

# 杜仲醇的制备及其表征

郑阳<sup>1</sup>, 彭胜<sup>1</sup>, 史丽娟<sup>1</sup>, 彭密军<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室 杜仲湖南省工程实验室,  
张家界 427000; <sup>2</sup>湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 长沙 410000

**摘要:** 采用大孔吸附树脂-制备液相色谱联用技术分离制备杜仲醇。以杜仲叶为原料, 采用超声波辅助提取, 提取液经过正丁醇萃取、D101 大孔吸附树脂柱分离纯化后, 再通过反相半制备液相色谱分离, 以 V(甲醇):V(水) = 15:85 为流动相进行洗脱, 制备得到杜仲醇单体。采用紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振波谱(NMR)及液相色谱-质谱联用(LC-MS)等方法对所得单体进行了结构验证。液相色谱法分析检测表明制备所得杜仲醇纯度达 95.12%。

**关键词:** 杜仲叶; 杜仲醇; 制备; 结构表征

中图分类号: R284.1; R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.016

## Preparation and Characterization of Eucommiol

ZHENG Yang<sup>1</sup>, PENG Sheng<sup>1</sup>, SHI Li-juan<sup>1</sup>, PENG Mi-jun<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Hunan Engineering Laboratory for *Eucommia ulmoides* Oliv., Jishou University, Zhangjiajie 427000, China; <sup>2</sup>Hunan Co-Innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410000, China

**Abstract:** In this study, eucommiol was isolated and purified from leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. by liquid-liquid extraction, macroporous resin adsorption and semi-preparative HPLC. Firstly, the crude extract was extracted by ultrasonic-assisted extraction using n-butanol as extraction solvent. Secondly, the n-butanol extract was separated by D101 macroporous resin column. Finally, eucommiol was prepared by reverse phase semi-preparative HPLC. The mobile phase of semi-preparative HPLC was methanol-water (V: V = 15: 85). The structure of the isolated eucommiol was subsequently confirmed by ultraviolet spectrophotometry (UV), infrared absorption spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). HPLC analyses were performed to test and verify the purity of eucommiol (95.12%).

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves; eucommiol; preparation; structural characterization

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是我国名贵经济树种<sup>[1]</sup>, 《神农本草经》列为上品<sup>[2]</sup>。研究表明, 杜仲功效成分主要为环烯醚萜类、木脂素类、苯丙素类以及多糖类和氨基酸等营养成分<sup>[3,4]</sup>, 具有调节血压血脂、抗菌、抗病毒、抑制肿瘤细胞、抗氧化、延缓衰老等药理作用<sup>[5]</sup>。迄今为止, 杜仲中已知的环烯醚萜类化合物有 24 种<sup>[6]</sup>, 杜仲醇 (eucommiol, EU) 是环烯醚萜类化合物开环之后的产物, 最早由日本学者 Bianco 等发现并命名, 为杜仲中极具特异性的

裂环环烯醚萜类化合物<sup>[7,8]</sup>, 结构式见图 1。研究表明杜仲醇对肉芽形成及胶原蛋白的合成具有促进作用<sup>[9,10]</sup>。虽然杜仲醇是杜仲中极具特异性的裂环环烯醚萜类化合物, 但是对其特异性的研究和单体的分离制备工艺少有报道。本文以本地廉价易得的杜仲叶为原料对杜仲醇的制备进行了研究, 以期对杜仲环烯醚萜类化合物单体活性研究提供基础。

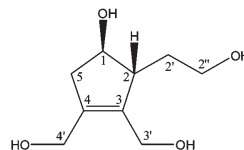


图 1 杜仲醇分子结构

Fig. 1 Chemical structures of eucommiol

收稿日期: 2015-8-18

接受日期: 2015-10-15

基金项目: 湖南省教育厅高校产业化培育项目 (11CY015); 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室开放项目 (JDZ201501); 吉首大学校级科研项目 (14JDY056)

\* 通讯作者 E-mail: pengmj163@163.com

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

杜仲叶于2013年11月份采集于吉首大学张家界校区,经廖博儒研究员鉴定为杜仲属杜仲;将采集的杜仲叶,经微波杀青,50℃烘干,粉碎,过80目筛,备用。杜仲醇标准品(自制),甲醇为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司);D-101大孔吸附树脂(郑州勤实科技有限公司);GF<sub>254</sub>薄层层析硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司);正丁醇、95%乙醇等均为国产分析纯。

### 1.2 仪器和设备

Agilent-1260型高效液相色谱(HPLC)仪,美国Agilent;LC3000型半制备液相色谱仪,北京创新通恒有限公司;Nicolet iS10型红外光谱仪,美国Thermo Scientific;LCMS-2020型液质联用,日本岛津;400M DEGUO型核磁共振,美国BRUKER;KQ-250E型超声波清洗器,中国昆山超声仪器有限公司;AEL-405M型万分之一天平,日本SHIMADZU;R215型旋转蒸发仪,德国Heidolph;GZX-9146-MBE数显鼓风干燥箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

## 2 实验方法

### 2.1 杜仲醇的检测

#### 2.1.1 TLC检测方法

展开剂:V(氯仿):V(甲醇)=7:3,显色剂:10%硫酸-乙醇溶液,110℃加热后即显粉紫色。

#### 2.1.2 HPLC检测方法

色谱条件:色谱柱为Kromasil 100-5C<sub>18</sub>(250×4.6 mm,5 μm);流速1.0 mL/min;柱温30℃;进样量20 μL。流动相:V(甲醇):V(水)=10:90;检测波长210 nm。

### 2.2 杜仲醇的提取

称取杜仲叶原料1.5 kg,加入体积分数为30%的乙醇,料液比为1:10(g:mL),超声波辅助提取1 h,提取2次,提取液减压浓缩后得粗提液780 mL。粗提液加两倍体积的体积分数为95%的乙醇进行两次醇沉,减压浓缩后得浓缩液,备用。高效液相检测提取液中的杜仲醇时,因粗提液中杜仲醇浓度较低不易被检出且出峰处易被其他物质干扰,所以后续试验中杜仲醇的测定都经大孔吸附树脂纯化后再定量检测。

### 2.3 杜仲醇的纯化

#### 2.3.1 液液萃取

取适量体积的浓缩液,选用乙酸乙酯、正丁醇溶液进行萃取,等体积反复萃取3次后,分别合并萃取层,减压浓缩,真空干燥得萃取物。高效液相色谱法检测,结果表明杜仲醇主要位于正丁醇萃取层中,故后续实验分离纯化正丁醇萃取物。

#### 2.3.2 大孔树脂分离

D101大孔树脂加过量的体积分数为95%的乙醇浸泡24 h,浸泡后的大孔树脂装入Φ40×450 mm的层析柱中,95%乙醇洗脱至醇与任意比例水混合均不产生浑浊为止,然后水洗树脂柱至无醇味。湿法上样,正丁醇萃取物加水溶解后,缓慢倒入装有已处理好的D101大孔吸附树脂柱(柱体积为440 mL),水洗脱,控制洗脱流速为1 VB/h,220 mL为一份,收集Fr-1至Fr-12共6倍柱体积的流份。薄层层析法跟踪检测,合并相同组分,减压浓缩后,真空干燥备用。

#### 2.3.3 半制备色谱纯化

2.3.2得到的样品用半制备液相色谱柱进行分离。半制备液相色谱的色谱条件:色谱柱为Daisogel C<sub>18</sub>(250×20 mm,10 μm);流速5.0 mL/min;柱温为室温;进样量1 mL。流动相:V(甲醇):V(水)=15:85;检测波长210 nm。分别收集不同保留时间组分。分别收集洗脱液,旋蒸浓缩真空干燥,得到保留时间为19 min左右的化合物并对其进行检测。

### 2.4 杜仲醇的结构鉴定方法

对制备所得化合物进行UV、IR、LC-MS、NMR检测,确定其化学结构。

## 3 结果与讨论

### 3.1 纯化结果

分离纯化所得样品均采用高效液相色谱进行检测,液相色谱条件见2.1.2,此条件下杜仲醇的出峰时间为5.1 min。各阶段所得样品的色谱图如图2所示。

#### 3.1.1 液液萃取分离结果

从杜仲醇的结构式中可知其有4个羟基,易溶于水、甲醇、乙醇等极性较大的溶剂。选取中等极性的乙酸乙酯和正丁醇对粗提液进行液液萃取。液相检测乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物,结果显示杜仲醇集中在正丁醇萃取物中。杜仲叶乙醇提取物中杜仲醇含量为0.3871%,液相谱图见图2-A,采用正丁醇溶液进行萃取分离后,正丁醇萃取物中杜仲醇

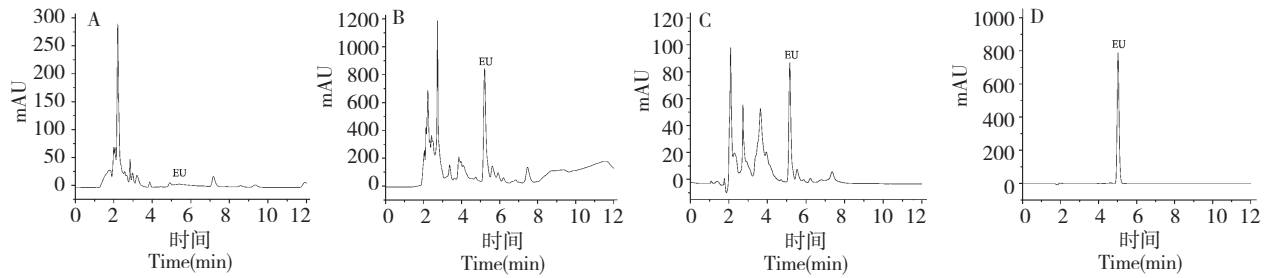


图2 杜仲叶乙醇提取液(A)、正丁醇萃取物(B)、D101大孔吸附树脂处理后样品(C)及半制备液相得杜仲醇样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of *E. ulmoides* ethanol extract (A), n-butanol fraction (B), sample enriched by D101 macroporous resin (C) and sample purified by semi-preparative HPLC (D)

的含量为1.154%，液相色谱图见图2-B。虽正丁醇萃取对杜仲醇的分离富集效果有限，但该步除去了较多的杂质，利于后续大孔吸附树脂的纯化操作。

### 3.1.2 大孔吸附树脂分离结果

选择D101大孔吸附树脂对正丁醇层萃取物进行分离纯化，采用薄层层析法进行跟踪检测，薄层层析法见“2.1.1”。薄层层析法检测结果显示杜仲醇主要位于Fr-5至Fr-8流份中，合并后液相检测得其含量为8.302%。与正丁醇萃取物相比，含量明显提高。大孔吸附树脂分离后样品的液相色谱图见图2-C。

### 3.1.3 半制备液相分离结果

经大孔吸附树脂柱得到的流份中环烯醚萜类化合物含量较高，得到了有效的富集，但进一步分离纯化杜仲醇还需结合其他分离手段。本文采用半制备液相色谱法进行进一步的分离制备。半制备液相色谱条件见“2.3.3”，制备所得流份利用高效液相色谱进行跟踪检测。制备得到的杜仲醇样品经过减压浓缩，真空干燥，取样检测，半制备液相所得样品的液相色谱图见图2-D。采用色谱峰面积归一化法计算制备所得杜仲醇纯度为95.12%。

## 3.2 结构鉴定

制备所得杜仲醇为浅褐色油状液体；溶于水、甲醇、乙醇、正丁醇等溶剂；UV ( $H_2O$ )  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) 208 (2.62)；IR  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ): 3373.20 (-OH), 2921.07, 1605.18, 1428.56 (C=C), 1255.10, 1181.62, 984.67, 892.59； $^1H$  NMR ( $D_2O$ , 400MHz)  $\delta$ : 4.31 (1H, d, H-3'a), 4.24 (2H, q, H-4'), 4.17 (1H, m, H-1), 4.13 (1H, d, H-3'b), 3.72 (2H, t, H-2''), 2.88 (1H, dd, H-5b), 2.73 (1H, m, H-2), 2.33 (1H, dd, H-5a), 1.86 (1H, m, H-2'b), 1.52 (1H, m,

H-2'a)； $^{13}C$  NMR ( $D_2O$ , 100 MHz)  $\delta$ : 138.139 (C-4), 136.306 (C-3), 74.459 (C-1), 60.061 (C-2''), 57.113 (C-4'), 55.374 (C-3'), 52.087 (C-2), 41.406 (C-5), 32.290 (C-2')；ESI MS ( $m/z$ ):  $[M + Na]^+ = 211.15$ ，显示相对分子质量为188。其IR、 $^1H$  NMR、 $^{13}C$  NMR和质谱数据与文献报道基本一致<sup>[9]</sup>，该化合物确定为杜仲醇。

## 4 结论

采用正丁醇萃取、D101大孔吸附树脂吸附纯化、半制备液相色谱法分离制备杜仲中特异性化合物杜仲醇，不仅操作方便，且制备所得高纯度的单体样品可用于后续工艺探索。制备得到的化合物经光谱、质谱和核磁等定性手段确定为杜仲醇，液相色谱法定量分析表明制备所得杜仲醇的纯度达95.12%。杜仲醇作为杜仲中特有的裂环环烯醚萜类化合物，制备及提取工艺报道较少，该方法为在杜仲中分离高纯度单体化合物提供了参考。

### 参考文献

- Li FD (李芳东), Du HY (杜红岩). *Eucommia ulmoides* Oliv (杜仲). Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2001. 1-2.
- Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). Traditional Chinese Medicine Dictionary (中药大辞典). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1977. Volume I, 1031-1044.
- Lv Q (吕强), Peng MJ (彭密军), Lan WJ (兰文菊), et al. Effect of processing methods on the content of several active ingredients in barks and leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业), 2012, 32: 75-79.

(下转第1421页)