

芦荟色酮的高速逆流色谱分离制备方法研究

潘霞, 曹学丽, 董银卯, 赵华

(北京工商大学化工与环境工程学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100037)

摘要 :芦荟色酮是在芦荟叶中特有的一类具有抗炎和抑制酪氨酸酶等作用的活性物质。以芦荟全叶为原料,经过一系列的预处理手段,从脱色剂活性炭中获得芦荟色酮粗提物,再经过溶剂分配和富集后采用高速逆流色谱(HSCCC)对其中的色酮成分进行分离纯化。研究表明,采用氯仿-甲醇-水(体积比为4:3:2)混合溶液和二氯甲烷-甲醇-水(体积比为5:4:2)混合溶液作为溶剂分离系统,经过两步HSCCC可以分离纯化出色谱纯度在95%以上的芦荟色酮单体。经过紫外检测、快原子轰击质谱及核磁共振等方法的结构分析鉴定,证实分离所得物质为肉桂酰基-C-葡萄糖甙芦荟色酮。

关键词 :高速逆流色谱;芦荟色酮;分离纯化

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)01-0096-04

Preparative Isolation and Purification of Cinnamoyl-C-Glycoside Chromone from Aloe Vera by High-Speed Countercurrent Chromatography

PAN Xia, CAO Xueli, DONG Yinmao, ZHAO Hua

(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China)

Abstract : Aloe chromone is a group of anti-inflammatory and anti-tyrosinase constituents found in aloe vera leaves. High-speed countercurrent chromatography (HSCCC) is reported for the preparative isolation and purification of a chromone from aloe vera. The crude extract was obtained by a series of pretreatment of aloe vera leaves and extracted from decolorizing active carbon with methanol. Then the extract was distributed between dichloromethane and water, and the organic part was then subjected to HSCCC for the isolation of chromone constituents. The chromone compounds with a high performance liquid chromatographic grade (>95%) was isolated through two step HSCCC separations by employing two solvent systems composed of chloroform-methanol-water and dichloromethane-methanol-water at volume ratios of 4/3/2 and 5/4/2, respectively. The chromone was finally identified as cinnamoyl-C-glycoside chromone by ultraviolet (UV), fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS), nuclear magnetic resonance (^1H NMR and ^{13}C NMR).

Key words : high-speed countercurrent chromatography; aloe chromone; isolation and purification

芦荟色酮是一类具有很大开发潜力的天然活性物质,它的药理活性主要表现在抗炎、抗氧化和抑制酪氨酸酶活性等方面^[1]。1996年,日本的 Okamura 等^[2]分离出 8 种芦荟色酮,并对其进行了结构鉴定和药效分析。但到目前为止,各国对芦荟色酮的研究开展的依然较少。阻碍芦荟色酮深层次研究开发的主要问题在于芦荟中的色酮成分含量很低。研究

表明,在脱色凝胶中芦荟色酮的含量小于 0.001%,在未脱色凝胶中的含量小于 0.011%;在脱色全叶提取物中的含量小于 0.002%,在未脱色全叶提取物中含量小于 0.025%^[3]。文献报道的芦荟色酮的分离纯化方法主要是采用制备液相色谱法^[4],但制备液相色谱存在操作成本高、制备量有限等问题,因此研究开发芦荟色酮的高效分离纯化方法成为当前该领

收稿日期 2004-02-24

作者简介 潘霞,女,硕士研究生。

通讯联系人:曹学丽,女,博士,副研究员,主要从事天然活性成分的分离纯化研究, Tel (010) 68983116, E-mail : caoxl@th. btbu. edu. cn.

基金项目:教育部科学技术研究重点项目,北京市教委科技发展计划项目(KM200310011045)。

域研究的关键。

高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography ,HSCCC)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种连续高效的液-液分配色谱分离技术。由于高速逆流色谱不需要固体支撑体,物质的分离依据其在两相互不混溶的液体中分配系数的不同而实现,因而避免了因不可逆吸附而引起的样品损失、失活、变性等,不仅使样品能够全部回收,回收的样品更能反映其本来的特性,而且由于被分离物质与液态固定相之间能够充分接触,使得样品的制备量大大提高,因而 HSCCC 是一种理想的制备分离手段。它相对于传统的柱色谱技术,具有适用面广、高效、快速、制备量大、费用低等优点,近年来被广泛应用于生命科学、中医药、海洋药物、现代农业及标准化等领域。目前, HSCCC 技术正在发展成为一种备受关注的分离纯化技术^[5]。

目前有关高速逆流色谱在植物活性成分分离研究的应用报道较多。如利用 HSCCC 可进行包括银杏黄酮、牡荆甙在内的多种天然产物活性成分高纯度标准品的分离制备^[6],以及包括芦荟素、芦荟大黄素在内的蒽醌类化合物的分离纯化^[7]。

本文将 HSCCC 与其他传统的预处理手段相结合,成功地应用于芦荟全叶中一种低含量色酮的分离和制备,并采用高效液相色谱(HPLC)、快原子轰击质谱(FAB-MS)、核磁共振(¹H NMR 和 ¹³C NMR)等手段对其纯度和结构进行了分析和鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器

高速逆流色谱仪系统:北京市新技术应用研究所研制的 GS10A3 型高速逆流色谱仪,聚四氟乙烯管(PTFE)分离柱,内径 1.6 mm,总容量 220 mL;并配有 S1007A 型恒流泵,8823A-UV 检测器,3057 型记录仪。

高效液相色谱系统:Agilent 1100LC 型高效液相色谱系统,配有 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱、四元泵、二极管阵列检测器(DAD)、自动进样器。

1.2 试剂

氯仿、甲醇、二氯甲烷、冰醋酸等试剂均为分析纯试剂,购于北京化工厂。用于 HPLC 分析的甲醇试剂为色谱纯,购于迪马公司。活性炭为分析纯,购于北京大力精细化工厂。自制双重蒸馏水。

1.3 芦荟色酮的提取和预处理

如前所述,芦荟色酮在芦荟全叶中的含量低于 0.025%,而在芦荟凝胶中的含量低于 0.011%,说明芦荟色酮在芦荟凝胶和芦荟外皮中均有分布,因此

在实验中取芦荟全叶为初始原料。首先将芦荟全叶通过切搅机打碎至细小颗粒状,加入活性炭粉末进行脱色,并通过加热来降低样品粘度。样品与活性炭的混合物经过板式过滤器过滤,分离出活性炭,并将其干燥。将该活性炭用甲醇反复萃取、过滤,所得滤液经减压浓缩,获得棕色稠膏。将此稠膏经二氯甲烷-水混合溶剂萃取,合并二氯甲烷相并进行减压浓缩,获得芦荟色酮粗提物^[10]。

1.4 HSCCC 分离方法

采用 HSCCC 分离方法对上述粗提物进行分离纯化。首先配制一定体积比的氯仿-甲醇-水(或二氯甲烷-甲醇-水)两相溶剂系统,将其充分混合后,静置分层。取上相(水相)作为固定相,下相(有机相)作为流动相。每次分离前,用输液泵以较高流速将上相固定相注满螺旋管柱。启动 HSCCC 主机,调节转速为 800 r/min,由首端向尾端,以 2.0 mL/min 的流速向柱中泵入下相流动相。当下相流动相从主机出口流出,证明体系已经达到流体动力学平衡,此时将样品溶液打入进样环。样品溶液主要用下相流动相配制。柱口流出物通过紫外检测器在 254 nm 下连续检测。记录仪同步记录,根据谱峰收集样品。

1.5 高效液相色谱分析

采用高效液相色谱分析色酮粗提物中芦荟色酮成分和经过 HSCCC 分离纯化后的样品纯度^[4]。HPLC 分析条件为 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm i. d.);DAD 检测波长为 284 nm;流动相为甲醇-水(体积比为 55:45),流速 0.7 mL/min。

1.6 FAB-MS 和 ¹H NMR, ¹³C NMR 结构确认

采用质谱和核磁共振氢谱、碳谱进行芦荟色酮的结构确认。结构确认的检测均在军事医学科学院仪器分析测试中心完成。

2 结果与讨论

2.1 芦荟色酮的提取和富集

芦荟色酮的粗提物由甲醇从活性炭中提取浓缩而得。由于其中色酮的含量较低,因此在进一步的分离纯化之前,采用二氯甲烷-水溶剂萃取的方法,对目标组分进行预富集。通过比较粗提物在该溶剂萃取前后的 HPLC 分析谱图(分别见图 1-a 和图 1-b)可以看出,采用二氯甲烷-水溶剂萃取的方法进行目标组分的富集是非常有效的。同时,还分析比较了溶剂萃取后有机相与水相的 HPLC 分析谱图(分别见图 1-b 和图 1-c)。结果表明,采用二氯甲烷-水溶剂体系进行萃取,既可以高选择性的将芦荟色酮

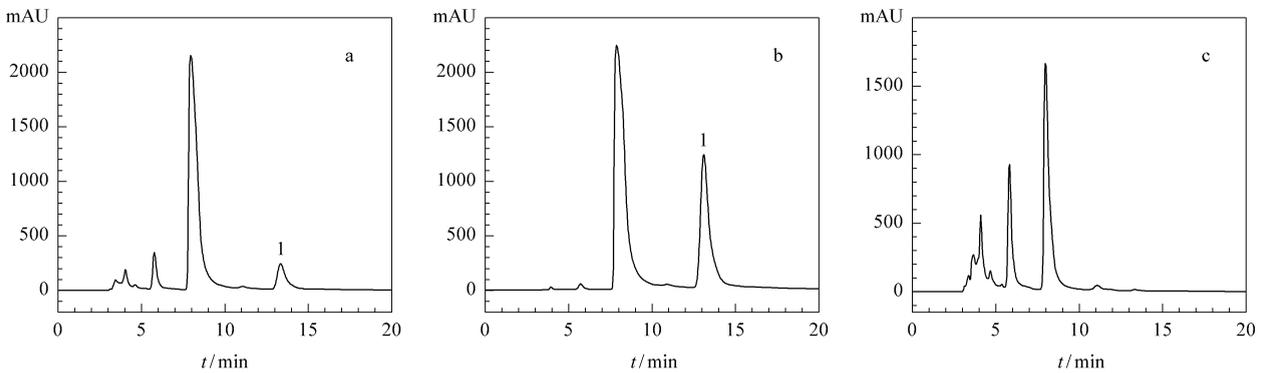


图 1 各阶段提取产物的 HPLC 分析谱图

Fig. 1 HPLC analysis of extracts from each step

a. methanol extract of activated carbon ; b. dichloromethane extract ; c. aqueous solution. Peak : 1. chromone.

成分富集到有机相中,又可获得较高的萃取效率,同时还可以有效地去除大量无关的杂质。

2.2 芦荟色酮的分离纯化

溶剂体系的选择是 HSCCC 分离中最为关键的环节,溶剂体系选择的合适与否,直接关系到分离结果的好坏。根据前面的预处理结果可知,目标组分芦荟色酮的极性较弱,因此应选用弱极性体系。氯仿-甲醇-水是被广泛应用的溶剂分离系统之一,主要应用于弱极性物质的分离。在该溶剂体系中,氯仿和水为两相,甲醇在两相中皆有分布。对于氯

仿-甲醇-水体系,若目标组分易溶于该体系的下相,可通过用二氯甲烷、四氯化碳、正己烷部分地代替氯仿,或增加甲醇与水的含量,将目标组分拉向上相;反之,则可降低甲醇的比例。这样做的原因在于:当甲醇含量增加时,其既可以减小水相的极性,同时又可以增加有机相的极性,因而可达到改变待分离成分在两相中的分配系数的目的。

从图 2 的 HPLC 分析结果可以看出,经溶剂萃取后得到的色酮粗提物中除含有目标组分外,还含有大量的杂质,需要进一步分离纯化。

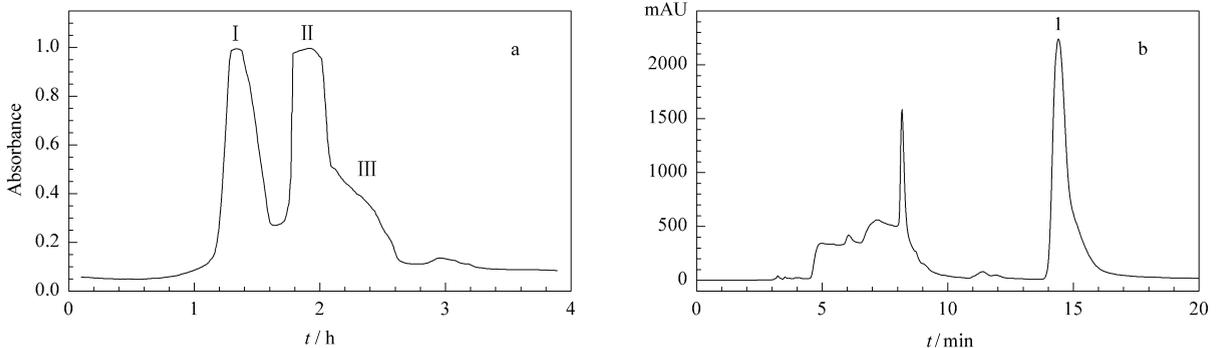


图 2 经第一步分离的 HSCCC 谱图(a)及其中组分 II(b)的 HPLC 分析谱图

Fig. 2 First-step HSCCC separation of crude extract of Aloe (a) and HPLC analysis of peak II fraction (b)

60 mg crude extract dissolved in 3 mL of lower organic phase, retention of stationary phase : 80% . UV detection : a. 254 nm ; b. 284 nm. Peak : 1. chromone.

本实验采用了两步高速逆流色谱的分离纯化方法,通过逐渐调整溶剂体系的配比,达到理想的分离效果,最终分离到高纯度的芦荟色酮单体。首先在第一步中,采用由氯仿-甲醇-水(体积比为 4:3:2)混合溶液组成的两相体系进行粗分(色谱图见图 2-a)。经 HPLC 分析表明(见图 2-b),其中峰 II 中包含大量目标组分,但同时仍有其他的杂质成分存在。为此,调节溶剂体系配比,通过减小流动相的极性,以二氯甲烷代替氯仿,采用二氯甲烷-甲醇-水(体积比为 5:4:2)的溶剂体系,对图 2-a 中的目标组分

(峰 II)进一步纯化,结果如图 3-a 所示。HPLC 分析表明(见图 3-b),峰 II'组分为高纯度的芦荟色酮成分,其 HPLC 纯度可达 95% 以上。

2.3 结构确认

图 3 中的组分 II'经真空干燥得到白色固体粉末,其紫外光谱最大吸收波长为 245, 255 和 284 nm,与文献[10]中报道的芦荟色酮的紫外特征吸收值(246, 254, 284 nm)基本一致。

由目标组分的快原子轰击质谱分析结果可知,其分子离子峰([M+H]⁺)对应的质量数为 543.2,

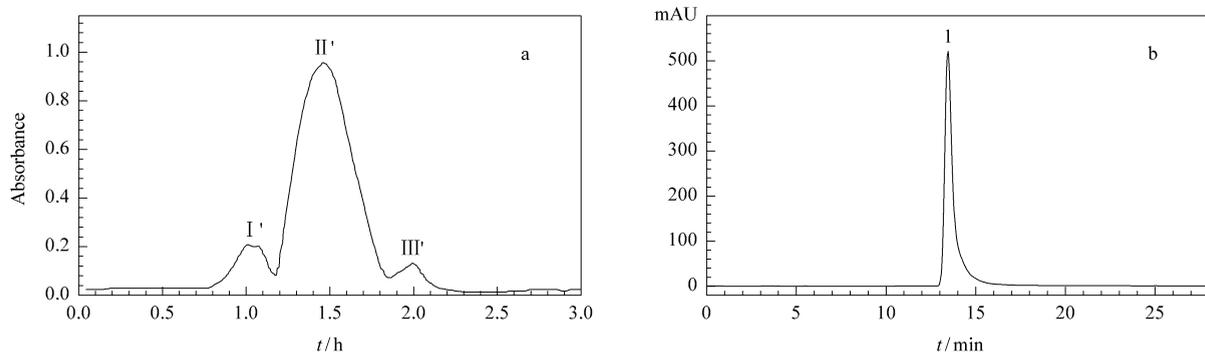


图 3 经第二步分离的 HSCCC 谱图 (a) 及其中组分 II' (b) 的 HPLC 分析谱图

Fig. 3 Second-step HSCCC separation of partially purified fraction (a) and HPLC analysis of Peak II' fraction (b)

UV detection : a. 254 nm ; b. 284 nm. Peak : 1. chromone.

由于该样品在做质谱分析之前先进行了核磁分析, 样品经过了 CD_3OD 处理, 因此该化合物的相对分子质量应为 541.2 (即 $543.2 - 2 = 541.2$), 与文献 [10] 报道的肉桂酰基-C-葡萄糖甙芦荟色酮 (其化学结构见图 4) 的相对分子质量一致。

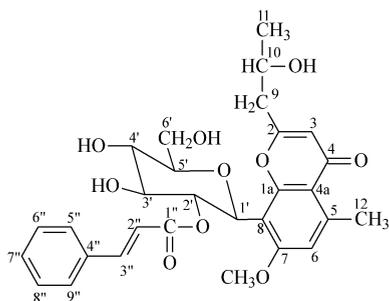


图 4 肉桂酰基-C-葡萄糖甙芦荟色酮的结构

Fig. 4 Chemical structure of cinnamoyl-C-glycoside chromone

^{13}C NMR 数据, δ (C 的位置, 见图 4): 167.4 (C-2), 112.6 (C-3), 182.2 (C-4), 117.2 (C-4a), 144.6 (C-5), 112.6 (C-6), 161.9 (C-7), 111.8 (C-8), 159.5 (C-1a), 44.5 (C-9), 66.7 (C-10), 23.6 (C-11), 23.5 (C-12), 57.0 (OMeC-7), 72.0 (C-1'), 74.2 (C-2'), 77.7 (C-3'), 72.6 (C-4'), 82.8 (C-5'), 63.0 (C-6'), 167.6 (C-1''), 118.3 (C-2''), 146.4 (C-3''), 135.5 (C-4''), 129.9 (C-5''), C-9''), 129.1 (C-6''), C-8''), 131.5 (C-7''). 各 C 原子的归属与该色酮的结构相一致。

1H NMR 数据 δ : 1.13 (1H, s, H-3); 6.80 (1H, s, H-6); 2.84 (2H, dd, 14 Hz, 7.2 Hz, CH_2 -9); 4.38 (1H, m, H-10); 1.33 (3H, d, 6 Hz, CH_3 -11); 2.75 (3H, s, CH_3 -12); 6.26 (1H, d, 16 Hz,

H-2''); 7.46 (1H, d, 16 Hz, H-3''); 7.36, 7.50 (5H, m, H-5'', H-9'', H-6'', H-8'', H-7''); 5.20 (1H, d, 10 Hz, H-1'); 5.73 (1H, dd, 10 Hz, H-2'); 3.40 ~ 3.50 (1H, m, H-5'); 3.61 (1H, dd, 10 Hz, H-4'); 3.70 ~ 3.80 (2H, m, H-3', H-6'a); 4.00 (1H, m, H-6'b); 3.89 (3H, s, OMe-7)。

综合上述紫外吸收光谱、质谱以及 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据, 最终确认分离得到的色酮成分为肉桂酰基-C-葡萄糖甙芦荟色酮。

3 结论

本文报道了配合一些提取和预处理手段, 采用高速逆流色谱从芦荟叶中分离制备出低含量的高纯度芦荟色酮单体的方法, 该方法具有高效性和独特性。本文的研究为芦荟色酮的进一步药理活性研究奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Okamura N, Hine N, Tateyama Y, Nakazawa M, Fujioka T, Mihashi K, Yagi A. *Phytochemistry*, 1998, 49(1): 219
- [2] Okamura N, Hine N, Harada S, Fujioka T, Mihashi K, Yagi A. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 495
- [3] Waller T. US 5965540. 1999
- [4] Park M K, Park J H, Kim N Y, Shin Y G, Young S, Lee J G, Kim K H, Lee S K. *Phytochem Anal*, 1998, 9: 186
- [5] Cao X L, Tian Y, Zhang T Y, Ito Y. *J Chromatogr A*, 1998, 813: 397
- [6] Zhang T Y, Cao X L, Han X. *J Liq Chromat & Rel Tech*, 2003, 26(9/10): 1565
- [7] Yuan Liming, Liu Guoxiang, Tian Guocai. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (袁黎明, 刘国祥, 田国才. 分析化学), 2003, 31(2): 251
- [8] Waller T, Jia Q, Padmapriya A. US 5675000. 1997