

黄芩素的分离纯化与结构表征

李云霞², 索全伶^{1*}, 贺文智¹, 李春萍¹, 黄延春²

1. 内蒙古工业大学化工学院, 内蒙古 呼和浩特 010051

2. 内蒙古师范大学化学与环境科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010022

摘要 以聚酰胺为柱层析吸附剂, 以乙醇-氯仿混合溶剂梯度洗脱, 从中药黄芩的甲醇提取液中分离出有效成分黄芩素的粗品。通过对有效成分进行重结晶等纯化处理, 得到了一种黄色短棱柱晶状产物。利用红外光谱 (FTIR)、紫外-可见光谱 (UV-Vis)、质谱 (MS)、氢谱 (¹H-NMR) 及碳谱 (¹³C-NMR) 等分析测试手段, 对产物的组成和结构进行了表征。红外光谱测定结果表明, 产物的结构中含有共轭芳香体系和单取代苯; 紫外-可见光谱和质谱表明, 产物为黄酮而非黄酮苷化合物, A 环上含有三个酚羟基, B 环无羟基和其他基团取代; 核磁共振氢谱及碳谱表明, 产物的结构中含 15 个碳原子, 三组羟基质子。同时, 文章还对所有 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 信号进行了归属, 对 FTIR 光谱特征吸收峰所对应的官能团及其振动形式进行了指认, 给出了化合物及碎片离子在质谱中的裂解方式, 最终将黄色短棱柱晶状产物鉴定为 5,6,7-三羟基黄酮, 即黄芩素, 分子式为 C₁₅H₁₀O₅。

关键词 黄芩素; 分离; 纯化; 结构表征

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2008)08-1895-05

引言

黄芩 (*Scutellaria baicalensis georgii*) 是历史悠久的传统中药, 属唇形科。植物黄芩以根部入药, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎之功效。黄芩素 (Baicalin, BA I/B) 是黄芩的主要有效成分之一, 也是黄芩的另一主要有效成分黄芩苷 (Baicalin) 的苷元, 具有显著的抗菌、抗炎及抗变态活性^[1-3]。近年来的研究表明, 黄芩素能诱导感染 HIV 的细胞发生凋亡, 可抑制人体癌细胞特别是肝癌细胞的生长, 对氢过氧化物可能引起的肝中毒具有保护作用, 有望开发成为一种治疗爱滋病、癌症等世界性疑难病症的有效药物^[4,5]。黄芩素的抗氧化作用、对神经细胞和心肌细胞的保护作用, 对心脑血管系统的作用、对脂肪细胞分化的作用及与之相关疾病的可能作用机制研究非常活跃, 并且趋深入^[6]。由于黄芩属植物的种类繁多、成分各异^[7,8], 为了研究有效成分的药用功能, 许多学者分析了黄芩属植物中的化学成分, 研究了有效成分的组成和结构^[9-13]。各类谱学表征方法也应用到了中草药有效成分的定性、定量分析中^[14-16]。因此, 制备较高纯度的黄芩素产品, 利用谱学方法研究其组成、结构与药效的关系, 对于充分发挥传统中药优势, 改进中药制剂形式, 促进我国

中药产业现代化具有重要意义。

本文以中药黄芩为原料, 采用萃取、柱层析和重结晶等分离、纯化有效成分的方法, 得到了一种黄色短棱柱状晶体。利用紫外-可见 (UV-Vis) 光谱, 推断了晶体母核的结构及取代基位置, 并利用 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR, MS 等谱学表征方法进行了鉴定。本文所分离的黄色晶体为 5,6,7-三羟基黄酮, 即黄芩素, 分子式为 C₁₅H₁₀O₅, 化学结构如图 1 所示。

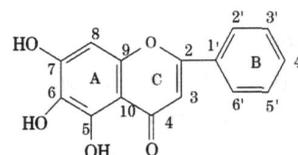


Fig 1 Structure of baicalin

1 实验部分

1.1 原料、试剂与仪器

实验原料为野生黄芩干燥根, 产地为内蒙古卓资县; 甲醇、氯仿、乙醇、-萘酚、醋酸钠、三氯化铝、硼酸等均为分析纯试剂, 柱层析用聚酰胺过 30~60 目, 层析用聚酰胺薄

收稿日期: 2007-04-28, 修订日期: 2007-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20666003) 资助

作者简介: 李云霞, 女, 1973 年生, 内蒙古师范大学化学与环境科学学院讲师

*通讯联系人 e-mail: szj@mut.edu.cn

膜,由浙江台州路桥四甲生化塑料厂生产。

采用上海科学精密仪器有限公司产 SGW XT-4 型显微熔点仪测定熔点,用萘进行温度校正;采用 WXG4 型圆盘旋光仪测定旋光度,用甲醇溶样;采用 Nicolet FTIR 红外光谱仪测定红外光谱, KBr 压片;采用日本岛津公司产 UV-3101 紫外-可见光谱仪测定 UV-Vis 光谱;采用 Varian INOVA-501 (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz) 核磁共振仪测定 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 谱, DMSO- d_6 溶样, TMS 为内标;采用 Micromass Autospec Ultima-TOF 质谱仪测定 High FAB-MS 谱;采用日本岛津公司产 LCMS-2010 型 LC-MS 联用仪测定 ES/MS 谱;采用 Finnigan Ploaris Q MS 质谱仪测定 EFMS 谱。

1.2 黄芩中黄芩素的提取与纯化

称取 100 g 黄芩粗粉(40 目),用 200 mL 甲醇于室温下浸渍 3 次,每次 48 h,合并提取液后,用旋转蒸发器减压浓缩至原体积的 1/6(约 100 mL);将此浓缩液与 2 倍体积量的层析用聚酰胺均匀拌合,放入真空干燥箱,室温、减压下将其中的甲醇溶剂完全去除,得柱层析用干粉样品。再将此干粉样品与石油醚混合,装入聚酰胺层析柱;经氯仿-乙醇系统梯度洗脱,聚酰胺薄膜检查,得黄芩素纯品。将柱层析得到的纯品经反复重结晶处理后,得到黄芩素黄色晶体 90 mg。

2 黄芩素的鉴定

2.1 性状及显色反应

本文分离出的黄芩素为黄色透明棱柱状晶体, m. p. 264 ~ 266, 在紫外灯(365 nm)下呈现弱的荧光,无旋光性;盐酸-镁粉显色反应后溶液颜色略加深; Molish 显色反应后溶液无分层现象,呈阴性,表明化合物为黄酮类,但非黄酮苷类;三氯化铁反应呈蓝绿色,显示了结构中酚羟基的存在;铅-柠檬酸显色反应先呈亮黄色,后变浅黄,最后褪成无色,显示此化合物中含有 C5-OH 基团,而无 C3-OH 或 C3 成苷。

2.2 IR 光谱解析

化合物的固相红外光谱如图 2 所示,光谱数据(KBr 压片, cm^{-1})如下: 3 411, 3 098, 1 660, 1 618, 1 583, 1 470,

1 388, 1 295, 1 157, 1 081, 895, 855, 830, 727, 676, 635, 476。

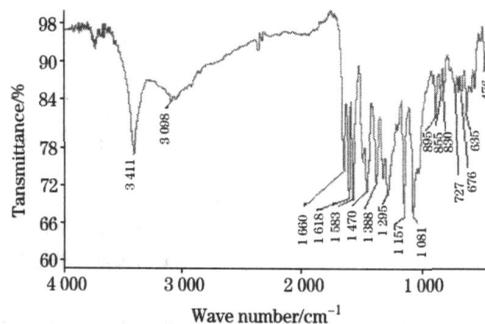


Fig 2 Solid IR spectra of baicalin

3 411(OH), 1 388(OH), 1 295($=\text{C}-\text{OH}$), 1 157 cm^{-1} ($=\text{C}-\text{OH}$) 吸收峰为羟基相关峰, 3 411 cm^{-1} 峰形较宽, 表明羟基存在着分子内或分子间的氢键缔合; 1 660 cm^{-1} ($=\text{O}$) 处强峰为分子中羰基的特征吸收峰, 与芳香酮的特征吸收峰(1 680 ~ 1 700 cm^{-1}) 相比, $=\text{O}$ 向低波数方向移动了约 30 cm^{-1} 。由于黄酮母核中的 $-\text{吡喃酮}$ 环氧原子可提供孤对电子, 与相邻的双键发生 $p-\pi$ 共轭, 形成共振极限式[如图 3 (a) 所示], 使整个 $-\text{吡喃酮}$ 环骨架具有准芳香性, 导致 $\text{C}=\text{O}$ 双键性减弱而单键性增强, 因而振动波数降低。此外, 羰基与相邻的 5-OH 可形成六元环的分子内氢键[如图 3 (b) 所示], 这种分子内氢键效应也使羰基的振动频率减小。在 1 630 ~ 1 450 cm^{-1} 区域内, 分别在 1 618, 1 583, 1 470 cm^{-1} 处出现了 3 个强尖锐吸收峰, 此为共轭芳香体系存在的重要标志, 由芳环骨架 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动($=\text{C}-\text{C}$) 产生。芳环的相关峰还有: 3 098 cm^{-1} 处 $=\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰($=\text{C}-\text{H}$); 1 081 cm^{-1} 处苯环的呼吸运动吸收峰; 900 ~ 665 cm^{-1} 区域内的几个中强峰, 为各个不同取代的芳环上的 $=\text{C}-\text{H}$ 面外弯曲振动($=\text{C}-\text{H}$) 及 $\text{C}=\text{C}$ 键的面内弯曲振动($=\text{C}-\text{C}$) 产生, 其中, 855 cm^{-1} 处的中强吸收峰是 3 位上无取代基的黄酮化合物的特征吸收峰, 它来自 $-\text{吡喃酮}$ 环 C_3 的 $=\text{C}-\text{H}$ 面外弯曲振动。在 730 和 677 cm^{-1} 处同时出现了该区域两个强吸收峰, 此为单取代苯的标志, 分别由单取代苯环 $=\text{C}-\text{H}$ 的面外弯曲振动($=\text{C}-\text{H}$) 和 $\text{C}=\text{C}$ 双键的面外弯曲振动($=\text{C}-\text{C}$) 产生^[17, 18]。

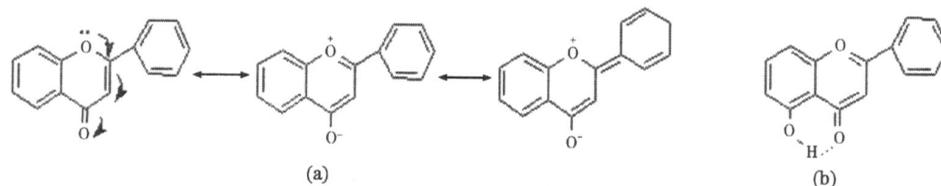


Fig 3 Limit resonance formula and hydrogen

2.3 UV-Vis 光谱解析

将少量晶体溶于甲醇,并在甲醇溶液中分别加入五种诊断试剂,测得了 5 组紫外光谱数据:在 MeOH 溶液中: 247sh, 276, 323;在 MeOH 溶液中加入 NaOMe: 258, 366;

在 MeOH 溶液中加入 NaOAc: 271, 356;在 MeOH 溶液中加入 NaOAc/H₃BO₃: 271, 335;在 MeOH 溶液中加入 AlCl₃: 249, 284, 361;在 MeOH 溶液中加入 AlCl₃/HCl: 253, 284, 347。

化合物的甲醇溶液紫外光谱在 240 ~ 400 nm 区域内出现

了两个强吸收峰—带 和带 , 吸收波长分别为 323 和 276 nm, 表明化合物为黄酮化合物, 且无羟基取代和苷化; 从甲醇钠紫外光谱、醋酸钠紫外光谱及醋酸钠/硼酸紫外光谱可以推断出化合物结构中可能含有 5,6,7,5,7,8 或 3,4,5 的三羟基结构; 从三氯化铝及三氯化铝/盐酸紫外光谱可推断, 化合物结构中含有 3-OH 或 5-OH, B 环上无邻二酚羟基。因此, 从其紫外光谱可以初步判定化合物为一黄酮化合物, 具有 5-羟基、4-羰基结构, A 环上可能含有 5,6,7 或 5,7,8 的三羟基结构^[19,20]。

2.4 质谱解析

高分辨质谱 (High FAB-MS) 给出 $[M+1]^+$ 的分子式为 $C_{15}H_{11}O_5$, 质核比 m/z 271.0586, 计算值 m/z 271.0606, 因此, 化合物实际分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$; 从 ESI-MS 得准分子离子峰 $[M-1]^+$ m/z 269; 从 ESI-MS 得分子离子峰 $[M]^+$ m/z 270。ESI-MS 与 ESI-MS 分子离子峰均为 m/z 270, 表明

化合物为一黄酮化合物, 而非黄酮苷类。根据黄酮类化合物的裂解规律, A 环上的取代由 A_1^+ 碎片的质核比决定, B 环上的取代由 B_1^+ 和 B_2^+ 碎片的质核比决定^[21]。在 ESI-MS 图谱中, 碎片峰 m/z 102 和 m/z 105 分别与黄酮的 B_1^+ 和 B_2^+ 质核比相同, 说明 B 环无羟基和其他基团取代; 碎片峰 m/z 168 比黄酮 A_1^+ 的 m/z 120 高出 48 个质量单位, 说明化合物的 A 环上有 3 个氧原子取代; 由于分子量 M 为 270, 因此, A 环上的这 3 个氧原子均为酚羟基取代, 无甲氧基取代。结合化合物 ^1H-NMR 出现的 5, 6, 7 位上的羟基质子信号, 确定 A 环为 5,6,7-三羟基取代。化合物 ESI-MS 谱中的各主要碎片分别是: m/z 270 M^+ ; m/z 242 $[M-CO]^+$; m/z 168 A_1^+ ; m/z 140 $[A_1-CO]^+$; m/z 105 B_2^+ ; m/z 102 B_1^+ ; m/z 77 $[B_2-CO]^+$, 具体裂解方式和碎片如图 4 所示。

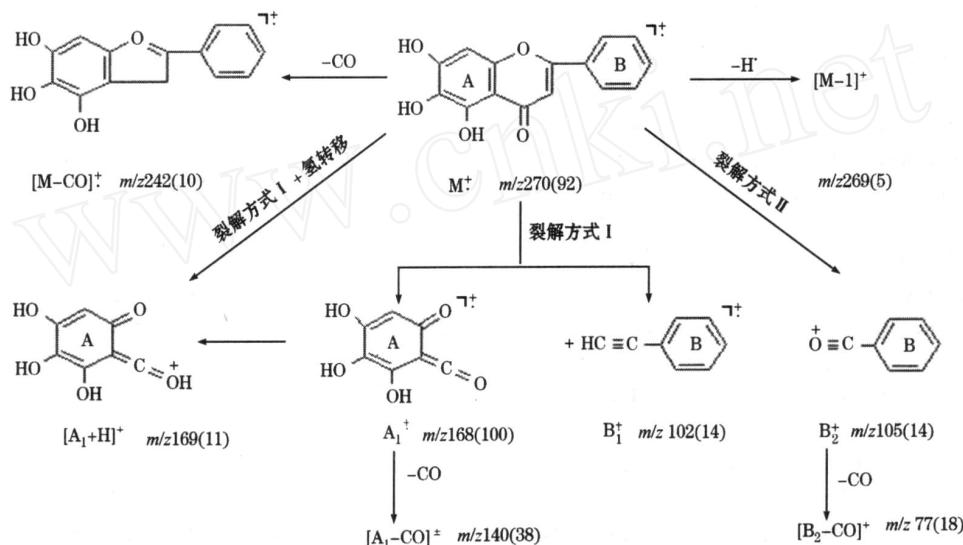


Fig 4 Fragmentation of baicalein

2.5 核磁共振谱解析

2.5.1 $^{13}C-NMR$ 解析

在化合物的 $^{13}C-NMR$ 全去偶谱中, 共出现了 13 条谱线, 其中 B 环上 C-3, 5 和 C-2, 6 分别为化学等价碳, 谱线发生重合, 因此 $^{13}C-NMR$ 清晰地显示了该化合物具有 15 个碳原子。根据各个碳原子的类型, 将这 13 条谱线分为 3 个区域: 位于谱图最低场 182.118 处的谱线为羰基碳原子信号; 170~130 范围内的 5 条谱线分别为 5 个含氧芳香碳原子信号; 在 93~131 范围的 7 条谱线为黄酮母核上的 9 个不含氧芳香碳原子信号。化学位移及信号归属见表 1。

2.5.2 ^1H-NMR 解析

在化合物的 ^1H-NMR 谱中, 黄酮母核上的羟基质子信号出现在谱图中的低场, 化学位移 12.649, 10.555 和 8.797 处的单峰分别由 5-OH, 7-OH 和 6-OH 质子产生。由于羟基上的氢质子很活泼, 在溶液中易发生离子化, 当溶液中滴入重水 (D_2O) 后, 羟基氢会被重水质子部分交换, 这时由 -OH 所引起的信号强度就会减弱。滴入重水后的 ^1H-NMR

($DMSO + D_2O$) 谱显示, 上述 3 组信号消失, 由此判断, 这 3 组峰均由羟基质子产生。由于 5-OH 质子可与相邻 4 位 CO 基形成氢键, 质子屏蔽效应较小, 因而出现在较低场。

6.924 和 6.622 处的尖锐单峰分别为 A 环 H-8 质子和 C 环 H-3 质子的信号。8.055 处信号由 B 环上 H-2 和 H-6 产生, 由于受到 C 环的去屏蔽效应影响, 共振信号比 B 环上的其余质子出现在相对较低场, 并与相邻 3 (5) 偶合而表现为一组双重峰 ($J = 6.0$ Hz); 7.612~7.544 处的多重峰由 H-3, H-5 和 H-4 产生, 这两组峰的峰面积之比为 2:3。 ^1H-NMR 谱的各谱线化学位移及其归属见表 1。

3 结论

综上所述, 可以确定, 本文分离纯化出的黄色晶体为 5,6,7-三羟基黄酮, 即黄芩素, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$, 化学结构式如图 1 所示。

Table 1 NMR data and corresponding atom of baicalein

$^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO-}d_6, 125 \text{ MHz})$			$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6, 500 \text{ MHz})$		
C		C		H	
C-2	162.9	C-9	146.9	5-OH	12.649s
C-3	104.3	C-10	104.7	7-OH	10.555s
C-4	182.1	C-1	130.8	6-OH	8.797s
C-5	149.8	C-2 ,6	126.3	H-2 ,6	8.055d
C-6	131.8	C-3 ,5	129.1	H-3 ,4 ,5	7.612 ~ 7.544m
C-7	153.6	C-4	129.3	H-8	6.924s
C-8	94.0			H-3	6.622s

参 考 文 献

- [1] YANG De-po, HU Hai-yan, HUANG Shi-liang(杨得坡, 胡海燕, 黄世亮). Journal of Chinese Medicinal Materials(中药材), 2000, 23(5): 272.
- [2] Shen Y C, Chiou W F, Chou Y C, et al. European Journal of Pharmacology, 2003, 465(1-2): 171.
- [3] Bok Y K. Planta Medica, 2003, 69(8): 687.
- [4] Wu J A, Attele A S, Zhang L, et al. American Journal of Chinese Medicine, 2001, 29(1): 69.
- [5] Hwang J M, Tseng T H, Tsai Y Y, et al. Journal of Biomedical Science, 2005, 12: 389.
- [6] XU Wen-jie, DING Qi-long(许文杰, 丁启龙). Jiangsu Pharmaceutical and Clinical Research(江苏药学与临床研究), 2006, 14(2): 35.
- [7] CHEN Bo-jun, GAO Shan-lin, YU Guo-dian(陈柏君, 高山林, 余国奠). Chinese Wild Plant Resources(中国野生植物资源), 1999, 18(3): 20.
- [8] Kanji I, Kazutaka N. Phytochemistry, 1995, 40(1): 279.
- [9] DONG Jia-ping, CHEN Ding-yi(董建萍, 陈定一). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 1992, 23(12): 619.
- [10] LI Zhong-rong, QIU Ming-hua, NIE Rui-lin(李忠荣, 邱名华, 聂瑞麟). Natural Product Research and Development(天然产物研究与开发), 1996, 8(1): 19.
- [11] LI Zhong-rong, QIU Ming-hua, NIE Rui-lin(李忠荣, 邱名华, 聂瑞麟). Natural Product Research and Development(天然产物研究与开发), 1999, 11(2): 8.
- [12] ZHOU Zhi-fa, YANG Chong-ren(周志发, 杨崇仁). Acta Botanica Yunnanica(云南植物研究), 2000, 22(4): 475.
- [13] Zhang Yongyu, Guo Yunzhen, Ageta H, et al. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 1998, 7(2): 100.
- [14] ZHANG Yong-yu, SONG Ai-hua(张永昱, 宋爱华). Chinese Journal of Magnetic Resonance(波谱学杂志), 2001, 18(2): 169.
- [15] XIONG Chun-mei, GUO Ya-dong, MA Yin-hai, et al(熊春媚, 郭亚东, 马银海, 等). Food and Drug(食品与药品), 2007, 9(3): 15.
- [16] LI Yan, WU Ran-ran, YU Bai-hua, et al(李燕, 吴然然, 于佰华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(10): 1846.
- [17] XIE Jing-xi, CHANG Jun-biao, WANG Xu-ming(谢晶曦, 常俊标, 王绪明). Application of IR Spectrometry in Organic Chemistry and Medicine Chemistry(红外光谱在有机化学和药物化学中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2001. 403.
- [18] YU Shi-lin, LI Yin-wei(于世林, 李寅蔚). Spectroscopic Methods(波谱分析法). Chongqing: Chongqing University Press(重庆: 重庆大学出版社), 1994. 42.
- [19] LI Yun-xia, SUO Quan-ling, HE Wen-zhi, et al(李云霞, 索全伶, 贺文智, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 131.
- [20] Compiled by Phytochemistry Laboratory, Shanghai Medicine Institute of Academia Sinica(中国科学院上海药物研究所植物化学研究室编译). Flavonoids Characterization Manual 黄酮体化合物鉴定手册. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1981. 389.
- [21] XIAO Chong-hou(肖崇厚). Chinese Traditional Medicine Chemistry(中药化学). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press(上海: 上海科学技术出版社), 1996. 317.

Separation and Purification and Structural Characterization of Baicalein

LI Yun-xia², SUO Quan-ling^{1*}, HE Wen-zhi¹, LI Chun-ping¹, HUANG Yan-chun²

1. Chemical Engineering College, Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010051, China

2. Chemical and Environmental Science College, Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022, China

Abstract The root of *scutellaria baicalensis georgi* that contains a variety of flavonoids is a very old and well-known drug in traditional Chinese medicine, which is widely used for treatment of bronchitis, tumors and inflammatory diseases. The baicalein is the main active component from traditional Chinese medicine *scutellaria baicalensis georgi*. It is a very significance research work that the baicalein was separated and purified, and its composition and molecular structure are analyzed and determined for the pharmacology study of Chinese medicine *scutellaria baicalensis georgi*. The main works in this paper are as follows. Powdered roots (100 g) were extracted with methanol by three times, each time for 48 hours. The crude extracts were purified by polyamide column chromatography and CH₃Cl-C₂H₅OH gradient desorption. A short yellow prismatic crystal was acquired by recrystallizing technique and its composition and molecular structure were characterized by color reactions and spectral analysis methods as FTIR, UV-Vis, MS and ¹H NMR, ¹³C-NMR. The FTIR spectrum appears the absorption bands for hydroxyls, pyrone carbonyl, aromatic C=C bond and singly substituted phenyl. The characteristic absorption peaks and the vibration modes in FTIR spectrum were identified as corresponding groups. The UV-Vis spectrum in methanol solution and the mix solution of methanol with 5 diagnostic reagents, NaOMe, NaOAc, NaOAc/H₃BO₃, AlCl₃, AlCl₃/HCl, respectively indicate that the yellow prismatic crystal is flavone with 5-hydroxyl, 4-carbonyl and 5,6,7- or 5,7,8-trihydroxyls on ring A. The structure of the crystal was characterized by three different MS. The results of FAB-, ESF and EFMS show that it is not a flavone glucoside but the flavone with three phenyl hydroxyls on ring A, and no OH group and other substituted groups on ring B. The molecular ion and fragment ions are identified by MS, which include such as m/z 270 M⁺, m/z 242 [M-CO]⁺, m/z 168 A, m/z 140 [A₁-CO]⁺, m/z 105 B, m/z 102 B, m/z 77 [B₂-CO]⁺, respectively. ¹³C-NMR(DMSO-d₆) exhibits the signals of the fifteen carbon atoms, nine oxygenous aromatic C, five non-oxygenous aromatic C and a carbonyl C. ¹H-NMR(DMSO-d₆ + D₂O, DMSO-d₆) indicates the presence of C-5, C-6, C-7 hydroxyl protons, which is consistent with the results of UV spectrum. The signals for C-2,6 hydroxyls appear at δ 8.055 as a doublet peak with spin-spin coupling constant 6.0 Hz. The other signals were ascribed to the corresponding H or C atoms in the compound. The results of FTIR, UV-Vis, MS, ¹H NMR, ¹³C-NMR spectroscopy characterization show that crystal is the 5,6,7-trihydroxy-flavone, that is baicalein, and the molecular formula is C₁₅H₁₀O₅.

Keywords Baicalein; Separation; Purification; Structural characterization

(Received Apr. 28, 2007; accepted Aug. 8, 2007)

* Corresponding author