

高速逆流色谱分离制备广陈皮中多甲氧基黄酮类成分的研究

郑国栋¹, 周芳², 蒋林¹, 杨得坡¹, 杨雪¹, 林乐维¹

(1. 中山大学药学院 生药与天然药物化学实验室, 广东 广州 510006; 2. 湖南中医药大学药学院 天然药物化学实验室, 湖南 长沙 410208)

摘要:目的 采用高速逆流色谱技术(HSCCC)从广陈皮中制备分离高纯度多甲氧基黄酮类成分。方法 应用制备型高速逆流色谱仪,通过优化各分离条件,以四元两相溶剂系统石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(1 0.8 0.7 0.8),上相为固定相,下相为流动相,制备分离广陈皮醋酸乙酯萃取部分粗提物。结果 300 mg 粗提物经过 260 min 一次制备分离,得到了 3 个多甲氧基黄酮类化合物,经 EIMS 及 ¹H-NMR 分析,鉴定为川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮及橘皮素,其质量分数分别为 96.25%、97.10%、99.22%。结论 该方法简便、经济,所得化合物既可作为广陈皮质量控制的参考物质,又可为柑橘属植物分类学研究提供一定的依据。

关键词:广陈皮;多甲氧基黄酮;高速逆流色谱

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0052-04

Isolation and purification of polymethoxylated flavonoids from *Pericarpium Citri Reticulatae* by high speed counter-current chromatography

ZHENG Guo-dong¹, ZHOU Fang², JIANG Lin¹, YANG De-po¹, YANG Xue¹, LIN Le-wei¹

(1. Laboratory of Pharmacognosy and Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2. Laboratory of Natural Medicinal Chemistry, College of Pharmaceutical Sciences of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract : Objective High speed counter-current chromatography (HSCCC) was applied to the preparative separation of polymethoxylated flavonoids (PMFs) with high purity from *Pericarpium Citri Reticulatae*. **Methods** After various parameters of preparative HSCCC were optimized preliminarily, the crude extract of the EtOAc part of *Pericarpium Citri Reticulatae* was separated with a two-phase solvent system composed of petroleum ether-EtOAc-methanol-water (1 0.8 0.7 0.8). The upper phase was chosen as the stationary phase, while the lower phase was chosen as the mobile phase. **Results** Three PMFs including nobiletin, 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxy flavone, and tangeretin could be obtained from 300 mg crude extracts in one-step separation in 260 min with their purities as 96.25%, 97.10%, and 99.22%, respectively. And their structures were identified by EIMS and ¹H-NMR. **Conclusion** The results demonstrate that the adopted methods are simple, feasible, economical, and efficient for rapid preparative isolation of PMFs from species of *Citrus* L. The compounds obtained in the experiment could be used as reference substances for quality control of *Pericarpium Citri Reticulatae*. Furthermore, the adopted methods may be used as strong research tools for taxonomy in botanical sciences of *Citrus* L.

Key words: *Pericarpium Citri Reticulatae*; polymethoxylated flavonoids (PMFs); high speed counter-current chromatography (HSCCC)

广陈皮是广东著名的传统中药材,位列十大广药之一。《中国药典》2005 年版记载,陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干

燥成熟果皮,其药材可分为陈皮及广陈皮,质量以广陈皮为优。广陈皮药材来源较广,正品为茶枝柑 *Citrus reticulata* 'Chachi' 的干燥成熟果皮,主产于

收稿日期:2009-04-09

基金项目:国家科技部“十一五”支撑项目(2006BAI06A11-02)

作者简介:郑国栋(1979—),男,湖北省宜昌市人,博士,主要从事生药学与天然药物化学方向的研究与开发。

Tel.:15918518120 Fax:(020)39943043 E-mail:gd200237@126.com

*通讯作者 蒋林 Tel:(020)39943041 E-mail:linderson_jiang@163.com

广东新会,具有理气健脾、和胃止呕、燥湿化痰等多种功效。广陈皮含有丰富的多甲氧基黄酮类成分,其可作为芸香科柑橘属分类的指标性成分。该类成分具有显著的药理活性,如抗癌^[1,2]、抗诱变^[3]、抗炎^[4]、抗氧化^[5]及心血管保护^[6]等作用。故本课题拟采用高速逆流色谱(high speed counter-current chromatography, HSCCC)技术制备分离广陈皮多甲氧基黄酮类成分,由于该技术不使用载体,没有不可逆吸附,具有样品无损失、无污染、高效、快速和大制备量分离等优点,并使常规提取分离无法分离得到的一些微量及死吸附成分的获得成为可能,现已广泛成功应用于天然产物有效成分的分离制备^[7~9]。

1 仪器与材料

高速逆流色谱系统:Mk5 QuikPrep 500 制备型高速逆流色谱仪(英国 AECS Co.), LC-Series 液相泵(美国 SSI Co.), 不锈钢线圈管路 PTFE preparative coil(直径 2.16 mm, 总容积 450 mL, 选择容积 230 mL, 转速 0~860 r/min), 20 mL 定量环, SPD-10AVP 紫外检测器(日本岛津);高效液相色谱系统:Waters 600E 型高效液相色谱仪(美国 Milliford), Waters 2996 二极管阵列检测器, Waters 717 plus 自动进样器, Empower 色谱工作站软件; Milli-Q plus system 超纯水仪(美国 Millipore); 电子轰击电离质谱仪(TraceDSQ, Thermo, USA); Bruker Avance AV 400 超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker); Varian INOVA 500NB 超导核磁共振谱仪(美国 Varian); EYELA 旋转蒸发仪(日本东京)。

广陈皮药材于 2007 年 12 月采自广东省江门市新会区双水镇广东省水果良种苗木繁育场,经中山大学药学院蒋林研究员鉴定为茶枝柑 *C. reticulata* 'Chachi' 的干燥成熟果皮。乙腈、甲醇为色谱纯试剂,其他试剂均为分析纯试剂,怡宝纯净水(怡宝食品饮料有限公司),超纯水(自制)。

2 方法与结果

2.1 样品预处理:1 kg 干燥广陈皮打成粗粉、过 20 目筛,用 80%乙醇回流提取 3 次、每次 1.5 h、合并提取液,提取液浓缩至无醇味并用水分散,依次用石油醚(60~90)、醋酸乙酯分别萃取 6 次,合并萃取液,醋酸乙酯萃取部分减压浓缩得醋酸乙酯浸膏样品 10 g。

2.2 HPLC 样品分析:迪马 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(50:50);进样量:10 μL;体积流量:1.0 mL/min;

检测波长:330 nm;柱温:25。样品经分离后,显示 5 个主要色谱峰,见图 1。

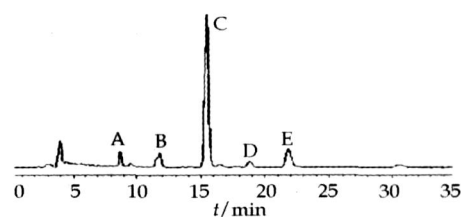


图 1 广陈皮醋酸乙酯萃取部分 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram of EtOAc crude extract from Pericarpium Citri Reticulatae

2.3 溶剂系统筛选:以试管法结合高效液相色谱法测定高速逆流色谱溶剂系统的分配系数 k 值($k = C_{\text{固定相}} / C_{\text{流动相}}$, $0.5 \leq k \leq 2$)^[10],以之为依据,对四元两相溶剂系统石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水进行筛选。结果表明,石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(1:0.8:0.7:0.8)为最佳溶剂系统,除峰 A 外,峰 B~E 的 k 值均在 0.5~2,见表 1。

表 1 广陈皮醋酸乙酯萃取部分 HSCCC 溶剂系统筛选

Table 1 Selection of two-phase solvent system for EtOAc crude extract from Pericarpium Citri Reticulatae

溶剂系统	分配系数 k				
	峰 A	峰 B	峰 C	峰 D	峰 E
1.0 0.8 0.6 0.8	0.18	0.50	1.15	1.80	2.05
1.0 0.8 0.7 0.7	0.12	0.32	0.73	1.20	1.48
1.0 0.8 0.7 0.8	0.26	0.58	1.17	1.47	2.00
1.0 0.8 0.9 0.7	0.10	0.20	0.46	0.64	1.64
1.0 0.9 0.6 0.8	0.41	0.53	0.75	2.57	4.40
1.0 0.9 0.8 0.8	0.15	0.35	0.79	1.26	1.35

2.4 其他分离条件优化

2.4.1 固定相及流动相选择:以所选溶剂系统下相为固定相,上相为流动相时,分离时发现基线不稳定,且在分离过程中一直伴随固定相的流失,固定相保留率较低、分离时间长,故选择溶剂系统上相为固定相,下相为流动相。

2.4.2 样品质量浓度的选择:固定进样体积为 20 mL,逐步提高进样质量浓度分别为 5、10、15、20 mg/mL,发现以 20 mg/mL 为进样质量浓度时,会导致峰分离效果变差及固定相流失,故选择 15 mg/mL 为适宜进样质量浓度。

2.4.3 转速、柱温及流动相体积流量的选择:预试验结果表明,转速越快,固定相保留率越高;柱温过低,会带来固定相的流失,柱温过高,则溶剂系统在分离过程中易出现大量气泡,从而影响分离;流动相体积流量过低会导致分离周期延长,过高则会导致固定相流失且分离效果变差。故经综合考虑,转速、

柱温及流动相体积流量分别设定为 860 r/min、35 及 2 mL/min。

2.5 HSCCC 制备分离:溶剂系统为石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(1 0.8 0.7 0.8);固定相:上相;流动相:下相;线圈容积:230 mL;进样量:300 mg;进样体积:20 mL;转速:860 r/min;流动相体积流量:2 mL/min;检测波长:330 nm;柱温:35;固定相保留率:78%。300 mg 样品经 260 min 一次制备分离,得到 A~E 5 个组分,见图 2。其中,A、B 未能完全分离,C、D、E 则得到了良好的分离。组分 A~E 经浓缩干燥后,称定质量,分别为 20、16、22、3、8 mg。

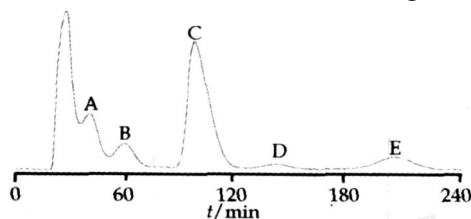


图 2 HSCCC 制备分离广陈皮醋酸乙酯萃取部分色谱图

Fig 2 Preparative HSCCC separation of EtOAc crude extract from *Pericarpium Citri Reticulatae*

2.6 HPLC-PDA 对质量分数的分析:组分 A~E 经 HPLC-PDA 分析(色谱条件见 2.2)、按峰面积归一化法计算质量分数。结果表明,组分 A、B 不纯,其主要成分质量分数分别为 86.03%、86.41%,尚需进一步纯化处理,组分 C、D、E 则较为纯净,其质量分数分别为 96.25%、97.10%、99.22%,结果见图 3。

2.7 化合物结构鉴定

化合物 C:无色针状结晶(甲醇),mp 133~134,分子式 $C_{21}H_{22}O_8$ 。EFMS m/z (%):402(M^+),387($M^+ - CH_3$, 100),371($M^+ - OCH_3$),357,344,326,255,197,182,162,149,131,111,97,83,69,57。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ :7.56(1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6),7.41(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2),6.99(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5),6.61(1H, s, H-3),4.10(3H, s, OCH_3),4.02(3H, s, OCH_3),3.97(3H, s, OCH_3),3.95(9H, m, 3 $\times OCH_3$)。其光谱数据与文献报道对照基本一致^[11],故化合物 C 鉴定为 5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮(川陈皮素)。

化合物 D:黄色针状结晶(甲醇),mp 130~131,分子式 $C_{22}H_{24}O_9$ 。EFMS m/z (%):432(M^+),417($M^+ - CH_3$, 100),401,387,374,359,225,209,202,197,187,173,165,149,137,119,107,83,77,69。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ :7.83(1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6),7.81(H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2),

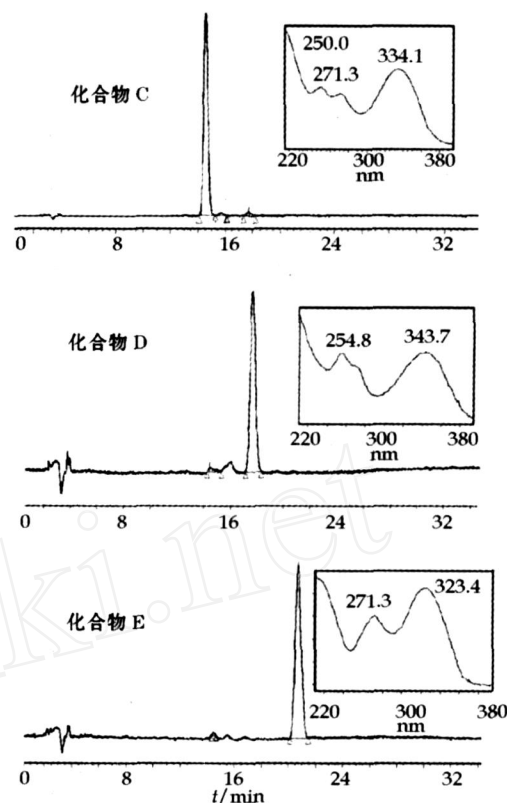


图 3 化合物 C~E 的 HPLC-PDA 纯度分析色谱图

Fig 3 HPLC-PDA Purity analysis of compounds C~E

7.06(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'),4.09(3H, s, OCH_3),4.00(3H, s, OCH_3),3.98(3H, s, OCH_3),3.97(6H, m, 2 $\times OCH_3$),3.95(3H, s, OCH_3),3.89(3H, s, OCH_3)。其光谱数据与文献报道对照基本一致^[12],故化合物 D 鉴定为 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮。

化合物 E:无色针状结晶(甲醇),mp 159~160,分子式 $C_{20}H_{20}O_7$ 。EFMS m/z (%):372(M^+),357($M^+ - CH_3$, 100),329,314,296,268,225,197,182,179,157,153,135,132,117,89,83,69。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ :7.87(2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2',6'),7.02(2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3',5'),6.60(1H, s, H-3),4.10(3H, s, OCH_3),4.02(3H, s, OCH_3),3.95(6H, s, 2 $\times OCH_3$),3.89(3H, s, OCH_3)。其光谱数据与文献报道对照基本一致^[13],故化合物 E 鉴定为 5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮(橘红素)。

化合物 C~E 的结构式见图 4。

3 讨论

在应用 HSCCC 技术制备分离天然产物化学成分的过程中,良好溶剂系统的选择是关键。可根据需要选用二元、三元或多元溶剂系统,并控制上下两

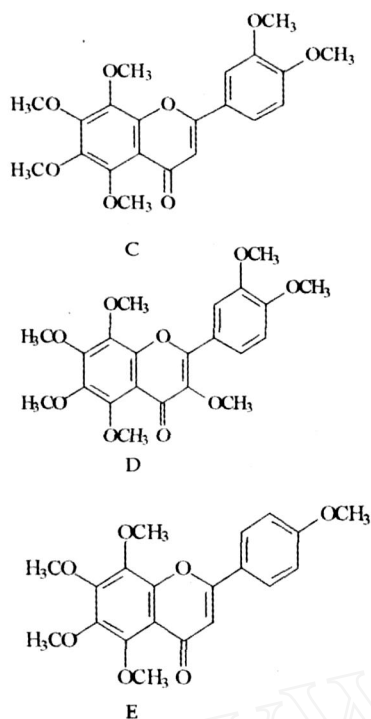


图 4 化合物 C~E 的结构式

Fig 4 Structures of compounds C—E

相分层时间在 30 s 以内,且不能出现乳化现象,通过简单试管法结合薄层色谱、高效液相色谱、毛细管电泳等方法计算 k 值,尽量控制其值在 0.5~2,从而确定最佳溶剂系统。另外,固定相及流动相的选择、样品进样量、转速、流动相体积流量、柱温等亦是考察的重要指标。

在选择最佳溶剂系统时,Ito^[10]认为应控制 α 值 ≥ 1.5 (分离度, $\alpha = k_2/k_1$, $k_2 > k_1$)。笔者认为在进行多组分分离时,该条件不仅难以实现,且并无太大必要,适当控制 k 值在 0.5~2 即可。本实验选用的溶剂系统, α_{AB} 、 α_{BC} 、 α_{CD} 、 α_{DE} 经计算分别为 2.23、2.02、1.26、1.36,化合物 C、D、E 依然得到了良好的分离。

在薄层色谱预试验中,发现在采用各种不同展开剂的条件下(如石油醚-醋酸乙酯,石油醚-丙酮等不同比例溶剂系统),化合物 D(3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮)及 E(橘红素)其 R_f 值总相同,且由于其相对分子质量接近,难以通过常规分离手段分离。实验采用 HSCCC 技术,经一次制备分离,得到了高纯度的两种化合物,该方法简单、可行,其结果不仅可

作为参考物质进一步应用于广陈皮的质量控制研究,又可为柑橘属的植物分类学研究提供一定的依据。

致谢:新会农业局、新会陈皮协会、广东省水果苗木繁育场及新宝堂陈皮有限公司等单位在样品采集及基地建设方面对本项目工作的大力支持和协助。

参考文献:

- [1] Thomas W. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(5): 354-362.
- [2] Li S M, Pan M H, Lai C S, et al. Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(10): 3381-3389.
- [3] Mustafaev O N, Abilev S K, Melnik V A, et al. Structure-activity relationships of antimutagenic flavonoids [J]. *Ekologicheskaya Genetika*, 2005, 3(4): 11-18.
- [4] Li S M, Sang S M, Pan M H, et al. Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobiletin in mouse [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(18): 5177-5181.
- [5] Miyake Y. Characteristics of flavonoids in Niihime fruit - a new sour citrus fruit [J]. *Food Sci Technol Res*, 2006, 12(3): 186-193.
- [6] Guthrie N, Kurowska E M, Manthey J A, et al. Compositions and methods of treating, reducing and preventing cardiovascular diseases and disorders with polymethoxyflavones [P]. US:US 06987125, 2006-01-17.
- [7] Liu R, Lu Y B, Wu T X, et al. Simultaneous isolation and purification of mollugin and two anthraquinones from *Rubia cordifolia* by HSCCC [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(1-2): 95-99.
- [8] Wang X, Liu J H, Zhang T Y, et al. Rapid and simple method for quality control of raw materials of herbs by HSCCC [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2007, 30(17): 2585-2592.
- [9] Yang C J, Li D X, Wan X C. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods: An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 861(1): 140-144.
- [10] 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.
- [11] Li S M, Lo C Y, Ho C T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel [J]. *J Agri Food Chem*, 2006, 54(12): 4176-4185.
- [12] Weber B, Hartmann B, Stockigt D, et al. Liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance as complementary analytical techniques for unambiguous identification of polymethoxylated flavones in residues from molecular distillation of orange peel oils (*Citrus sinensis*) [J]. *J Agri Food Chem*, 2006, 54(2): 274-278.
- [13] Wang D D, Wang J, Huang X H, et al. Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques [J]. *J Pharm Biomed*, 2007, 44(1): 63-69.