

高效液相色谱法制备人面果中二苯甲酮异构体环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇的研究

高瑞锡¹, 龚韦凡², 陈玉³, 刘慧³, 甘飞³, 李竣^{2*}, 杨光忠^{2*}

¹中南民族大学天然产物化学研究室; ²中南民族大学药学院; ³中南民族大学化学与材料科学学院, 武汉 430074

摘要:本研究报道了一种制备人面果中 π 键二苯甲酮异构体环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇的液相色谱研究方法。实验中通过色谱柱以及流动相考察, 在分析色谱柱上实现了液相方法的建立、模拟及筛选试验, 并在半制备色谱柱上实现了放大试验和进样量考察。优化后的色谱条件可实现异构体达到 2.5 的分离度, 并在浓度 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时的进样量达到 500 μL , 单体化合物环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇可通过液相色谱、核磁共振 DEPT 谱及质谱予以确认。该研究表明, 常规 C_{18} 色谱柱能够对 π 键异构体进行拆分, 将加快更多具有生物活性的二苯甲酮单体化合物的发现。

关键词: π 键二苯甲酮异构体; 环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇; 人面果; 高效液相色谱法; 制备分离

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.014

Preparation of Benzophenone Isomers, Cycloxanthochymol and Isoxanthochymol from *Garcinia xanthochymus* by High-performance Liquid Chromatography

GAO Rui-xi¹, GONG Wei-fan², CHEN Yu³, LIU Hui³, GAN Fei³, LI Jun^{2*}, YANG Guang-zhong^{2*}

¹Laboratory for Natural Product Chemistry, College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities;

²College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities; ³College of Chemistry and Material Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: This study reported a liquid chromatographic method for preparing π bond benzophenone isomers cycloxanthochymol and isoxanthochymol from *Garcinia xanthochymus*. The liquid chromatographic method was proposed, simulated and optimized through column selection and buffer selection on analytical columns, and verified on a preparative column. Cycloxanthochymol and isoxanthochymol were prepared after the inject volume selection, and identified by NMR as well as mass spectrometry. The optimized method realized baseline separation with resolution of 2.5, and the isomers were prepared with the inject volume of 500 μL at sample concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Results of the HPLC analysis and the distortionless enhancement by polarization transfer confirmed the differences between the monomers on the π bond position. In conclusion, this study indicated that a common octadecyl bonded silica gel column can meet the challenge preparation of π bond isomers, which will accelerate the foundation of more bioactive benzophenone compounds in the future.

Key words: π bond benzophenone isomer; cycloxanthochymol and isoxanthochymol; *Garcinia xanthochymus*; high-performance liquid chromatography; preparative separation

藤黄属 (*Garcinia* Linn.) 植物在我国有 21 种, 主要分布于广东、海南、广西、云南等省份^[1]。本属植物中含有 300 多种特有的二苯甲酮及多异戊烯基

二苯甲酮 (Polyprenylated Benzophenones) 化合物^[2], 这类化合物具有较好的抗肿瘤、抗 HIV 和抗菌活性, 已成为研究热门^[3-6]。但由于该类化合物多异戊烯基侧链 π 键位置异构现象的存在, 从部分异构体如大叶藤黄醇 (Xanthochymol) 和 Guttiferone E、Guttiferone C、D、环大叶藤黄醇 (Cycloxanthochymol) 和异大叶藤黄醇 (Isoxanthochymol) 中获得高纯度单体

收稿日期: 2017-02-27 接受日期: 2017-03-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31000157); 湖北省高校优秀中青年科技创新团队计划 (T201220)

* 通信作者 Tel: 86-27-67841196; E-mail: lijun-pharm@hotmail.com; yanggz888@126.com

化合物较为困难^[7]。环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇在藤黄属植物人面果(*Garcinia xanthochymus*)中含量丰富。早在1973年,异大叶藤黄醇就被报

道^[8],但直到2006年*Chem Rev*的报道中仍与异大叶藤黄醇被视作异构体存在^[9]。相关研究进展有很少有报道这对 π 键异构体的分离制备工作^[10,11]。

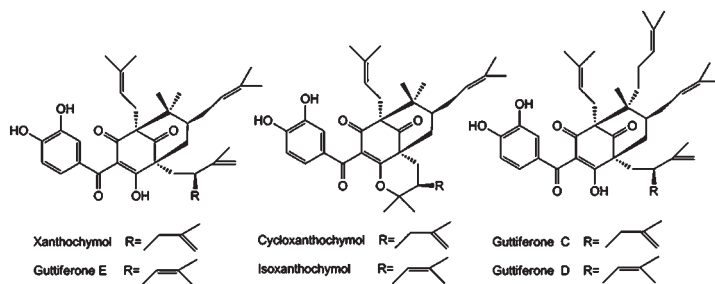


图1 代表性的 π 键多异戊烯基二苯甲酮异构体

Fig. 1 Representative polyprenylated benzophenones as π bond isomers

随着高效液相色谱技术的发展,众多研究表明可以从流动相洗脱比例、流动相添加剂以及进样量方面对 π 键位置异构体进行分离^[12-14]。例如,将离子液体试剂,如乙酸铵加入水中使用,能够增加色谱柱保留参数并改善分离效果^[13]。基于已有研究^[15,16],本课题组尝试通过色谱柱选择、流动相选择以及进样量考察来达到异构体的基线分离和制备工作。通过液相分析、质谱以及核磁共振等检测手段,本课题组获得了较高纯度的环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇单体化合物,将为进一步研究工作奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 材料与试剂

分析纯级乙醇、三氟乙酸、乙酸铵、乙酸(国药集团,上海);艾科浦超纯水过滤系统(艾科浦国际有限公司,重庆);色谱级甲醇、乙腈(美国Tedia公司)。

人面果果实采收于云南西双版纳自治州,由西双版纳民族药学研究中心赵应红教授鉴定为人面果的果实,标本保存于中南民族大学药学院(编号GXY-201206)。

1.2 仪器

雷磁 PHS-3C pH 计(上海精密科学仪器有限公司,上海);AUW 120D 十万分之一天平(岛津公司,日本京都);安捷伦 1200 高效液相色谱仪(安捷伦公司,日本东京),配备四元泵、自动进样器、柱温箱以及可变波长检测器;JASCO P-1020 旋光仪(JASCO 公司,日本东京);安捷伦 G6230 TOF 质谱仪(安

捷伦公司,美国加利福利亚洲);布鲁克 DMX-500 核磁共振仪(布鲁克公司,德国萨尔州)。

1.3 提取与分离

取 6.5 kg 新鲜人面果果实粉末,用 95% 乙醇常温渗漉 3 次,每次 3 d,合并滤液、减压浓缩并用乙酸乙酯萃取,获得 330 g 乙酸乙酯部位浸膏。将所有浸膏经硅胶柱层析(200 ~ 300 目,青岛海洋化工厂),用石油醚-乙酸乙酯进行洗脱(19:1,9:1,7:3及6:4),获得环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇异构体粗品 1.5 g。

1.4 高效液相色谱实验

1.4.1 供试品制备

供试品及对照品溶液溶解于乙醇中,浓度均为 0.2 mg/mL。所有样品溶液均用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤(津腾公司,天津)。根据欧洲药典,使用分离度评价色谱峰分离情况,公式为: $R = \frac{1.18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$ ^[17]。当 R 大于 1.5 时,两个相邻

色谱峰将被判定为成功分离, t_R 和 W 分别代表化合物保留时间和色谱峰高度一半时的峰宽。

1.4.2 色谱条件的优化考察

8 种不同型号色谱柱及流动相数据均在表一中列出。流动相流速均控制在 0.6 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 5 μ L,检测器波长为 280 nm^[11]。流动相考察中统一使用 Syncronis C₁₈ 色谱柱。

1.4.3 液相条件验证、进样量考察以及样品制备试验

使用 YMC-Pack ODS-A C₁₈ 柱(250 mm \times 10 mm,5 μ m,日本 YMC 公司)进行分析液相条件验证、进样量考察及样品制备。流动相为乙腈-水(图

3a), 甲醇-水(图 3b), 甲醇-10 mM 乙酸铵-乙酸缓冲溶液(pH 4.0, 图 3c), 甲醇-乙腈-10 mM 乙酸铵-乙酸缓冲溶液(pH 4.0, 图 3d), 进样量为 75 μ L, 洗脱速度为 1.8 mL/min。流动相洗脱比例为:85% 有机相等度洗脱(图 3a,3c);50% 乙腈,1%~35% 甲醇梯度洗脱(图 3b);50% 乙腈,1%~35% 甲醇,0~30 min 后等度洗脱(图 3b);50% 乙腈,1%~35% 甲醇,0~30 min 梯度洗托,50% 乙腈,35% 甲醇,30 min 后等度洗脱,50%~55% 乙腈,35% 甲醇,60~80 min 后梯度洗脱(图 3d)。进样量考察中,进样量选

择为 75、125、200、300、400 和 500 μ L。其他色谱条件与 1.4.2 相同。

1.5 核磁共振及质谱分析

采用氢谱、碳谱、DEPT 135 和质谱(ESI-MS)等手段鉴定大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇的结构。单体化合物相关数据已与文献报道数据进行了比对确认^[3,6]。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

表 1 环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇分离的色谱柱考察

Table 1 Column suitability test for CXM and IXM

序号 No.	色谱柱 Column ¹	规格 Specification	产地 Source	流动相比例 (流速:0.6 mL/min) Mobile phase (Rate:0.6 mL/min)	分离度 Resolution
1	Synchronis C ₁₈ , Thermo ^a	250 × 4.6 mm, 5 μ m	美国		2.5
2	Platisil C ₁₈ , Dikma Tech Inc. ^a	250 × 4.6 mm, 5 μ m	中国	a. 60% 乙腈, 1-25% 甲醇, 0-25 min; 60% 乙腈, 25% 甲醇, 25 min 后等度洗脱	2.4
3	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ , Agilent ^b	250 × 4.6 mm, 5 μ m	美国		2.4
4	Cosmosil MS-II C ₁₈ , Nacalai Tesque ^b	250 × 4.6 mm, 5 μ m	日本	b. 50% 乙腈, 1-35% 甲醇, 0-25 min, 50% 乙腈, 35% 甲醇, 25 min 后等度洗脱	2.3
5	Pursuit C ₁₈ , Agilent ^b	250 × 4.6 mm, 5 μ m	美国		2.0
6	BDS Hypersil C ₁₈ , Thermo ^b	250 × 4.6 mm, 5 μ m	美国	c. 50% 乙腈, 1-15% 甲醇, 0-25 min, 50% 乙腈, 15% 甲醇, 25 min 后等度洗脱	1.8
7	Kromasil C ₁₈ , Dalian Replete Tech. ^b	150 × 4.6 mm, 5 μ m	中国		1.8
8	Synergi Polar C ₁₈ , Phenomenex ^c	250 × 4.6 mm, 4 μ m	美国		0.6

如表 1 所示,8 种色谱柱对异构体的分离度分别为 0.6(Synergi Polar C₁₈)、1.8(Kromasil 和 BDS Hypersil C₁₈)、2.0(Pursuit C₁₈)、2.3(Cosmosil C₁₈)、2.4(Zorbax 和 Platisil C₁₈)以及 2.5(Synchronis C₁₈)。表明色谱柱在异构体分离中起了重要作用。不同色谱柱硅胶表面的细微差距将导致部分色谱柱无法对异构体进行成功分离,例如 Synergi Polar C₁₈的分离度只有 0.6,而 Synchronis C₁₈分离度有 2.5。比较

Kromasil C₁₈ 和 Pursuit C₁₈的分离度可以发现,在相同的洗脱条件(流动相、洗脱速度以及比例)下,250 mm 的长色谱柱显然分离度更高。基于以上实验数据,我们选择 Synchronis C₁₈ 作为统一的色谱柱来考察流动相对异构体分离的影响。

如引言中所述,使用缓冲溶液代替纯水将对

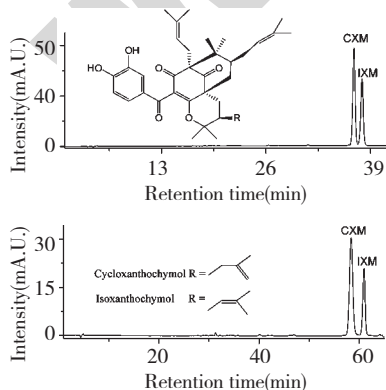


图 2 制备环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇的流动相选择
Fig. 2 Mobile phase selection for separating CXM and IXM

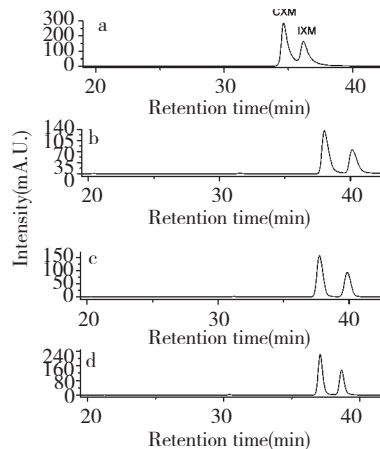


图 3 环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇半制备试验
Fig. 3 Preparation of CXM and IXM using a semi-preparative column

化合物的保留、降低峰宽以及提高分离度带来改善。在预实验中,我们测试了三种水相溶剂,包括 0.1% 三氟乙酸、10 mM 乙酸铵-乙酸以及磷酸二氢钾。磷酸二氢钾因其在高比例有机相中迅速沉淀这一副作用很快被剔除备选洗脱剂。如图 2 上图所示,两种异构体在 40 分钟内实现了分离(0.1% 三氟乙酸),分离度达到了 1.8,但相对于缓冲溶液的 2.5 还是差了很多(图 2)。因此我们选择后者作为优选后的流动相。在该条件下,通过峰面积计算,我们发现环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇的含量比近似为 7:5,与文献报道略有差异^[9]。

2.2 液相条件验证、进样量选择以及异构体的制备研究

图 3a 的结果表明,尽管分离度有 1.5,在 75 微升的进样量条件下两种异构体并不能达到完全的分,拖尾现象仍然存在,提示了该异构体尽管能被用作 HPLC 分析,但不能制备分离的原因。本研究中,高洗脱强度、更低粘度的有机溶剂如乙腈,反而对异构体的制备是一个负面条件,因为细微调节乙腈的比例将给化合物的分离度带来显著改变;实际数据表明,甲醇的分离效果较好(图 3b, 2.0)。如果用缓冲溶液代替超纯水而其他条件不变,分离度也会提高(图 3c),通过混合有机相及梯度洗脱将进一步使异构体的分离度达到 2.5(图 3d),同时降低拖尾现象以便实现高纯度的样品制备。

进样体积在异构体的制备实验中也需要被考虑。如图 4a 所示,随着进样量加大,异构体的分离度逐渐降低。为保证样品纯度并缩短制备时间,在样品浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下进样 500 μL 是较好的选择,过高进样量将使色谱柱过载并降低化合物分离度。该实验也表明,如果换用更大规格色谱柱

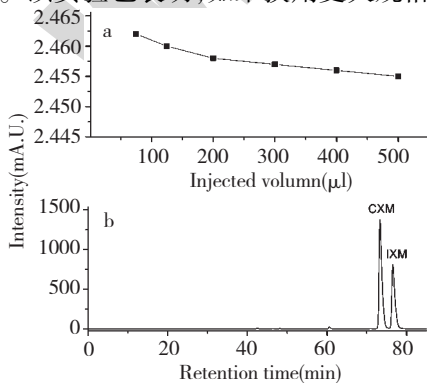


图 4 环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇的制备体积选择

Fig. 4 Volume selection for preparation of CXM and IXM

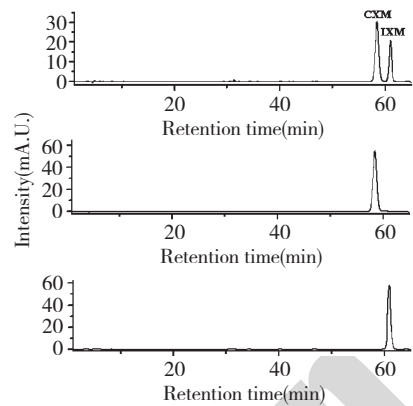


图 5 环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇制备后液相分析

Fig. 5 HPLC analysis of CXM and IXM

如(250 mm \times 20, 30 或 50 mm),能够节约时间并快速获得高纯单体化合物。制备后,两个单体化合物能够通过核磁共振及质谱的检验(见补充材料),证实了液相色谱条件的有效性。

3 结论

本研究成功开发了一种制备二苯甲酮异构体环大叶藤黄醇和异大叶藤黄醇的色谱方法。该方法实现了异构体的有效分离、制备以及相关谱学验证。研究表明,常规 C_{18} 色谱柱能够对分离困难的 π 键异构体实现有效分离,将加快更多“热点化合物”的多异戊烯基二苯甲酮单体化合物的发现。

致谢:感谢国家自然科学基金(31000157)及湖北省高校优秀中青年科技创新团队计划(T201220)对本研究的支持。

参考文献

- 1 The Editorial Committee of Flora of China(中国科学院中国植物志编委). The Flora of China, Vol. 50 (中国植物志第 50 卷). Beijing: Science Press, 2007. 40-47.
- 2 Kumar S, Sharma S, Chattopadhyay SK. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera; Ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia*, 2013, 89: 86-125.
- 3 Wu S, Long C, Kennelly EJ. Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. *Nat Prod Rep*, 2014, 31: 1158-1174.
- 4 Gustafson KR, Blunt JW, Munro MHG, et al. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosa*. *Tetrahedron*, 1992, 48: 10093-10102.

- 5 Baggett S, Protiva P, Mazzola EP, *et al.* Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. *J Nat Prod*, 2005, 68:354-360.
- 6 Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, *et al.* Antibacterial activity of some *Garcinia* benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 311-314.
- 7 Roux D, Hadi HA, Thoret S, *et al.* Structure-activity relationship of polyisoprenyl benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the tubulin/microtubule system. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1070-1076.
- 8 Karanjgoakar CG, Rao AVR, Venkataraman K, *et al.* The constitution of xanthochymol and isoxanthochymol. *Tetrahedr Lett*, 1973, 50:4977-4980.
- 9 Ciochina R, Grossman RB. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chem Rev*, 2006, 106:3963-3986.
- 10 Zhang L, Chiou C, Cheng J, *et al.* Cytotoxic polyisoprenyl benzophenonoids from *Garcinia subelliptica*. *J Nat Prod*, 2010, 73:557-562.
- 11 Yang H, Figueroa M, To S, *et al.* Benzophenones and biflavonoids from *Garcinia livingstonei* fruits. *J Agric Food Chem*, 2010, 58:4749-4755.
- 12 Gritti F, Guiochon G. Separations by gradient elution: Why are steep gradient profiles distorted and what is their impact on resolution in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2014, 1344:66-75.
- 13 Flieger J. The effect of chaotropic mobile phase additives on the separation of selected alkaloids in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2006, 1113:37-44.
- 14 Gedicke K, Antos D, Seidel-Morgenstern A. Effect on separation of injecting samples in a solvent different from the mobile phase. *J Chromatogr A*, 2007, 1162:62-73.
- 15 Chen Y (陈玉), Fan H (范华), Yang GZ (杨光忠), *et al.* Prenylated xanthenes from the bark of *Garcinia xanthochymus* and their 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities. *Molecules*, 2010, 15:7438-7449.
- 16 Fu M (付蒙), Feng HJ (冯慧瑾), Chen Y (陈玉), *et al.* Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts *in vitro*. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2012, 10:129-134.
- 17 Council of Europe, *European pharmacopoeia*, 8th edition, the Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe; Strasbourg France, 2013, 75.

(上接第 1135 页)

- 7 Beier RC, Mundy BP, Strobel GA. Assignment of anomeric configuration and identification of carbohydrate residues by ¹³C nmr. 1. Galacto- and glucopyranosides and furanosides. *Can J Chem*, 1980, 58:2800-2804.
- 8 Ngoc TM, Minh PTH, Hung TM, *et al.* Lipoyxygenase inhibitory constituents from *Rhubarb*. *Arch Pharm Res*, 2008, 31: 598-605.
- 9 Cho JY, Yang X, Park KH, *et al.* Isolation and identification of antioxidative compounds and their activities from *Suaeda japonica*. *Food Sci Biotechnol*, 2013, 22:1547-1557.
- 10 Lin JB (林建斌), Zhao LC (赵立春), Guo JZ (郭建忠), *et al.* Chemical constituents from aerial parts of *Fagopyrum dibotrys*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47: 1841-1844.
- 11 Zhang WJ (张雯洁), Liu YQ (刘玉清), Li XC (李兴从), *et al.* Chemical constituents of "Ecological tea" from Yunnan. *Acta Botan Yunnanica*, 1995, 17:204-208.
- 12 Youssef DTA, Badr JM, Shaala LA, *et al.* Bamanie ehrenasterol and biemnic acid; new bioactive compounds from the RedSea sponge *Biemna ehrenbergi*. *Phytochem Lett*, 2015, 12:296-301.
- 13 Carvalho MJ, Carvalho LM, Ferreira AM, *et al.* A new xanthone from *Hedychium gardnerianum*. *Nat Prod Res*, 2003, 17: 445-449.
- 14 Reta GF, Tonn CE, Rios-Luci C, *et al.* Cytotoxic bioactivity of some phenylpropanoic acid derivatives. *Nat Prod Commun*, 2012, 10:1341-1346.
- 15 Domondon DL, He WD, Kimpe ND, *et al.* β -Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. *Phytochemistry*, 2004, 65:181-187.
- 16 Tan NH, Zhou J, Chen CX, *et al.* Cyclopeptides from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*. *Phytochemistry*, 1993, 32: 1327-1330.