

苏木水提物化学组成分析及有效成分的纯化结构表征

李争春, 郭彩霞, 白宝清, 任英瑜, 孟 颖, 王志娟, 张生万*

山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 对苏木 *Caesalpinia sappan* 水提物中化学成分进行分析及有效成分的结构表征。方法 采用高效液相色谱串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 分析苏木水提物中的化学成分, 考察苏木水提物对膀胱癌 T24 细胞的杀伤作用, 使用柱色谱法对其中主要化学成分巴西苏木素进行分离纯化以及使用核磁共振 (NMR) 进行结构表征。结果 经 HPLC-MS/MS 对苏木水提物进行分析, 共检出 16 种化合物, 鉴定出 14 种, 其主要成分分别为槲皮素、巴西苏木素、异甘草素、原苏木素 B、brazilin A、3'-去氧苏木醇、4-O-hydroxybrazilin、苏木查耳酮、(αS)-α, 2', 4, 4'-tetrahydroxydihydrochalcone 等。其中巴西苏木素针对膀胱癌 T24 细胞的杀伤试验结果表明癌细胞的杀伤率与主要成分巴西苏木素浓度呈正相关。通过分离纯化得到了苏木水提物中巴西苏木素的纯品。结论 为苏木水提物中化学成分的鉴定提供了新的方法, 为今后研究苏木的药用功能提供了依据。

关键词: 苏木; 巴西苏木素; 高效液相色谱串联质谱法; 槲皮素; 异甘草素; 原苏木素 B; 苏木查耳酮

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)08-1063-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.005

Component analysis, and purification and characterization of active ingredients in aqueous extract from *Sappan Lignum*

LI Zheng-chun, GUO Cai-xia, BAI Bao-qing, REN Ying-yu, MENG Ying, WANG Zhi-juan, ZHANG Sheng-wan

School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To investigate, purify, and characterize the active ingredients in the aqueous extract from *Sappan Lignum* (the dry heartwood of *Caesalpinia sappan*). **Methods** HPLC-MS/MS was used in the analysis of the chemical constituents in the aqueous extract from *Sappan Lignum*. Then the inhibitory effect of the aqueous extract from *Sappan Lignum* on human bladder tumor cell line T24 *in vitro* was studied. The main chemical constituents were purified by column chromatography and their structures were characterized by NMR. **Results** In the aqueous extract from *Sappan Lignum*, 16 compounds were separated and detected well by HPLC-MS/MS and 14 were identified. The main compounds were quercetin, brazilin, isoliquiritigenin, protosappanin B, brazilin A, 3'-deoxysappanol, 4-O-hydroxybrazilin, sappanchalcone, and (αS)-α, 2', 4, 4'-tetrahydroxy dihydrochalcone. The killing rate of cancer cells was positively correlated to the concentration of the main component which was brazilin. At last, according to the purification by column chromatography and the structural characterization by NMR, we obtained the pure brazilin in the aqueous extract from *Sappan Lignum*. **Conclusion** The research offers a new method for the identification of the components in the aqueous extract from *Sappan Lignum* and provides a basis for the medicinal functions of *Sappan Lignum* for future study.

Key words: *Sappan Lignum*; brazilin; HPLC-MS/MS; quercetin; isoliquiritigenin; protosappanin B; sappanchalcone

苏木 *Sappan Lignum* 是豆科云实属植物苏木 *Caesalpinia sappan* L. 的干燥心材, 是我国的传统中药, 《中国药典》2010 年版记载其具有活血祛瘀、消肿止痛的功效^[1]。近代国内外学者发现苏木还具有抗病毒、免疫抑制、抗肿瘤等作用^[2-3]。苏木的化学成分主要包括巴西苏木素类、原苏木素类、查耳酮

类及高异黄酮化合物衍生物等类型化合物^[4-5]。巴西苏木素是苏木的主要成分之一, 曾报道其具有多种生物活性^[6]。如今巴西苏木素由于其对某些肿瘤细胞较强的杀伤效果再次得到关注^[7]。此外, 苏木中的其他成分被报道具有较强的抗氧化活性及抗炎作用^[8]。因此, 分析苏木的化学组成及有效成分

收稿日期: 2014-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171748); 山西省国际科技合作项目 (2013081051); 山西省普通高校特色重点学科建设项目

作者简介: 李争春 (1988—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物及食品化学。Tel: (0351)7011787 E-mail: 342004283@qq.com

*通信作者 张生万 Tel: (0351)7011787 E-mail: zswan@sxu.edu.cn

的结构表征对阐明其药效物质基础及作用机制具有重要意义。

目前应用于苏木药材中化学成分的测定方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法^[9]等,而使用高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)对其进行检测的文章鲜有报道。本实验首次采用HPLC-MS/MS技术对苏木水提物进行成分分析,并考察了主要成分巴西苏木素对膀胱癌细胞T24的杀伤作用,利用柱色谱分离得到苏木水提物中巴西苏木素纯品,通过核磁共振对其进行了结构表征,为苏木水提物中活性成分的确定及药用功能提供了一定的理论基础及实验依据。

1 仪器与材料

美国Agilent 1200 HPLC仪,配有四元泵、在线真空脱气机、柱温箱和可变波长扫描紫外检测器(VWD);LTQ XL型质谱仪(Thermo-fisher公司),配电喷雾电离(ESI)离子化源;CX21FSI型普通光学显微镜(日本Olympus公司),BRUKER—600 Hz核磁共振仪;真空冷冻干燥机FD—1A—80(北京博医康实验仪器有限公司);色谱缸(120 mm×60 mm);玻璃毛细点样管(内径0.5 mm,管长100 mm,上海汇润物资有限公司);旋转蒸发仪R2002(杭州瑞佳精密科学仪器有限公司);玻璃色谱柱(Φ400 mm×40 mm,自制);WFH—203B紫外分析仪(上海驰唐电子有限公司);GF₂₅₄硅胶板(青岛海洋化工厂分厂)。

实验用水为Milli-Q (Millipore, bedford, MA)超纯水;甲醇(色谱纯, TEDIA);DMSO (Sigma);台盼蓝(Sigma);巴西苏木素对照品(成都曼思特生物科技公司,质量分数大于99%);柱色谱用硅胶(160~200目,青岛海洋化工厂分厂);石油醚、醋酸、醋酸乙酯均为分析纯。膀胱癌T24细胞(中国科学院上海生命科学研究院)。

苏木饮片购自安徽省万生中药饮片有限公司,批号001206,产地湖南,经山西省食品药品检验所张学悟主任药师鉴定为豆科云实属植物苏木*Caesalpinia sappan* L. 的干燥心材。

2 方法

2.1 样品制备

干燥的苏木心材1 kg,剪碎后8倍去离子水浸泡,煮沸后常压回流提取3次,每次1 h,合并提取液,继续加热浓缩至1 L,冷却后滤过,使用冰箱预冻后置于真空冷冻干燥机,干燥得到苏木水提物的粗粉。

2.2 HPLC-MS/MS 分析条件

液相色谱条件: Waters sunfire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为甲醇(A)-0.2%甲酸水溶液(B);梯度洗脱程序: 0~3 min, 20%~28% A; 3~10 min, 28%~30% A; 10~30 min, 30%~45% A; 30~55 min, 45%~60% A; 55~60 min, 60% A。体积流量1 mL/min;柱温35℃;进样量20 μL。

质谱条件: He作为辅助气和鞘气;辅助气: 1.92 MPa;鞘气: 6.30 MPa;喷雾电压: 2.5 kV;毛细管温度: 300℃;扫描范围 *m/z*: 50~1 200;正离子模式检测;柱后分流比1:1;选取一级质谱最高峰进行CID碎片扫描。

2.3 细胞杀伤率的测定

将膀胱癌T24细胞消化、离心,用生理盐水制成细胞悬液;将不同条件下得到的提取物用的生理盐水配成质量浓度20 mg/mL溶液;然后将细胞悬液分成7组各取100 μL,每组中分别加入900 μL质量浓度为20 mg/mL溶液的1~7号苏木水提物(经HPLC面积归一化测定其巴西苏木素质量分数分别为44.75%、45.38%、47.76%、49.72%、51.71%、53.13%、55.84%)。选用0 min作为对照,将每组加入药物的细胞分别于20、40、60、80、100 min吸取100 μL的细胞悬液,加入等量的台盼蓝染液,显微镜下随机计数200个细胞,分别计数活细胞(未着色细胞)和死细胞(着色细胞)数,按公式(细胞杀伤率=死亡细胞数/细胞总数)计算细胞杀伤率,每组计数4次,取平均值。

2.4 苏木水提物主要成分的分离及鉴定

用乙醇溶解巴西苏木素对照品,点样于GF₂₅₄薄层板上,氯仿-丙酮-甲酸(8:4:1)展开,待溶剂挥发后使用紫外分析仪观察,待用。取15 g苏木水提物粗粉用硅胶柱色谱分离纯化。先用醋酸乙酯-石油醚-醋酸(20:100:1)洗脱,薄层色谱法跟踪检测。出现巴西苏木素斑点时改用醋酸乙酯-石油醚-醋酸(20:60:1)洗脱,合并出现巴西苏木素的相同流分,减压蒸除溶剂。将干燥后的流分再次经硅胶柱色谱柱,醋酸乙酯-石油醚-醋酸(20:100:1)再次洗脱。薄层色谱法跟踪,合并出现巴西苏木素的相同流分,减压蒸干,得到巴西苏木素1.37 g(经高效液相色谱法面积归一化测定其质量分数大于99%),经NMR和文献比较确认其结构。

3 结果与分析

3.1 苏木化学成分分析

按“2.1”项下方法制备得水提物(粗粉),在“2.2”项 HPLC-MS/MS 分析条件下进行化学成分分析,其总离子流色谱见图1,质谱解析结果见表1。

结合文献报道,对苏木中的14种化合物进行鉴定,其峰面积之和占到总离子流色谱图总峰面积的

97.37%,其主要成分分别为槲皮素、巴西苏木素、异甘草素、原苏木素 B、brazil A、3'-去氧苏木醇、4-O-hydroxybrazilin、苏木查耳酮、(α S)- α , 2', 4, 4'-tetrahydroxy dihydrochalcone 等。由总离子流色谱图可知苏木水提物中主要成分为巴西苏木素(t_R =9.50 min)和原苏木素 B (t_R =11.23 min),与文献报道中高效液相色谱法测得的苏木水提物主要成分结果一致^[9]。

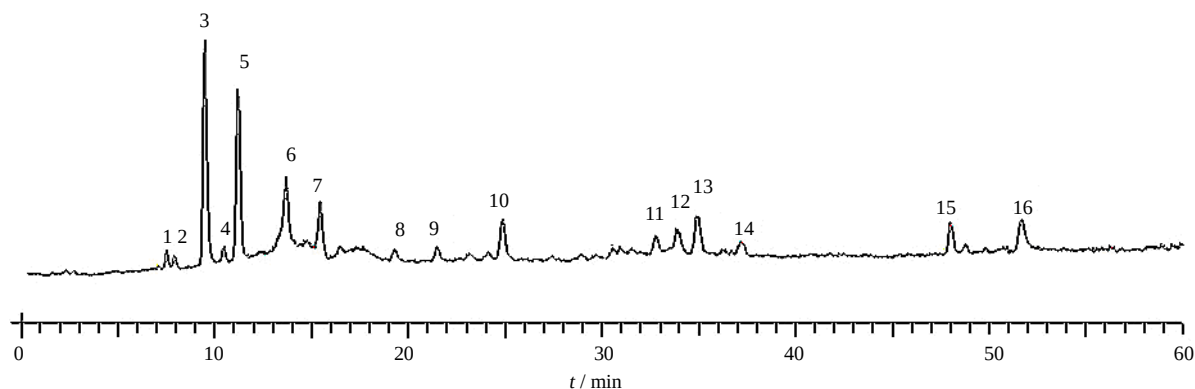


图1 苏木水提物正离子检测模式总离子流图

Fig. 1 TIC chromatogram in positive ion for aqueous extract from *Sappan Lignum*

表1 苏木水提物的 HPLC-MS/MS 数据及其结构鉴定结果

Table 1 Structure identification and HPLC-MS/MS data of aqueous extract from *Sappan Lignum*

峰号	t_R /min	相对分子质量	一级质谱	二级质谱(相对丰度/%)	结构鉴定
1	7.49	304	327.11 [M+Na] ⁺	309.12 [M+Na-H ₂ O] ⁺ (100), 296.83 [M+Na-OCH ₂] ⁺ (35)	苏木醇或表苏木醇 ^[4]
2	7.95	302	325.03 [M+Na] ⁺	306.95 [M+Na-H ₂ O] ⁺ (100)	槲皮素 ^[5]
3	9.50	286	309.08 [M+Na] ⁺	138.97 [M+H-148] ⁺ (100), 277.47 [M+Na-32] ⁺ (77)	巴西苏木素 ^[10]
4	10.48	256	297.14 [M+Na+H ₂ O] ⁺	281.09 [M+Na+H ₂ O-O] ⁺ (100), 238.98 [M+H-H ₂ O] ⁺ (40)	异甘草素 ^[11]
5	11.23	304	327.17 [M+Na] ⁺	288.54 [M+H-O] ⁺ (100)	原苏木素 B ^[11]
6	13.67	302	357.12 [M+Na+H ₃ COH] ⁺	324.98 [M+Na] ⁺ (100), 339.09 [M+Na+H ₃ COH-H ₂ O] ⁺ (15)	苏木酮 B (3R) 或 3,7-二羟基-3-(3',4'-二羟基苄基)-苯并二氢呋喃-4-酮 ^[5]
7	15.46	302	357.16 [M+Na+H ₃ COH] ⁺	324.98 [M+Na] ⁺ (100), 339.02 [M+Na+H ₃ COH-H ₂ O] ⁺ (25)	苏木酮 B (3R) 或 3,7-二羟基-3-(3',4'-二羟基苄基)-苯并二氢呋喃-4-酮 ^[5]
8	19.34	318	341.13 [M+Na] ⁺	294.98 [M+Na-H ₂ O-CO] ⁺ (100), 322.84 [M+Na-H ₂ O] ⁺ (90), 273 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ (65)	brazil A ^[12]
9	21.47	288	311.08 [M+Na] ⁺	293.00 [M+Na-H ₂ O] ⁺ (100)	3'-去氧苏木醇 ^[13]
10	24.87	302	325.11 [M+Na] ⁺	306.85 [M+Na-H ₂ O] ⁺ (100), 287.09 [M+H-O] ⁺ (20)	4-O-hydroxybrazilin ^[14]
11	32.75	586	609.22 [M+Na] ⁺	325.00 [M+Na] ⁺ (100), 306.91 [M+Na-H ₂ O] ⁺ (35)	原苏木素 E-1 或原苏木素 E-2 ^[14]
12	33.96	286	309.12 [M+Na] ⁺	276.74 [M+Na-32] ⁺ 100, 280.98 [M+Na-CO] ⁺ (80)	苏木查耳酮 ^[8]
13	34.97	586	609.19 [M+Na] ⁺	324.97 [M+Na] ⁺ (100), 307.00 [M+Na-H ₂ O] ⁺ (40)	原苏木素 E-1 或原苏木素 E-2 ^[14]
14	37.22	604	627.15 [M+Na] ⁺	324.99 (100)	未知
15	47.99	274	274.28 [M+H] ⁺	256.18 [M+H-H ₂ O] ⁺ (100)	(α S)- α , 2', 4, 4'-tetrahydroxydihydrochalcone ^[13]
16	51.68	376	399.25 [M+Na] ⁺	325.07 (100), 302.38 (20)	未知

3.2 细胞的杀伤作用

为了考察苏木水提取物 1~7 号中主要成分巴西苏木素对膀胱癌 T24 细胞的杀伤作用,以巴西苏木素相对质量分数作为横坐标(X),T24 细胞杀伤率作为纵坐标(Y),对不同时间(20、40、60、80、100 min)的结果作相关图,如图 2 所示。其相关系数分别为 0.794 1、0.934 7、0.954 8、0.954 4、0.953 9。

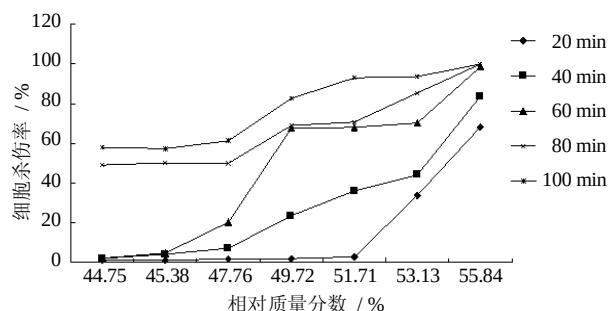


图2 巴西苏木素相对质量分数与T24细胞杀伤率在不同时间下相关图

Fig. 2 Correlation between relative content of brazilin and killing rate of T24 cell at different times

由图 2 可知,细胞悬液中加入苏木水提取物作用 20 min,巴西苏木素相对质量分数小于 51.71%时苏木水提取物对膀胱癌 T24 细胞的杀伤作用甚微;巴西苏木素相对质量分数 $\geq 53.13\%$ 时,对 T24 细胞的杀伤作用明显提高。细胞悬液中加入苏木水提取物作用 40 min,巴西苏木素相对质量分数小于 49.72%时苏木水提取物对 T24 细胞的杀伤作用较低,而巴西苏木素相对质量分数由 49.72%逐步提高时,苏木水提取物对 T24 细胞的杀伤作用随着相对质量分数的增加而逐渐提高。细胞悬液中加入苏木水提取物作用 60 min,苏木水提取物对 T24 细胞的杀伤作用同样是从巴西苏木素相对质量分数在 49.72%及以上时有了显著提高。细胞悬液中加入苏木水提取物作用 80 min 与 100 min,苏木水提取物对 T24 细胞作用的杀伤率在巴西苏木素相对质量分数在 44.75%时分别达到 49.05%和 58.01%,相对质量分数达到 49.72%之前,苏木水提取物对 T24 细胞的杀伤作用随巴西苏木素相对质量分数的增高变化不大,在相对质量分数大于 49.72%后,苏木水提取物对 T24 细胞的杀伤作用明显提高;在巴西苏木素相对质量分数达到 55.84%时,细胞杀伤率均达 100%。综上所述,将苏木水提取物加入 T24 细胞悬液,其死亡率随着作用时间的延长而增大,随着巴西苏木素相对质量分数的增高,膀

胱癌细胞 T24 杀伤率明显提高,呈正相关性;巴西苏木素相对质量分数大于 50%时,苏木水提取物对细胞杀伤作用更为显著。该结果表明,主要成分巴西苏木素对癌细胞杀伤率具有显著影响,是苏木水提取物的主要抗癌有效成分。

3.3 核磁共振表征结果

苏木水提粗粉经柱色谱分离纯化后得到了橙黄色无定形粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.14 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1), 6.42 (1H, dd, $J = 8.4$, 2.4 Hz, H-2), 9.24 (1H, s, 3-OH), 6.20 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 3.57 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6), 3.85 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6), 5.28 (1H, s, 6'-OH), 2.88 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 2.71 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 6.54 (1H, s, H-8), 8.62 (1H, s, 9-OH), 6.63 (1H, s, H-11), 3.84 (1H, s, H-12); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 130.8 (C-1), 114.2 (C-1'), 108.6 (C-2), 153.9 (C-3), 102.6 (C-4), 155.7 (C-4'), 69.5 (C-6), 76.2 (C-6'), 41.8 (C-7), 129.6 (C-7'), 111.9 (C-8), 144.1 (C-9), 143.8 (C-10), 111.5 (C-11), 135.4 (C-11'), 49.4 (C-12)。以上波谱数据与文献报道一致^[10],故鉴定分离得到的单体化合物为巴西苏木素。

4 讨论

本实验采用 HPLC-MS/MS 对苏木中的化学成分进行定性分析,通过对质谱信息分析,并参考相关文献,初步确定了 16 种化合物,其中的主要成分有槲皮素、巴西苏木素、异甘草素、原苏木素 B、brazil A、3'-去氧苏木醇、4-O-hydroxybrazilin、苏木查耳酮、 $(\alpha\text{S})-\alpha$, 2', 4, 4'-tetrahydroxy dihydrochalcone 等,其中巴西苏木素是苏木水提取物的主要化学成分。将苏木水提取物对膀胱癌 T24 细胞进行杀伤性考察,结果表明苏木水提取物对 T24 细胞有明显杀伤作用,且巴西苏木素为其主要抗癌有效成分。由于实验所得的苏木水提取物中巴西苏木素相对质量分数最大为 55.84%,所以没有考察巴西苏木素相对质量分数在 55.84%以上时对 T24 细胞杀伤率。巴西苏木素纯品对 T24 细胞杀伤作用的实验,将在后续研究中开展。此外,利用简单快速的柱色谱法对苏木水提取物主成分分离纯化,得到巴西苏木素的单体,并采用 NMR 进行了表征。本研究为苏木的成分分析提供了新的方法,为其化学成分与药效相关性奠定基础,同时为今后研究苏木的抗癌作用提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] Jeong H J, Kim Y M, Kim J H, *et al.* Homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* displaying viral neuraminidases inhibition [J]. *Cent Eur J Chem*, 2012, 35(5): 786-790.
- [3] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1999.
- [4] Namikoshi M, Nakata H, Nagai M, *et al.* Homoisoflavonoids and related compounds. II. isolation and absolute configurations of 3, 4-dihydroxylated homoisoflavans and brazilins from *Caesalpinia sappan* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(7): 2761-2773.
- [5] Namikoshi M, Nakata H, Saitoh T. Homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(6): 1831-1833.
- [6] Choi B M, Kim B R. Upregulation of heme oxygenase-1 by brazilin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways and its protective effect against oxidative injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 580(1): 12-18.
- [7] Lee D Y, Lee M K, Kim G S, *et al.* Brazilin inhibits growth and induces apoptosis in human glioblastoma cells [J]. *Molecules*, 2013, 18(2): 2449-2457.
- [8] Washiyama M, Sasaki Y, Hosokawa T, *et al.* Anti-inflammatory constituents of *Sappan Lignum* [J]. *Cent Eur J Chem*, 2009, 32(5): 941-944.
- [9] 陈雪敏, 胡永钢, 李美萍, 等. 高效液相色谱法同时测定苏木中的巴西苏木素和原苏木素 B [J]. *分析试验室*, 2012, 31(4): 98-101.
- [10] Shimokawa T, Kinjo J, Yamahara J, *et al.* Two novel aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(8): 3545-3547.
- [11] Namikoshi M, Nakata H, Nuno M, *et al.* Homoisoflavonoids and related compounds. III. Phenolic constituents of *Caesalpinia japonica* Sieb. et Zucc. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(9): 3568-3575.
- [12] Yang B O, Ke C Q, He Z S, *et al.* Brazilide A, a novel lactone with an unprecedented skeleton from *Caesalpinia sappan* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(9): 1731-1733.
- [13] Min B S, Cuong T D, Hung T M, *et al.* Compounds from the heartwood of *Caesalpinia sappan* and their anti-inflammatory activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(10): 7436-7439.
- [14] Nagai M, Nagumo S. Protosappanins E-1 and E-2, stereoisomeric dibenzoxocins combined with brazilin from *Sappan Lignum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(6): 1490-1494.