流色谱(High speed counter-current chromatography, HSCCC)具有分离速度快、样品损失小的特点, 是近年来广泛用于天然有效成分分离纯化的色谱技术<sup>[7-10]</sup>。笔者在前期研究基础上运用 HSCCC 方法从 200 mg 雪白睡莲花提取物中分离得到了 4 种化合物, 分别为异槲皮苷(图 1 I, 41.4 mg)、紫云英苷(图 1 II, 40 mg)、isostrictiniin(图 1 III, 50.1 mg)和烟花苷(图 1 IV, 26.3 mg), 其纯度分别为 73.53%、92.42%、82.36% 和 85.65%, 旨在为睡莲花

质量控制方法的建立提供依据。

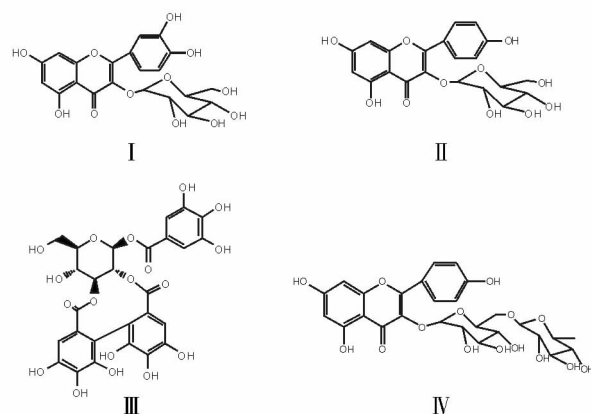


图 1 睡莲花中酚类成分的化学结构

Fig.1 Chemical structures of phenolic compounds from *Nymphaea candida*

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 药材。**雪白睡莲花药材购自新疆维吾尔药业有限公司, 由新疆药物研究所何江副研究员鉴定为雪白睡莲花(*Nymphaea candida* Presl)的干燥花蕾。

**1.1.2 试剂。**异槲皮苷、紫云英苷、isostrictiniin 和烟花苷对照品由该研究室自制, 含量均大于 95%。D101 大孔吸附树脂购自天津兴南允能高分子技术有限公司; 聚酰胺树脂购自浙江台州四甲生化材料厂; 乙腈、甲醇为色谱纯, 乙醇等其他

**基金项目** 新疆维吾尔自治区科技支撑计划项目(20133318)。

**作者简介** 买吾拉江·阿不都热衣木(1992-), 男, 新疆柯坪人, 硕士研究生, 研究方向: 药食兼用植物的研究与开发。\* 通讯作者, 研究员, 博士, 硕士生导师, 从事药食兼用植物的研究与开发工作。

**收稿日期** 2016-06-06

试剂为国产分析纯。

**1.1.3 仪器。**TBE-300B 高速逆流色谱仪由上海同田生化技术有限公司生产;N2000 色谱工作站由浙江大学智达信息工程有限公司生产;SPD-10Avp 高效液相色谱仪由日本岛津公司生产;AS 系列超声波清洗机由天津奥特赛恩斯仪器有限公司生产。

1.2 方法

**1.2.1 睡莲花提取物的制备。**睡莲花药材脱脂后,以料液比 1:25 (g/mL) 加入 70% 乙醇,回流提取 3 次,每次提取 0.5 h,过滤,合并提取液,减压浓缩至浸膏。然后将睡莲花提取物浸膏以适量蒸馏水溶解后上 D101 大孔树脂,先分别用 5 倍柱体积的水和 30% 乙醇除杂,再以 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩至浸膏。浸膏以水混悬溶解后上聚酰胺吸附树脂,先以 5 倍柱体积水除杂,再用 60% 乙醇梯度洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,干燥备用。

**1.2.2 HSCCC 溶剂体系的确定。**选择乙酸乙酯:水(5:5)、乙酸乙酯:甲醇:水(4:1:5)、乙酸乙酯:正丁醇:水(4:1:5)和乙酸乙酯:乙醇:水(4:1:5)作为进行 HSCCC 的溶剂体系。各溶剂体系配制后充分振摇,然后静置分层,分别取上、下相溶剂各 3.0 mL,置于装有 5 mg 样品的具塞试管中,充分振摇溶解后静置分层,分别取上下相溶液以 HPLC 检测,计算分配系数  $K$ ,  $K = A_1/A_2$  ( $A_1$  和  $A_2$  分别为上相和下相各色谱峰的峰面积)。

**1.2.3 HSCCC 法分离纯化睡莲花提取物中的有效成分。**试验前将达到平衡的两相溶剂系统按上相和下相分别放入试剂瓶中,超声脱气 20 min。将上相(固定相)以 10 mL/min 的

速度泵入 HSCCC 螺旋管中,待螺旋管充满后,缓慢调节主机转数至 850 r/min,同时以 2.0 mL/min 的速度将下相(流动相)泵入其中,待两相平衡后取样品 200 mg 溶于上下相各 5 mL 的混合溶液中,由进样阀注入到螺旋管中,同时开始采集数据。

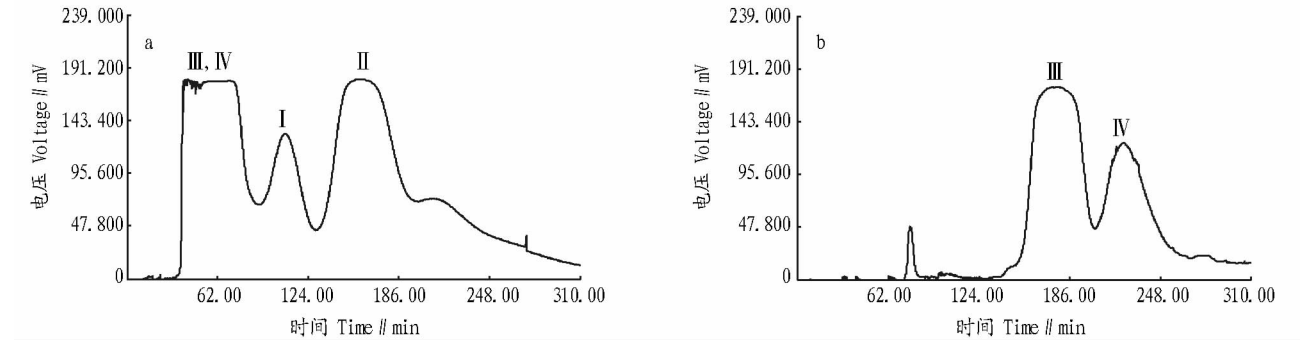
**1.2.4 HPLC 检测分析。**采用 HPLC 检测各色谱峰的纯度。色谱条件:Phenomenex C18 柱(250×4.6,5 μm),梯度洗脱程序(0 min~15 min~20 min,21% A~25% A~21% A);流动相为乙腈(A):0.2% 磷酸水溶液(B),柱温 30℃,流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm。

2 结果与分析

**2.1 HSCCC 溶剂系统的选择** 溶剂系统的选择是通过目标成分的分配系数  $K$ 、分离度等因素决定的,目标成分在不同溶剂体系中的  $K$  值见表 1。在 4 种溶剂系统中,各化合物的  $K$  值差异较大,能够保证各化合物间具有较好的分离度。然而,在溶剂系统①和③中,化合物 I 和 II 的  $K$  值太大,分离时间长,效率低。乙酸乙酯-甲醇-水(4:1:5,②)和乙酸乙酯-乙醇-水(4:1:5,④)系统有合适的  $K$  值,对分离纯化睡莲花酚类成分较为合适,然而溶剂系统④在 HSCCC 上的保留率低,故选择乙酸乙酯:甲醇:水(4:1:5)系统进行睡莲花酚类成分的分离,分别得到组分 I(41.4 mg)、II(40 mg)以及 III 和 IV 的混合物(85 mg)。溶剂系统③对化合物 III 和 IV 有较好的分离度,进一步选择该体系从该混合物中分离纯化得到化合物 III(50.1 mg)和 IV(26.3 mg)。该体系分离效果好,固定相保留率 43.1%。HSCCC 分离纯化效果见图 2。

表 1 睡莲花酚类成分在不同溶剂系统中的分配系数  
Table 1 Partition coefficient (K) of phenolic compounds from *N. candida*

| 溶剂系统比例<br>Proportion of solvent system (V/V/V)            | 分配系数 Partition coefficient (K) |       |      |      |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|------|------|
|                                                           | I                              | II    | III  | IV   |
| ① 乙酸乙酯:水=5:5 Ethyl acetate: water =5:5                    | 4.41                           | 10.75 | 0.32 | 0.26 |
| ② 乙酸乙酯:甲醇:水=4:1:5 Ethyl acetate: methanol: water =4:1:5   | 3.43                           | 6.69  | 0.61 | 0.40 |
| ③ 乙酸乙酯:正丁醇:水=4:1:5 Ethyl acetate: n-butanol: water =4:1:5 | 11.28                          | 21.54 | 2.80 | 3.50 |
| ④ 乙酸乙酯:乙醇:水=4:1:5 Ethyl acetate: ethanol: water =4:1:5    | 3.97                           | 7.45  | 0.94 | 0.83 |

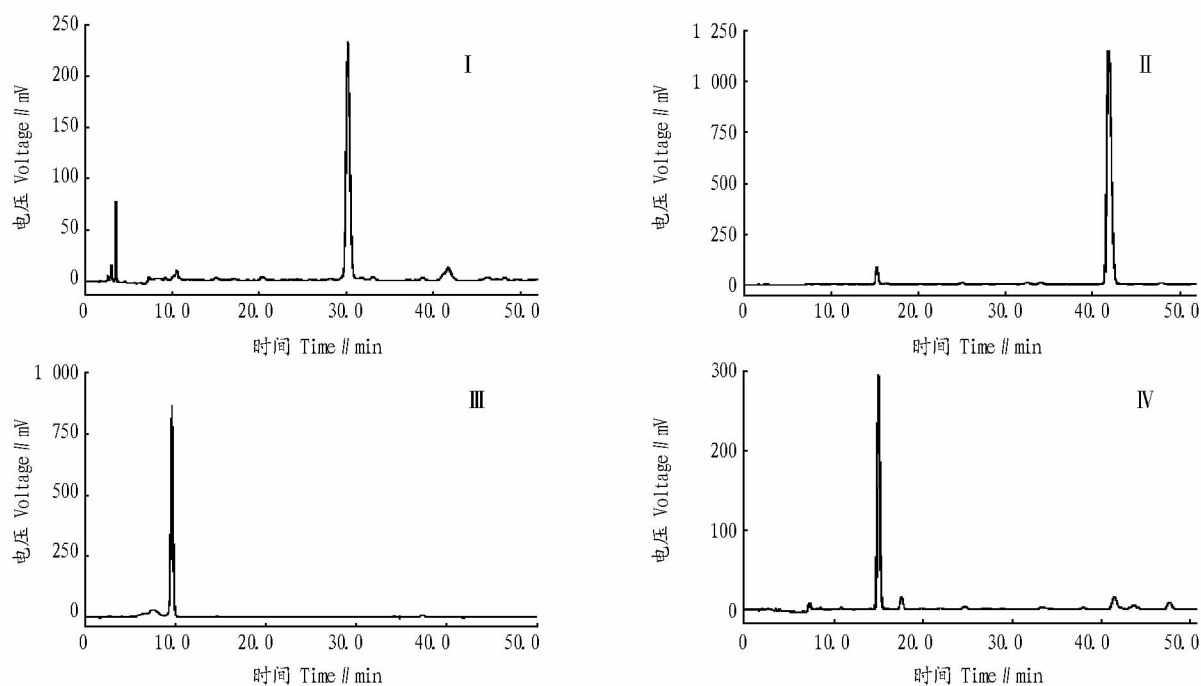


注: a. 乙酸乙酯: 甲醇: 水(4:1:5); b. 乙酸乙酯: 正丁醇: 水(4:1:5)。  
Note: a. Ethyl acetate: methanol: water(4:1:5); b. Ethyl acetate: n-butanol: water (4:1:5)。

图 2 睡莲花酚类成分的高速逆流色谱  
Fig. 2 HSCCC chromatogram of phenolic compounds from *N. candida*

**2.2 HPLC 纯度检测及结构确证** 经 HPLC 分析,化合物 I、II ~ IV 的纯度分别为 73.53%、92.42%、82.36% 和 85.65%。通过波谱技术及理化性质,并与已知对照品共薄

层, *R<sub>f</sub>* 值一致,故确证它们的结构分别为异槲皮苷(I)、紫云英苷(II)、isostrictiniin(III)和烟花苷(IV)。



注: I. 异槲皮苷, II. 紫云英苷, III. isostrictiniin, IV. 烟花苷。  
Note: I. Isoquercitrin; II. Astragalin; III. Isostrictiniin; IV. Nicotiflorin.

图3 睡莲花酚类成分的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of phenolic compounds from *N. candida*

3 结论

利用 HSCCC 方法对雪白睡莲花提取物中的标识性酚类化合物进行了分离纯化,经过溶剂体系的优化选择,应用乙酸乙酯: 甲醇: 水(4: 1: 5)和乙酸乙酯: 正丁醇: 水(4: 1: 5)两步从雪白睡莲花提取物中分离得到了异槲皮苷、紫云英苷、isostrictiniin 和烟花苷。该方法样品损失小,且能够快速从睡莲花中获得高纯度的标示性成分。试验结果可为维吾尔药睡莲花质量标准的制定及其进一步深入开发提供基础数据。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部中国药典委员会. 维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:41.  
[2] 刘勇民. 维吾尔药志:下[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:541.  
[3] RAJAGOPAL K, SASIKALA K, RAGAVAN B. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Nymphaea stellata* flowers in normal and alloxan diabetic rats [J]. Pharm Biol, 2008, 46: 654 – 659.  
[4] ZHAO J, LIU T, MA L, et al. Antioxidant and preventive effects of extract from *Nymphaea candida* flower on *in vitro* immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures [J/OL]. Evidence – based complementary and alternative medicine (2009 – 01 – 12) [2016 – 04 – 05]. <http://www.doc88.com/p-3347741121785.html>. doi:101093/ecam/nep003.  
[5] RAJAGOPAL K, SASIKALA K, RAGAVAN B. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Nymphaea stellata* flowers in normal and alloxan diabetic rats [J]. Pharm Biol, 2008, 46: 654 – 659.  
[6] 赵军, 徐芳, 吉腾飞, 等. 睡莲属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(1): 141 – 147.  
[7] 邱多隆, 郑媛媛, 陈小芬, 等. 高速逆流色谱技术分离纯化天然产物中黄酮类化合物的研究进展 [J]. 分析化学评述与进展, 2011, 39(2): 269 – 275.  
[8] CHEN L, XIN X L, LAN R, et al. Isolation of cyanidin3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography [J]. Food chemistry, 2014, 152: 386 – 390.  
[9] 彭爱一, 曲学伟, 李慧, 等. 高速逆流色谱分离纯化九里香中的黄酮类化合物 [J]. 色谱, 2010, 28(4): 383 – 387.  
[10] 盛达成, 肖文军, 邵元元. 高速逆流色谱分离纯化荷叶黄酮槲皮素 [J]. 食品工业科技, 2011(4): 312 – 319.  
[11] 孙玉亮, 池建淮, 万毅, 等. 艾叶挥发油提取工艺的研究进展 [J]. 淮海医药, 2012, 30(4): 374 – 375.  
[12] 石琳, 阳元娥, 姚勇芳. 不同提取方法对艾叶挥发油成分的影响 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(35): 21641 – 21643.  
[13] 尹立影. 加压溶剂法提取红三叶草异黄酮及其单体分离研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 5.  
[14] 杨磊, 李彤, 张琳, 等. 加压溶剂法提取雷公藤甲素及其条件优化 [J].

化工进展, 2010, 29(2): 323 – 327.  
[15] 赵志鸿, 袁耿楠, 黄勇勇. 艾叶挥发油提取工艺的优化 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(35): 66 – 69.  
[16] 段蓉. 艾叶化学成分的提取、分离与含量测定研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2011: 6.  
[17] 易筠. 蕲艾鞣酸的提取分离、药理研究和结构鉴定 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2011: 15.

(上接第 94 页)