

烤 3 min 显浅紫色,后逐渐变为蓝色硅胶薄层色谱二氯甲烷-乙醚(10:1)展开 Rf 值为 0.48。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 371, 2 976, 1 742, 1 642, 1 513, 1 452, 1 340, 1 289, 966, 777。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.63 (1H, d, $J=9$ Hz), 6.41 (1H, dd, $J=2, 9$ Hz), 6.37 (1H, brs), 5.13, 5.10, 4.26 (1H, d, $J=12$ Hz), 3.11 (1H, m), 2.18 (2H, m), 2.09 (2H, m), 2.01 (2H, m), 1.79 (2H, m), 1.68 (3H, brs), 1.63 (3H, s), 1.61 (3H, s), 1.35 (3H, s), 1.07 (3H, d, $J=7$ Hz)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 195.7, 171.8, 166.1, 164.4, 136.3, 133.5, 131.5, 124.2, 122.9, 113.9, 108.7, 103.5, 55.3 (βC 影响), 54.5, 41.3 (βC 影响), 39.7, 39.7, 26.6, 25.7, 22.2, 20.3, 17.7, 16.1, 13.4。该化合物 5 位为 β 型甲基,与文献报道^[7]中化合物的 α 型甲基报道相对应。由于 β 型甲基改变,附近碳氢受其影响谱图数据与文献^[7]中有些差异,但所得数据与文献报道^[7]中化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据综合比较对照,容易确定其为 β 型甲基,其他数据与文献一致。分子式: $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ 。鉴定为: 3S-(2,4-二酚

羟基)-4R,5S-二甲基-5-[4,8-二甲基-3(E),7(E)-壬二烯基-1]-四氢-2-呋喃酮(3S-(2,4-dihydroxybenzoyl)-4R,5S-dimethyl-5-[4,8-dimethyl-3(E),7(E)-nonadien-1-yl]-tetrahydro-2-turanone)。

References:

- [1] Naguib Y M. Pharmaceutically active composition extracted from *Ferula Hermonis* and process of its extraction [P]. US: 6623768 B1, 2003-09-23.
- [2] Yong R S. Anticancer composition comprising sesquiterpenes isolated from *Resina Ferula* [P]. WO 02/30438 A1, 2002-04-18.
- [3] Ping Z, Yo S S, Ta K S, et al. Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53: 689-697.
- [4] Li Z L, Xue D Y, Chen Y Z, et al. *Rhododendron tubulosum* Ching ex. Wang Wei-yei [J]. *Chem J Chin Univ* (中国高等学校化学学报), 1990, 10: 1150-1152.
- [5] Konjima K, Isaka K, Purev O, et al. Derivatives from *Ferula feruloides* V [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49 (9): 1072-1076.
- [6] Konjima K, Isaka K, Purev O, et al. Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(11): 1781-1784.
- [7] Konjima K, Isaka K, Purev O, et al. Derivatives from *Ferula feruloides* III [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47 (8): 1145-1147.

红车轴草异黄酮的分离、纯化及结构鉴定

陈寒青^{1,2}, 金征宇^{1*}

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥, 230036)

红车轴草 *Trifolium pratense* L. 为豆科车轴草属多年生草本植物, 又名红三叶、红花苜蓿、红菽草、红荷兰翘翘、金雀菜、三叶草。红车轴草原产于小亚西亚和西南欧, 在欧洲各国及俄罗斯、澳大利亚、新西兰、美国等国海洋性气候地区广泛栽培。红车轴草在我国新疆、吉林、云贵高原、湖北鄂西山地都有野生, 另外我国江淮流域、华南、西南等地均有栽培, 是我国长江流域以南地区优良的豆科牧草。

红车轴草主要含有异黄酮类、蛋白质、氨基酸、糖类和维生素等多种成分。其中红车轴草异黄酮因具有改善妇女更年期综合症特别是降低潮热的发病率, 抑制前列腺癌、乳腺癌、子宫内腺癌、胃癌、胰腺癌和骨髓白血病细胞的生长, 改善动脉血管的柔顺性, 抑制酪氨酸蛋白激酶、拓扑异构酶 I 和 II、芳香化酶、 3β -羟基甾醇脱氢酶和 17β -羟基甾醇脱氢活性

等多种生理功能而格外受人关注^[1]。

到目前为止, 国外学者先后报道红车轴草中存在数十种异黄酮类化合物^[2~6]。红车轴草是一种重要的豆科牧草, 我国南北各省区均有种植, 资源十分丰富, 但我国红车轴草异黄酮的主要组成鲜见报道。为此, 本实验对我国湖北恩施产的红车轴草异黄酮的组成进行了系统研究, 从中分离得到 8 种异黄酮类化合物, 他们分别鉴定为: 德鸾尾素(irilone, I)、芒柄花素(formononetin, II)、红车轴草素(pratensein, III)、大豆黄素(daidzein, IV)、毛蕊异黄酮(calycosin, V)、染料木素(genistein, VI)、鸡豆黄素 A (biochanin A, VII) 和芒柄花苷(ononin, VIII)。以上 8 个化合物均为首次从我国产的红车轴草中分得。

1 材料与与方法

1.1 实验材料与仪器: 红车轴草, 2002 年 6 月采集

收稿日期: 2005-12-18

作者简介: 陈寒青(1970-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然活性物质的研究与开发。 E-mail: syuhqchen@163.com

* 通讯作者 金征宇 Tel: (0510)85913299 E-mail: zjin@sytu.edu.cn

于湖北恩施;GF₂₅₄薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶(100~200目);青岛海洋化工有限公司产品;聚酰胺(80~100目);浙江台州市路桥四甲生化塑料厂产品;Sephadex LH-20;Pharmacia 公司产品;其他溶剂均为上海化学试剂公司分析纯产品。

Avance 500 核磁共振仪:瑞士 Bruker 公司;Waters Platform ZMD 4000 液相色谱-质谱联用仪:美国 Waters 公司;UV-2102 PCS 紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;RE-52AAA 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;SHB-Ⅲ A 循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司;BSZ-100 自动部分收集器:上海沪西分析仪器厂;HL-2 恒流泵:上海沪西分析仪器厂;ZF-90 暗箱式紫外透射仪:上海顾村电光仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 红车轴草异黄酮的提取:将 10 kg 红车轴草粉分批放入 15 L 密闭容器中,按料液比 1:10 (g/mL) 加入 70%乙醇,在室温下浸提 48 h,其间每隔 2 h 搅拌一次。滤过,将滤出的乙醇提取液旋转蒸发浓缩至浆状,蒸发温度低于 50 °C。如此反复 3 次,合并 3 次提取浓缩物。待 10 kg 红车轴草粉全部提取完,将每次提取浓缩物合并得红车轴草 70%乙醇提取物。

1.2.2 乙醇提取物的处理:将乙醇提取物用石油醚进行脱脂,反复多次直到石油醚相无色为止。将脱脂后的乙醇提取物用无水乙醚萃取,反复多次,直至乙醚相无色为止。合并乙醚相并将其在低于 30 °C 温度下减压浓缩得乙醚可溶组分。将乙醚萃取液用水饱和和正丁醇萃取,反复萃取多次,直至正丁醇相无色为止。合并正丁醇相,蒸发正丁醇,得正丁醇可溶组分。

1.2.3 异黄酮的分离:将乙醚可溶组分上硅胶柱(100~200目,120 cm×6 cm),先用二氯甲烷洗脱,再分别用二氯甲烷-甲醇(95:5)和二氯甲烷-甲醇(90:10)洗脱,并分部收集,薄层色谱检测,得到组分 I、II、III。将组分 I 上硅胶柱(60 cm×6 cm),用二氯甲烷和甲醇梯度洗脱,并分部收集,得到两个主要组分,标为 Ia 和 Ib,然后将 Ia 和 Ib 分别反复上聚酰胺柱,用乙醇梯度洗脱,并分部收集,甲醇重结晶,得化合物 I 和 II。将组分 II 上硅胶柱(60 cm×6 cm),用二氯甲烷和甲醇梯度洗脱,并分部收集,得到 3 个主要组分,标为 IIc、II d 和 II e,然后分别反复上聚酰胺柱(80~100目,50 cm×4 cm),用乙醇梯度洗脱,并分部收集,甲醇重结晶,得化合物 III~V。将组分 III 上硅胶柱(60 cm×6 cm),用二氯

甲烷和甲醇梯度洗脱,并分部收集,得到两个主要组分,标为 III f 和 III g,然后将 III f 和 III g 分别反复上聚酰胺柱(80~100目,50 cm×4 cm),用乙醇梯度洗脱,并分部收集,甲醇重结晶,得化合物 VI 和 VII。

将正丁醇可溶组分上聚酰胺柱(80~100目,120 cm×6 cm),先用去离子水洗脱,然后分别用 20%、40%、60%、75%乙醇洗脱,并分部收集,得到一个主要组分 IV。将组分 IV 分别上聚酰胺柱(60 cm×6 cm)和 Sephadex LH-20 柱(40 cm×3 cm),用乙醇梯度洗脱,甲醇重结晶,得到化合物 VIII。

2 结构鉴定

化合物 I:淡黄色针状结晶,UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (nm): 272, 336(sh)。ESI-MS (*m/z*): 321[M+Na]⁺, 299[M+H]⁺, 298[M]⁺, 297[M-H]⁻。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ : 12.92(1H, s, OH-5), 9.61(1H, s, OH-4'), 8.44(1H, s, H-2), 7.4(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2', 6'), 6.89(1H, s, H-8), 6.84(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3', 5'), 6.18(2H, s, 6, 7-OCH₂O-)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ : 180.9(C-4), 157.5(C-4'), 154.6(C-2), 154.0(C-7), 153.0(C-8a), 141.4(C-5), 130.2(C-2', 6'), 129.6(C-6), 122.1(C-3), 120.9(C-1'), 115.1(C-3', 5'), 107.4(C-4a), 102.9(-OCH₂O-), 89.6(C-8)。根据以上波谱数据并对照文献报道^[6],鉴定化合物 I 为 5,4'-二羟基-6,7-亚甲二氧基异黄酮,即德鸾尾素。

化合物 II:白色针状结晶,根据 UV、ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据并对照文献报道^[7],鉴定化合物 II 为 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮,即芒柄花素。

化合物 III:无色针状结晶,UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (nm): 263, 293(sh)。ESI-MS(*m/z*): 299[M-H]⁻, 284.5[M-CH₃]⁻。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ : 12.96(1H, s, OH-5), 10.88(1H, s, OH-7), 9.06(1H, s, OH-3'), 8.32(1H, s, H-2), 7.03(1H, s, H-2'), 6.96(1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.95(1H, d, *J*=8.6 Hz, H-6'), 6.38(1H, s, H-8), 6.22(1H, s, H-6), 3.79(3H, s, 4'-OCH₃)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ : 180.1(C-4), 164.4(C-7), 162.0(C-5), 157.5(C-8a), 154.1(C-2), 147.7(C-4'), 146.1(C-3'), 123.3(C-1'), 122.1(C-3), 119.8(C-6'), 116.4(C-2'), 112.0(C-5'), 104.4(C-4a), 99.0(C-6), 93.6(C-8), 55.6(4'-OCH₃)。根据以上波谱数据并对照参考文献报道^[8],鉴定化合物 III 为 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基异黄酮,即红车轴草素。

化合物 IV:白色粉末。根据 UV、ESI-MS、

¹H-NMR和¹³C-NMR波谱数据并对照参考文献报道^[9], 鉴定化合物Ⅳ为7,4'-二羟基异黄酮,即大豆黄素。

化合物Ⅴ:白色粉末,UV $\lambda_{\max}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (nm):249, 291。ESI-MS (*m/z*):283[M-H]⁻,269[M-CH₃]⁻。¹H-NMR(400 MHz,DMSO-d₆) δ :8.21(1H,s,H-2),7.99(1H,d,*J*=8.7 Hz,H-5),7.11(2H,d,*J*=1.3 Hz,H-2'),6.97(1H,dd,*J*=8.6, 1.6 Hz,H-6),6.94(1H,dd,*J*=7.5,1.3 Hz,H-6'), 6.93(2H,d,*J*=7.4 Hz,H-5'),6.85(1H,d,*J*=2 Hz,H-8),3.82(3H,s,4'-OCH₃)。 ¹³C-NMR(100 MHz,DMSO-d₆) δ :174.8(C-4),162.7(C-7),157.5(C-8a),153.0(C-2),147.6(C-4'),146.1(C-3'), 127.4(C-5),124.9(C-1'),123.5(C-3),119.9(C-6'),116.8(C-4a),116.6(C-2'),115.3(C-6),112.1(C-5'),102.2(C-8),55.8(4'-OCH₃)。根据以上波谱数据并对照文献^[10],鉴定化合物Ⅴ为7,3'-二羟基-4'-甲氧基异黄酮,即毛蕊异黄酮。

化合物Ⅵ:白色无定形粉末。根据UV、ESI-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR波谱数据并对照文献^[11],鉴定化合物Ⅵ为5,7,4'-三羟基异黄酮,即染料木素。

化合物Ⅶ:淡黄色粉末,UV $\lambda_{\max}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (nm):262, 327(sh)。ESI-MS (*m/z*):283[M-H]⁻,269[M-CH₃]⁻。¹H-NMR(400 MHz,DMSO-d₆) δ :12.91(1H,s,OH-5),10.88(1H,s,OH-7),8.33(1H,s,H-2),7.50(2H,d,*J*=8.7 Hz,H-2',6'),7.00(2H,d,*J*=8.7 Hz,H-3',5'),6.38(1H,d,*J*=1.8 Hz,H-8),6.22(1H,d,*J*=1.8 Hz,H-6),3.78(3H,s,4'-OCH₃)。 ¹³C-NMR(100 MHz,DMSO-d₆) δ :180.1(C-4),164.3(C-7),162.0(C-5),159.1(C-4'), 157.6(C-8a),154.2(C-2),130.1(C-2',6'),122.9(C-1'),121.9(C-3),113.7(C-3',5'),104.4(C-4a),99.0(C-8),93.7(C-6),55.1(4'-OCH₃)。根据以上波谱数据并对照文献^[12],鉴定化合物Ⅶ为5,7-二羟基-4'-甲氧基异黄酮,即鸡豆黄素。

化合物Ⅷ:白色粉末,UV $\lambda_{\max}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ (nm):251,303 (sh)。ESI-MS (*m/z*):429[M-H]⁻,267[M-Glucose]⁻。¹H-NMR(400 MHz,DMSO-d₆) δ :8.39(1H,s,H-2),8.08(1H,d,*J*=8.8 Hz,H-5),7.54(2H,d,*J*=6.6 Hz,H-2',6'),7.44(1H,d,*J*=2.1 Hz,H-8),7.17(1H,dd,*J*=8.8,2.1 Hz,H-6),7.0

(2H,d,*J*=6.6 Hz,H-3',5'),5.12(1H,d,*J*=6.7 Hz,H-1''),3.79(3H,s,4'-OCH₃),3.2~3.5(糖上H)。 ¹³C-NMR(100 MHz,DMSO-d₆) δ :174.6(C-4), 161.4(C-7),159.0(C-4'),157.0(C-8a),153.4(C-2),130.0(C-2',6'),126.9(C-5),124.0(C-1'), 123.4(C-3),118.5(C-4a),115.6(C-6),113.6(C-3',5'),103.5(C-8),100.1(C-1''),77.2(C-3''),76.5(C-5''),73.1(C-2''),69.7(C-4''),60.7(C-6''),55.1(4'-OCH₃)。根据以上波谱数据并对照文献^[7],鉴定化合物Ⅷ结构为芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷,即芒柄花苷。

References:

[1] Chen H Q, Jin Z Y. Advances in study on composition and main physiological functions of isoflavones in *Trifolium pratense* [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2004, 30(11): 70-76.
 [2] He X G, Lin L Z, Lian L Z. Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 755: 127-132.
 [3] Lin L Z, He X G, Lindenmaier M, et al. LC-ESI-MS Study of the flavonoid glycoside malonates of red clover (*Trifolium pratense*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 354-365.
 [4] Klejduš B, Vitamvasova-Sterbova D, Kuban V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 450: 81-97.
 [5] Eva de Rijke, Frans de Kanter, Freck Ariese, et al. Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in *T. pratense* L. leaves [J]. *J Sep Sci*, 2004, 27: 1061-1070.
 [6] Ali A A, El-Emary N A, El-Moghazi M A. Three isoflavonoids from *Iris germanica* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(9): 2061-2063.
 [7] Wu J, Tu P F, Zhao Y Y. Isolation and identification of four isoflavones and pterocarpin from Buyang Huanwu Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(7): 583-585.
 [8] Kobayashi M, Noguchi H, Sankawa U. Formation of isoflavones by callus culture of *Glycyrrhiza uralensis* with different production pattered [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33: 3811-3816.
 [9] Yu D L, Yang X D, Guo J, et al. Studies on chemical constituents of *Erythrina arborescens* Roxb. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(6): 353-355.
 [10] Kamnaing P, Free S N Y F, Nkengfack A, et al. An isoflavan-quinone and a flavonol from *Milletia laurentii* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51: 829-832.
 [11] Ji W L, Qin M J, Wang Z T. Studies on the constituents of *Belamcanda chinensis* (1) [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(3): 197-199.
 [12] Chang Y C, Nair M G, Santell R C, et al. Microwave-mediated synthesis of anticarcinogenic isoflavones from soybeans [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 1869-1871.