

高速逆流色谱快速分离四种甘草黄酮及其结构鉴定

高 蕾¹ 杨光丽² 陈俐娟³

(1. 四川大学化学工程学院, 成都, 610065; 2. 四川大学药学院, 成都, 610065; 3. 四川大学肿瘤生物治疗国家重点实验室, 成都, 610041)

摘 要

通过高速逆流色谱从新疆产甘草粗提物中分离得到甘草黄酮醇、甘草素、芒柄花素和甘草异黄酮甲四种甘草类黄酮。溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1 2 1 1), 上相作为固定相, 下相作为流动相, 主机旋转方向为顺时针, 转速 850rpm, 流速 4.0mL/min, 检测波长 260nm。经过 160min 分离, 从 400mg 甘草粗提物中得到甘草黄酮醇 26mg、甘草素 8mg、芒柄花素 12mg、甘草异黄酮甲 10mg, 纯度分别为 96.3%、95.7%、98.5%、98.8%。结构经熔点、UV、MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定。

关键词: 高速逆流色谱 甘草黄酮醇 甘草素 芒柄花素 甘草异黄酮甲

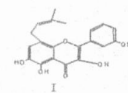
引言

甘草属(*Glycyrrhiza*)植物系豆科蝶形花亚科多年生草本植物。该属在我国有 18 种 3 个变种, 分别为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)和光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)^[1]。甘草是我国传统中药, 素有“十药九草”之称, 在传统中医药中被称为“国老”。现代研究发现, 甘草除了传统的镇痰止咳、清热解毒、抗炎、抗变态作用外, 还有良好的治疗急慢性病毒肝炎和抗肿瘤的效果。其中甘草中的黄酮类成分被证明比甘草酸具有更好的抗肿瘤疗效^[2-4]。

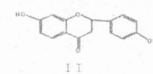
因植物甘草种属多样, 不同种属甘草粗提物所含成分差别较大, 且有效成分含量低, 故市场上一直缺少甘草黄酮的相应标准品。本实验首次成功用高速逆流色谱从豆科甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)中分离得到甘草黄酮醇、甘草素、芒柄花素和甘草异黄酮甲四种黄酮成分, 纯度均达到 95% 以上。据研究显示, 其中甘草素具有抑止过氧化物阴离子的产生、抗氧化溶血及保护红细胞的作用^[2]。甘草异黄酮甲具有雌性激素样作用, 可抑止乳腺癌细胞增殖^[3-4]。

高速逆流色谱作为一种不需要固态载体的液-

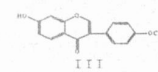
液分配色谱, 现已在天然产物分离纯化领域得到广泛应用。与传统柱层析法相比, 它具有分离速度快、样品吸附低、分离重现性好等优点^[5]。在此以前, 这些成分通常采用硅胶柱层析法分离, 速度较慢, 重复效果不够理想。用高速逆流色谱法不仅使分离速度大为提高, 且根据紫外吸收色谱图可良好重复收集样品, 对深入研究甘草黄酮药效作用机制有重要意义。



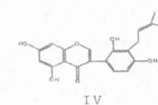
I: 甘草黄酮醇 (Licoflavonol)



II: 甘草素 (Licochalcone A)



III: 芒柄花素 (formononetin)



IV: 甘草异黄酮甲 (Licoisoflavone A)

图 1 四种馏分结构式

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料

TBE300A 高速逆流色谱仪:上海同田生化技术有限公司;

A KTA prime 泵及紫外检测系统:美国 GE 公司;

HX-1050 恒温器:北京博医康实验仪器有限公司;

Alliance 2996 高效液相色谱仪:美国 Waters 公司;

色谱柱: Sunfire C₁₈ (120mm ×70mm, 5μm), 美国 Waters 公司;

Mercury plus 400 核磁共振仪:美国瓦里安公司;

Waters Q-tof 质谱仪;

申光 WRS-1B 数字熔点仪:上海申光仪器仪表有限公司。

甘草粗提物制备及 HSCCC 分离用溶剂(正己烷、乙酸乙酯、甲醇等):均为分析纯,天津科密欧化学试剂厂;

HPLC 分析用乙腈:色谱纯, Fisher chemicals;

实验用水:经 Millipore 超纯水制备系统净化;

甘草:药材购自成都中草药批发市场,产地新疆。

1.2 样品制备

称取 5kg 甘草,粉碎,过 40 目筛,用 70%乙醇按体积比 3:1 在室温(28℃)下浸泡三天,将所得浸泡液旋蒸近干,得到浸膏。将浸膏用 70%甲醇重溶解,依次用正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取。取乙酸乙酯萃取层旋蒸干,置于真空干燥箱 45℃ 中完全干燥,得到红棕色粉末 561g(即得实验用甘草粗提物)。

1.3 两相溶剂体系及样品溶液的制备

本实验所用溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:2:1:1),四种溶剂按比例配置于分液漏斗中,充分振荡后静置,待平衡后分别得到上下两相,上相作固定相,下相作流动相,超声脱气 5min,备用。称取适量样品充分溶解于下相(流动相)中,使样品浓度为 20mg/mL。

1.4 分配系数的测定

本实验根据文献[6]用 HPLC 测定样品在不同

溶剂体系中的分配系数。于试管中称取 1mg 甘草粗提物,分别加入已达到分配平衡的上、下相各 1mL,充分振荡溶解。取已溶解样品的上、下相各 100μL,离心浓缩干,用 HPLC 测定上相中组分峰面积为 A₁,下相中组分峰面积为 A₂,分配系数 $K = A_2 / A_1$ (表 1)。

表 1 馏分 ~ 在正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系中分配系数

正己烷-乙酸乙酯- 甲醇-水				分配系数			
1	0.5	1	0.5	2.15	2.64	1.22	0.8
1	1	1	1	1.93	1.51	0.96	0.71
1	2	1	1	1.73	0.86	0.69	1.12
1	2	1.5	1	1.56	0.83	1.35	0.94

1.5 HSCCC 分离过程

上相作为固定相,下相作为流动相,将固定相与流动相按体积比 70:30,以流速 20mL/min 泵入高速逆流色谱主机螺旋管,保护压力设定为 1MPa。当主机螺旋管被完全充满后,调节恒温水浴为 25℃,开启 HSCCC 主机,旋转方向为顺时针,使转速逐渐增加到 850rpm,将流动相以 4.0mL/min 流速泵入。待 HSCCC 主机螺旋管内流动相与固定相达到动力学平衡时,即只有流动相流出时,可进样。紫外检测器设置波长为 254nm。根据紫外吸收色谱图手动收集各馏分。

2 结果与讨论

2.1 HSCCC 溶剂系统选择和实验参数的设定

溶剂系统是决定高速逆流色谱分离样品效果的最重要因素。不同的溶剂系统由于粘度、极性、密度等性质的差异,对相同的成分会产生不同的溶解、分配能力,形成分配系数的差异^[5]。本实验中共考察正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 1:0.5:1:0.5、1:1:1:1、1:2:1:1、1:2:1.5:1 四个溶剂系统,并通过 HPLC 测定此四个系统的分配系数(见表 1)。实验结果证明,正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 1:2:1:1 系统的分离效果最为理想。

此外,影响逆流色谱分离效果的因素还有主机转速、流动相流速和样品浓度。流动相流速主要影响分离时间长短和分离度,本实验分别考察以下流速:2mL/min、3 mL/min、4 mL/min、5 mL/min,实

实验结果证明,流速为 4 mL/min 时,既可达到理想分离效果也可缩短分离时间;主机转速是影响固定相保留率的重要因素,转速高则固定相保留率高,但分离管易受损坏,在本实验中主机设定转速为 850rpm;样品浓度分别考察了 10mg/mL、20 mg/mL、25 mg/mL,其中样品浓度为 20 mg/mL 时,结果最为理想。在上述最佳分离条件下,固定相在初始动力学平衡时保留率为 65%,随着分离时间的增长,逐渐有部分固定相随馏分被带出,分离结束后,固定相的保留率为 33%。完成一次分离需时 160min,可从 400mg 甘草粗提物中得到甘草黄酮醇 26mg、甘草素 8mg、芒柄花素 12mg、甘草异黄酮甲 10mg(图 2)。

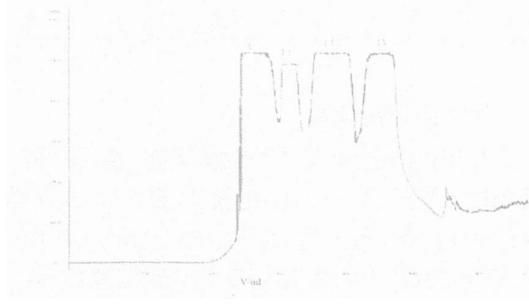


图 2 甘草粗提物 HSCCC 色谱图

2.2 纯度鉴定

甘草粗样品及分离所得各馏分液相色谱分析条件为:

色谱柱:Sunfire C₁₈ (120mm ×70mm, 5μm);流动相:乙腈-水-冰醋酸(40 60 0.2)等度洗脱,体积流量 1mL/min,检测波长 254nm,柱温 25℃,进样量 10μL。用峰面积归一法确定四个馏分纯度分别为:馏分 I 96.3%、馏分 II 95.7%、馏分 III 98.5%、馏分 IV 98.8%(图 3、4)。

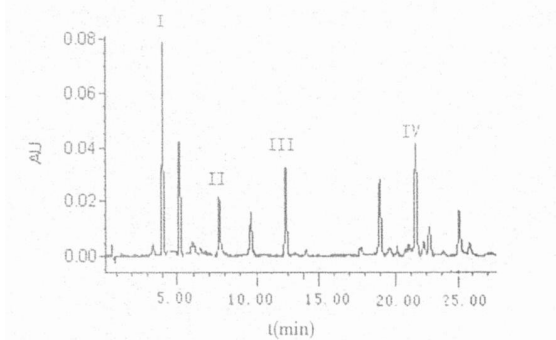


图 3 甘草粗提物 HPLC 色谱图

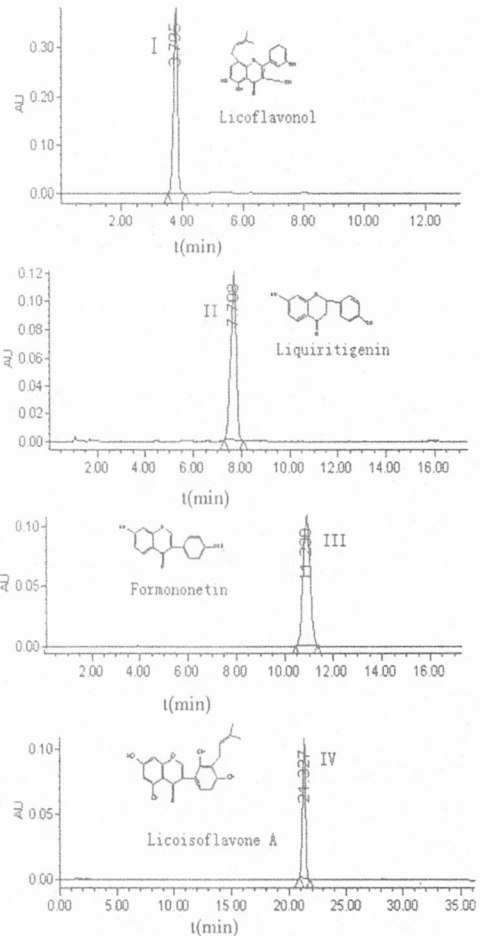


图 4 高速逆流色谱馏分 HPLC 色谱图

2.3 结构鉴定

取制备所得馏分进行熔点、UV、MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 分析,其结果如下:

2.3.1 馏分 I

甘草黄酮醇(Licoflavonol)为黄棕色粉末;mp: 185 ~ 187℃;UV_{max} (nm) MeOH: 219, 270, TOF-MS: 353[M-1]⁻、260[M-93]⁻ (93 为甘草黄酮醇的苯酚支链);¹H-NMR (400MHz, DMSO): 5.28 (1H, t, J = 7.0Hz, 异戊烯支链)、6.16 (1H, d, J = 2.5Hz, 7-H)、7.38 (1H, d, J = 2.5Hz, 2'-H)、7.54 (1H, d, J = 2.5Hz, 6'-H)、9.21 (1H, s, 3-OH)、12.83 (1H, s, 5-OH)、10.86 (1H, s, 6-OH)、9.57 (1H, s, 3'-OH);¹³C-NMR (200MHz, DMSO): 163.6 (C-2)、126.6 (C-3)、182.1 (C-4)、161.4 (C-5)、169.2 (C-6)、123.6 (C-7)、120.7 (C-8)、157.9 (C-9)、113.8 (C-10)、136.3 (C-1'), 113.4 (C-2'), 157.2 (C-3'), 114.9 (C-4'), 129.8 (C-5'), 118.8 (C-6'),

23.1 (C-1'), 121.5 (C-2'), 127.9 (C-3'), 24.1 (C-4'), 17.5 (C-5')。该数据与文献[8]结果对照一致,故确定 I 为甘草黄酮醇。

2.3.2 馏分 II

甘草素 (Liquiritigenin) 为白色针状结晶; mp: 201 ~ 203 ; UV_{max} (nm) MeOH: 270, 315, TOF-MS: 255[M-1]⁻, 135[M-121]⁻ (去掉苯酚基团后再发生 cleavage C-O 重排, 135 为甘草素特征碎片峰^[7]), 119[M-121-16]⁻ (再脱去一个氧原子, 氧环结构被破坏, 形成更稳定的单苯环结构, 也为甘草素特征碎片峰^[7]); ¹H-NMR (400MHz, DMSO) : 10.56 (1H, s, 7-OH), 9.57 (1H, s, 4⁻OH), 7.64 (1H, d, J = 8.6 Hz, 5-H), 7.32 (2H, d, J = 8.5 Hz, 2'-H, 6⁻H), 6.79 (2H, d, J = 8.5 Hz, 3⁻H, 5'-H), 6.50 (1H, dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 6-H), 6.33 (1H, d, J = 2.1 Hz, 8-H), 5.44 (1H, dd, J = 12.8, 2.8 Hz, 2-H), 3.11 (1H, dd, J = 16.8, 12.8 Hz, 3-H); ¹³C-NMR (200 MHz, DMSO) : 77.6 (C-2), 44.1 (C-3), 190.5 (C-4), 129.1 (C-5), 109.8 (C-6), 164.6 (C-7), 102.5 (C-8), 158.8 (C-9), 120.1 (C-10), 129.3 (C-1'), 157.6 (C-4'), 128.2 (C-2', C-6'), 115.1 (C-3', C-5')。以上数据与文献[9]、[10]结果对照一致,故确定 II 为甘草素。

2.3.3 馏分 III

芒柄花素 (formononetin) 为白色针状结晶; mp: 246 ~ 248 ; UV_{max} (nm) MeOH: 246, 310; TOF-MS: 267[M-1]⁻, 195[M-72]⁻ (该结构具有氢, 发生麦氏重排, 脱掉一个中性小分子 C₄H₈O₁, 分子量 72), 269 [M+1]⁺, 197 [M-72]⁺; ¹H-NMR (400M Hz, DMSO) : 8.13 (1H, s, 2-H), 8.04 (1H, d, J = 8.5 Hz, 5-H), 7.45 (2H, d, J = 8.5 Hz, 2', 6⁻H), 7.08 (1H, d, J = 2.0 Hz, 8-H), 6.88 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 6-H), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz, 3', 5⁻H), 3.83 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (200MHz, DMSO) : 152.1 (C-2), 124.3 (C-3), 175.6 (C-4), 127.1 (C-5), 115.6 (C-6), 161.7 (C-7), 102.5 (C-8), 158.3 (C-9), 116.4 (C-10), 123.2 (C-1'), 128.3 (C-2', 6'), 112.6 (C-3', 5'), 158.8 (C-4'), 55.3 (C-4', -OCH₃)。以上数据与文献[11]结果对照一致,故确定 III 为芒柄花素。

2.3.4 馏分 IV

甘草异黄酮甲 (Licoisoflavone A) 为浅黄色粉末; mp: 112 ~ 114 ; UV_{max} (nm) MeOH: 315, 367; TOF-MS: 353[M-1]⁻, 255[M-98]⁻; ¹H-NMR (400M Hz, DMSO) : 12.83 (1H, s, 5-OH), 10.86 (1H, s, 7-OH), 9.30 (1H, s, 4⁻OH), 8.23 (1H, s, 2⁻OH), 8.11 (1H, s, 2-H), 6.75 (1H, d, J = 9 Hz, 6⁻H), 6.39 (1H, d, J = 2 Hz, 6-H), 6.37 (1H, d, J = 9 Hz, 5-H), 6.22 (1H, d, J = 2 Hz, 8-H), 5.16 (1H, t, J = 7 Hz, 2'⁻H), 3.24 (2H, d, J = 7 Hz, 1'⁻H), 1.71 (3H, s, -CH₃), 1.62 (3H, s, -CH₃); ¹³C-NMR (200M Hz, DMSO) : 153.5 (C-2), 119.4 (C-3), 178.2 (C-4), 160.6 (C-5), 97.6 (C-6), 163.1 (C-7), 96.7 (C-8), 157.9 (C-9), 105.0 (C-10), 108.2 (C-1'), 150.8 (C-2'), 115.3 (C-3'), 155.4 (C-4'), 105.7 (C-5'), 127.5 (C-6'), 21.4 (C-1'), 121.8 (C-2'), 128.6 (C-3'), 24.1 (C-4'), 17.5 (C-5')。以上数据与文献[12]结果对照一致,故确定馏分 IV 为甘草异黄酮甲。

3 结论

高速逆流色谱法在天然产物分离纯化领域展现了巨大的前景,与传统的柱分离相比,它具有分离速度快、进样量大、分离效果重复性好的优势;与制备型液相色谱相比,高速逆流色谱对化学试剂和样品纯度要求较低,设备维护简易。用高速逆流色谱法对多成分的复杂样品进行初次分离,效果好于传统柱层析。若与制备液相色谱结合,则可快速、大量的制得相应标准品,并大大降低成本。

参考文献

- [1] 杨爱馥, 黄凤兰, 乌拉尔甘草药理作用研究进展[J], 东北农业大学学报, 2006, 37(1): 115 ~ 119
- [2] 田庆来, 关月平, 张波, 甘草有效成分的药理作用研究进展[J], 天然产物研究与开发, 2006, 8: 34 ~ 37
- [3] 于辉, 李春香, 宫凌涛, 甘草的药理作用概述[J], 现代生物医学进展, 2006, 6: 21 ~ 23
- [4] Zhao F. P., Dieter Strack, Alfred Baumert, et al., Antioxidant constituents from Licorice roots[J], Phytochemistry, 2003, 6: 219 ~ 228
- [5] 张天佑, 逆流色谱技术[M], 北京: 北京科学技术出版社, 2001: 171
- [6] Ito Y., Conway W. D. (Eds), High-speed Countercurrent Chromatography [M], Wiley/ Interscience, New York: 1996, 1: 36

(下转第 50 页)

硝化,反应器出现很好的脱氮效果。

参考文献

- [1]Woo-Nyoung Lee ,et al. ,Factors affecting filtration characteristics in membranecoupled moving bed biofilm reactor[J] ,Water res. ,2006 ,40 : 1827 ~ 1835
 [2]杨 平,方治华,石炎福,多孔聚合物载体与活性炭载体用于厌氧

- 流化床处理有机废水的比较[J],环境科学,2001,22(1):45~48
 [3]郑 平,等,新型生物脱氮理论与技术[M],北京:科学出版社,2004
 [4]尤勇军,等,同步硝化反硝化生物脱氮技术研究[J],环境污染治理技术与设备,2006,7(4):128~131
 [5]王学江,等,DO 对 MBBR 同步硝化反硝化生物脱氮影响研究[J],同济大学学报,2006,34(4):514~517

Study on the treatment characteristics of the membrane-coupled fluidized bed bioreactor operated under high MLSS

Song Wei, Yang Ping

(Collage of architecture and enviroment, Sichuan University, China, 610065)

Abstract :Study on the treatment characteristics of a novel MBR operated under high MLSS. The exerimental results showed that it is feasible for this new novel MBR to put into application. If the MLSS was between 20 ~ 25g/L and suspended carrier in 5 % volume rate, control DO between 0.5 ~ 1.0mg/L and C/N between 4 ~ 6 and HRT in 4h, the MBR can reach a high efficiency of treatment in denitrification and COD remove. In long term of operated, the novel MBR show high volumetric loading bearing and low membrane fouling and low sludge yields.

Key words :suspended carrier ; biofilm ; denitrification ; MBR ; fluidized bed ; MLSS

(上接第 37 页)

- [7]周 燕,王明奎,廖 循,甘草有效成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J],分析化学,2004,32:174~178
 [8]贾世山,马超美,王建明,甘草叶中黄酮成分的化学研究[J],药理学学报,1990,25(2):758~762
 [9]Cheng-jun Ma, Gui-sheng Li, Da-lei Zhang, One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from Glycyrrhiza uralensis Risch. using high-speed counter-current chromatography

- [J], Journal of Chromatography A, 2005, 7:188~192
 [10]李伟东,阚旒铭,刺果甘草化学成分的研究[J],南京中医药大学学报,2000,16(4):223~226
 [11]马晓峰,田晓明,陈英杰,蒙古黄芪中黄酮类成分的研究[J],中草药,2005,36(9):1293~1298
 [12]张埭梅,徐旭东,黄甘草异黄酮成分的研究[J],药理学学报,1997,32(4):301~304

One step isolation and purification of four licoflavones from Glycyrrhiza Uralensis by High-speed Counter-counter Chromatography

Gao Lei^{*1}, Wang Biqin², Yang Guangli³, Chen Lijuan⁴

(1. College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu, 610065; 2. College of chemistry, Sichuan Normal University, Chengdu, 610068; 3. College of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, 610065; 4. The State Key Lab of Tumor Biotherapy, Sichuan University, Chengdu, 610041)

Abstract :In this paper, we developed a preparative high-speed counter-counter chromatography (HSCCC) to isolate four flavones from Glycyrrhiza Uralensis: Licoflavonol, Liquiritigenin, Formononetin, and Licoisoflavone A. The two-phase solvent system was composed of n-hexane: ethyl acetate: methanol: water (1:2:1:1). The upper phase was stationary phase and the lower phase was mobile phase. Rotational direction was clockwise and rotational speed was 850r/min. The effluent was detected at 260nm at the flow rate 4.0ml/min. There were 26mg Licoflavonol, 8mg Liquiritigenin, 12mg Formononetin and 10mg Licoisoflavone A through one step separation from 400mg glycyrrhiza uralensis crude extracts, and the purity was separately: 96.3%, 95.7%, 98.5% and 98.8%. MP, UV, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR was identified the structures of four fractions.

Key words :HSCCC Licoflavonol Liquiritigenin Formonoetin Licoisoflavone A