

高速逆流色谱法分离纯化黄芪中的芒柄花素和毛蕊异黄酮

马晓丰^{1,2}, 屠鹏飞¹, 陈英杰², 张天佑³, 魏 芸³

(1. 北京大学中药现代研究中心, 北京 100083; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016;
3. 北京市新技术应用研究所, 北京 100035)

摘要 :采用高速逆流色谱法(HSCCC),以正己烷-氯仿-甲醇-水组成二相系统作为固定相与流动相,对黄芪的乙酸乙酯粗提物进行了分离纯化。结果发现:以正己烷-氯仿-甲醇-水(体积比为1.5:3:3:2)组成的系统可以从黄芪的乙酸乙酯粗提物中分离出毛蕊异黄酮,纯度可达95%以上,并可以初步纯化芒柄花素;接着用正己烷-氯仿-甲醇-水(体积比为4:4:5:4)组成的系统进一步纯化芒柄花素,其纯度达95%以上。利用该方法,可以对中药黄芪中的异黄酮进行快速的分离和纯化。

关键词 :高速逆流色谱;芒柄花素;毛蕊异黄酮;黄芪

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)03-0299-03

Preparative Isolation and Purification of Calycosin and Formononetin from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by High-Speed Counter-Current Chromatography

MA Xiaofeng^{1,2}, TU Pengfei¹, CHEN Yingjie², ZHANG Tianyou³, WEI Yun³

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Peking University, Beijing 100083, China;
2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
3. Beijing Institute of New Technology Application, Beijing 100035, China)

Abstract : Preparative high-speed counter-current chromatography (HSCCC) was used for the separation of calycosin and formononetin from the ethyl acetate extract of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. Calycosin was obtained by HSCCC with a binary phase solvent system composed of *n*-hexane-chloroform-methanol-water (1.5:3:3:2, v/v). Then, formononetin was obtained with a system composed of *n*-hexane-chloroform-methanol-water (4:4:5:4, v/v). The mobile phase was the lower phase and operated at a flow-rate of 2.0 mL/min, while the apparatus rotated at 800 r/min. High performance liquid chromatographic analysis of calycosin and formononetin revealed that their purities were over 95%. HSCCC is a useful method for the separation of natural products.

Key words : high-speed counter-current chromatography; formononetin; calycosin; *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao

高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)是美国国家医学院 Ito 博士等^[1]于 20 世纪 80 年代发明的一种无任何固态支持介质的液-液分配色谱技术。其基本原理是根据被分离的物质在两相溶剂系统中的分配系数不同而得到最终分离^[2]。这种分离技术由于不使用固体支持介质,避免了因与固体填料发生不可逆吸附而造成的样品损失、失活变性等常规填料易产生的

弊端,可使样品得以全部回收,具有分离容量大、性能强、高效、快速的特点,尤其适用于制备性分离。到目前为止,此技术已应用于生物化学、生物工程、医学、药学、天然产物化学、有机合成、化工、环境、农业、食品、材料等领域,在植物化学领域被广泛应用于生物碱、黄酮类化合物、醌类化合物、萜类化合物、香豆素、有机酸等成分分离和制备研究^[3-9]。

芒柄花素(formononetin)和毛蕊异黄酮(caly-

cosin)是中药黄芪中的主要有效成分,其化学结构见图 1。由于这两个化合物在紫外光下有吸收,容易检测,因此常常被用作黄芪及其复方制剂质量控制的标准品。为了建立上述 2 种标准品的快速制备方法,为黄芪的质量评价提供物质基础,我们对分离纯化芒柄花素和毛蕊异黄酮的方法进行了研究。文献[3]已报道了应用 HSCCC 分离毛蕊异黄酮的方法,本实验简化了实验步骤,优化了色谱条件,应用 HSCCC 分离纯化了蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)中的毛蕊异黄酮,同时分离纯化了芒柄花素。

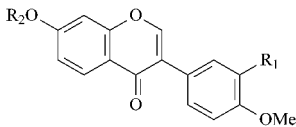


图 1 芒柄花素、毛蕊异黄酮的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of formononetin and calycosin

Formononetin : $R_1 = R_2 = H$.

Calycosin : $R_1 = H, R_2 = OH$.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GS 10A2 型半制备高速逆流色谱仪:多层螺旋管柱(长 110 m、直径 1.6 mm、总体积 230 mL), β 值为 0.5 ~ 0.8;Six star NS-1007 恒流泵(流速为 0 ~ 9.99 mL/min);8823A 紫外检测器(以上仪器均为北京市新技术应用研究所生产)。手动进样阀:20 mL(天津高新科技公司)。Yokogawa Model 3057 便携式记录仪(四川仪器厂)。Waters 高效液相色谱(HPLC)仪:包括 Waters 600 泵、Waters 2487 全波长紫外检测器、Millennium³² 数据处理系统(美国 Sage 公司)。旋转蒸发器(日本 Eyela 公司)。

正己烷、氯仿、甲醇为分析纯试剂(北京化工厂);重蒸水为自制;HPLC 所用乙腈为色谱纯试剂(Braker 试剂公司)。

1.2 样品的处理

取蒙古黄芪药材(购于山西省浑源县药材公司)15 kg,以 8 倍质量的 50%(体积分数)乙醇水溶液加热回流提取 3 次,减压回收乙醇后,将浸膏溶于热水中,以石油醚萃取除脂,再以乙酸乙酯萃取,将乙酸乙酯萃取物减压回收溶剂,得到蒙古黄芪异黄酮的粗提物。

1.3 HSCCC 分离纯化条件及步骤

溶剂系统 1 为正己烷-氯仿-甲醇-水(体积比为 1.5:3:3:2),溶剂系统 2 为正己烷-氯仿-甲醇-水

(体积比为 4:4:5:4);流速 2.0 mL/min,转速 800 r/min,记录仪衰减 100 mV,纸速 2.0 cm/h,紫外检测波长为 254 nm,检测器衰减 2.0 A。

将正己烷、氯仿、甲醇和水 4 种溶剂按一定比例置于分液漏斗中,充分振荡混合,静置,使用前将两相分开。上层水相为固定相,下层有机相为流动相。将样品以溶剂系统 1 的下相溶解后,根据要求配制成适当浓度。

在室温下,将上层水相完全充满多层螺旋管柱,下层有机相以 2.0 mL/min 的速度泵入柱中,同时将离心机转速逐步升至 800 r/min。当流动相开始从柱尾端流出时,即可认为固定相与流动相在柱中达到了动态平衡。这时通过样品环注入 20 mL 样品溶液,以波长为 254 nm 的紫外检测器连续监控尾端流出的液体,根据色谱图收集各峰流分。收集并减压浓缩 HSCCC 的各峰流分,利用 HPLC 分析所得流分的纯度。以核磁共振(¹H-NMR、¹³C-NMR)鉴定结构。固定相保留值为分离后所余固定相与柱体积的比值。

1.4 HPLC 条件

色谱柱:Symmetry ShieldTM RP₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm i. d.);柱温:40 ℃。流动相:乙腈-水(体积比为 40:60);流速:1.0 mL/min。紫外检测波长:254 nm。

2 结果与讨论

图 2 为 20 mL(190 mg)黄芪提取物的 HSCCC 图(采用溶剂系统 1),分别接流分 1(峰 1)和流分 2(峰 2);将流分 2 减压蒸干后,可得到毛蕊异黄酮 25

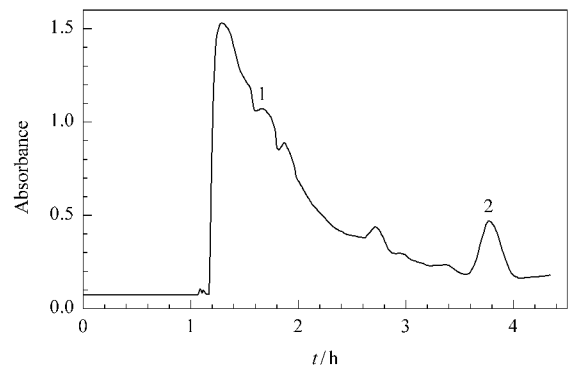


图 2 蒙古黄芪的乙酸乙酯粗提物的半制备 HSCCC 图
Fig. 2 Chromatogram of the crude ethyl acetate extract from *A. mongholicus* by preparative HSCCC

Solvent system: *n*-hexane-chloroform-methanol-water (1.5:3:3:2, v/v); stationary phase: upper aqueous phase; mobile phase: lower organic phase; flow rate: 2.0 mL/min; revolution speed: 800 r/min; detection wavelength: 254 nm; sample: 190 mg dissolved in 20 mL lower phase; retention of the stationary phase: 66.7%.

Peak 1: formononetin; peak 2: calycosin.

mg, 经 HPLC 检测其纯度超过 95% (见图 4-b), 流分 1 中含芒柄花素约为 50%。图 3 是图 2 中流分 1 的 HSCCC 图(采用溶剂系统 2), 将峰 1 减压蒸干后, 可得到芒柄花素 20 mg, 经 HPLC 检测其纯度超过 95% (见图 4-c)。图 4-a 是黄芪的乙酸乙酯粗提物的 HPLC 图, 可以得知其中毛蕊异黄酮的含量约为 15%, 芒柄花素的含量约为 17%。

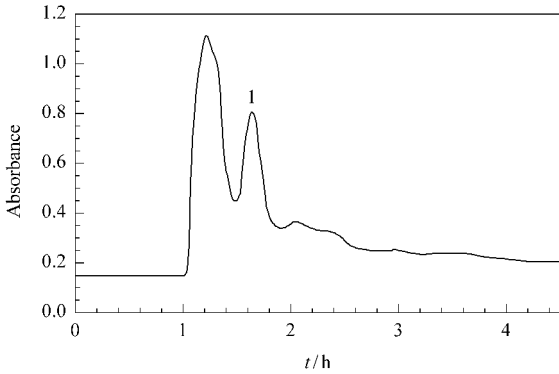


图 3 经过一次纯化的提取物的半制备 HSCCC 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the partially purified extract of *A. mongholicus* by preparative HSCCC

Solvent system: *n*-hexane-chloroform-methanol-water (4:4:5:4, v/v); stationary phase: upper aqueous phase; mobile phase: lower organic phase; flow rate: 2.0 mL/min; revolution speed: 800 r/min; detection wavelength: 254 nm; sample: 80 mg dissolved in 20 mL lower phase; retention of the stationary phase: 60.0%.

Peak 1: formononetin.

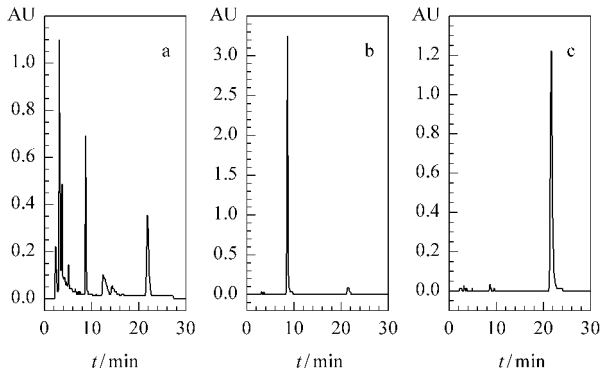


图 4 蒙古黄芪乙酸乙酯粗提物(a)、图 2 中流分 2(b)和图 3 中流分 1(c)的 HPLC 图

Fig. 4 Chromatograms of the crude ethyl acetate extract from *A. mongholicus* (a), effluent No. 2 in Fig. 2 (b) and effluent No. 1 in Fig. 3 (c) by HPLC

Column: Symmetry Shield™ RP₁₈ column (250 mm × 4.6 mm i. d.); mobile phase: acetonitrile-water (40:60, v/v); flow rate: 1.0 mL/min.

芒柄花素、毛蕊异黄酮的化学结构由 ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 鉴定。图 3 中的峰 1: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3.77(3H, s, -OCH₃),

6.86(1H, s, H-8), 6.93(1H, dd, *J* = 8.7 Hz, 1.8 Hz, H-6), 6.98(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3', H-5'), 7.49(2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-2', H-6'), 7.96(1H, d, H-5), 8.33(1H, s, H-2), 10.82(1H, s, C₇-OH); ¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 153.2(C-2), 123.4(C-3), 174.7(C-4), 127.4(C-5), 115.8(C-6), 162.6(C-7), 102.2(C-8), 157.5(C-9), 116.7(C-10), 124.7(C-1'), 116.5(C-2'), 146.1(C-3'), 147.6(C-4'), 112.0(C-5'), 119.8(C-6')。将以上数据与文献[10]对照, 确定峰 1 组分为芒柄花素。图 2 中的峰 2: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.77(3H, s, -OCH₃), 6.84(1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-8), 6.91(1H, dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 2 Hz, H-6), 6.93(2H, br s, H-5', H-6'), 7.02(1H, br s, H-2'), 7.95(1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 8.26(1H, s, H-2); ¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 153.2(C-2), 123.2(C-3), 174.6(C-4), 127.4(C-5), 115.2(C-6), 162.6(C-7), 102.1(C-8), 157.5(C-9), 116.6(C-10), 124.2(C-1'), 130.1(C-2'), 113.6(C-3'), 158.9(C-4'), 113.6(C-5'), 130.1(C-6')。将以上数据与文献[10]对照, 确定峰 2 组分为毛蕊异黄酮。

3 结论

以上实验结果表明, HSCCC 能有效地从黄芪粗提物中分离纯化毛蕊异黄酮及芒柄花素, 得到的高纯度样品可以作为标准品用于分析测试或药理与毒理试验。由此可见, HSCCC 在分离纯化结构相似的异黄酮类成分方面将会具有很好的效果。

参考文献:

- [1] Ito Y, Sandlin J, Bowers W G. *J Chromatogr*, 1982, 244 (2): 247
- [2] Ito Y. *CRC Crit Rev Anal Chem*, 1986, 17(1): 65
- [3] Ma X F, Zhang T Y, Wei Y, Tu P F, Chen Y J, Ito Y. *J Chromatogr A*, 2002, 962: 243
- [4] Ma X F, Tu P F, Chen Y J, Zhang T Y, Wei Y, Ito Y. *J Chromatogr A*, 2003, 992: 193
- [5] Ma X F, Tu P F, Chen Y J, Zhang T Y, Wei Y, Ito Y. *J Chromatogr A*, 2004, 1023: 311
- [6] Du Q Z, Xia M, Ito Y. *J Chromatogr A*, 2002, 962: 239
- [7] Wei Y, Zhang T Y, Ito Y. *J Chromatogr A*, 2003, 1017: 125
- [8] Lu H T, Jiang Y, Chen F. *J Chromatogr A*, 2004, 1023: 159
- [9] Lu H T, Jiang Y, Chen F. *J Chromatogr A*, 2004, 1026: 185
- [10] Song Chunqing, Zheng Zhiren, Liu Di, Hu Zhibi, Sheng Wanyun. *Acta Botanica Sinica* (宋纯清, 郑志仁, 刘涤, 胡之璧, 盛宛云. *植物学报*), 1997, 39(8): 764