

高速逆流色谱分离制备陈皮中的黄酮类化合物

孙印石¹, 刘政波¹, 王建华^{1*}, 王 迎², 祝丽香¹, 李来玲¹

(1. 山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018; 2. 泰山林业科学研究院, 山东 泰安 271000)

摘要 :应用高速逆流色谱法分离制备了陈皮中3种黄酮类化合物。以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为2:4:3:3)为两相溶剂系统,在主机转速850 r/min、流动相流速1.7 mL/min、检测波长280 nm条件下进行分离制备,6 h内从4.0 g陈皮粗提物中一步分离制备得到橙皮苷10.1 mg、桔皮素49.8 mg和5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮50.6 mg,纯度均达97.0%以上,各化合物结构经质谱和核磁共振氢谱、碳谱鉴定。利用该方法可以对陈皮中的黄酮类化合物进行快速的分离和纯化。

关键词 :高速逆流色谱,橙皮苷,桔皮素,5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮,陈皮

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)02-0244-04 栏目类别 :技术与应用

Preparative isolation and purification of flavones from *Pericarpium Citri Reticulatae* by high-speed counter-current chromatography

SUN Yinshi¹, LIU Zhengbo¹, WANG Jianhua^{1*}, WANG Ying², ZHU Lixiang¹, LI Lailing¹

(1. College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

2. Taishan Academy of Forestry, Taian 271000, China)

Abstract : Three flavones were prepared, isolated and purified from *Pericarpium Citri Reticulatae* by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). A two-phase solvent system composed of light petroleum-ethyl acetate-methanol-water (2:4:3:3, v/v/v/v) was used. Within 6 hours, 10.1 mg of hesperidin, 49.8 mg of 5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone and 50.6 mg of 5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone with their purities over 97.0% were obtained from 4.0 g of the crude extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* in one-step elution under the conditions of a flow rate of 1.70 mL/min, 800 r/min and the detection wavelength of 280 nm. The obtained fractions were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), and identified by mass spectrometry (MS), ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) and ¹³C-NMR. The results indicate that HSCCC is a powerful technique for the purification of flavones from *Citrus reticulata* Blanco.

Key words : high-speed counter-current chromatography (HSCCC); hesperidin; 5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone; 5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone; *Pericarpium Citri Reticulatae*

陈皮(*Pericarpium Citri Reticulatae*)为芸香科植物橘 *Citrus reticulatae* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮,具有理气、燥湿、化痰等作用^[1]。橙皮苷(Hesperidin)是陈皮中含量较高的特征性成分,具有维持血管正常渗透压、降低血管脆性、缩短流血时间等作用。此外,陈皮中尚有陈皮素、川陈皮素、新陈皮苷、桔皮素、5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮等生理活性物质^[2-4]。

高速逆流色谱(high-speed counter-current

chromatography,简称HSCCC)是一种液-液分配色谱技术。与其他色谱分离方法相比,HSCCC不用任何固体载体或支撑体作为固定相,样品只是通过互不溶解的两相溶剂间分配的不同而在短时间内实现高效分离和纯品的制备,因而近10年来在天然产物领域得到了关注和应用^[5-8]。

为了建立陈皮标准品的快速制备方法,为陈皮的质量评价提供参考,作者对陈皮中的黄酮类成分进行了研究。文献[5]已报道应用HSCCC分离陈

* 通讯联系人:王建华,教授,博士生导师。E-mail:sdauwangjh@yahoo.cn.

基金项目:泰安市科技发展计划[2007]10.

收稿日期:2008-06-29

皮有效成分的方法,本文简化了实验步骤,优化了色谱条件,用 HSCCC 一步分离制备得到橙皮苷 10.1 mg(组分 I)、桔皮素 49.8 mg(组分 II)和 5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮 50.6 mg(组分 III)。3 种产物的纯度经检测均达 97.0% 以上。其结构(见图 1)经电喷雾电离质谱(ESI-MS)、核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)和核磁共振碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)鉴定。

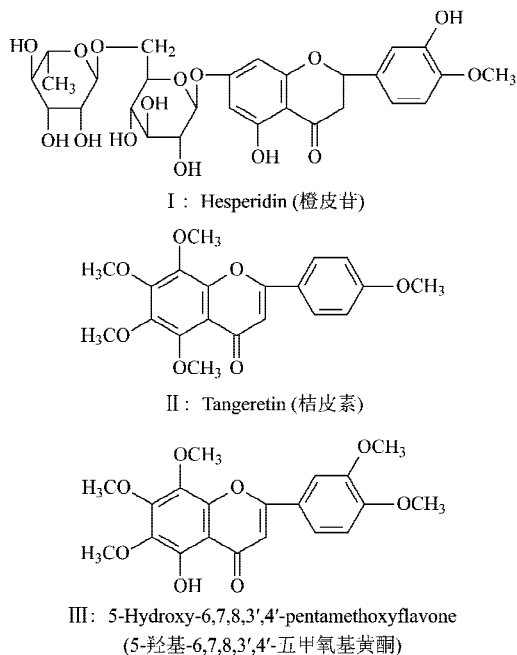


图 1 3 种黄酮类化合物的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of 3 flavone compounds

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GS10A 半制备型高速逆流色谱仪(北京天宝物华生物技术有限公司),包括 S1007A 泵,8823B-UV 紫外检测器(280 nm),BF-2002 CT11 信号采集单元,HW2000 工作站;采用多层聚四氟乙烯螺旋管(直径 2.6 mm,分离体积 230 mL, β 值为 0.5 ~ 0.8)20 mL 进样圈。Waters 600E 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Waters 公司),包括 600E 四元梯度泵,2996 光电二极管阵列(PDA)检测器,中文 Empower 色谱管理系统,四通道脱气机。SZ-93 自动双重蒸馏水器(上海亚荣生化仪器厂);FW177 型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);KQ5200D 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BD-25 十万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);N-1000 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

石油醚(沸程为 60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$)、乙酸乙酯、甲醇、乙醇为分析纯试剂,HPLC 所用甲醇为色谱纯试剂,

均为天津永大试剂厂生产;水为自制二次蒸馏水。

1.2 陈皮粗提取物的制备

取陈皮药材(购于泰安市龙潭大药店),样品经粉碎机粉碎,过 40 目筛。称取干燥的陈皮粉末 20 g,加入 400 mL 乙醇,超声波提取 30 min,过滤后提取上清液。将残渣重复提取 3 次,合并上清液,减压浓缩至浸膏后真空干燥,得黄色粉末,放置于冰箱中备用。

1.3 溶剂体系和样品溶液的配制

在分液漏斗中配制石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 2:3:3:3)两相溶剂体系,充分振摇后在室温下静置过夜。使用前分别取上下两相,超声脱气 30 min。取 4.0 g 陈皮粗提取物,用溶剂体系的上相和下相各 10 mL 溶解样品,备用。

1.4 HSCCC 分离制备过程

用最大流速(9.99 mL/min)将上相注入 HSCCC 分离管中,待上相充满整个管路后调整主机转速为 850 r/min,再以 1.7 mL/min 流速注入下相;待流动相从柱出口流出,两相在分离管中达到动态平衡后,由进样阀注入 20 mL 样品溶液。280 nm 波长下检测,记录色谱图,根据色谱图收集目标成分。

1.5 HPLC 分析条件

色谱柱:Symmetry- C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm 5 μm)。流动相 A:甲醇,B:水;梯度程序:0 ~ 70 min,流动相 A 由 35% 升至 80%,流速 0.8 mL/min。测定温度 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 280 nm。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的选择

对比了使用甲醇和乙醇为提取剂的超声提取效果。实验结果显示,乙醇的提取率明显高于甲醇,这可能是由于乙醇能使大部分糖类物质形成沉淀而不易被溶出,因此选用乙醇为提取剂。另外还考察了不同固液比(即陈皮粉末(g)与提取剂乙醇的体积(mL)之比)对 3 种黄酮物质提取率的影响:取适量的干燥陈皮粉末,按照固液比 1:10,1:15,1:20 和 1:25 分别进行超声波提取处理,各提取液经液相色谱分析。实验结果表明,在固液比为 1:20 时,3 种黄酮目标化合物的提取率最高。

2.2 HSCCC 分离条件的选择

在高速逆流色谱中,溶剂系统的选择至关重要,合适的溶剂系统是其分离的关键。本研究中根据所分离化合物的特性,考察了溶剂体系石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水在不同体积配比下的分配系数(依据文献[9,10]计算分配系数),以此来优选陈皮中黄酮类成分最佳分离溶剂体系的配比,结果见表 1。实

验结果表明 :石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 2 :4:3:3)溶剂体系对橙皮苷、桔皮素和 5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮有较合适的分配系数 ,因此被用来分离目标成分。

表 1 3 种黄酮类化合物在不同溶剂系统中的分配系数

Table 1 The *K* (partition coefficient) values of 3 flavones (I - III) in several solvent systems

Solvent system (A : B : C : D , v/v/v/v)	<i>K</i> values		
	I	II	III
2 : 8 : 3 : 6	7.05	12.03	14.21
1 : 8 : 3 : 4	5.63	7.77	8.80
1 : 6 : 3 : 3	1.95	3.43	4.75
2 : 4 : 3 : 3	0.86	1.23	1.63

A : petroleum ; B : ethyl acetate ; C : methanol ; D : water.

Compounds I - III : see Fig. 1.

实验中还对流速进行了优化。流速太慢 ,浪费时间 ,流速太快 ,分离效果不好 ,尤其是橙皮苷很容易和前后的杂质峰混合。本文最终选择流速为 1.7 mL/min。

2.3 HSCCC 分离制备的结果

按照“ 1.4 ”节所述步骤对“ 1.3 ”节得到的陈皮粗提物溶液进行分离 ,固定相保留率为 78% ,分离时间为 6 h ,HSCCC 色谱图见图 2。根据 HSCCC 图谱手动分段收集 ,得到 3 个组分(见图 2 中的 I、II 和 III)。将组分 I ~ III 减压浓缩干燥 ,其质量依次为 10.1 ,49.8 ,50.6 mg。将组分 I ~ III 分别通过 HPLC 检测(见图 3-b ,c ,d) ,面积归一化法测定其纯度依次为 97.9% ,97.0% 和 98.4%。此结果表明 ,利用高速逆流色谱对陈皮活性成分进行大量制备分离的方法切实可行。

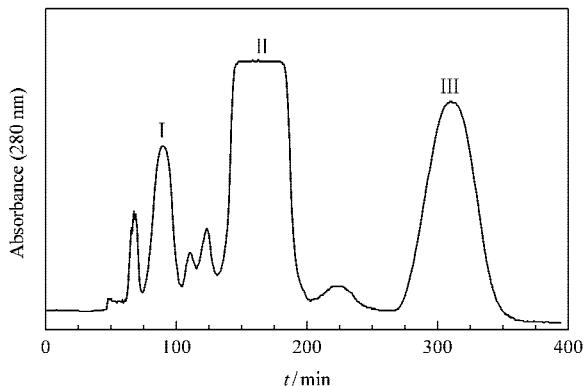


图 2 陈皮粗提物的高速逆流色谱图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of the crude extract
For peaks I - III , see Fig. 1.

2.4 HPLC 条件的优化

采用 PDA 检测器在 210 ~ 400 nm 范围内比较各波长下 3 种组分的吸收光谱 ,发现 3 种组分的最大吸收波长有较大的差异。组分 I 在 280 nm 左右有很大吸收 ,在 254 nm 下吸收非常弱 ;而化合物 II

和 III 在 254 nm 和 280 nm 下吸收都比较强。另外 ,虽然 3 种物质在 210 ~ 220 nm 下都有很强吸收 ,但在此波长处 ,流动相有较强的末端吸收 ,基线不够平稳。综合考虑 3 个化合物检测波长选择为 280 nm。在此条件下可在有效消除背景干扰的同时保证检测的灵敏度。陈皮粗提物及分离得到的 3 个组分的 HPLC 谱图见图 3。

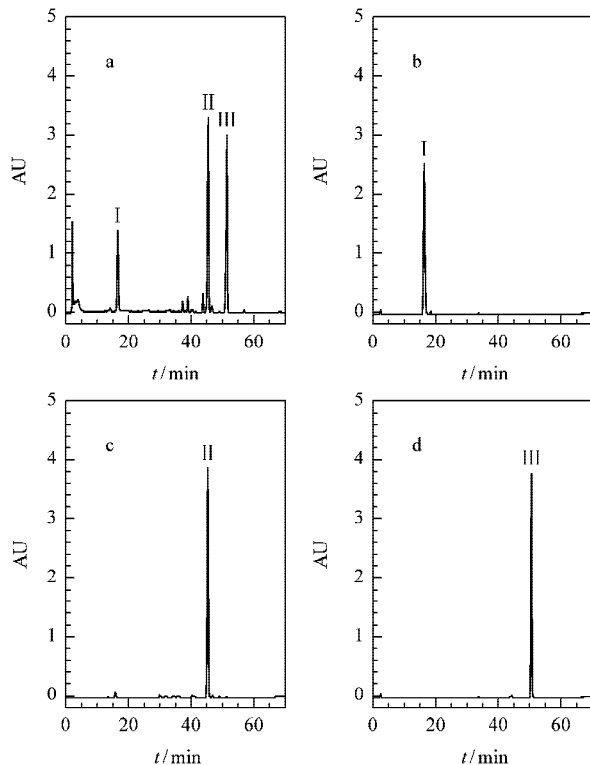


图 3 (a)陈皮粗提物及从图 2 中分离得到的 (b)橙皮苷、(c)桔皮素和 (d)5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮的 HPLC 谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of (a) the crude extract , (b) hesperidin , (c) tangeretin and (d) 5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone

2.5 组分 I、II 和 III 的结构鉴定

组分 I 白色粉末(MeOH)。EI-MS m/z 302 ([M - Rha - Glc]⁺) , m/z 285 ([M - Rha - Glc - CH₃]⁺ , 相对丰度为 100%)。¹H-NMR (600 MHz , DMSO) δ : 1.09 (3H , d , J = 6.5 Hz , 6'''-CH₃) , 5.50 (1H , dd , J = 3 Hz , 12.5 Hz , H-2) , 2.76 (1H , dd , J = 3 Hz , 17 Hz , H-3) , 3.27 (1H , dd , J = 12 Hz , 17 Hz , H-3) , 3.77 (3H , s , 4'-OCH₃) , 3 ~ 3.85 (10H , m , 糖上质子) , 4.52 (1H , s , H-1''') , 4.98 (1H , d , J = 7.5 Hz , H-1'') , 6.12 (1H , d , J = 2 Hz , H-6) , 6.14 (1H , d , J = 2 Hz , H-8) , 6.93 (3H , m , H-2' , 5' , 6') , 9.10 (1H , s , 3'-OH) , 12.0 (1H , s , 5-OH)。 ¹³C-NMR (DMSO) δ : 78.39 (C-2) , 42.05 (C-3) , 197.07 (C-4) , 163.05 (C-5) , 96.37 (C-6) , 165.14 (C-7) , 95.53 (C-8) , 162.51 (C-9) , 100.55 (C-10) , 130.80 (C-

1'), 114.1 (C-2'), 147.96 (C-3'), 146.45 (C-4'), 112.00 (C-5'), 117.97 (C-6'), 55.67 (C-7'), 99.42 (C-1''), 72.98 (C-2''), 76.26 (C-3''), 70.27 (C-4''), 75.51 (C-5''), 66.03 (C-6''), 103.32 (C-1'''), 70.69 (C-2'''), 72.06 (C-3'''), 69.57 (C-4'''), 68.32 (C-5'''), 17.85 (C-6'''). 以上波谱数据与文献[11]报道一致,故鉴定为橙皮苷。

组分 II 浅黄色针状结晶 (MeOH)。EI-MS: m/z 372 ([M]⁺), m/z 357 ([M - CH₃]⁺, 相对丰度为 100%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.89 (6H, s, 2 × OCH₃), 3.96 (3H, s, OCH₃), 4.02 (3H, s, OCH₃), 4.11 (3H, s, OCH₃), 6.64 (1H, s, H-3), 7.03 (2H, d, J = 9.6 Hz, H-3', 5'), 7.90 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6')。以上波谱数据与文献[12, 13]报道一致,故鉴定为桔皮素。

组分 III 黄色针状结晶 (MeOH)。EI-MS: m/z 388 ([M]⁺), m/z 373 ([M - CH₃]⁺, 相对丰度为 100%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.96 (3H, s, OCH₃), 3.97 (3H, s, OCH₃), 3.98 (6H, m, 2 × OCH₃), 4.12 (3H, s, OCH₃), 6.62 (1H, s, H-3), 7.00 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5'), 7.42 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, J = 10.4 Hz, 1.8 Hz, H-6')。以上波谱数据与文献[12, 13]报道一致,故鉴定为 5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮。

3 结论

应用高速逆流色谱法从陈皮粗提取物中一步分离制备了 3 种黄酮类成分,分别为橙皮苷、桔皮素和 5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮。橙皮苷是我国药典规定的陈皮中标志性成分,其标准物质的制备对于陈皮的质量标准评价和后续的药理研究都具有非常重要的实用价值。另外,通过预试验发现后两种黄酮物质在陈皮中的含量非常高,如何简便、快速

制备中药中含量较高的有效成分,并利用多组分对原药材进行质量规范已经成为全面评估中药品质的一个重要的发展方向。所建立的高速逆流色谱法具有简便、快速、节省溶剂等特点,具有较好的实际应用价值。

参考文献:

- [1] The Pharmacopoeia Committee of People's Republic China. Pharmacopoeia of People's Republic China, Part I. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典,一部. 北京:化学工业出版社), 2005
- [2] Zheng X J, Zhan X R, Wang X P. Modern Chinese Medicine (郑小吉,詹晓如,王小平. 中国现代中药), 2007, 9(10): 30
- [3] Qian S H, Wang Y X, Kang S H, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (钱士辉,王侗先,亢寿海,等. 中国中药杂志), 2003, 28(12): 1167
- [4] Qian S H, Chen L. Journal of Chinese Medicinal Materials (钱士辉,陈廉. 中药材), 1998, 21(6): 301
- [5] Yuan L M, Ai P, Chen X X, et al. J Lig Chromatogr Relat Tech, 2002, 25(6): 889
- [6] Hu J Y, Liang Y, Xie Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (胡江涌,梁勇,谢亚,等. 色谱), 2007, 25(4): 528
- [7] Liu Y, Chou G X. Chinese Journal of Chromatography (刘云,俞桂新. 色谱), 2007, 25(5): 735
- [8] Huang D F, Cao X L, Zhao H, et al. Chinese Journal of Chromatography (黄丹凤,曹学丽,赵华,等. 色谱), 2006, 24(1): 42
- [9] Lu H T, Jiang Y, Chen F. J Chromatogr A, 2004, 1026: 185
- [10] Geng Y L, Liu J H, Lv R M, et al. Sep Purif Technol, 2007, 57: 237
- [11] Yang Z J, Zheng Y N, Xiang L. Journal of Chinese Medicinal Materials (杨子娟,郑毅男,向兰. 中药材), 2007, 30(10): 1248
- [12] Zhao X M, Ye X Q, Xi Y F, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (赵雪梅,叶兴乾,席屿芳,等. 中草药), 2003, 34(1): 11
- [13] Chen J, Montanari A M, Widmer W W. J Agric Food Chem, 1997, 45: 364