

高速逆流色谱法从棉花花提取物中分离制备异槲皮素

赵永昕, 热依木古丽·阿布都拉, 吴 涛, 巴 杭, 阿吉阿克拜尔·艾萨*

中国科学院新疆理化技术研究所 干旱区植物资源化学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要: 目的 应用高速逆流色谱法分离制备异槲皮素。方法 对棉花花提取物用高速逆流色谱法一步分离纯化, 以醋酸乙酯-水(1:1)为两相溶剂体系, 上相为固定相, 下相为流动相, 主机转速为 800 r/min, 体积流量 2.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 采用波谱法对所得化合物进行结构鉴定, 薄层色谱、高效液相色谱法测定产品的纯度。结果 在该条件下经一步分离可得到质量分数为 99% 的异槲皮素对照品。结论 该方法操作简便, 适合于从棉花花提取物中分离制备异槲皮素对照品。

关键词: 棉花花提取物; 总黄酮; 异槲皮素; 高速逆流色谱

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)01-0034-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.009

Separation and preparation of isoquercetin from *Gossypii Flos* extract by high speed counter-current chromatography

ZHAO Yong-xin, ABDULLA Rahima, WU Tao, BA Hang, AISA Haji Akber

Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry of Arid, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Science, Urumqi 830011, China

Abstract: Objective To establish a method for the isolation and preparation of isoquercetin by high speed counter-current chromatography (HSCCC). **Methods** The total flavonoids in *Gossypii Flos* extract was further separated by HSCCC with a two-phase solvent system composed of ethylacetate-water (1:1) stationary phase. Main engine speed was 850 r/min and the detection wavelength was 254 nm at a flow rate of 2.0 mL/min. The obtained fraction was identified by spectral analysis and the purity was analyzed by TLC and HPLC. **Results** Isoquercetin reference substance with the purity of 99% under this given situation was obtained. **Conclusion** The results indicate that HSCCC is a simple and rapid method for the separation and preparation of isoquercetin reference substance.

Key words: *Gossypii Flos* extract; total flavonoids; isoquercetin; high speed counter-current chromatography

棉花花为锦葵科棉属植物草棉 *Gossypium herbaceum* L. 或陆地棉 *G. hirsutum* L. 干燥的花, 为维吾尔医民族药, 具有安神、健脑、强心、消炎退肿等功效, 主要用于医治神经和脑病症及消退炎肿^[1-4]。近几年本实验室已对棉花花进行了较深入的研究, 对其提取物采用传统柱色谱分离, 结合核磁共振与多级质谱联用等方法发现其中主要是黄酮类化合物^[5]。药理实验表明棉花花乙醇提取物经大孔树脂处理后的产物具有抗老年痴呆的作用^[6]。本实验室完善了该有效部位的提取工艺和纯化工艺, 得到总黄酮标准提取物。异槲皮素为其中含量较高的黄酮类化合物。高速逆流色谱是一种液-液分配色

谱, 因其不需要固相载体支持, 克服了固相载体不可逆吸附而引起样品的损失、失活和变性, 具有适用范围广、操作灵活、高效快速、制备量大及费用低等优点^[7]。作为一种分离方法, 它已经成功用于分离不同的天然产物^[8]。本研究主要针对棉花花瓣提取物, 利用高速逆流色谱技术对其中的异槲皮素进行了纯化及制备, 得到了异槲皮素对照品。通过熔点法、紫外光谱法、质谱法、核磁共振法等方法进行了表征, 并经高效液相色谱(归一化法)分析, 该异槲皮素对照品质量分数在 99% 以上。

1 仪器与材料

HHS400 高速逆流色谱仪(北京新技术应用研

收稿日期: 2012-10-16

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究与发展项目(201010108)

作者简介: 赵永昕, 助理研究员, 硕士, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: yongxinzhao@126.com

*通信作者 阿吉阿克拜尔·艾萨(1965—), 博士生导师。Tel: (0991) 3835679 E-mail: haji@ms.xjb.ac.cn

究所),配有聚四氟乙烯管,S-1007恒流泵,8823B紫外检测仪(北京圣益通技术开发有限公司),N2000色谱数据工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);美国戴安高效液相色谱仪:P680 HPLC泵,ASI-100自动进样器,UVD170U紫外检测器,Chromleon色谱工作站。

聚酰胺薄膜(台州市路桥四甲生化塑料厂),所用试剂均为分析纯。棉花花瓣采自新疆自治区吐鲁番地区,经中国科学院新疆生态与地理研究所沈冠冕研究员鉴定为草棉 *Gossypium herbaceum* L.的花。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

棉花花瓣总黄酮提取物的制备来自本实验室成熟稳定的工艺。棉花花瓣按料液比1:16加70%乙醇,加热回流提取3h,重复3次,回收乙醇,50℃减压浓缩至为相对密度为1.26~1.30的浸膏,加蒸馏水60℃加热溶解,制成2mg/mL溶液。溶液以1个柱体积流速上已处理好的AB-8大孔吸附树脂柱,上样量为3个柱体积,用50%乙醇以每小时1个柱体积洗脱,收集3个柱体积洗脱液,再用70%乙醇洗脱1个柱体积,合并洗脱液,减压浓缩,干燥,粉碎过80目筛,即得。

2.2 异槲皮素的分离制备

2.2.1 溶剂体系的选择 根据高速逆流溶剂系统选择的黄金规则和待分离物质的性质,分配系数(K)公式 $K=C_U/C_L$ (C_U 为上相中待分离物质的质量浓度, C_L 为下相中待分离物质的质量浓度)计算 K 值^[8-10],结果发现醋酸乙酯-水(1:1)时,异槲皮素 K 值为1.03,非常适合HSCCC分离,因此确定其为溶剂体系。

2.2.2 产品的制备 将醋酸乙酯-水(1:1)溶剂体系加入分液漏斗中,充分振摇后,静置分层,其中上相为固定相,下相为流动相,超声脱气。采用单线圈、头接尾的洗脱方式,首先使管路充满固定相(上相),主机正转,转速为800 r/min,然后以2.0 mL/min泵入流动相(下相)。待流动相流出,两相溶剂在柱中达到平衡状态时,取棉花提取物200 mg,溶于等体积的上下相中,用注射器进样,进样量10 mL,用紫外检测器对流出液进行检测,检测波长254 nm,收集阴影部分保留时间为240~290 min流份,得产品26.6 mg。高速逆流色谱图见图1。

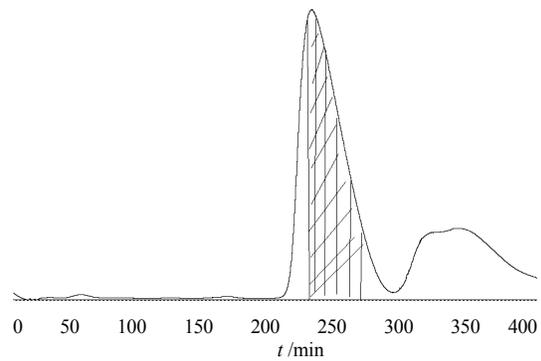


图1 棉花花提取物的高速逆流色谱图

Fig. 1 HSCCC chromatogram of *Gossypii Flos* extract

2.3 定性鉴别

2.3.1 结构鉴定 黄色粉末, mp 249~250℃(甲醇), UV λ_{max} (甲醇): 256、359 nm。¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.07~5.29(糖), 5.45(1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 6.20(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 6.38(1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.84(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.58(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6'), 7.56(1H, s, H-2'), 9.24(1H, s, 4'-OH), 9.74(1H, s, 3'-OH), 10.86(1H, s, 7-OH), 12.62(1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 60.9(C-6''), 70.1(C-4''), 74.1(C-2''), 76.5(C-3''), 77.5(C-5''), 93.6(C-8), 98.9(C-6), 100.9(C-1''), 103.5(C-10), 115.2(C-2'), 116.1(C-5'), 121.1(C-1'), 121.5(C-6'), 133.2(C-3), 145.0(C-3'), 148.6(C-4'), 155.9(C-9), 156.4(C-2), 161.1(C-5), 165.2(C-7), 177.2(C-4)。结构见图2。

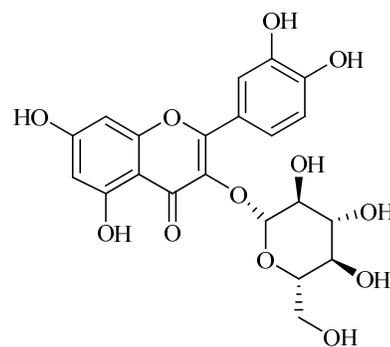


图2 异槲皮素的结构

Fig. 2 Structure of isoquercetin

2.3.2 紫外扫描检测 取异槲皮素产品2 mg,配制成0.2 mg/mL的甲醇溶液,进行紫外吸收光谱分析,结果最大吸收峰为256、359 nm。紫外吸收扫描光谱图见图3。

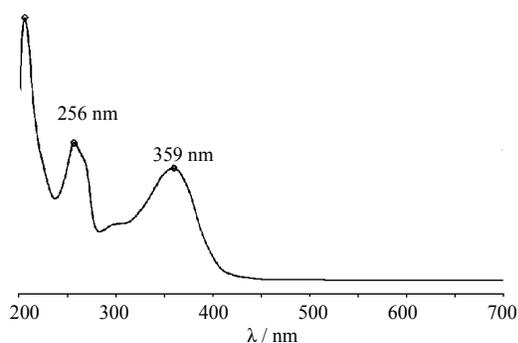


图 3 异槲皮素紫外吸收扫描光谱图

Fig. 3 UV absorption scanning spectrum of isoquercetin

2.3.3 TLC 鉴别 采用两种展开体系进行检测。异槲皮素样品点样量分别为 20、40、80、160、320 μg ，薄层板为硅胶 G，展开剂为丁酮 - 醋酸乙酯 - 甲醇 - 水 - 甲酸 (4 : 5 : 2 : 0.5 : 0.1)，显色剂为 1% 三氯化铝乙醇溶液，在 360 nm 下检测结果只见主斑点，不见杂质斑点 (R_f 值为 0.71)。样品点样量分别为 20、40、80、160、320 μg ，薄层板为聚酰胺，展开剂为丁酮 - 醋酸乙酯 - 甲醇 - 水 - 甲酸 (7 : 10 : 1 : 1 : 0.1)；显色剂为 1% 三氯化铝乙醇溶液，显色后分别置于 254、360 nm 紫外灯下观察，从 TLC 图上清晰可见只有一个圆斑点。

2.4 纯度分析

取本品 2 mg，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加色谱甲醇使其溶解，并稀释至刻度，摇匀，微孔滤膜滤过，取续滤液 10 μL 注入液相色谱仪。色谱条件：乙腈 - 甲醇 - 0.3% 甲酸水溶液 (5 : 40 : 55)，记录色谱图为主峰保留时间的 3 倍，以面积归一化法进行纯度测定，对所收集的测定结果，采用的格拉布斯 (Grubbs) 检验法进行检验，未发现异常值，测定结果呈正态分布，结果显示异槲皮素质量分数大于 99%。见图 4。

3 讨论

本实验通过高速逆流色谱法对棉花花提取物中异槲皮素进行了分离制备研究，因异槲皮素为棉花的花中分离得到的一个化合物，目前国内外没有市售的异槲皮素对照品，也未见分离制备异槲皮素对照品的文献报道。我国是世界棉花种植大国，主产于新疆、山东、河南等地，分布广泛，新疆棉花的资源非常丰富，种植面积广阔，而棉花的花作为一种废弃物，将其再生利用，通过自主创新，以专有

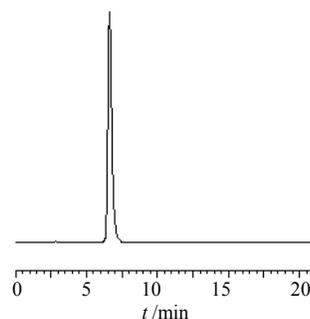


图 4 异槲皮素产品的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatogram of isoquercetin product

先进技术，提取分离和纯化高活性成分异槲皮素，服务于医药、食品和化妆品行业，满足中药材及成药分析检测、质量控制需求，意义深远。

参考文献

- [1] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔族药材标准 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993: 357.
- [2] Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants [J]. *J Plant Res*, 2000, 113(3): 287-299.
- [3] 阿吉艾克拜尔·艾萨, 再帕尔·阿不力孜, 朱海波, 等. 草花有效部位及其制备方法和用途 [P]. 中国: 200710126533, 2007-12-12.
- [4] Ji C, Aisa H A, Yang N, et al. *Gossypium herbaceum* extracts inhibited NF-kappaB activation to attenuate spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration induced by amyloid-beta in rats [J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 14(3): 271-283.
- [5] 吴涛, 蒋岚, 阿吉艾克拜尔·艾萨. 棉花花总黄酮片中黄酮类化合物的测定 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 713-715.
- [6] Geng P, Zhang R, Aisa H A, et al. Fast profiling of the integral metabolism of flavonols in the active fraction of *Gossypium herbaceum* L. using liquid chromatography/multi-stage tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(12): 1877-1888.
- [7] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1.
- [8] 刘钊, 陈卫平, 李清娟, 等. 高速逆流色谱法从多花蒿中分离制备阿格拉宾 [J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(4): 363-365.
- [9] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1065(2): 145-168.
- [10] Wu T, Abdulla R, Zhao Y X, et al. Simultaneous quantification of seven flavonoids in *Flos Gossypii* by LC [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(5/6): 467-470.