

文章编号:1001-6880(2016)12-1911-04

高速逆流色谱技术分离纯化红葱中的萘醌类化合物

段文娟,赵伟,李月,耿岩玲,王晓*

山东省中药质量控制技术重点实验室 山东省分析测试中心,济南 250014

摘要:采用高速逆流色谱(HSCCC)技术从红葱中快速分离纯化得到红葱乙素和异红葱乙素,建立了快速分离制备红葱中萘酚类化合物的方法。首先采用95%乙醇加热回流提取得红葱提取物,再用乙酸乙酯萃取富集萘醌类成分,然后用高速逆流色谱分离纯化,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5,v/v)组成二元溶剂系统,上相为固定相,下相为流动相,仪器转速为850 rpm,流速为2.0 mL/min,检测波长为254 nm。从200 mg富集萘醌类成分的粗提物中,一次性分离制备得到60 mg异红葱乙素和49 mg红葱乙素,经高效液相色谱法(HPLC)分析,其纯度分别为97.3%和98.6%。通过核磁共振氢谱(¹H NMR)和核磁共振碳谱(¹³C NMR)鉴定化合物为红葱乙素和异红葱乙素。研究结果表明,该方法快速、高效,适用于红葱中萘酚类化合物的分离纯化。

关键词:红葱;高速逆流色谱;红葱乙素;异红葱乙素

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.010

Separation and Purification of Naphthoquinones from *Eleutherine mericana* by High-speed Counter-current Chromatography

DUAN Wen-juan,ZHAO Wei,LI Yue,GENG Yan-ling,WANG Xiao*

Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and test Center, Jinan 250014, China

Abstract: An efficient method was established for the separation and purification of naphthoquinones from *Eleutherine mericana*. The naphthols was extracted with 95% ethanol from *E. mericana* and then enriched by extracting with ethyl acetate. The crude naphthol extract were separated by High-speed Counter-current Chromatography (HSCCC) with petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (6:4:5:5, v/v) as the solvent system. The revolution speed was 850 rpm with a flow rate of 2.0 mL/min. The eluent was continuously monitored by a UV monitor at 254 nm. Finally, 87 mg of eleuthericin and 35 mg of isoeleuthericin were obtained from 200 mg crude extract with purities of 97.3% and 98.6% by HPLC analysis, respectively. Their structures were identified by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectrum (NMR). The result showed that this method was simple, efficient and suitable for the isolation and separation of naphthols from *E. mericana*.

Key words: High-speed Counter-current Chromatography; *Eleutherine mericana*; eleuthericin; isoeleuthericin

红葱,又名小红蒜、百步还阳、红蒜头,为鸢尾科(*Iridaceae*)红葱属植物红葱(*Eleutherine mericana* Merr. et K. Heyne)的全草或鳞茎,具有清热凉血、活血通经、消肿解毒的功效^[1]。红葱原产于西印度群岛,在我国云南、广西等地均有分布,民间主要用于治疗冠心病、心绞痛等心血管疾病。根据文献报道,红葱的主要生物活性成分为萘酚、萘醌和蒽醌类化合物^[2-5],现代药理学研究表明,红葱具有降低血糖、舒张血管、抗真菌、抗细菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性,其中萘醌类化合物红葱乙素、异红

葱乙素可显著增加冠状动脉血流量,可用于治疗心脏病^[6-10]。传统的分离红葱乙素和异红葱乙素的方法有硅胶柱色谱、中低压色谱,高效液相色谱^[11,12],这些常规方法存在耗时长、死吸附大的缺点,造成样品的损失。为了解决这些问题,本研究建立了高速逆流色谱技术(high-speed counter-current chromatography,简称HSCCC)分离纯化红葱中化学成分的方法。高速逆流色谱法是一种液-液分配色谱技术,无固态载体,因此,可以避免死吸附引起的样品损失,在天然产物的分离纯化领域得到广泛应用^[13-15]。本研究首次采用高速逆流色谱法从红葱中分离纯化得到红葱乙素和异红葱乙素(图1)两个高纯度单体化合物,为进一步开发红葱资源提供了技术支撑。

收稿日期:2016-09-05 接受日期:2016-11-01

基金项目:三院联合基金项目(ZR2016YL006);山东省自然科学基金(ZR2013HM075)

* 通讯作者 Tel:86-531-82605304; E-mail: wangx@sdas.org

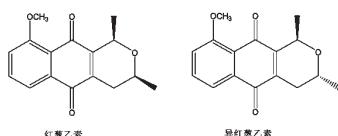


图 1 红葱中红葱乙素及异红葱乙素的结构式

Fig. 1 Chemical structure of eleutherinand and isoeleutherin

2 仪器与材料

TBE300A 高速逆流色谱仪(上海同田生物技术有限公司),TBP5002 泵(上海同田生物技术有限公司),3057-11 记录仪(重庆川仪总厂有限公司),8823B-紫外检测器(北京宾达英创科技有限公司);Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配有 2998 PDA 检测器);Varian INOVA-600 核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司);Agilent 1100 Series 6320 ion-trap 质谱仪(美国 Agilent 公司);Agilent 6890N-5973N 气相色谱/质谱联用仪(美国 Agilent 公司)。

高效液相色谱用乙腈为色谱纯(美国天地公司),水为哇哈哈纯净水;试验用石油醚、乙酸乙酯、甲醇均为分析纯,水为去离子水。

红葱购于云南,经山东省科学院刘伟副研究员鉴定为鸢尾科植物红葱(*Eleutherine mericana*)的鳞茎。

2 实验方法

2.1 红葱粗提物的制备

将购买的 2 kg 红葱药材粉碎成粗粉,加 95% 乙醇 10 L 加热回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,减压浓缩至稠膏,然后加 1000 mL 水混悬,用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,减压回收溶剂得乙酸乙酯粗提物 36 g,用于进一步分离纯化。

2.2 HSCCC 两相溶剂系统配制和样品溶液的准备

本实验 HSCCC 的溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5, v/v),按比例置于分液漏斗中,震荡使溶液充分混合,室温下静置过夜使其自然分层。分别取出上相和下相,上相作为固定相,下相作为流动相,超声脱气 30 min 除去上相和下相中的气泡,备用。

称取 200 mg 红葱乙酸乙酯粗提物,加入上述溶剂系统的上相和下相各 10 mL,超声溶解,作为样品溶液备用。

2.3 HSCCC 分离

将两相溶剂系统中超声脱气的上相(固定相)

以 20 mL/min 的流速泵入到高速逆流色谱仪的螺旋管中,待上相充满螺旋管后,启动仪器使色谱仪,调节主机按顺时针方向转动,当转速稳定在 850 rpm 后,以 2.0 mL/min 的流速泵入下相(流动相),当有下相从出口流出,即螺旋管中的上下相已达到平衡时,将样品溶液从进样圈注入高速逆流色谱仪,开启检测器和记录仪,检测波长为 254 nm,每 4 mL 接一管,根据色谱图收集馏分。

2.4 HPLC 分析条件

红葱乙酸乙酯粗提物以及经 HSCCC 所分得的各馏分均采用 HPLC 进行分析。色谱柱为 Venusil-ASB-C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 μm);检测波长为 254 nm;流动相为乙腈(A):水(B)=40%:60% 等度洗脱;流速为 1.0 mL/min;进样量为 20 μL。

3 结果与讨论

3.1 HSCCC 条件优化

选择溶剂体系是影响 HSCCC 分离效果的关键环节,通过测定目标化合物在两相溶剂中的分配系数(K_D)来选择适合的溶剂系统,根据文献报道,HSCCC 最合适的 K_D 值范围是 0.5~2.0^[16]。本实验选择三种不同体积配比的石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:5, v/v)溶剂体系中化合物 2 的 K_D 值大于 2.0,采用这个溶剂体系会导致分离时间过长,效率低;在石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:6:4, v/v)溶剂体系中化合物 1 和化合物 2 的 K_D 很小,采用这个溶剂体系时,化合物 1 和化合物 2 分离时间太短,难以达到良好分离效果;如图 2 所示,当溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5, v/v)时,两个萘醌类化合物能够在较短时间内能实现高效分离纯化,一次就可以得到两个高纯度单体化合物。

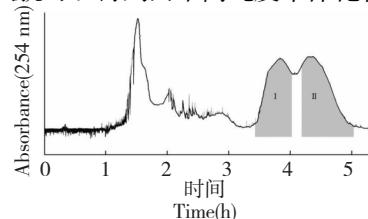


图 2 红葱中萘醌类化合物的 HSCCC 色谱图

Fig. 2 HSCCC chromatogram of naphthoquinones from *E. mericana*

吸收率(254 nm)

时间(h)

Time(h)

3.2 HSCCC 分离纯化的结果

选择石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5, v/v)溶剂体系, 按照2.3项下的方法操作, 对红葱乙酸乙酯粗提物进行分离纯化。根据高速逆流色谱图(图

2)分段收集, 将收集到组分分别放在氮吹下加速有机溶剂的挥发, 当无有机溶剂味道时冷冻干燥, 得到的化合物1为60 mg、化合物2为49 mg, 采用HPLC分析, 峰面积归一化法测定纯度, 分别为97.3%和98.6%。

表1 红葱中萘醌类成分在不同溶剂系统中的分配系数(K_D)

Table 1 Partition coefficients (K_D) values of naphthoquinones from *E. mericanain* different two-phase solvent system

溶剂体系 Solvent system	1	2
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:5:5:5, v/v) petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (5:5:5:5, v/v)	1.47	2.26
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:5:5, v/v) petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (5:5:5:5, v/v)	0.82	1.15
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(6:4:6:4, v/v) petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (5:5:5:5, v/v)	0.57	0.71

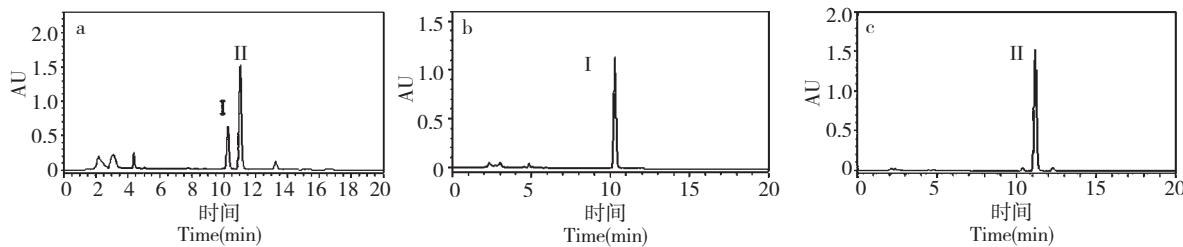


图3 红葱乙酸乙酯粗样(a)和分离得到异红葱乙素(b)及红葱乙素(c)的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of the pretreated crude sample (a) and separated eleuthericin (b) as well as isoeleuthericin (c)

3.3 化合物的结构鉴定

化合物1 黄色针状结晶; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.73 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-6), 7.64 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-7), 7.27 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-8), 4.85 (1H, m, H-1), 3.58 (1H, m, H-3), 2.73 (1H, m, J = 18.4 Hz, H-4), 2.20 (1H, m, J = 18.4 Hz, H-4), 1.53 (3H, d, J = 6.0 Hz, 1- CH_3), 1.35 (3H, d, J = 6.0 Hz, 1- CH_3), 4.00 (3H, s, 9-OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 70.2 (C-1), 68.7 (C-3), 29.9 (C-4), 183.7 (C-5), 118.9 (C-6), 133.9 (C-7), 117.8 (C-8), 159.4 (C-9), 184.0 (C-10), 139.9 (C-4a), 134.5 (C-5a), 119.0 (C-9a), 148.7 (C-10a), 56.4 (9-OCH₃), 20.8 (1- CH_3), 21.3 (3- CH_3)。化合物1的结构鉴定数据与文献^[17]报道基本一致, 确定化合物1为异红葱乙素(isoeleuthericin)。

化合物2 黄色针状结晶; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.75 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-6), 7.65 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-7), 7.26 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-8), 4.99 (1H, q, J = 6.8 Hz, H-1), 1.34 (3H, d, J = 6.0 Hz, 3- CH_3), 1.53 (3H, d, J = 6.8 Hz, 1- CH_3), 3.97

(1H, m, H-3), 2.71 (1H, dd, J = 19.2 Hz, H-4), 2.23 (1H, m, J = 19.2 Hz, H-4), 3.99 (3H, s, 9-OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 67.4 (C-1), 62.4 (C-3), 29.5 (C-4), 182.7 (C-5), 119.1 (C-6), 134.1 (C-7), 117.8 (C-8), 159.7 (C-9), 184.2 (C-10), 139.4 (C-4a), 134.7 (C-5a), 119.7 (C-9a), 148.1 (C-10a), 56.4 (9-OCH₃), 19.7 (1- CH_3), 21.5 (3- CH_3)。化合物2的结构鉴定数据与文献^[17]报道基本一致, 确定化合物2为红葱乙素(eleuthericin)。

4 结论

红葱中的主要活性成分为萘酚、萘醌和蒽醌, 理化性质非常相似, 采用传统的硅胶柱色谱、高效制备液相等方法消耗时间长且样品损耗大。本实验首次建立高速逆流色谱法对红葱的乙酸乙酯萃取粗样进行分离纯化, 一次进样, 5个小时就可以得到红葱乙素和异红葱乙素两个高纯度的蒽醌类化合物。该方法简便、高效、环境友好, 为红葱及蒽醌类成分的分离纯化研究提供了新的方法。

参考文献

- 1 Editorial board of Chinese MateriaMedica under the State Administration of Traditional Chinese Medicine (国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Materia Medica (中华本草). Shanghai:Shanghai Scientific& Technical Publishers (上海科学技术出版社),1999. 7310-7311.
- 2 Han AR, Min HY, Nam JW, et al. Identification of a new naphthalene and its derivatives from the bulb of *Eleutherine-americana* with inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. *Chem Pharm Bull*, 2008, 9: 1314-1316.
- 3 Hara H, Maruyama N, Yamashita S, et al. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine Americana*. *Chem Pharm Bull*, 1997, 10:1714-1716.
- 4 Xu JZ (徐金钟), Qiu F (邱峰), Qu GX (曲戈霞), et al. Studies on the antifungal constituents isolated from *Eleutherine americana*. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2005, 3:157-161.
- 5 Komura H, Mizukawa K, Minakata H, et al. New anthraquinones from *Eleutherine americana*. *Chem Pharm Bull*, 1983, 11: 4206-4208.
- 6 Ifesan BOT, Ibrahim D, Voravuthikunchai SP. Antimicrobial activity of crude ethanolic extract from *Eleutherine americana*. *J Food Agric Environ*, 2010, 34:1233-1236.
- 7 Liu XJ (刘西京), Wang CY (汪程远), Wang NL (王乃利), et al. Effect of *Elutherine americana* extracts on rats' vascular ring of aorta ex vivo. *China Pharm* (中国药房), 2009, 18:1376-1378.
- 8 Song SH, Min HY, Han AR, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the Regulation of NF- κ B activity. *IntImmunopharm*, 2009, 3:298-302.
- 9 Ieyama T, Gunawan-Puteri MD, Kawabata J. α -Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. *Food Chem*, 2011, 2:308-311.
- 10 Dai JJ (戴娇娇), Min XQ (闵庆喜), Zhong CH (钟彩红), et al. Protective effects on gastric mucosal lesion and antioxidantion of ethanol extracts from eleutherineplicata. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2013, 6:89-91.
- 11 Mahabusarakam W, Hemtasin C, Chakthong S, et al. Naphthoquinones, anthraquinones and naphthalene derivatives from the bulbs of *Eleutherine americana*. *Planta Med*, 2010, 4:345-349.
- 12 Qiu F (邱峰), Xu JZ (徐金钟), Duan WJ (段文娟), et al. New constituents from *Eleutherine americana*. *Chem J Chin Univ*(高等学校化学学报), 2005, 11:2057-2060.
- 13 Shu XK, DuanWJ, Liu F, et al. Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr B*, 2014, 947-948:62-67.
- 14 Liu F, Xi XJ, Wang M, et al. Isolation and purification of arctigenin from *FructusArctii* by enzymatic hydrolysis combined with high-speed counter-current chromatography. *J Sep Sci*, 2014, 37:376-381.
- 15 DuanWJ, Bai AY, Lin XJ, et al. Isolation and purification of highly polar antioxidants from *Chiritalonggangensis* by combination of macroporousresin and HSCCC. *Chromatographia*, 2014, 77:707-713.
- 16 Guan RJ(管仁军), Wang DJ(王岱杰), Yu ZY(于宗渊), et al. Preparative isolation and purification of the active components from *ViticisFructus* by high speed counter current chromatography. *Chin J Chromatogr(色谱)*, 2010, 11:1043-1047.
- 17 Liu XJ (刘西京). Chemical constituents of *Eleutherine americana*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43:223-225.

(上接第 1869 页)

- 17 Ayer WA, Saeedi-Ghomie MH, Engen DV, et al. The sterpuric acids: A new type of sesquiterpenoid. *Tetrahedron*, 1981, 37: 379-385.
- 18 Gao J, Lin H, Liu J. A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. *Steroids*, 2001, 66:771-775.
- 19 Josette B, Do KD, Marcel F. Cmr spectroscopy of labdanic

- diterpenes and related substances. *J Nat Prod*, 1984 ,47:592-599.
- 20 Guan YQ(关永强), Cao MM(曹蒙蒙), Liu T(刘亭), et al. Effect of secondary metabolites of endophytic fungus *Pestalotiopsis adustaon* HeLa cells. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2014, 36:325-329.