

白花败酱草黄酮类成分的高速逆流色谱快速制备

彭金咏, 范国荣*, 吴玉田 (第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 目的 应用高速逆流色谱分离纯化白花败酱草化学成分。方法 利用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:0.6:0.6:1)为两相溶剂系统, 主机转速 $800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 上相为固定相, 下相为流动相, 流速 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 254 nm , 所得产物经高效液相色谱法检测, 结构经 MS、 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定。结果 6 h 内经一步洗脱从 400 mg 白花败酱草乙酸乙酯萃取物中分离得到纯度高于 98% 的木犀草素 26 mg , 5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮 15 mg 和 5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮 21 mg 。结论 3 个化合物均为首次从败酱属植物中分离得到, 该分离制备法简便、快速, 产物纯度高。

关键词: 白花败酱草; 黄酮; 制备色谱; 逆流色谱

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2006)13-0977-03

Isolation and Separation of Flavones from *Patrinia villosa* by High-Speed Counter-Current Chromatography

PENG Jinyong, FAN Guorong*, WU Yutian (College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a preparative high-speed counter-current chromatography (HSCCC) for isolating the chemical constituents from *Patrinia villosa* Juss. **METHODS** A two-phase solvent system composed of *n*-hexane: ethyl acetate: methanol: water (1:0.6:0.6:1) was used. at a flow rate of $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, while the apparatus rotated at $800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ and the effluent was detected at 254 nm . The obtained fractions were analyzed by HPLC and identified by MS, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. **RESULTS** 26 mg luteolin, 15 mg 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy flavone and 21 mg 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy flavone with purities of over 98% were obtained from 400 mg crude extract in one-step elution and less than 6 hours. **CONCLUSION** Three kinds of flavones are all discovered from the plant of *Patrinia* genus for the first time. The results indicate that HSCCC is a powerful technique of purification for natural products.

KEY WORDS: *Patrinia villosa* Juss; flavone; preparative chromatography; counter current chromatography

白花败酱草 (*Patrinia villosa* Juss) 又名苦菜、苦斋、鹿肠, 系败酱科多年生草本植物, 分布于我国华东、华中、华南及西南各地。因其含有多种氨基酸、维生素和矿物质等有益成分而被人们广泛食用^[1], 它也是一种常用中药, 始载于《神农本草经》, 曾被《中国药典》(1977年版) 收载, 具有清热利湿、解毒排脓、活血化瘀、清心安神、促进肝细胞再生、改善肝功能、增强抑菌和抗病毒等作用, 临床上常用于治疗阑尾炎、痢疾、肝炎、扁桃体炎、流行性腮腺炎、痈肿等症^[1-2]。有关白花败酱草化学成分研究报道的较少, 仅涉及几种环烯醚萜类化合物^[3]。因此, 进一步研究白花败酱草的化学成分, 对阐明其药效物质基础、质量控制、开发现代中药新药和充分利用我国的药材资源等具有意义。

采用柱色谱法和重结晶等传统的分离制备方法分离植物中的有效单体, 不仅费时费力、污染环境,

而且所用固定相对样品有不可逆性吸附作用。高速逆流色谱(HSCCC)是一种较新型的液液分配色谱技术, 它不用任何固体支撑体或载体而克服了传统分离方法对样品的不可逆性吸附作用, 因而样品回收率高, 同时还具有应用范围广、仪器操作简单、分离量大等优点^[4,5]。

本研究中采用溶剂提取和萃取法得到粗提物, 以此粗提物直接进行高速逆流色谱分离纯化, 经一步洗脱分离得到纯度高于 98% 的木犀草素、5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮和 5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮, 3 者均为首次从败酱属植物中发现。该法操作简单、产物纯度高。目前, 尚未见快速、简便从白花败酱草中分离多种成分的报道。

1 仪器与材料

TBE-300A 高速逆流色谱仪(深圳同田生化技术有限公司)。聚四氟乙烯管缠绕在 3 个水平轴上

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划 2003AA2Z3524)

作者简介: 彭金咏, 男, 博士 * 通讯作者: 范国荣, 男, 副教授, 硕士生导师 Tel: 021-25070388 E-mail: Guofan@yahoo.com.cn

形成螺旋管(管直径 2.6 mm, 分离体积 300 mL), 20 mL 进样圈。该 HSCCC 还配备了柱塞式泵(S 系列, 北京圣益通技术开发有限公司), UV- II 型检测器(中国科学院上海生物化学所), N2010 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。Waters 高效液相色谱仪, 包括 515 泵, 2487 检测器, 20 μ L 定量圈, N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。

白花败酱草购自上海童涵春中药饮片厂, 经第二军医大学生药学教研室秦路平博士鉴定, 实验中所用石油醚、乙酸乙酯、甲醇、正己烷、冰醋酸均为分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司), 乙腈为色谱纯(默克), 水为自制重蒸馏水, 并经微孔滤膜过滤。

2 提取分离

2.1 白花败酱草粗提物制备

将药材适当粉碎, 称取粗粉 3.0 kg, 加 8 倍量体积分数为 70% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次 2.0 h。过滤, 合并滤液, 减压回收乙醇, 得浸膏。取浸膏加适量水混悬后, 依次用石油醚和乙酸乙酯萃取, 乙酸乙酯萃取物减压浓缩后真空干燥得浅黄色粉末 46.5 g (提取率为 1.55%), 置冰箱保存, 备用。精密称取 400 mg 进行高速逆流色谱分离制备。

2.2 高效液相色谱分析条件

色谱柱: Lichrospher C₁₈ (6.0 mm \times 150 mm, 5 μ m) (汉邦科技有限公司), 流动相为乙腈-水-冰醋酸=60:40:2, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温为室温, 进样量 20 μ L。在此条件下乙酸乙酯萃取物色谱图见图 1-A, 峰 1, 2, 3 分别为木犀草素、5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮、5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮。

2.3 高速逆流色谱分离制备

在逆流色谱中, 一个好的溶剂系统应满足下列要求^[6]: ①固定相要有较高的保留率; ②两相溶剂系统的分层时间短于 30 s; ③分配系数(K)应当接近 1; ④两色谱峰的分度度(α)大于 1.5。分配系数太大或太小都不利于分离, 分度度太小则容易造成峰重叠, 太大则易引起色谱峰扩宽。溶剂体系的选择对分离效果至关重要, 本研究中, 根据所分离化合物特性, 考察了正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水这一溶剂体系在不同配比条件下目标成分的分配情况, 并根据文献^[6]来计算分配系数与分离度值, 即分配系数 $K = A_{\text{upper}}/A_{\text{lower}}$, 分离度 $\alpha = K_2/K_1, K_2 > K_1$, 结果见表 1。由此选择正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水=1:0.6:0.6:1 为分离木犀草素、5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮

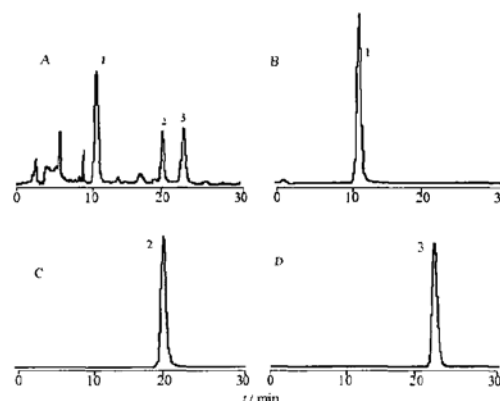


图 1 HPLC 色谱图

A- 粗提物; B- 逆流色谱流分 I; C- 逆流色谱流分 II; D- 逆流色谱流分 III
1- 木犀草素; 2- 5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮; 3- 5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮

Fig 1 HPLC chromatogram

A- crude extract; B- fraction I; C- fraction II; D- fraction III 1- luteolin; 2- 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy flavone; 3- 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy flavone

与 5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮所用的两相溶剂系统。在分液漏斗中配制正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水=1:0.6:0.6:1 两相溶剂体系, 充分振摇后静止, 使用前分取上下相, 超声脱气后泵入逆流色谱仪。先将 HSCCC 分离管中充满上相, 调整主机转速为 800 r \cdot min⁻¹, 再以 2.0 mL \cdot min⁻¹ 流速泵入下相, 待流动相从柱出口流出, 表明两相在分离管中建立了动态平衡, 由进样阀进样, 流出液用紫外检测器在 254 nm 处进行检测, 同时记录色谱图, 根据色谱图接收目标成分。结果在 6 h 内共分离得到 3 个流分, 即“ I ”、“ II ”和“ III ”, 逆流色谱图见图 2。

表 1 不同溶剂体系中分离化合物的分配系数与分离度值

Tab 1 Partition coefficient (K) and separation factor (α) of the target compounds

Solvent system	Compound 1		Compound 2		Compound 3
	K_1	α_1	K_2	α_2	K_3
n-Hexane: ethyl acetate: methanol: water					
1: 0.2: 0.2: 1	0.012	2.83	0.034	1.47	0.084
1: 0.4: 0.4: 1	0.087	1.38	0.12	2.67	0.32
1: 0.6: 0.6: 1	0.25	2.44	0.61	1.80	1.10
1: 0.8: 0.8: 1	0.78	1.86	1.45	1.37	1.98
1: 1: 1: 1	1.12	1.54	1.72	1.31	2.25
1: 1.2: 1.2: 1	1.45	1.37	1.98	1.45	2.87

注: 化合物 1, 2, 3 分别为木犀草素、5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮与 5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮; $\alpha_1 = K_2/K_1, \alpha_2 = K_3/K_2$

Note: Compounds 1, 2, 3 are respective luteolin, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy flavone, 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy flavone, $\alpha_1 = K_2/K_1, \alpha_2 = K_3/K_2$

3 产物纯度检测及结构鉴定

所得流分经 HPLC 分析表明 I, II 和 III 均为单一色谱峰色谱图见图 1-B, C, D, 峰纯度分别为 98.8%, 98.2% 和 99.1% (峰面积归一化法)。各流分减压回收溶剂后真空干燥得 26 mg 化合物 I, 15

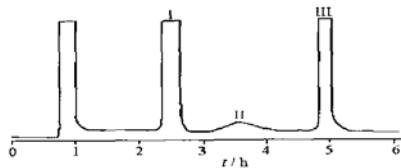


图2 粗提物逆流色谱图。I, II, III- 接收流分

Fig 2 HSCCC chromatogram of the crude extract. I, II, III- collected fractions

mg 化合物 II 和 21 mg 化合物 III, 3 者均为浅黄色粉末。

流分 I: 浅黄色粉末, mp 235~ 238 °C, UV λ nm: 358, 259, 270 (MeOH)。TOF-MS: 285 [M-H]⁻, 571 [2M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.02 (1H, br s, 5-OH), 7.45 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz, 6'-H), 7.40 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, 2'-H), 6.91 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, 5'-H), 6.71 (1H, s, 3-H), 6.47 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 6-H), 6.59 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-8)。¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.8 (C-2), 103.3 (C-3), 181.4 (C-4), 161.4 (C-5), 99.0 (C-6), 164.9 (C-7), 93.9 (C-8), 157.3 (C-9), 103.9 (C-10), 118.8 (C-1'), 113.1 (C-2'), 145.9 (C-3'), 149.9 (C-4'), 116.0 (C-5'), 121.7 (C-6')。以上数据与文献^[7]对照一致, 可以断定 I 为木犀草素。

流分 II: 浅黄色粉末, mp 143~ 145 °C, 盐酸镁粉反应呈阳性。ESFMS *m/z*: 321 [M + Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 6-H), 6.83 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 8-H), 6.98 (1H, s, 3-H), 7.12 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 3', 5'-H), 8.10 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 2', 6'-H), 12.95 (1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.8 (C-2), 103.8 (C-3), 182.2 (C-4), 161.4 (C-5), 98.2 (C-6), 165.4 (C-7), 92.9 (C-8), 104.4 (C-10), 157.4 (C-9), 122.9 (C-1'), 128.6 (C-2', C-6'), 114.8 (C-3', C-5'), 162.6 (C-4'), 55.8 (4'-OCH₃), 56.3 (7-OCH₃)。以上数据与文献^[8]对照一致, 可以确认 II 为 5-羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮。

流分 III: 浅黄色粉末, mp 167~ 169 °C, 盐酸镁粉反应呈阳性。ESFMS *m/z*: 351 [M + Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.91 (9H, s, OCH₃ ×

3), 6.42 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 6-H), 6.82 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 8-H), 7.09 (1H, s, 3-H), 7.15 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, 5'-H), 7.60 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 2'-H), 7.73 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, 6'-H), 12.91 (1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.3 (C-2, C-5), 104.2 (C-3, C-10), 182.3 (C-4), 98.3 (C-6), 165.4 (C-7), 92.9 (C-8), 157.5 (C-9), 122.9 (C-1'), 109.7 (C-2'), 149.2 (C-3'), 152.4 (C-4'), 111.9 (C-5'), 120.4 (C-6'), 55.7 (7-OCH₃), 56.1 (4'-OCH₃), 56.3 (3'-OCH₃)。以上数据与文献^[9]对照一致, 可以确认 III 为 5-羟基-7, 3', 4'-三甲氧基黄酮。

4 讨论

本实验采用高速逆流色谱法从白花败酱草乙酸乙酯萃取物中直接分离得到 3 个纯度高于 98% 的黄酮, 简便、快速。在逆流色谱分离过程中, 进样量为 400 mg, 分离得到的化合物总量为 62 mg, 其余部分主要是最易溶于流动相和固定相的化合物, 分别为最早出峰(第一个平头峰)和最迟出峰(保留在固定相中), 除此之外还有部分没有吸收的化合物。这样就将目标成分与杂质分开, 达到分离的目的。

REFERENCES

- [1] CHENG B H. The value of *Patrinia villosa* Juss [J]. *J Plant* (植物杂志), 2002, (6): 15.
- [2] HE F J, YANG J P, TIAN Y J. The chemical and pharmacology research of the *Patrinia genus*[J]. *Gansu Med* (甘肃医药), 1993, 12 (3): 161-163.
- [3] XU C J, ZENG X Y, YU D Q. The chemical research of *Patrinia villosa* Juss [J]. *Acta Pharm Sin*, 1985, 20 (9): 652-656.
- [4] WANG X, WANG Y Q, GENG Y L, et al. Isolation and purification of honokiol and magnolol from cortex *Magnoliae officinalis* by high speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1036(2): 171-175.
- [5] JIANG Y, LU H T, CHEN F. Preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of liquorice using high speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1033 (1): 183-196.
- [6] MANDAVA N B, ITO Y. *Countercurrent Chromatography, Theory and Practice*[M]. New York, Marcel Dekker, 1998: 443-449.
- [7] REN Y L, YANG J S. Study on chemical constituents of *Saussurea tridac-tyla* Schr Bip II [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36 (9): 590-593.
- [8] HUANG L Z, LU Z Z, LI J B, et al. Study on chemical constituents of *Lonicera japonica*[J]. *Chin Trad Herbal Drugs* (中草药), 1996, 27 (11): 645-646.
- [9] ABDEDATIF Z, AKINO J, BERNARD B. DNA topoisomerase I inhibitors: cytotoxic flavones from *Ceethedon Fannaensis* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59 (5): 701-703.

(收稿日期: 2005-05-26)

《中国药学杂志》为我国中文核心期刊