

高速逆流色谱分离制备椭圆叶花锚中的2种吡酮苷元

刘永玲^{1,2}, 陈涛^{1,2}, 王萍^{1,2}, 尤进茂¹, 刘永军¹, 李玉林^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 椭圆叶花锚的主要活性成分为吡酮类化合物, 这类化合物具有利胆、抗炎、抗菌及抗病毒活性。应用高速逆流色谱法建立了2种高纯度吡酮苷元的分离制备方法。对椭圆叶花锚氯仿萃取部位运用高速逆流色谱分离纯化, 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:7:5, v/v/v/v)为两相溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相。在主机转速800 r/min, 流动相流速1.5 mL/min, 检测波长254 nm条件下进行分离制备。所得产物经高效液相色谱分析检测, 其化学结构由核磁共振氢谱(¹H NMR)和核磁共振碳谱(¹³C NMR)鉴定。在此条件下, 从100 mg粗样品中一步分离得到18 mg 1-羟基-2,3,5-三甲氧基吡酮, 14 mg 1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基吡酮。经高效液相色谱分析, 其纯度均达98%以上。该方法简便、快速, 所得产物纯度高, 适合于椭圆叶花锚吡酮苷元的制备分离。

关键词: 高速逆流色谱; 1-羟基-2,3,5-三甲氧基吡酮; 1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基吡酮; 椭圆叶花锚

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)05-0536-04

Preparative separation of two xanthenes from *Halenia elliptica* by high-speed counter-current chromatography

LIU Yongling^{1,2}, CHEN Tao^{1,2}, WANG Ping^{1,2}, YOU Jinmao¹, LIU Yongjun¹, LI Yulin^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A high performance method for isolation and purification of two xanthenes from a crude extract of *Halenia elliptica* was successfully established by utilizing high-speed counter-current chromatography (HSCCC). The separation was performed with a two-phase solvent system composed of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water (5:5:7:5, v/v/v/v) with the lower phase as the mobile phase at a flow rate of 1.5 mL/min. The apparatus was rotated at 800 r/min. The effluent was detected at 254 nm. Under the optimized conditions, 18 mg of 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxyxanthone and 14 mg of 1-hydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthone were obtained from 100 mg of the crude extract of *Halenia elliptica* in one-step separation within 360 min. The results of high performance liquid chromatographic (HPLC) analysis showed that the purity of each of the target compounds was over 98%. The chemical structures of the two compounds were confirmed by ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and ¹³C NMR. The established method is simple, highly efficient and suitable for large scale separation of xanthenes from *Halenia elliptica*.

Key words: high-speed counter-current chromatography (HSCCC); 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxyxanthone; 1-hydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthone; *Halenia elliptica*

椭圆叶花锚 (*Halenia elliptica*) 系龙胆科 (Gentianaceae) 花锚属 (*Halenia*) 植物, 是藏药中治疗肝胆系统疾病的常用药物之一^[1]。临床上, 椭圆叶花锚多用于治疗小儿急性黄疸肝炎和小儿急性

乙型肝炎, 疗效显著^[2,3]。已有研究表明, 椭圆叶花锚中吡酮苷类物质具有抗肝炎的作用^[4], 但其生物活性则主要是通过转化为吡酮苷元产生^[5]。目前, 有关椭圆叶花锚吡酮成分分离的研究报道大多采用

* 通讯联系人: 李玉林, 副研究员, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: liyulin@nwipb.cas.cn.

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目。

收稿日期: 2012-01-13

传统柱色谱方法^[6-10]存在样品组分损失、玷污、变性、失活、拖尾、分离困难、收率低等不足。高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)是一种不使用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术。其克服了固相载体对样品的吸附而产生的损失、变性等优点,并可以在短时间内实现高效制备性分离,因而在植物有效成分的分离与制备方面得到了广泛的应用^[11-13]。本研究采用 HSCCC 技术对椭圆叶花锚中吡酮苷元成分进行了分离制备与纯化,得到两种高纯度的吡酮苷元(1-羟基-2,3,5-三甲氧基吡酮(I)和1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基吡酮(II)),为其进一步药用开发研究提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

TBE-300A ÄKTA Prime 高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司),配有 ÄKTA Prime 泵及紫外检测系统(美国 GE 公司),聚四氟乙烯(PTFE)管分离柱(内径 1.6 mm,分离柱体积 280 mL),N2000 色谱工作站和溶剂选择系统(浙江大学智达信息工程有限公司),HX-1050 恒温循环器(北京博医康实验仪器有限公司),Agilent 1200HPLC 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),配备 G1354A 四元泵,G1313A 自动脱气机,G1316A 柱温箱,G1315B 二极管阵列检测器和 G1329A 自动进样器;AM400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。

椭圆叶花锚采集于青海省互助县南门峡乡,由中国科学院西北高原生物研究所陈世龙研究员鉴定。萃取及 HSCCC 分离用的试剂氯仿、甲醇、乙酸乙酯和正己烷均为分析纯,高效液相色谱(HPLC)分析用甲醇为色谱纯(山东禹王公司),实验用水为超纯水。

1.2 样品制备

取干燥的椭圆叶花锚全草 500 g,切至 0.5 ~ 1.0 cm 碎段,加 10 倍体积的 75% (体积分数,下同)乙醇。于 80 °C 回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液并减压浓缩至无醇味,得浸膏 110 g。将浸膏加水悬浮后,置于分液漏斗中,用石油醚(沸点 60 ~ 90 °C)进行萃取,直至石油醚萃取溶液无色。再用氯仿萃取,反复多次,直至氯仿萃取部分无颜色。回收氯仿,得氯仿萃取部分 25 g,作为 HSCCC 待分离样品,放置 4 °C 冰箱内备用。

1.3 溶剂体系及样品溶液的制备

在分液漏斗中配制正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:7:5,体积比,下同)两相溶剂系统,充分振摇

后静置过夜。上相为固定相,下相为流动相,使用前分别超声脱气 30 min。取 100 mg 待分离样品粉末,振荡后完全溶解于 20 mL 上相溶液中,备用。

1.4 分离与鉴定

1.4.1 HSCCC 分离制备

以最大流速 20 mL/min 将溶剂系统上相泵入主机并充满分离螺旋管,开启循环水浴并将温度设定为 25 °C。开启主机电源,以 800 r/min 正向旋转。待转速稳定后,泵入流动相。待流动相从管柱出口流出且基线稳定后,将样品溶液由进样圈注入。管柱出口处流出液在 254 nm 波长下连续检测,根据色谱图手动收集各峰组分,HPLC 检测其纯度。

1.4.2 HPLC 分析及结构鉴定

椭圆叶花锚氯仿萃取部分和高速逆流色谱分离得到的各组分用 HPLC 分析。HPLC 分析条件: Eclipse XDB-C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 甲醇(A)-水(B)线性梯度洗脱(0 ~ 15 min, 50%A ~ 65%A; 15 ~ 25 min, 65%A ~ 68%A; 25 ~ 30 min, 68%A ~ 95%A; 30 ~ 40 min, 95%A); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 25 °C。椭圆叶花锚氯仿萃取部分的 HPLC 谱图如图 1 所示。

HSCCC 分离得到的各峰组分的结构根据核磁共振氢谱(¹H-NMR)和核磁共振碳谱(¹³C-NMR)的数据进行鉴定。

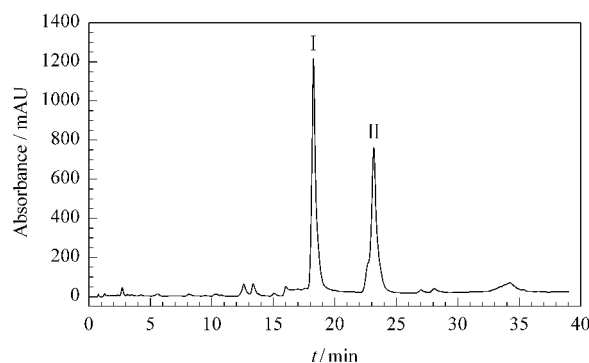


图 1 椭圆叶花锚氯仿萃取部分的 HPLC 谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of chloroform extract from *Halenia elliptica*

Column: Eclipse XDB C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase: methanol (A) and water (B) in linear gradient mode (0 - 15 min, 50%A - 65%A; 15 - 25 min, 65%A - 68%A; 25 - 30 min, 68%A - 95%A; 30 - 40 min, 95%A); flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 254 nm; column temperature: 25 °C.

I. 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxyxanthone; II. 1-hydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthone.

2 结果和讨论

2.1 HSCCC 溶剂系统的优化选择

在高速逆流色谱中,溶剂系统的选择至关重要,

合适的溶剂系统是天然药物中活性成分分离纯化的关键。根据色谱理论,用于 HSCCC 样品分离的两相溶剂系统需满足如下条件: 目标物能稳定的溶于两相溶剂; 目标物在两相中具有合适的分配系数 K ($0.5 < K < 2.0$)^[14,15], 分离因子 ($\alpha = K_{II}/K_I$, $K_{II} > K_I$) 大于 1.5; 溶剂系统分层时间短 (< 30 s); 有合适的固定相保留率 ($> 50\%$)。若 K 远小于 1, 样品会很快随流动相流出, 达不到分离效果; 若 K 远大于 1, 样品的出峰时间会延长, 形成宽峰。本研究测定了两个目标化合物在不同溶剂系统中的分配系数, 结果见表 1。

表 1 两个目标化合物在不同溶剂系统中的分配系数 (K)

Table 1 Partition coefficients (K) of the two target components in different solvent systems

Solvent system	Volume ratio	K_I	K_{II}
Chloroform-water	6:6	<0.01	<0.01
Chloroform-methanol	5:1:5	<0.01	0.02
-water	5:2:6	0.03	0.12
	5:3:2	0.11	0.25
<i>n</i> -Hexane-ethyl acetate-	1:1:1:1	<0.01	2.34
methanol-water	5:4:5:6	0.87	3.25
	5:5:8:4	0.38	0.57
	5:4:5:4	0.65	2.31
	5:5:7:5	0.96	1.46

鉴于待分离样品为椭圆叶花锚醇提取物的氯仿萃取部位, 首先选用氯仿-水作为溶剂系统, 甲醇作极性调节剂。由表 1 可知, 目标化合物大部分溶于下相 (K 远小于 1), 故氯仿-水体系不适于目标化合物的分离。选用正己烷-水为基本溶液的溶剂系统, 并以乙酸乙酯和甲醇作极性调节剂, 考察了目标化合物在不同比例正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水中的分配情况。由表 1 可知, 当采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:4:5:4, v/v/v/v) 为溶剂系统时, 两个目标化合物有较好的分离因子 ($\alpha = 3.55 > 1.5$), 但是化合物 II 的分配系数大于 2, 洗脱时间较长。当用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (5:5:7:5, v/v/v/v) 为两相溶剂系统时, 目标化合物的分配系数 ($0.5 < K < 2$) 及分离因子 ($\alpha = 1.52 > 1.5$) 合理, 固定相保留率大于 60%, 可实现目标化合物的高效分离。本溶剂体系由于上相体积明显少于下相体积, 故用上相作为固定相。实验同时对流动相流速、旋转管转速和分离温度等也进行了优化, 结果发现, 在流速 1.5 mL/min、转速为 800 r/min、温度为 25 °C 条件下, 分离结果令人满意。在此分离条件下, 从 100 mg 待分离样品中一次性得到 18 mg 化合物 I 和 14 mg 化合物 II。HSCCC 分离谱图见图 2。HPLC 测定两种化合物的纯度均大于 98% (见图 3)。

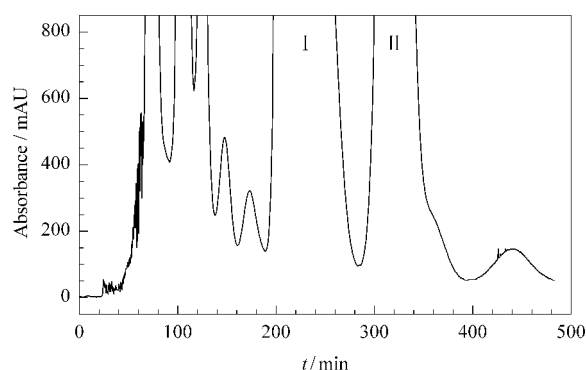


图 2 椭圆叶花锚氯仿萃取部分的 HSCCC 分离谱图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of chloroform extract from *Halenia elliptica*

Two-phase solvent system: *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water (5:5:7:5, v/v/v/v); mobile phase: the lower phase; flow rate: 1.5 mL/min; revolution speed: 800 r/min; detection wavelength: 254 nm; separation temperature: 25 °C; retention of the stationary phase: 65%.

For I and II, see Fig. 1.

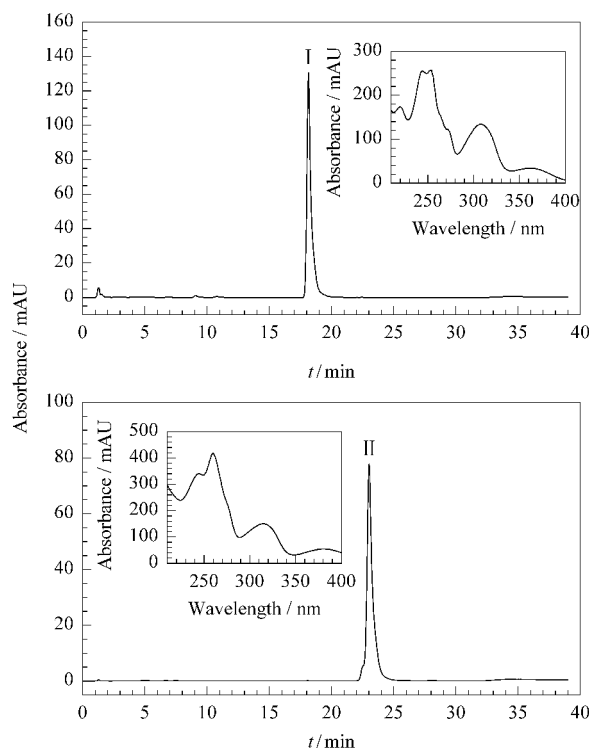


图 3 HSCCC 制备组分的 HPLC 谱图及其紫外光谱
Fig. 3 HPLC chromatograms and ultraviolet spectra of fractions prepared from HSCCC

Conditions and peak identifications were the same as in Fig. 1.

2.2 HSCCC 制备组分结构鉴定

化合物 I 黄色粉末, ^1H NMR (400 MHz, DM-SO-d_6): 12.70 (s, 1H, 1-OH), 7.67 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-8), 7.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-6), 7.41 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7), 6.86 (s, 1H, H-4), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6):

d_6): 180.7 (C=O), 160.3 (C-1), 153.2 (C-4a), 152.3 (C-3), 148.1 (C-4b), 145.7 (C-5), 131.4 (C-2), 124.3 (C-7), 121.1 (C-8a), 116.8 (C-8), 115.7 (C-6), 103.5 (C-8b), 91.8 (C-4), 60.2 (OCH₃), 56.9 (OCH₃), 56.4 (OCH₃)。参照文献^[6-8] 确定该化合物为 1-羟基-2,3,5-三甲氧基吡喃酮(1-hydroxy-2,3,5-trimethoxyxanthone)。

化合物 II 黄色粉末, ¹H NMR(400 MHz, DM-SO- d_6): 12.50(s, 1H, 1-OH), 7.67(d, J = 7.6 Hz, 1H, H-8), 7.54(d, J = 8.0 Hz, 1H, H-6), 7.40(t, J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 4.07(s, 3H, OCH₃), 4.00(s, 3H, OCH₃), 3.93(s, 3H, OCH₃), 3.83(s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO- d_6): 181.2(C=O), 153.8(C-3), 149.7(C-1), 148.3(C-5), 145.6(C-4a), 145.2(C-4b), 134.9(C-4), 132.4(C-2), 124.3(C-7), 120.0(C-8a), 117.1(C-8), 115.7(C-6), 104.4(C-8b), 61.5(OCH₃), 60.6(OCH₃), 56.5(OCH₃)。参照文献^[16-18] 确定该化合物为 1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基吡喃酮(1-hydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthone)。

3 结语

本研究采用高速逆流色谱分离方法,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:7:5, v/v/v/v)为溶剂,从 100 mg 椭圆叶花锚醇提物的氯仿萃取部分一步分离得到 18 mg 1-羟基-2,3,5-三甲氧基吡喃酮,14 mg 1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基吡喃酮,纯度均在 98% 以上,为椭圆叶花锚吡喃酮苷元成分的系统分离研究提供了一种高效的分离制备方法。与传统分离方法相比,该方法具有简便、快速、节省溶剂的特点,具有较好的实际应用价值。

参考文献:

[1] State Administration of Traditional Chinese Medicine "Chinese Materia Medica" Editorial Board. Chinese Materia

Medica, Vol.2. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草, 第 2 卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 5561

- [2] Liu H G, Zhang T J, Wang L L, et al. Drug Evaluation Research (刘黄刚, 张铁军, 王丽莉, 等. 药物评价研究), 2011, 34(6): 448
- [3] Ji L J, Ji W H, Chen G C, et al. Journal of Wuhan Botanical Research (纪兰菊, 吉文鹤, 陈桂琛, 等. 武汉植物学研究), 2004, 22(5): 473
- [4] Gu Y, Zhong G Y, Zhang Y, et al. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology (古锐, 钟国跃, 张艺, 等. 中药新药与临床药理), 2009, 20(4): 397
- [5] Liu X, Liu Y, Shi Y P. China Journal of Chinese Material Medica (刘霞, 刘勇, 师彦平. 中国中药杂志), 2009, 34(5): 580
- [6] Sun H F, Hu B L, Ding J Y, et al. Acta Botanica Sinica (孙洪发, 胡伯林, 丁经业, 等. 植物学报), 1987, 29(4): 422
- [7] Wang H L, Chen H, Geng C A, et al. China Journal of Chinese Material Medica (王洪玲, 陈浩, 耿长安, 等. 中国中药杂志), 2011, 36(11): 1454
- [8] Dhasmana H, Garg H S. Phytochemistry, 1989, 28(10): 2819
- [9] Dhasmana H, Garg H S. Phytochemistry, 1990, 29(3): 961
- [10] Gao J, Wang S J, Fang F, et al. Acta Academiae Medicinae Sinicae (高洁, 王素娟, 方芳, 等. 中国医学科学院学报), 2004, 26(4): 364
- [11] Han X, Zhang T Y, Wei Y, et al. J Chromatogr A, 2002, 971(1): 237
- [12] Peng A Y, Qu X W, Li H, et al. Chinese Journal of Chromatography (彭爱一, 曲学伟, 李慧, 等. 色谱), 2010, 28(4): 383
- [13] Liu M Z, Zhang S J, Yang C H, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘敏卓, 张思佳, 杨春华, 等. 色谱), 2011, 29(5): 430
- [14] Wang X, Li F W, Zhang H X, et al. J Chromatogr A, 2005, 1090(1/2): 188
- [15] Oka H, Harada K, Ito Y. J Chromatogr A, 1998, 812: 35
- [16] Ji W, Cui Y L, Chen R J, et al. Chinese Journal of Chromatography (纪伟, 崔玉兰, 陈仁娟, 等. 色谱), 2010, 28(8): 813
- [17] Wang Y, Shi J G, Che Z T, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (王琰, 石建功, 车镇涛, 等. 药物分析杂志), 2008, 28(3): 345
- [18] Recio-Iglesias M C, Marston A, Hostettmann K. Phytochemistry, 1992, 31(4): 1387