

## 千层塔提取物废液中 3,4-二羟基肉桂酸和 3,4-二甲氧基肉桂酸的提取

王婷婷<sup>1</sup>, 赵丽娟<sup>2</sup>, 何山<sup>1\*</sup>, 牟桐<sup>1</sup>, 原野<sup>1</sup>, 严小军<sup>1</sup>

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波中药制药有限公司, 浙江 宁波 315806)

**摘要:** 利用高速逆流色谱(HSCCC)对千层塔提取物废液中含量较高的 2 个同系物进行初步纯化分离, 再利用高效液相色谱(HPLC)对收集到的样品进行同系物分离, 得到 8 mg 化合物 A, 7 mg 化合物 B, 纯度均在 95%以上。经核磁共振仪(NMR)鉴定 2 个组分的化学结构, 结果证明, 千层塔提取物废液所含的主要成分即 2 个同系物分别为 3,4-二羟基肉桂酸和 3,4-二甲氧基肉桂酸。结论也同时证实高速逆流色谱与高效液相色谱联用能够有效分离样品所含同系物, 且工业提取千层塔有效成分后的废液中仍含有价值物质。

**关键词:** 高速逆流色谱; 高效液相色谱; 千层塔; 废液

中图分类号: O652.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 03-0026-05

千层塔(*Huperzia serrata*)为蛇足石杉的全草, 属于石杉科石杉属, 主要分布在四川、贵州、云南、浙江、福建等地。《四川中药志》中对千层塔的记载为:“性温, 味辛, 有小毒。”“收敛, 止血。治虫疮, 癆伤, 妇女白带, 痔疮出血。”现代临床医学研究表明, 千层塔提取物具有改善老年性记忆减退、治疗精神分裂症等等功效。

千层塔主要包括生物碱、三萜、黄酮等化学成分, 其中生物碱因其显著的胆碱酯酶抑制活性受到了广泛关注<sup>[1]</sup>。20 世纪 80 年代, 我国学者从千层塔中分离得到一种具有显著的抗乙酰胆碱酯酶活性的生物碱<sup>[2]</sup>。到 2002 年, 在千层塔中已经分离得到了生物碱 20 余种<sup>[3]</sup>。后续研究中, Huperzine V<sup>[4]</sup>、Huperzine C<sup>[5]</sup>、12-epilycodoline N-oxide<sup>[6]</sup>、7-hydroxylycopodine<sup>[6]</sup>、4,6alpha-dihydroxylycopodine<sup>[6]</sup>等生物碱又陆续从千层塔中分离出。

2011 年, 罗超等人<sup>[7]</sup>从千层塔中分离出了甾醇类化合物、黄酮醇类化合物、蒽醌类化合物以及有机酸醇类化合物。据分析, 千层塔挥发油含有大量的挥发性成分, 其中以 3-羟基-2-甲基戊二酸二甲

酯、苹果酸二甲酯、3-羟基-正丁酸甲酯等分子量较小的酯类与醇类物质较多, 且粗提物具有显著的舒缓神经、提神醒脑的作用<sup>[8]</sup>。

据报道, 咖啡酸、肉桂酸等植物酚类物质作为植物的次级代谢产物广泛存在于植物提取物中。咖啡酸现已被广泛应用于临床止血, 此外还具有显著的抗菌抗病毒和降血压作用<sup>[9]</sup>。并且, 肉桂酸现被用于合成治疗冠心病的药物、局部麻醉剂、杀菌剂和止血药等等。相关研究也证实, 肉桂酸具有显著的降低端粒酶活性、抗氧化活性以及抗辐射作用<sup>[10-12]</sup>。

千层塔提取物废液为工业提取千层塔有效成分之后残留的棕色油状体, 考虑到节约原材料、提高副产品得率, 且对千层塔提取物废液组分的研究未见报道。笔者对千层塔提取物废液成分进行研究, 发现废液中 2 个同系物的含量较高, 但由于杂质较多, 直接利用高效液相色谱(HPLC)制备分离较困难, 因此利用高速逆流色谱(HSCCC)和高效液相色谱(HPLC)联用的方法对废液中的主要成分进行纯化和分离, 并得到了最终产物 3,4-二羟基

收稿日期: 2013-03-03.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省钱江人才计划项目(2012R10068)。

第一作者: 王婷婷(1986—), 女, 河北张家口人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 天然药物化学。E-mail: happyjelly@yeah.net

\*通信作者: 何山(1982—), 男, 广东韶关人, 博士/讲师, 主要研究方向: 天然药物化学。E-mail: heshan@nbu.edu.cn

肉桂酸与3,4-二甲氧基肉桂酸.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

千层塔提取物废液由宁波市中药厂提供.

### 1.2 仪器设备

Waters 高效液相色谱仪(Waters 2998 紫外检测器-Waters2695 自动进样器); TBE-300B 高效逆流色谱仪; Bruker 500 MHz 核磁共振仪与 Bruker 400MHz 核磁共振仪; TSQ Quantum Access 液相色谱-三重四极杆质谱联用分析系统.

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 HPLC 检测分析千层塔提取物废液

高效液相色谱柱: YMC HPLC C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm). 柱温为 25℃. 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. 进样量 10 μL. 洗脱溶剂分别为水和甲醇. 梯度洗脱: 60 min 10%~90%. 检测波长为 320 nm.

#### 1.3.2 HSCCC 初步纯化千层塔提取物废液中同系物

高速逆流色谱仪进样为 300 mg. 转速为 900 r·min<sup>-1</sup>(厂商建议). 柱温为 25℃. 流速为 2.0 mL·min<sup>-1</sup>. 检测波长为 280 nm. 溶剂体系为正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水=1:1:1:1.

#### 1.3.3 HPLC 分离纯化 2 个同系物

高效液相色谱柱: X Bridge HPLC C18 柱(10 mm×250 mm, 10 μm). 柱温为 25℃. 流速为 3 mL·min<sup>-1</sup>. 进样量 600 μL. 洗脱溶剂分别为水和甲醇. 等度洗脱: 28%. 检测波长为 320 nm.

#### 1.3.4 NMR 鉴定 2 个同系物化学结构

核磁共振仪: Bruker 500 MHz; Bruker 400 MHz. 方法: ESI-MS, <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR.

## 2 结果与分析

### 2.1 HPLC 分析结果

如图 1 所示, 千层塔提取物废液中成分复杂, 在 35 min 之前有许多小峰出现, 化合物 A 和化合物 B 在 35 min 被洗脱出来, 但是色谱图显示, 这 2 种物质不仅两者之间出峰时间接近, 而且与前面的小峰出峰时间相差较小, 由此可见, 直接利用 HPLC 制备出纯物质较困难.

### 2.2 HSCCC 初步纯化样品中同系物图谱

如图 2 所示, 图中的化合物 A 和化合物 B 在

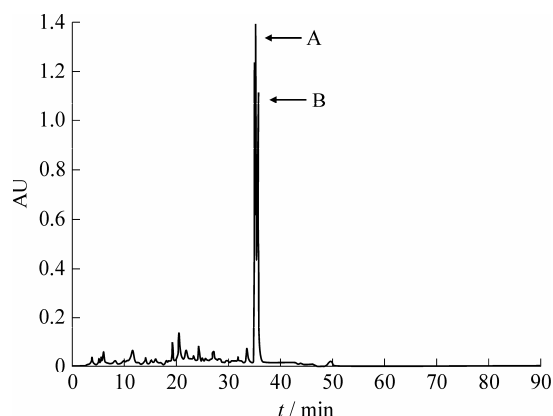


图1 千层塔提取物废液 320 nm 下的高效液相色谱图

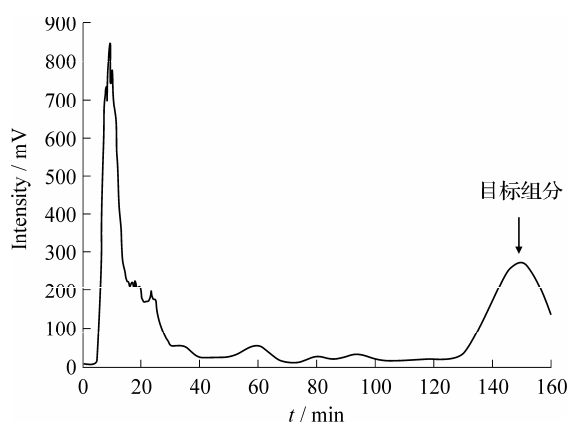


图2 千层塔提取物废液 280 nm 下的高速逆流色谱图

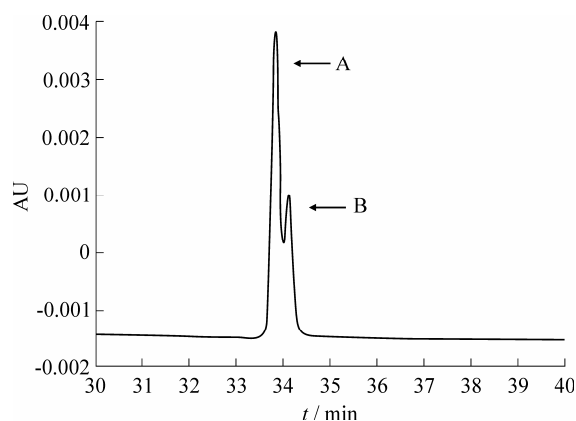


图3 高速逆流色谱 130~160 min 峰高效液相色谱图

HSCCC 中分离得到 1 个对称的峰形, 将该时间段的物质收集后利用 HPLC 进行检测, 得到图 3 所示的峰形. 比较上述图 1~图 3 可知, 经 HSCCC 初步纯化之后, 收集样品中, 化合物 A 和化合物 B 出峰时间段的前后较短时间内无明显杂质峰出现, 更有利于利用 HPLC 制备出纯物质.

### 2.3 HPLC 分离纯化结果

如图4~图7所示,在图3中出峰时间较接近的化合物A和化合物B经HPLC分离后得到较纯的化合物A和化合物B,二者出峰前后较短时间内无其他杂峰,而且光谱图也较明确。

### 2.4 NMR 鉴定 2 个同系物化学结构结果

化合物A为棕色油状物,ESI-MS ( $m/z$ ): ( $M^+ + Na$ ), 211.36,  $^1H$  NMR( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$ : 7.63(1H, d,  $J=15.96$  Hz), 7.41(1H, d,  $J=7.36$  Hz), 7.27(1H, S),

6.86Hz(1H, m), 6.29(1H, d,  $J=15.92$  Hz).  $^{13}C$  NMR, ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$ : 168.16, 158.35, 144.89, 144.79, 130.03, 129.91, 126.80, 115.96, 114.88. 与文献数据对比可知,化合物A为3,4-二羟基肉桂酸,其化学结构式如图8所示。

化合物B为棕色油状物,ESI-MS ( $m/z$ ): ( $M^+ + Na$ ), 238.41,  $^1H$  NMR( $CD_3OD$ , 500 MHz):  $\delta$ : 7.61(1H, d,  $J=15.85$  Hz), 7.18(1H, S), 7.06(1H, d,  $J=8.15$  Hz), 6.81(1H, d,  $J=8$  Hz), 6.35(1H, d,  $J=15.9$  Hz),

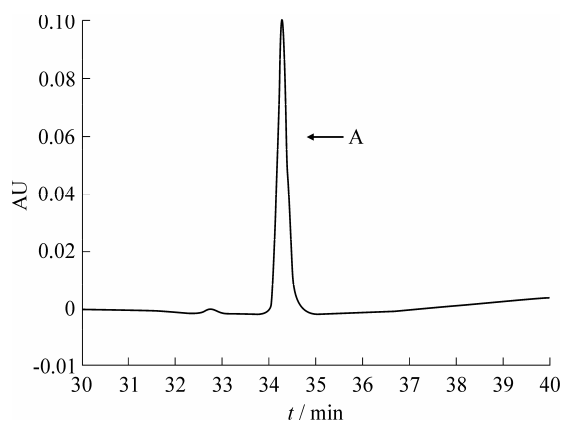


图4 千层塔提取物废液化合物A制备后纯物质的高效液相色谱图

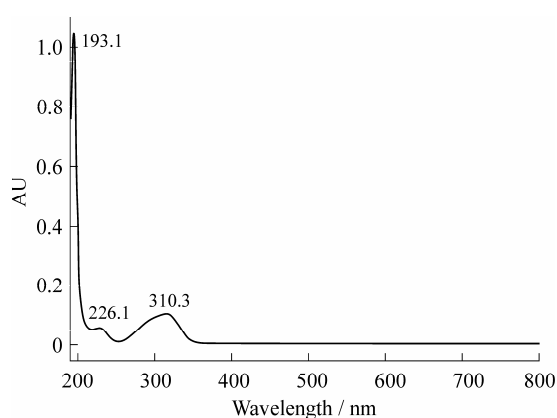


图5 千层塔提取物废液化合物A制备后纯物质紫外可见光谱图

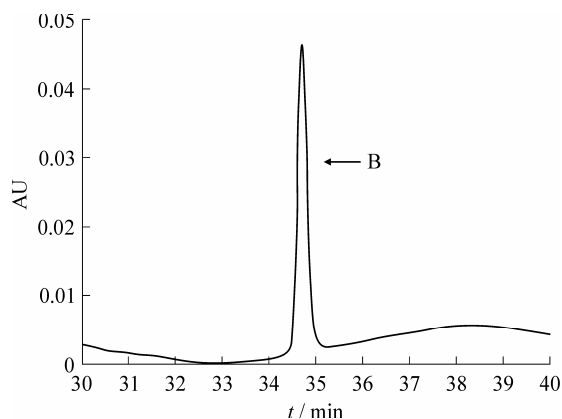


图6 千层塔提取物废液化合物B制备后纯物质高效液相色谱图

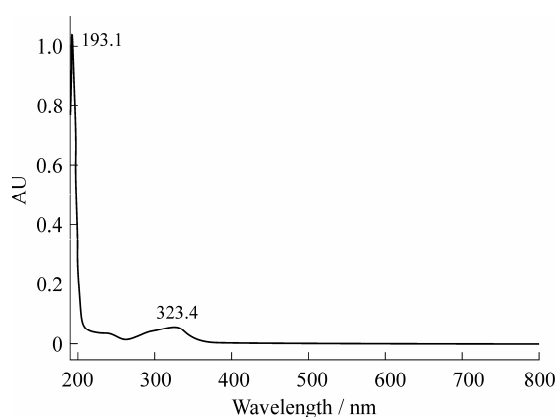


图7 千层塔提取物废液化合物B制备后纯物质紫外可见光谱图

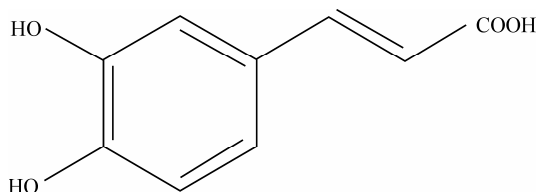


图8 化合物A的化学结构

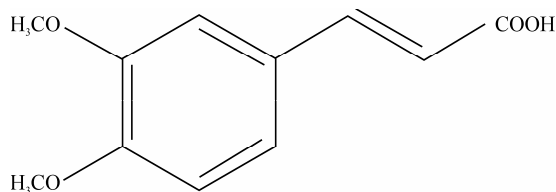


图9 化合物B的化学结构

3.89(3H, m), 3.76(3H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR, ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz):  $\delta$ : 169.76, 156.68, 149.42, 146.84, 127.71, 124.10, 116.52, 115.25, 111.80, 56.51, 52.02. 与文献数据对比可知, 化合物 B 为 3,4-二甲氧基肉桂酸, 其化学结构式如图 9 所示.

### 3 讨论

HSCCC 与 HPLC 是天然产物领域常用的分离技术<sup>[13]</sup>, 前者需要液态载体, 而后者需要固体支撑体. HSCCC 不借助固体支撑体, 根据样品组分在两相体系中的分配系数不同使组分分离, 具有高效、快速、制备量大、费用低等优点. 然而, HSCCC 在分离同系物时, 则存在分离纯度不高的问题. HPLC 制备方法的流动相通常是采用一种或多种有机溶剂的混合溶剂对样品进行洗脱, 样品组分不同而吸附能力不同, 因此出峰时间不同, 从而实现分离. HPLC 方法制备纯物质具有检测限低、测定范围广、纯度高的特点<sup>[14]</sup>. 但是, 也存在一些弊端: 样品成分复杂且含量较高时, 杂质峰易与目标产物峰重叠, 影响产物纯度; 使用试剂均为色谱级, 成本较高; 组分复杂的样品反复进样, 可能缩短色谱柱寿命. 本研究将 HSCCC 与 HPLC 相结合, 首先利用 HSCCC 纯化分离得到 2 个同系物, 再利用精度较高的 HPLC 将 3,4-二羟基肉桂酸和 3,4-二甲氧基肉桂酸纯化分离.

以往研究中, 通常使用石油醚、醋酸乙酯、氯仿和正丁醇等有机溶剂提取千层塔成分, 再浓缩至小体积进行研究<sup>[15-17]</sup>. 工业提取千层塔中有效成分之后的残留物通常废弃, 本研究对该种废液的成分进行分析, 再将其主要成分分离纯化并鉴定其结构, 在此之前未见其他报道. 前人有关千层塔成分的研究成果报道中, 迄今为止从千层塔中分离纯化得到 90 多种生物碱类化合物、30 多种三萜类化合物以及部分黄酮类化合物<sup>[18]</sup>. 从千层塔提取物废液中分离得到 3,4-二羟基肉桂酸与 3,4-二甲氧基肉桂酸为首次报道, 并且这 2 种物质均属于植物酚类, 是植物合成的次级代谢产物<sup>[19]</sup>.

### 4 结论

结果证实, 对于组分复杂、目标产物出峰时间较为接近的样品进行分离制备, 可以采用 HSCCC

与 HPLC 联用的方法. 首先选择合适的溶剂体系通过 HSCCC 初步分离样品, 去除样品中的杂质并使目标产物(同系物)得到初步纯化, 再经 HPLC 纯化制备, 经再次分析检测确定无杂质后利用 NMR 进行结构鉴定. 千层塔提取物废液中成分仍较复杂, 3,4-二羟基肉桂酸与 3,4-二甲氧基肉桂酸在废液中含量较高, 经分离纯化后可以得到纯物质. 实验结论也证明, 千层塔在经工业提取主要有效成分之后的废液中还存在大量的 3,4-二羟基肉桂酸与 3,4-二甲氧基肉桂酸, 因此, 可以采取合理工艺收集该部分产物.

### 参考文献:

- [1] 徐艳群. 千层塔非生物碱部分的化学成分研究[D]. 云南: 云南大学, 2008.
- [2] 浙江省药用植物志编写组. 浙江药用植物志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1980.
- [3] 郭斌, 徐玲玲, 尉亚辉, 等. 千层塔的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16):2018-2023.
- [4] Liu Huiqing, Tan Changheng, Jiang Shanhao, et al. *Huperzine H*, a new lycopodium alkaloid from *Huperzia serrata*[J]. Chinese Chem Lett, 2004, 15(3):303-304.
- [5] 袁珊琴, 赵毅民, 冯锐. 蛇足石杉碱丙的结构鉴定[J]. 药学学报, 2004, 39(2):116-118.
- [6] Tan Changheng, Zhu Dayuan. Lycopodine-type lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*[J]. Helv Chim Acta, 2004, 87(8):1963-1967.
- [7] 罗超, 陈重, 张文芳, 等. 蛇足石杉化学成分研究[J]. 中医药, 2011, 42(12):2407-2409.
- [8] 王婷婷, 赵丽娟, 何山, 等. 千层塔挥发油成分的气相色谱-质谱法(GC/MS)分析[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2012, 25(4):16-19.
- [9] 王峰, 刘敏, 杨连春, 等. 咖啡酸阿魏酸对高血压大鼠的降压作用[J]. 解放军药学报, 1999, 15(5):1-4.
- [10] 张婷, 周舫, 陈晓岚, 等. 肉桂酸对 A549 细胞分化及端粒酶活性的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2003, 38(6):905-907.
- [11] 赵春贵, 张立伟, 王晖, 等. 肉桂酸及其衍生物抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1):218-222.
- [12] 董欣, 宋金芳, 章琦, 等. 肉桂酸硫酯衍生物的合成及其辐射防护作用研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1997, 15(2):105-108.
- [13] 江和源, 程后坤, 杜琪珍. 高速逆流色谱法分离纯化茶黄素[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(4):30-35.
- [14] 黎飞, 王扬, 张成, 等. HPLC/ICP-MS 法测定水质中 Cr

- (III)和 Cr(VI)的研究[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2012, 25(3):13-16.
- [15] 蒋金和, 刘莹, 王利勤, 等. 蛇足石杉化学成分的研究[J]. 云南师范大学学报, 2010, 30(3):59-64.
- [16] 罗迎春, 李齐激, 杨元凤, 等. 黔产千层塔化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12):3172-3173.
- [17] 袁珊琴, 赵毅民. 蛇足石杉生物碱成分的研究(VI)[J]. 中草药, 2003, 34(7):595-596.
- [18] 袁经权, 周小雷, 王硕, 等. 蛇足石杉化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(2):399-407.
- [19] 郭安南. 绿茶、红茶和咖啡中几种功能成分的分离鉴定及抗氧化性能的比较[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2011, 14(1):18-23.

## Extraction of 3,4-Dihydroxy Cinnamic Acid and 3,4-Dimethoxy Cinnamic Acid from Waste Extracted from *Huperzia serrata*

WANG Ting-ting<sup>1</sup>, ZHAO Li-juan<sup>2</sup>, HE Shan<sup>1\*</sup>, MOU Tong, YUAN Ye<sup>1</sup>, YAN Xiao-jun<sup>1</sup>

( 1.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Ningbo Traditional Chinese Pharmaceutical Co. Ltd, Ningbo 315806, China )

**Abstract:** High-speed counter-current chromatography(HSCCC) is first used preliminarily to purify two homologues with higher content in waste from extracts of *Huperzia serrata*, and high performance liquid chromatography(HPLC) is used to separate the two components. 8 mg compound A and 7 mg compound B are obtained, and purity of both compounds reaches more than 95%. Then chemical structure of the two components is identified using the nuclear magnetic resonance apparatus(NMR). The results show that the two components are 3,4-dihydroxy cinnamic acid and 3,4-dimethoxy cinnamic acid. Conclusion can be made that the homologues can be purified by combination of high-speed counter-current chromatography and high performance liquid chromatography, and there still are valuable substances in waste from extracts of *Huperzia serrata*.

**Key words:** high-speed counter-current chromatography; high performance liquid chromatography; *Huperzia serrata*; waste

(责任编辑 章践立)