

高良姜中二苯基庚烷类化合物的高速逆流色谱分离制备

叶琼仙¹, 谭 雄¹, 朱龙平^{1,2}, 赵志敏¹, 杨得坡^{1,2}, 尹 胜^{1,2}, 王冬梅^{1,2*}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广东 广州 510006)

摘要: 应用高速逆流色谱法(HSCCC)分离纯化了高良姜中3种二苯基庚烷类化合物。以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(2:3:1.75:1, v/v/v/v)为两相溶剂系统,下相为固定相,上相为流动相,在主机转速为858 r/min、流速1.5 mL/min的条件下,从122.20 mg高良姜石油醚萃取物中经一步HSCCC分离可制备得到5*R*-羟基-7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-苯基-3-庚酮(7.37 mg)、7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-苯基-4*E*-烯-3-庚酮(9.11 mg)和1,7-二苯基-4*E*-烯-3-庚酮(15.44 mg),经高效液相色谱分析,纯度均大于93%,各化合物的结构由质谱和核磁共振氢谱、碳谱鉴定确证。该方法简便、快速、高效,可用于高良姜中二苯基庚烷类化合物的快速分离制备。

关键词: 高速逆流色谱; 制备; 二苯基庚烷类化合物; 高良姜; 中药材

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)03-0327-05

Isolation and purification of diarylheptanoids from *Alpinia officinarum* Hance by high-speed counter-current chromatography

YE Qiongxiang¹, TAN Xiong¹, ZHU Longping^{1,2}, ZHAO Zhimin¹,
YANG Depo^{1,2}, YIN Sheng^{1,2}, WANG Dongmei^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Three diarylheptanoids were isolated and purified from *Alpinia officinarum* Hance by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). A two-phase solvent system composed of hexane-ethyl acetate-methanol-water (2:3:1.75:1, v/v/v/v) was used. The lower phase was used as the stationary phase. From 122.20 mg petroleum ether extract of *A. officinarum*, 5*R*-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone (7.37 mg), 7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenyl-4*E*-en-3-heptanone (9.11 mg) and 1,7-diphenyl-4*E*-en-3-heptanone (15.44 mg) with purities over 93% were obtained within 140 min in one-step separation by HSCCC under the conditions of a flow rate of 1.5 mL/min and 858 r/min. The obtained compounds were analyzed by high performance liquid chromatography to provide their purities, and their structures were confirmed by using mass spectrometry, ¹H-nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and ¹³C-NMR. The established HSCCC method is relatively simple, fast and suitable for the isolation and purification of diarylheptanoids from *A. officinarum*.

Key words: high-speed counter-current chromatography (HSCCC); preparation; diarylheptanoids; *Alpinia officinarum* Hance; traditional Chinese herbal medicine

高良姜为姜科山姜属植物高良姜(*Alpinia officinarum* Hance)的干燥根茎,其性热味辛,归脾、胃经,具温胃散寒、消食止痛的功效,用于脘腹冷痛、胃寒呕吐、暖气吞酸等^[1]。高良姜主要分布于广东、海南、广西等,为“十大广药”之一。高良姜的化学成

分复杂,主要含有黄酮类、挥发油和二苯基庚烷类化合物,目前已从其药材中分离鉴定了50多种化合物^[2]。

高良姜中的二苯基庚烷类化合物含量较高、种类多,具有镇痛抗炎、抗氧化、抑制呕吐等多种生理

* 通讯联系人: 王冬梅,博士,副教授,主要从事天然药物化学研究。Tel: (020) 39943042, E-mail: Lsswdm@mail.sysu.edu.cn.

基金项目: 国家科技部中澳国际合作项目(2009DFA31230)和中山大学医科学生业余科研基金项目([2010] 31号)。

收稿日期: 2011-11-11

活性^[3-5],是高良姜的主要药理活性成分。其中,5*R*-羟基-7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-4-苯基-3-庚酮含量较高,已被证实具有抗呕吐^[6]、抗肿瘤^[7]、抗菌等多种药理活性,其他的二苯基庚烷类成分的药理活性还有待深入进行。因此建立二苯基庚烷类成分的高效分离制备方法对高良姜药材及其产品的开发利用具有重要的意义。但目前对二苯基庚烷类化合物的分离制备方法还局限于传统的柱层析,只有少数研究采用柱层析与制备高效液相色谱(HPLC)相结合的方法^[8,9]。这些传统的分离纯化方法具有耗时长、成本高、溶剂消耗量大、制备量小等的缺点,可快速、简便分离纯化高良姜中二苯基庚烷类化合物的方法鲜见报道。

高速逆流色谱(HSCCC)是一种简单的液-液分配色谱技术,无需固定相载体,避免了样品的不可逆吸附、失活等问题,样品只通过在互不混溶的两相溶剂间分配的不同而在短时间内实现高效分离^[10-12],且溶剂消耗少,成本低,亦有利于环保。本文将 HSCCC 用于高良姜中二苯基庚烷类化合物单体的分离制备,旨在建立高良姜中活性成分对照品的快速、高效、低成本的制备方法,为高良姜药材的质量控制与深入的药理活性及作用机制研究提供必要的物质基础。

本文经过溶剂系统的筛选与优化,通过一步 HSCCC 分离即可从高良姜的石油醚萃取物中分离纯化得到 3 种化合物,并利用电喷雾电离质谱(ESI-MS)、核磁共振氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)对其结构进行了确证。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

QuikPrepTM Mk 5 CCC(英国 AECS)系统,包括 LabAllianceTM Series II HPLC 泵(美国 SSI),SPD-10A UV 紫外检测器(岛津),BS-400A 自动收集器,N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);采用不锈钢管缠绕的线圈(直径 2.16 mm,线圈体积 115 mL, β 值为 0.62~0.85,最大转速 860 r/min),10 mL 进样环。Shimadzu 公司 LC-20A 高效液相色谱仪,包括 LC-20A 二元高压泵、Prominence Sil-20A 自动进样器、SPD-20A 二极管阵列检测器(DAD);Thermo LCQ DECA XP 电喷雾质谱仪(ESI-MS, Thermo Finnigan 公司,美国);Avance 400MHz 型核磁共振波谱仪(NMR, Bruker 公司,瑞士);Milli-Q plus 超纯水仪(Millipore 公司,美国)。

甲醇、正己烷、乙酸乙酯均为分析纯(天津市百世化工有限公司),HPLC 分析用乙腈为色谱纯溶剂(Honeywell 公司,美国)。高良姜药材购自广州清平药材市场。

1.2 高良姜石油醚萃取物的制备

将高良姜干燥药材粉碎后,过 20 目筛,取 1.5 kg 加入 10 倍体积甲醇超声浸润 1 h 后,回流提取 2 次,每次 1 h,合并两次提取液,减压浓缩成浸膏。将浸膏均匀分散于适量的蒸馏水后用等体积石油醚萃取 3 次,合并石油醚萃取液,减压浓缩挥去溶剂,得到石油醚萃取物 21.09 g,冷藏备用。

1.3 HPLC 分析条件

色谱柱: Diamonsil C18 (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm, Dikma Technologies, USA)。流动相: A,乙腈; B,超纯水; 梯度洗脱程序: 0~10 min, 30% A~50% A; 10~40 min, 50% A~90% A; 40~60 min, 90% A。流速: 1.0 mL/min, DAD 检测波长范围: 190~600 nm。

1.4 HSCCC 两相溶剂系统的选择

对不同配比的正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水组成的溶剂系统进行试管实验,通过分层时间和上下相体积比粗筛溶剂系统,选取其中的 4 种配比,用 HPLC 法分析,计算各目标化合物的分配系数 K ^[13,14]。

分别按照 2:3:2:1、2:3:1.75:1、2.5:2.5:2:1、2.5:2.5:1.75:1 这 4 种体积比配制各溶剂系统。分别取相同体积的上相与下相置于试管中,加入一定量的样品,剧烈振摇使样品充分溶解,静置分层。达到分配平衡后,分别取上相和下相各 1.0 mL,挥干溶剂后用等量的甲醇溶解,经 HPLC 分析得到目标化合物在上相中的峰面积(A_{upper})与下相中的峰面积(A_{lower}),按照公式 $K = A_{lower}/A_{upper}$ 计算得到目标化合物的分配系数。

1.5 HSCCC 分离用溶剂体系和样品溶液的配制

在分液漏斗中配制正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 2:3:1.75:1)两相溶剂体系,充分振摇后静置分层。将上相和下相溶液分离后,超声脱气 30 min,备用。

准确称取高良姜石油醚萃取物 122.02 mg 溶解于 10 mL 流动相(上相溶液)中得到 12.20 g/L 的样品溶液,用微孔滤膜过滤后备用。

1.6 HSCCC 分离纯化方法

将已脱气的固定相(下相)以 8.0 mL/min 的速度泵入 HSCCC 分离管,待固定相充满整个分离管后,调节主机转速至最大转速(显示值 858 r/min),同时以 1.5 mL/min 的速度泵入流动相(上相);待

流动相从柱出口流出、且固定相不再流出、两相在分离管中达到动态平衡后,由进样阀注入 10 mL 样品溶液。280 nm 下检测,记录色谱图,自动流分收集器每 5 min 收集 1 个流分。分离结束后,停止转动线圈,用甲醇将线圈内的固定相置换出来。

2 结果与讨论

2.1 高良姜石油醚萃取物的 HPLC-DAD 分析

图 1 为高良姜石油醚萃取物的 HPLC 色谱图。二苯基庚烷类化合物的紫外吸收特征为在 210 ~ 230 nm 有 E 带强吸收峰,在 250 ~ 280 nm 附近有 B 带弱吸收峰;通过各色谱峰在 200 ~ 600 nm 范围内的吸收光谱可知,色谱峰 I、II、III 为二苯基庚烷类化合物,故选择这 3 个色谱峰作为后续 HSCCC 分离的目标化合物。虽然 3 个色谱峰在 210 nm 吸收强度大,但由于样品中的其他化合物及流动相(乙酸乙酯、甲醇等)在 210 ~ 220 nm 下均有较强的吸收,在 HSCCC 分离中这种溶剂吸收带来的基线背景吸收值过高,且影响基线的平稳。因此,综合考虑选择 HSCCC 分离的检测波长为 280 nm。

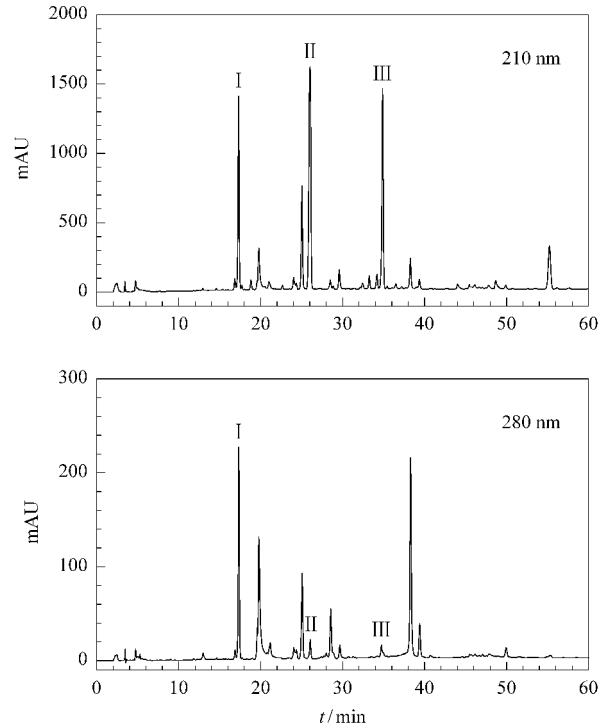


图 1 高良姜石油醚萃取物的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of petroleum ether extract from *Alpinia officinarum* Hance

2.2 HSCCC 溶剂系统的选择

合适的溶剂系统是获得理想的 HSCCC 分离的关键。本研究根据所分离化合物的性质,考察了上述 3 个色谱峰所对应化合物在 4 种不同组成比例的

正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水溶剂体系中的分配系数,从中优选出具有合适分配系数的溶剂体系,结果见表 1。

表 1 3 种化合物在不同比例的溶剂体系中的分配系数
Table 1 Partition coefficients (*K*) of compounds I – III in *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water solvent systems with different compositions

Solvent system	$V(n\text{-hexane}) : V(\text{ethyl acetate}) : V(\text{methanol}) : V(\text{water})$	<i>K</i>		
		I	II	III
1	2:3:2:1	2.13	0.67	0.18
2	2:3:1.75:1	1.67	0.64	0.32
3	2.5:2.5:2:1	3.85	0.65	0.16
4	2.5:2.5:1.75:1	2.22	0.23	0.04

$K = A_{\text{lower}} / A_{\text{upper}}$

由表 1 可见,在溶剂体系 1、3、4 条件下,3 种化合物的分配系数差异较大,但化合物 III 的分配系数偏小,容易与样品中几乎没有保留的杂质一起过早地被洗脱出来,不适合高良姜石油醚萃取物中各物质的分离。而在溶剂体系 2 中,各化合物之间的分配系数差异较大,且分配系数在 0.5 ~ 2.0,所需分离时间较短,是较为适宜的 HSCCC 分离溶剂体系。

2.3 线圈转速的优化

在 HSCCC 分离中,线圈转速对固定相保留率和分离效率可产生重要影响。本研究使用的高速逆流色谱仪的最大转速为 860 r/min,溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 2:3:1.75:1)在主机转速为 700 r/min 时,固定相保留率为 75%;当主机转速设置为最大(显示值为 858 r/min)时,固定相保留率为 78%。当固定相保留率相当的时候,主机转速加快,有利于提高分离效率^[3],因此综合考虑最后选择以 858 r/min 为主机转速。

2.4 HSCCC 分离制备的结果

在 1.5 和 1.6 节所述 HSCCC 条件下,对高良姜石油醚萃取物(122.02 mg)进行分离纯化,总的分离时间为 160 min,其分离色谱图见图 2。每 5 min 收集一个流分,各流分经 HPLC 分析,确定 20 ~ 25 min 流分为流分 1 (Fr. 1), 40 ~ 45 min 为流分 2 (Fr. 2), 合并 105 ~ 130 min 为流分 3 (Fr. 3)。将流分 1 ~ 3 减压浓缩干燥,其质量依次为 15.44, 9.11, 7.37 mg。由 HPLC 分析中色谱峰的保留时间可知(见图 3), Fr. 1、2 及 3 分别对应于化合物 III、II 及 I,峰面积归一化法测得各化合物的纯度分别为 93.1%、93.2% 和 94.7%。

2.5 结构鉴定

化合物 I: 无色油状物。ESI-MS *m/z*: 327 [M

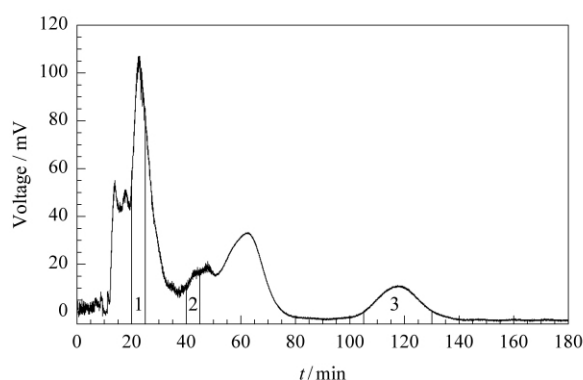


图2 高良姜石油醚萃取物的 HSCCC 分离色谱图
Fig. 2 HSCCC chromatogram of the petroleum ether extract from *Alpinia officinarum* Hance

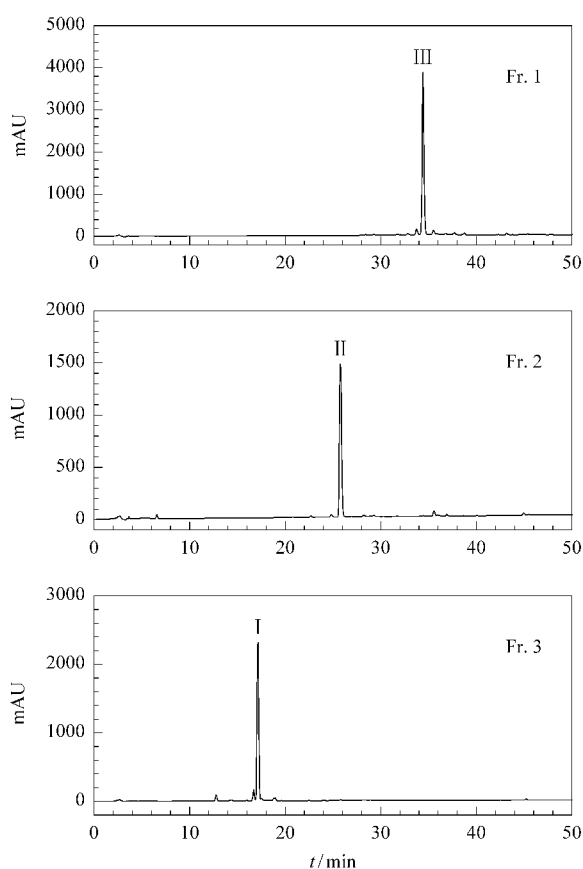


图3 HSCCC 分离所得流分1,2,3的 HPLC 色谱图(210 nm)
Fig. 3 HPLC chromatograms of the fractions 1, 2, 3 separated by HSCCC (210 nm)

$-\text{H}]^-$. $^1\text{H-NMR}$ (δ , 400 MHz, CDCl_3): 7.15 ~ 7.30 (5H, m, H-2' ~ 6'), 6.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2''), 6.70 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5''), 6.67 (1H, dd, $J = 1.9, 8.0$ Hz, H-6''), 3.95 ~ 4.08 (1H, m, H-5), 3.04 (1H, brs, 5-OH), 3.87 (3H, s, 3''-OCH₃), 2.50 ~ 2.93 (8H, m, H-1, 2, 4, 7), 1.64 ~ 1.73 (2H, m, H-6). $^{13}\text{C NMR}$ (δ , 100 MHz, CDCl_3): 29.48 (C-1), 45.01 (C-2), 211.12 (C-3), 49.26 (C-4), 66.84 (C-5), 38.33 (C-6),

31.41 (C-7), 140.62 (C-1'), 128.24 (C-2'), 128.54 (C-3'), 126.22 (C-4'), 128.54 (C-5'), 128.24 (C-6'), 133.68 (C-1''), 111.03 (C-2''), 146.36 (C-3''), 143.71 (C-4''), 114.22 (C-5''), 120.90 (C-6''), 55.86 (OCH₃)。以上数据与文献 [6] 的报道一致,表明化合物 I 为 5*R*-羟基-7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-苯基-3-庚酮(5*R*-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone)。

化合物 II: 无色油状物。ESI-MS m/z : 309 $[\text{M} - \text{H}]^-$. $^1\text{H-NMR}$ (δ , 400 MHz, CD_3OD): 7.16 ~ 7.25 (5H, m, H-2' ~ 6'), 6.91 (1H, dt, $J = 6.87, 15.93$ Hz, H-5), 6.84 (1H, d, $J = 1.85$ Hz, H-2''), 6.73 (1H, d, $J = 6.99$ Hz, H-5''), 6.66 (1H, dd, $J = 1.86, 8.02$ Hz, H-6''), 6.11 (1H, d, $J = 15.96$ Hz, H-4), 3.81 (3H, s, 3''-OCH₃), 2.82 ~ 2.91 (4H, m, H-1, 2), 2.71 (2H, t, $J = 7.59$ Hz, H-7), 2.49 ~ 2.56 (2H, m, H-6)。 $^{13}\text{C NMR}$ (δ , 100 MHz, CD_3OD): 30.2 (C-1), 41.94 (C-2), 199.11 (C-3), 131.43 (C-4), 147.09 (C-5), 35.19 (C-6), 34.73 (C-7), 142.55 (C-1'), 129.15 (C-2', 6'), 129.21 (C-3', 5'), 126.68 (C-4'), 133.27 (C-1''), 112.86 (C-2''), 148.24 (C-3''), 145.79 (C-4''), 115.68 (C-5''), 121.6 (C-6''), 56.22 (3''-OCH₃)。以上数据与文献 [7,18] 的报道一致,表明化合物 II 为 7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-苯基-4*E*-烯-3-庚酮(7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenyl-4*E*-en-3-heptanone)。

化合物 III: 无色油状物。ESI-MS m/z : 263 $[\text{M} - \text{H}]^-$. $^1\text{H-NMR}$ (δ , 400 MHz, CD_3COCD_3): 7.10 ~ 7.30 (10H, m, H-2' ~ 6', 2'' ~ 6''), 6.83 (1H, dt, $J = 7.2, 15.9$ Hz, H-5), 6.10 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-4), 2.92 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-1), 2.83 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-2), 2.76 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-7), 2.53 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-6)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (δ , 100 MHz, CD_3COCD_3): 199.14 (C-3), 146.82 (C-5), 142.05 (C-1'), 141.00 (C-1''), 131.50 (C-4), 129.24 (C-3', 3'', 5', 5''), 129.16 (C-2', 2'', 6', 6''), 126.85 (C-4'), 126.70 (C-4''), 41.97 (C-2), 35.53 (C-6), 34.84 (C-7), 32.13 (C-1)。以上数据与文献 [9] 的报道一致,表明化合物 III 为 1,7-二苯基-4*E*-烯-3-庚酮(1,7-di-phenyl-4*E*-en-3-heptanone)。

确证得到的 3 种化合物的结构式见图 4。

3 结语

本研究将 HSCCC 应用到高良姜药材中二苯基

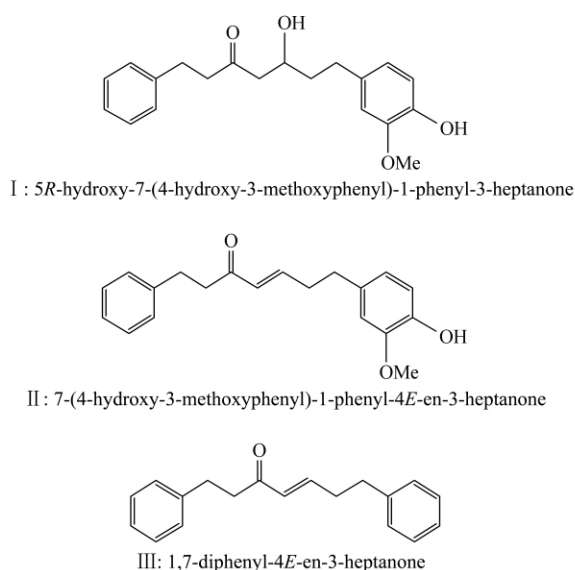


图4 3种二苯基庚烷类化合物的结构式

Fig. 4 Chemical structures of the three diarylheptanoids

庚烷类化合物的分离制备,采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(2:3:1.75:1, v/v/v/v) 四元溶剂系统,高良姜石油醚萃取物经一步 HSCCC 分离可获得3种二苯基庚烷类成分,分别为5*R*-羟基-7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-苯基-3-庚酮、7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-苯基-4*E*-烯-3-庚酮和1,7-二苯基-4*E*-烯-3-庚酮。所建立的 HSCCC 分离方法可用于快速、高效、低成本地分离制备高良姜中的二苯基庚烷类单体化合物对照品,可为这些成分的深入的药理活性与作用机制研究以及高良姜药材的质量控制方法的完善提供必要的物质基础。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Committee of People's Republic China. Pharmacopoeia of People's Republic China, Part 1. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press (国家药典委员会. 中国药典, 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2010: 270
- [2] Huang H Z, Yang D. Guangdong Chemical Industry (黄慧珍, 杨丹. 广东化工), 2009, 36(1): 77
- [3] Feng L N, Deng Y F, Liang N C. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (冯丽娜, 邓亦峰, 梁念慈. 时珍国医国药), 2009, 20(11): 2732
- [4] Lee S E, Hwang H J, Ha J S, et al. Life Sciences, 2003, 73: 167
- [5] Matsuda H, Ando S, Kato T, et al. Bioorgan Med Chem, 2006, 14: 138
- [6] Shin D, Kinoshita K, Koyama K, et al. J Nat Prod, 2002, 65: 1315
- [7] Heo M Y, Sohn S J, Au W W. Mutat Res, 2001, 488: 135
- [8] Shin D, Kinoshita K, Koyama K, et al. J Nat Prod, 2002, 65: 1315
- [9] An N, Zou Z M, Tian Z, et al. Fitoterapia, 2008, 79: 27
- [10] Sutherland I A, Fisher D. J Chromatogr A, 2009, 1216: 740
- [11] de Folter J, Sutherland I A. J Chromatogr A, 2009, 1216: 4218
- [12] Friesen J B, Pauli G F. J Chromatogr A, 2007, 1151: 51
- [13] Cui H Y, Jia X Y, Zhang X, et al. Sep Purif Technol, 2011, 77: 269
- [14] Peng A Y, Qu X W, Li H, et al. Chinese Journal of Chromatography (彭爱一, 曲学伟, 李慧, 等. 色谱), 2010, 28(4): 383
- [15] Ito Y. J Chromatogr A, 2005, 1065: 145
- [16] An N, Zhang H W, Xu L Z, et al. Food Chem, 2010, 119: 513
- [17] Itokawa H, Morita H, Midorikawa I, et al. Chem Pharm Bull, 1985, 33: 4889
- [18] Sun Y, Matsubara H, Kitanaka S, et al. Helvetica Chimica Acta, 2008, 91: 118
- [19] Liu Z H, Sang S M, Hartman T G, et al. Phytochem Anal, 2005, 16: 252