

中低压制备色谱制备茜草蒽醌成分的研究

林顺权, 高俊飞, 吴莉, 袁晓*

(中国科学院 武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 建立新的中低压制备色谱技术, 分离纯化茜草蒽醌单体。先采用高压液相色谱技术分析所分离产物的纯度, 再用核磁共振谱、红外、质谱分析确证单体的化学结构。结果表明: 用中低压色谱分离茜草的乙醇提取物而得到的4个单体, 其纯度分别为99.87%、99.56%、99.42%、98.21%, 结构鉴定为从石油醚萃取物中分离得到的单体为大叶茜草素, 从氯仿萃取物中分离得到的单体为1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌, 从乙酸乙酯萃取物中分离得到的单体分别为1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O-(3',6'-O-二乙酰基)- α -鼠李糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷和1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O-新橙皮糖苷。

关键词: 中低压制备色谱; HPLC; IR; MS; $^1\text{H-NMR}$; $^{13}\text{C-NMR}$; 茜草

中图分类号: 284.1; R286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)06-0857-04

* Study of anthraquinone component from rhizoma of *Rubia cordifolia* by preparative chromatogram of medium and low press

LIN Shun-Quan, GAO Jun-Fei, WU Li, YUAN Xiao*

(Wuhan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: A new technique of middle and low pressure preparative chromatogram was established, and the anthraquinone monomer from rhizoma of *Rubia cordifolia* were separated and purified. Purity of the compounds was analyzed by HPLC, and the structures of the compounds were confirmed by MS, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$, IR. The result showed that monomers were successfully obtained from ethanolic extract of *Rubia cordifolia*, with purities of 99.87%; 99.56%; 99.42%; 98.21%. Mollugin was separated from petroleum ether extract; 1,3,6-trihydroxy-2-methyl anthraquinone was separated from chloroform extract; 1,3,6-trihydroxy-2-methyl anthraquinone-3-O-(3',6'-O-acetyl)- α -rhamnose(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucoside and 1,3,6-trihydroxy-2-methyl anthraquinone-3-O-neohesperidoside were separated from acetic ether extract.

Key words: preparative chromatogram of medium and low press; HPLC; IR; MS; $^1\text{H-NMR}$; $^{13}\text{C-NMR}$; *Rubia cordifolia*

中药茜草是茜草科植物茜草(*Rubia cordifolia*)的根, 主要化学成分为水溶性的环己肽类、脂溶性的蒽醌及其糖苷类、还原萘醌等。蒽醌类物质是茜草的主要有效部位之一(杨连荣等, 2007), 近年来

的研究表明: 茜草的活性成分具有抗肿瘤活性(王艳双等, 2005), 升高白细胞及免疫调节作用, 在临床上, 茜草常与其他中药配伍制成各种中药制剂, 制成具有镇咳、祛痰、平喘作用的中药复方(张琳等,

* 收稿日期: 2011-01-04 修回日期: 2011-07-15

基金项目: 国家科技部基础研究专项(2008FY230400) [Supported by the Special Fund for Basic Research of National Science and Technology Ministry of China(2008FY230400)]

作者简介: 林顺权(1987-), 男, 福建莆田人, 从事中药学等研究工作。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yuanxiaomail@yahoo.com.cn)

2008)。

中低压(0.5~2 MPa)制备色谱是介于常压色谱和高压(5~15 MPa)色谱间的一种色谱分离技术,与高速逆流色谱(HSCCC)及高压制备色谱相比,中低压色谱更有洗脱溶剂选择范围大,分离样品的量大,在实验室,分离单体的量在 g 级,而 HSCCC 和 HPLC 色谱分离的量在 mg 级。利用 TLC 可以快速的建立分离方法,在发达国家,中低压制备色谱是实验室样品分离制备的主流方法,已经基本取代常压玻璃柱分离(康一,2009)。

本试验以茜草为原料,利用中低压制备色谱技术,研究一种新的分离纯化方法,最终,在短期内获得大量的高纯度单体。从而解决用高速逆流色谱和高压制备色谱所无法解决的问题。为天然药物的研发提供一条新的技术路线

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

Dr Flash II 型中低压制备色谱柱(上海利穗公司生产);L-2000 型高压液相色谱(日本日立公司生产);X-5 显微熔点测定仪(未校正);Avatar 360 FT-IR 红外光谱仪(美国 Nicolet 公司);Varian Mercury VX-300/600 型核磁共振仪(美国 Varian 公司);Flash 柱(北京先明乐施科技发展有限公司提供);药材于 2009 经本室特聘神农架林区陈庚宝工程师采自湖北省神农架及巴东地区,并鉴定为茜草(*Rubia cordifolia*)的茎。

1.2 实验方法

1.2.1 中低压制备色谱柱的制备条件 泵压力 100~200 Psi,流速 100 mL/min,检测器的监控波长为 395 nm,检测器的收集波长为 280 nm,死体积为 7 mL。

1.2.2 液相色谱检测条件 L-2130 四元梯度泵,L-2200 自动进样器,色谱柱:YMC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.2%甲酸水,(A、B 比例为根据不同的分离条件来确定);柱温 28 ℃;流速为 1 mL/min;检测波长 280 nm;进样量为 5 μL。

1.2.3 提取乙醇膏和不同溶剂萃取方法 茜草根 5 kg,烘干、粉碎后用 95%的乙醇超声提取,回收溶剂,得乙醇提取浸膏,渣继续用回收后的乙醇超声提取,重复 3~5 次,合并浸膏后称量为 710 g,得率为

14.2%;将浸膏加适量的温水稀释后,用石油醚萃取 3 次得到膏 35 g,得率为 0.7%;石油醚萃取后的渣,用三氯甲烷萃取 3 次得到膏 7.5 g,得率为 0.15%;三氯甲烷萃取后的渣用乙酸乙酯萃取 3 次得到膏 14 g,得率即 0.28%。

1.2.4 中低压制备色谱柱对石油醚萃取物的制备方法 将 35 g 石油醚萃取物用适量的乙酸乙酯溶解,用其 3 倍量的 300~400 目(常规柱用 100~200 目)硅胶拌样,吹干至无乙酸乙酯气味,取 400 mL Flash 柱两个,一个柱为干法上样柱,另一个为分离柱。先用石油醚洗脱分离柱 30 min 至柱平衡,再将 2 个柱子串联,然后将串联好的柱子接到中低压制备型色谱上,用石油醚:乙酸乙酯(95:5)等度洗脱,根据屏幕监控图收集流份,收集 20 份后,通过 TLC 辅助检识将流份分别合并为 4 组流份。其中合并后的第二组流份经 TLC 检视为黄色斑点,回收溶剂后得到粗晶,石油醚重结晶得亮黄色片晶为 1.5 g,定为化合物 I。

1.2.5 中低压制备色谱柱对氯仿萃取物的制备方法

先将氯仿萃取物 7.5 g 用适量的乙酸乙酯溶解,装柱方法同石油醚萃取物一样,用石油醚平衡柱子,然后依次用石油醚-乙酸乙酯为 30:70 洗脱柱子,溶剂用量为 3BV(3 倍柱子的体积),石油醚:乙酸乙酯为 20:80 洗脱 3BV,石油醚:乙酸乙酯:甲醇为 20:80:0.5 洗脱 3BV,石油醚:乙酸乙酯:甲醇为 20:80:1 洗脱 3BV,根据屏幕监控图收集流份,总共收集 20 份,通过 TLC 检识将流份分别合并为 4 组流份。第三组流份为粗晶,用乙酸乙酯重结晶,得橙黄色针晶,定为化合物 II。

1.2.6 中低压制备色谱柱对乙酸乙酯萃取物的制备方法 取乙酸乙酯萃取物 14 g,装柱方法同上,用石油醚平衡柱子,然后依次用石油醚:乙酸乙酯比例为 30:70 的溶剂洗脱柱子,溶剂用量为 3BV,石油醚:乙酸乙酯为 20:80 洗脱 3BV,石油醚:乙酸乙酯:甲醇为 20:80:0.5 洗脱 3BV,石油醚:乙酸乙酯:甲醇为 20:80:1 洗脱 3BV,根据屏幕监控图收集流份,总共收集 20 份,TLC 检识将流份合并为 4 组流份。TLC 检视第一、二、三组流份分别为 3 个黄色斑点,第三组流份用甲醇重结晶,乙酸乙酯洗至无色得到黄色粉末,用 2 mL 二甲基亚砜将黄色粉末溶解并上样到装有粒径为 30~50 μm 的 C₁₈ 反相柱,柱体积为 70 mL,用 28%甲醇-0.2%甲酸水等度洗脱精制,得到黄色粉末,定为化合物 III。第二

组流份,继续进行硅胶柱层析,先用氯仿洗杂质,再加入氯仿: 甲醇=5:1 洗脱,收集其中红色带,回收溶剂后,用乙酸乙酯热熔,加入氯仿变浑后,静置析晶得到黄色针晶,定为化合物Ⅳ(王校冬,2009)。

2 结果与分析

2.1 HPLC 的分析结果

化合物Ⅰ的扫描结果,波长 278 nm 处有最大吸收峰,HPLC 的分析结果为此波段是单峰,且没有杂峰,百分含量为 99.87%。化合物Ⅱ的扫描结果为波长 289 nm 处有最大吸收峰,分析结果为此波段是单峰,百分含量为 99.56%。化合物Ⅲ的扫描结果为波长 274 nm 和 418 nm 处有较大大吸收峰,分析结果在 274 nm 处,有较多的干扰峰,用 418 nm 波长测试,分析结果为此波段单峰,百分含量为 99.42%。HPLC 对化合物Ⅳ的扫描结果为波长 274 nm 和 430 nm 处有较大大吸收峰,但 274 nm 的吸光值测试的结果有干扰峰,采用 430 nm 的吸光值分析,结果略有杂峰,百分含量为 98.21%,4 个单体混合后的高压液相色谱测试结果见图 1。

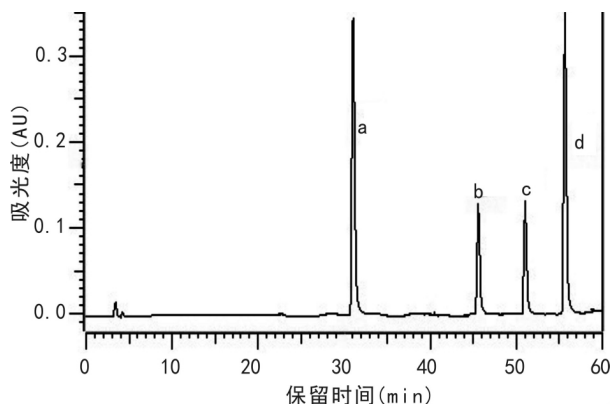


图 1 化合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ

Fig. 1 HPLC of Compound I, II, III, IV

a. 化合物Ⅲ; b. 化合物Ⅱ; c. 化合物Ⅰ; d. 化合物Ⅳ。

Compound III; b. Compound II; c. Compound I; d. Compound IV.

2.2 结构鉴定分析

化合物Ⅰ 为亮黄色片晶, FeCl_3 反应呈绿色, 紫外光 365 nm 下呈绿色荧光, 质谱测得分子量为 284.1, mp 128~130 °C (熔点仪未校正), IR (KBr) cm^{-1} : 2972, 1651 (C=O), 1582, 1449, 806, 770 (邻二取代芳环吸收值), $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) δ : 1.471 (6H, s, 2 CH_3), 4.008 (3H, s, $-\text{H}_3\text{CO}$) 显示有甲氧基, 5.78 (1H, d, $J=10.5$ Hz), 7.11 (1H, d, $J=$

10.5 Hz), 8.11 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 8.32 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 表示芳环上相邻 2 个稀质子, 这说明芳环有 β 位取代, $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 Hz) δ : 141.6 (C-1'), 103.1 (C-2'), 113.0 (C-3'), 155.1 (C-4'), 123.8 (C-5'), 129.5 (C-6'), 126.5 (C-7'), 121.8 (C-8'), 125.1 (C-9'), 129.4 (C-10')。以上数据与刘永隆 (1985) 报道的大叶茜草素基本一致。故鉴定为大叶茜草素。

化合物Ⅱ 为橙黄色针晶, mp 240~242 °C, 碱液试验呈阳性。IR (KBr) cm^{-1} : 3547, 3494, 1671, 1569, 1590. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2.50 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 7.19 (1H, s), 8.18 (1H, d, $J=8.6$ Hz), 7.23 (1H, dd, $J=8.6$ Hz, $J=2.55$ Hz), 7.90 (1H, d, $J=2.55$ Hz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 162.9 (C-1), 114.6 (C-2), 163.7 (C-3), 107.8 (C-4), 135.4 (C-4a), 110.3 (C-5), 162.2 (C-6), 121.8 (C-7), 129.4 (C-8), 185.4 (C-9), 182.5 (C-10)。以上数据与王素贤等 (1992) 报道的基本一致, 故鉴定为 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌。

化合物Ⅲ 为黄色粉末, mp 260~262; IR (KBr) cm^{-1} : 3389, ($-\text{OH}$), 1675 (C=O), 1600, 1583 (芳环的吸收值), 显示为蒽醌类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300) δ : 8.12 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 7.48 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 7.253 (1H, dd, $J=8.1$ Hz, $J=2.0$ Hz) 三个芳氢质子组成 ABX 系统, 2.158 (3H, s) 说明一个取代基为甲基, 另外 2 个取代基为酚羟基, 1.082 (3H, d, $J=5.1$ Hz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 164.3 (C-1), 121.2 (C-2), 160.8 (C-3), 105.7 (C-4), 113.2 (C-5), 162.0 (C-6), 122.2 (C-7), 130.3 (C-8), 182.3 (C-9), 187.0 (C-10), 98.1 (C-1'), 77.1 (C-2'), 77.0 (C-3'), 69.1 (C-4'), 136.0 (C-4a), 125.1 (C-8a)。以上数据与侯柏玲等 (2000) 报道的基本一致, 故鉴定为 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O-(3',6'-O-二乙酰基)- α -鼠李糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷。

化合物Ⅳ 为黄色针晶, 碱显色反应和醋酸镁显色反应呈阳性, mp 243~245;。EI-MS m/z : 270 (M^+) IR (KBr) cm^{-1} : 3422 ($-\text{OH}$), 1723, 1664 (C=O), 1631, 1596 (芳环), $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300) δ : 8.12 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.47 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 7.25 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=2.0$ Hz), 5.45 (1H, d, $J=6.9$ Hz), 1.93 (3H, s), 2.16 (3H, s), 1.11 (3H, d, $J=6$ Hz)。以上数据与侯柏玲等 (2000) 和乔亚芳等 (1990) 报道的基本一致, 故鉴定为 1,3,6-三羟

基-2-甲基蒽醌-3-O-新橙皮糖苷。

3 结论与讨论

在实验室分离化合物的有效成分单体时,常用的是常压制备色谱;虽然有容易操作、方便,不要额外购买仪器,只要购买玻璃柱和展开剂等优点,但一旦柱填充料的颗粒(硅胶 300~400 目)太小,流速会很慢,分离时间长,达不到好的分离效果,另外,与环境直接连接,试剂容易挥发,污染环境。随着高压

制备色谱和高速逆流色谱的相继问世,部分取代常压色谱,极大地缩短了分离时间,提高了单体的分离纯度。但是制备量有限,而且成本过高,溶剂耗损量大,大多只分离 mg 级的量。

另外,在研发新的药物工作中,对分离得到的化合物单体需要做进一步的药理和毒理试验,而做这些试验所需要单体的量仅靠 HSCCC 和 HPLC 制备色谱是很难完成,而用中低压制备就能够在实验室得以完成,以 1 kg 的茜草材料为例,分别以不同的分离设备,不同的分离方法得到的结果如表 1。

表 1 不同的设备对茜草的分离结果

Table 1 Separate result of different equipments to *Rubia cordifolia*

色谱名称 Chromatography Name	常压 Normal pressure	中低压 Low and medium pressure	高速逆流 HSCCC	高压液相 HPLC
分离时间 Separate time (h)	72	3	10	2
填充料选择 Filling chosen	硅胶(100~200 目)	硅胶(300~400 目)	溶剂作为固定相	粒径 5 μm C ₁₈
对溶剂选择 Solution chosen	没有限制	没有限制	2 相要分层	选择范围窄
分离样品量 Separate samples	10 g	30 g	2 g	100 mg
分离纯度 Separate purity (%)	80	90	95	98

由表 1 可以看出,在分离化合物的单体中,中低压制备色谱与高速逆流色谱和制备型液相色谱比较,有分离量大,分离时间短,对洗脱溶剂没有限制等优势,但分离单体的纯度相比要低。与常压色谱相比:常压色谱装住所用的硅胶一般在 100~200 目,分离出来的组分大多要进行 2~3 次过柱。然而,中低压制备色谱仪,以多根分离柱串联到低压泵上,极大加快分离速度,分离速度是传统方法的 10 倍以上。又因设备控制溶剂洗脱比例,与传统的手动调控溶剂比例来更能准确、快速、便捷。分离量可达 100 g 量级,容易与工厂化衔接,减少产品开发的中间环节。

参考文献:

- Hou BL(侯柏玲), Wang SX(王素贤). 2000. Studies on the chemical constituents of *Rubia sylvatica* (林茜草化学成分的研究)[J]. *Chin Trad Herb Drug* (中草药), 31(7): 492-494
- Kang Y(康一). 2009. A study on the material basis of drug action of Chinese angelica (中药当归的药效物质基础研究)[D]. Tianjin Univ(天津大学): 22-43
- Liou YL(刘永隆). 1985. Study on the chemical constituents of *Rubia schumammiana* Pritz 大叶茜草化学成分的研究[J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报) 20: 53
- Qiao YF(乔亚芳), Wang SX(王素贤), Wu LJ(吴立军), et al.

1990. Studies on the antibacterial constituents of *Rubia cordifolia* (茜草中抗菌活性成分的研究)[J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 25(11): 834-839
- Tan CY(谭朝阳), You ZL(尤昭玲). 2004. Study on extraction technology of *Rubia cordifolia* (茜草提取工艺的研究)[J]. *Chin Trad Herbal Drugs* (中草药), 35(4): 399-401
- Wang XD(王校冬). 2009. Study on extraction, separation, purification and product development of *Lycopene* (番茄红素的提取、分离、纯化及其产品开发)[D]. Zhejiang University of Commerce and Industry(浙江工商大学, 硕士论文): 32-40
- Wang SX(王素贤), Hua HM(华会明), Wu LJ(吴立军), et al. 1992. Studies on the anthraquinones of *Rubia cordifolia* (茜草中蒽醌类成分的研究)[J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 27(10): 743-747
- Wang YS(王艳双), Luo S(罗速), Cui XY(崔新颖), et al. 2005. On action and mechanism of antitumor of *Rubia cordifolia* (茜草抗肿瘤作用及其机制研究)[J]. *Beihua Univ J* (北华大学学报), 6(6): 499-504
- Yang LR(杨连荣), Zhou QH(周庆华), Zhang ZF(张哲锋), et al. 2007. Advances in researches on chemical composition and pharmacological action of *Rubia cordifolia* (茜草的化学成分与药理作用研究进展)[J]. *Inf Trad Chin Med* (中医药信息), 24(1): 21-23
- Zhang L(张琳), Peng L(彭亮), Hu BX(胡本祥). 2008. Advances in researches on chemical composition of *Rubia cordifolia* (茜草的化学成分研究进展)[J]. *Mod Trad Chin Med* (现代中医药), 28(2): 52-54