

制备液相色谱分离制备玉郎伞查尔酮类化合物

简洁^{1,2}, 黄建春¹, 焦杨¹, 谭宏棣¹, 黄仁彬^{1*}

1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

2. 桂林医学院 药理教研室, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 对壮药玉郎伞查尔酮类化合物进行分离制备和结构鉴定。方法 利用制备液相色谱分离、制备查尔酮类化合物, 经 HPLC 测定其质量分数、用 UV, IR, MS, 1D、2D-NMR, X 射线单晶衍射等对其进行结构鉴定。结果 从玉郎伞中首次分离制备出两种查尔酮类化合物, 其结构分别为 *cis*-2, 6-二甲氧基查尔酮和 *cis*-17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮。

结论 该方法制备玉郎伞查尔酮类化合物质量分数很高, 且简便、快速、可靠。

关键词: 制备液相色谱; 玉郎伞; 查尔酮类化合物; *cis*-2, 6-二甲氧基查尔酮; *cis*-17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮

中图分类号: R284.1; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1313-04

Isolation and preparation of chalcone compounds from tuber of *Millettia pulchra* var. *laxior* by pre-HPLC

JIAN Jie^{1,2}, HUANG Jian-chun¹, JIAO Yang¹, TAN Hong-di¹, HUANG Ren-bin¹

1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, China

Abstract: Objective To isolate and prepare chalcone compounds from the tuber of *Millettia pulchra* var. *laxior* (Yulansang, YLS) and identify their structures. **Methods** Pre-HPLC was used to prepare chalcone compounds and its purity was determined by HPLC. Several extensive spectral analyses, such as UV, IR, ESI-MS, X-ray monocrystal diffraction, and 1D, 2D-NMR were used to identify the chemical structures. **Results** Two chalcone compounds were isolated from YLS for the first time, their chemical structures were *cis*-2, 6-dimethoxyl chalcone and *cis*-17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone, respectively. **Conclusion** High purity compounds could be obtained from YLS by this methods.

Key words: pre-HPLC; the tuber of *Millettia pulchra* (Benth.) Kurz var. *laxior* (Dunn) Z. Wei (Yulansang, YLS); chalcone compounds; *cis*-2, 6-dimethoxyl chalcone; *cis*-17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone

近年来,制备高效液相色谱(pre-high-performance liquid chromatography, pre-HPLC)以其分辨率高、检测方便、收集产物准确等特点,在天然产物的提取分离与生产研究中应用日益广泛^[1-3]。玉郎伞为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* (Benth.) Kurz var. *laxior* (Dunn) Z. Wei 的块根,是广西壮族习用药材,具有提高免疫力、抗衰老、抗应激、改善大脑记忆等功能^[4-6]。本实验采用 pre-HPLC 分离玉郎伞黄酮类活性成分,考虑到柱效、柱维护等因素,将玉郎伞提取液经醋酸乙酯萃取、硅胶柱色谱分离后

以制备液相色谱进行进一步的分离纯化,得到两种高纯度化合物,经结构鉴定化合物 1 为 *cis*-2, 6-二甲氧基查尔酮,化合物 2 为 *cis*-17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮。

1 仪器与材料

WA—812 型微波辅助萃取仪(上海精密仪器仪表有限公司);安马西亚—100 型制备纯化液相色谱系统(附带自动馏分收集器,美国安马西亚公司);大连依利特 Sinochrom ODS-BP 制备柱(250 mm×10 mm, 5 μm);TU—1800 SPC 紫外分光光度计(北

收稿日期: 2010-10-19

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0630002-2A)

作者简介: 简洁(1972—),女,博士,副教授,研究方向为天然药物成分与心血管药理。

Tel: (0773)5359805 13297737748 E-mail: jianjielucky@yahoo.com.cn

*通讯作者 黄仁彬 Tel: (0771)5300002 E-mail: huangrenbin518@163.com

京普析通用仪器有限责任公司); Nicolet Nexus 470 型傅里叶变换红外分光光度计 (FT-IR, 美国尼高力公司); HP5989 型质谱仪 (美国惠普公司); Bruker Avance 500 型超导核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司); Smart Apex CCD 单晶 X 射线衍射仪 (德国布鲁克公司)。

玉郎伞饮片采摘、制备于广西灵山县, 经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* (Benth.) Kurz var. *laxior* (Dunn) Z. Wei 的块根。乙腈、甲醇为进口色谱纯; 石油醚、醋酸乙酯、氯仿、醋酸为国产分析纯; 水为超纯水; 制备色谱所用试剂使用前均经 0.45 μm 滤膜滤过、超声脱气。

2 方法与结果

2.1 样品提取

将 9 kg 玉郎伞饮片粉碎, 以料液比为 1:8 的 60%乙醇作为提取溶剂进行微波辅助提取 (提取温度 $<60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 微波功率 240 W), 提取 3 次, 每次 20 min。

2.2 初步分离

将“2.1”项下提取液合并浓缩, 加入石油醚萃取除色素、酯类后, 用醋酸乙酯萃取, 得 100 g 萃取物; 使用加压玻璃柱色谱 (120 cm $\times$ 10 cm), 将醋酸乙酯萃取物经硅胶柱色谱 (样品与硅胶 H 的比例为 1:30) 分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (98:2 $\rightarrow$ 70:30) 梯度洗脱, TLC 检查合并、减压浓缩、真空冷冻干燥, 得到 13 个组分 (记为 Fr. A~M)。

按文献方法^[5]对各组分进行体外抗氧化活性筛选, 最终选择抗氧化活性最高的 Fr. B [435 mg, 石油醚-醋酸乙酯 (92:8 洗脱部位)]、Fr. H [550 mg, 石油醚-醋酸乙酯 (80:20 洗脱部位)] 进行后续多级分离。

2.3 多级分离

Fr. B (435 mg) 经加压玻璃柱色谱 (60 cm $\times$ 5 cm)、硅胶 H 柱色谱 (43.5 g) 分离, 石油醚-醋酸乙酯 (96:4 洗脱), 得到 3 个组分 Fr. B₁~B₃; Fr. B₁ (400 mg) 再经加压玻璃柱色谱 (60 cm $\times$ 2.5 cm)、硅胶 H 柱色谱 (80 g) 分离、石油醚-醋酸乙酯 (80:20) 洗脱、氯仿-甲醇重结晶、得到白色棒状晶体 210 mg, 记为 B 晶。

二级、三级分离所用色谱柱同上, Fr. H (550 mg) 经硅胶 H 柱色谱 (55 g) 分离, 石油醚-醋酸乙酯 (96:4) 洗脱, 得到 3 个组分 Fr. H₁~H₃; Fr. H₁ (280 mg) 再经硅胶 H 柱色谱 (56 g) 分离、石油醚-

醋酸乙酯 (92:8) 洗脱、氯仿-甲醇重结晶、得到桔红色晶体 125 mg, 记为 H 晶。

2.4 制备纯化

B 晶、H 晶分别以乙腈超声溶解配成 5 mg/mL 的溶液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 上 pre-HPLC 仪制备, 经多次进样 (B 晶共进样 4.4 mL、H 晶共进样 2.5 mL)、收集峰, 得化合物 1 (20 mg)、化合物 2 (12 mg), 收率分别为 91%、96%。

2.5 色谱条件

2.5.1 制备色谱 色谱柱为 Sinochrom ODS-BP 制备柱 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 每次进样量 100 μL , 其余条件见表 1。制备色谱图见图 1。

表 1 两种化合物的制备条件

Table 1 Preparation conditions of two compounds

原料	流动相	体积流量/ (mL $\cdot$ min ⁻¹)	检测波 长/nm	收集时间 段/min
B 晶	乙腈-0.2%醋酸水 溶液 (90:10)	3	260	23.85~24.65
H 晶	乙腈-0.2%醋酸水 溶液 (85:15)	3	238	23.85~24.65 34.10~35.20

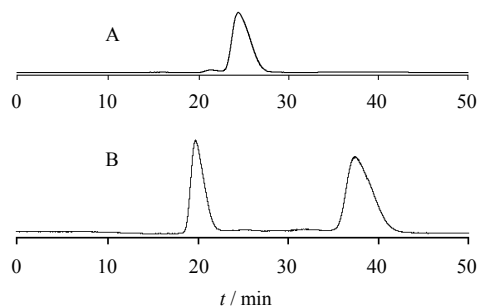


图 1 化合物 1 (A) 和 2 (B) 的 pre-HPLC 色谱图

Fig. 1 Pre-HPLC chromatograms of compounds 1 (A) and 2 (B)

2.5.2 分析色谱 色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, Waters 2487 UV 检测器; 检测波长 $\lambda_1=260\text{ nm}$ 、 $\lambda_2=238\text{ nm}$; 进样量 20 μg ; 化合物 1 流动相为甲醇-水 (70:30)、乙腈-0.2%水溶液醋酸 (90:10); 化合物 2 流动相为甲醇-水 (70:30)、乙腈-0.2%醋酸水溶液 (85:15)。

2.6 质量分数测定

按“2.5.2”项色谱条件, 以达到柱超载的进样量、2.5 倍主峰保留时间的洗脱时长、两种配比流动相分别对两个化合物进行纯度检测。按峰面积归一化法测得化合物 1、2 的质量分数分别为 98.1%、

98.8% ($n=6$)。

2.7 结构鉴定

化合物 1: 淡黄色针晶, ESI-MS 给出分子离子峰 m/z 269.00 $[M+H]^+$ 及 m/z 291.17 $[M+Na]^+$, 307.13 $[M+K]^+$, 结合 1H , ^{13}C -NMR 数据推定其分子式为 $C_{17}H_{16}O_3$ 。UV (MeOH) 光谱在 260 nm 处有最大吸收, 提示该化合物含有芳环且含有与芳环共轭的基团^[7]。IR 光谱在 3 501、3 123、1 623、1 604、1 568、1 528、1 285、1 228、1 165 cm^{-1} 处有强吸收, 提示分子中存在羟基、共轭羰基和芳环。在 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) 中, δ 8.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H- β) 与 7.72 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H- α) 为顺式二取代双键上相互偶合的两个氢; δ 7.60 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6') 为一单取代苯环上的 5 个氢; δ 3.86 (6H, s, H-OCH₃×2, H-7, 8) 为两个对称位置的甲氧基上的氢; δ 8.13 (2H, br d, $J=6.5$ Hz, H-3, 5) 与 δ 7.60 (1H, br d, $J=6.9$ Hz, H-4) 为苯环上相互邻位偶合的 3 个氢。在 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) 中, δ 174.2 (C-7') 表明此化合物结构中有一个羰基; δ 130.9 (C-1'), 129.2 (C-2'), 129.2 (C-3'), 129.2 (C-4'), 129.2 (C-5'), 129.2 (C-6') 表明结构中有一个单取代苯环结构片段; δ 110.6 (C- α), 121.5 (C- β) 表明结构中有一个双键; δ 60.2 (C-7), 60.2 (C-8) 表明结构中两个对称的甲氧基; δ 119.6 (C-1), 147.8 (C-2, 6), 128.6 (C-3, 5), 130.9 (C-4) 表明结构中有一个间位二氧取代的苯环。HMBC: H- β 与 C-2、C-6、C-7' 相关; H- α 与 C-1、C-1' 相关; H-7, 8 与 C-2、C-6 相关; H-4 与 C-5、C-3 相关; H-5, 3 与 C-4 相关; δ_H 7.60 与 δ_C 129.2 相关。结合 HSQC、HMBC、NOSEY 谱, 确定其结构式为 *cis*-2, 6-二甲氧基查尔酮, 为首次从壮药玉郎伞中分离鉴定; 经查阅 SciFinder 数据库表明本课题组首次报道了该化合物的核磁数据。

化合物 2: 桔色方晶, ESI-MS 给出分子离子峰 m/z 295.00 $[M+H]^+$ 及 m/z 610.99 $[2M+Na]^+$, 263.35 $[M-OMe]^+$, 结合 1H , ^{13}C -NMR 数据推定其分子式为 $C_{18}H_{14}O_4$ 。UV (MeOH) 光谱在 238 nm 处有最大吸收, 提示该化合物含有芳环且含有与芳环共轭的基团。IR 光谱在 3 501、3 133、1 600、1 562、1 474、1 380、1 262、1 219 cm^{-1} 处有强吸收, 提示分子中存在羟基、共轭羰基和芳环。在 1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz) 中, δ 3.95 (3H, s, H-6') 为甲氧基上的氢; δ 7.57 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6) 为一单取代苯

环上的 5 个氢; δ 7.77 (1H, s, H- α) 为顺式二取代双键上的氢; δ 8.2 (1H, d, H-4'), δ 7.2 (1H, d, H-5') 为与苯环相连的呋喃环上的两个氢; δ 8.17 (2H, s, H-2', 6') 为与呋喃环相连的双取代苯环上偶合的两个氢。在 ^{13}C -NMR (CDCl₃, 125 MHz) 中, δ 174.2 表明结构中有一个羰基; δ 145.7 (C-4'), 110.0 (C-5'), 154.8 (C-7'), 119.8 (C-8') 表明结构中有一个呋喃环; δ 141.8 (C-1), 128.6 (C-2), 130.6 (C-3), 128.6 (C-4), 130.6 (C-5), 128.6 (C-6) 表明结构中有一个单取代苯环; δ 104.2 (C- α), 158.2 (C- β) 表明结构中有一个双键; δ 60.2 (C-9') 表明结构中有一个甲氧基; δ 122.0 (C-1'), 128.4 (C-2'), 117.0 (C-3'), 150.0 (C-6'), 154.8 (C-7'), 119.8 (C-8') 表明结构中有一个间位二氧取代的苯环。X 射线单晶衍射结果显示化合物属单斜晶系, 空间群为 P2 (1)/c, 晶胞主要参数: $C_{18}H_{14}O_4$, M 294.29, $a = 10.881\ 3$ (16) nm, $b = 9.795\ 4$ (14) nm, $c = 13.347\ 3$ (19) nm, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 103.697$ (2)°, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1\ 382.2$ (3) nm³, $Z = 4$, $D_c = 1.414$ mg/m³, $F(000) = 616$, $\mu = 0.100$ mm⁻¹。X 射线单晶衍射结果同时表明, 由于离域作用, 化合物 2 分子在 H-3 和 H-6 位置可出现酮式和烯醇式的互变异构体, 烯醇型羟基为氢原子通过氢键与羰基上的氧原子结合所致 (C-7—O-1 = 1.303 5, C-7—O-1—H-1 = 109.5°)。将化合物 2 的核磁数据同文献对照^[8], 并参照 X 射线单晶衍射结果, 最终确定其结构式为 *cis*-17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮, 系首次从壮药玉郎伞中分离得到。

3 讨论

3.1 流动相选择

在前期实验中, 本课题组研究了流动相比比例对目标化合物的分离效果。作为本实验制备液相“原料药”的 B 晶、H 晶是柱色谱初步分离所得的中等极性部位, 根据文献数据^[9]和预试验筛选, 本实验选定乙腈-水的混合溶剂作为流动相。水的初始体积分数为 25%, 按 5% 幅度依次递减, 考察色谱峰分离度、出峰时间等因素, 最终确定流动相配比; 同时, 为了调节 pH 值, 抑制酚羟基在水中解离, 克服峰拖尾现象, 在流动相中加入 0.2% 醋酸。

3.2 制备柱、进样量选择

制备柱的粒径、直径、长度等因素对分离效果和制备效率影响很大。一般来说, 如要在短时间内制备大量目标物, 则应选择直径大于 2 cm 的制备柱或模拟流动床技术 (simulated moving bed, SMB)

进行制备^[10]。本实验采用手性半制备柱(250 mm×10 mm),在较短时间内目标物的得量已可满足质量分数测试及结构鉴定所需。同时,由于使用的是手性制备柱,可对化合物的同分异构体进行有效分离。本实验对H晶根据峰收集得到两份样品,在后续的核磁测定中发现它们具相同氢谱,X射线单晶衍射结果也证实化合物**2**分子在H-3和H-6位置可出现酮式和烯醇式的互变异构体,因此,在制备液相和分析液相色谱图上出现的两个峰很可能为同分异构现象所致。

对于制备色谱,在色谱柱、流动相、体积流量等条件确定后,进样量就成为最重要的参数,其不仅影响分配比、分离因子和分辨率,而且决定了生产效率和目标物质量分数^[11]。本实验考察了进样量从25~200 μL的分离情况,综合柱压、制备时间、单次制备量等因素,在既定的流动相洗脱条件下,将B晶、H晶溶液的每次进样量确定为100 μL。

虽然半制备液相色谱存在操作成本较高、样品需要预处理、制备量有限等问题,但与传统的薄层色谱和柱色谱法相比,它具有简便、快速、高纯度、制备量可满足结构鉴定所需并有助于发现新化合物等特点,目前已成为天然产物化学成分研究中的一种新型实用技术。本研究建立的方法对玉郎伞黄酮类化合物的分离纯化研究具有指导意义。

致谢:化合物的核磁数据解析由广西医科大学天然药物化学教研室邱莉博士完成。

参考文献

- [1] 朱文君,林梦感,杨国红,等.石蝉草中两个新的聚酮类化合物[J].中草药,2011,42(3):420-423.
- [2] 宁丽娟,叶志文,欧彪,等.毛鸡骨草中异夏佛塔苷对照品的制备研究[J].中草药,2010,41(9):1464-1466.
- [3] 冀旭,吴智宇,陈千良,等.知母皂苷B II对照品的快速制备研究[J].中草药,2010,41(11):1803-1806.
- [4] 黄仁彬,林兴,蒋伟哲,等.玉郎伞化学成分对自发性高血压大鼠血压的影响[J].中国医院药学杂志,2006,26(2):130-134.
- [5] 简洁,李勇文,蒋伟哲,等.玉郎伞黄酮单体对自由基清除作用的实验研究[J].中国老年学杂志,2009,29(18):72-73.
- [6] 戴斌,丘翠嫦,戴向东,等.玉郎伞与水罗伞的生药学比较研究[J].中草药,2007,38(12):1889-1892.
- [7] 冯洁,向诚,梁鸿,等.丰城鸡血藤异黄酮类成分的研究[J].中国中药杂志,2007,32(4):321-322.
- [8] Parmar V S, Rathore J S, Jain R, *et al.* Occurrence of pongamol as the enol structure in *Tephrosia purpurea* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(2): 591-593.
- [9] 袁黎明.制备色谱技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [10] 张红丽,柳春辉,赵艳芳,等.模拟移动床色谱分离制备手性药物雷诺嗪的研究[A].第十五次全国色谱学术报告会文集[C].郑州:郑州大学,2005.
- [11] 王大力,王清珊,金东日.反相高效液相色谱法分离制备洋葱中黄酮类化合物[J].中成药,2007,29(6):867-870.