

离子液体提取分离鹿藿中异黄酮化合物

郭燕燕 尹卫平* 刘 普 胡 亚 闫孟杰 孙向前

(河南科技大学化工与制药学院 洛阳 471003)

摘 要 以1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([Bmim]BF₄)离子液体取代天然产物研究中的溶剂,对具有抗雄性生育活性和抑菌作用的鹿藿根中的异黄酮成分进行提取和分离。从鹿藿根的70%乙醇粗提物中,成功分离纯化得到3种异黄酮类化合物,它们均是首次从植物鹿藿中分离得到。经过波谱分析鉴定,3种化合物的结构被确定为木豆酮(Cajanone)、鸡豆黄素A(Biochanin A)和1种新的异黄酮类化合物,被命名为3-[4'-(1"-甲氧基)-丙基氧代]-苯基-5,7-二羟基异黄酮(3-[4'-(1"-methoxy)-propoxy]-phenyl-5,7-dihydroxy-isoflavone)。建立了植物鹿藿中异黄酮含量的测定方法:以木豆酮化合物为标准品,在其紫外最大吸收峰270 nm处,测得生药中总异黄酮的含量为0.73%;测得平均加样回收率99.94%,相对标准偏差3.66%,离子液体回收率76.7%。

关键词 鹿藿,离子液体,提取分离,异黄酮类化合物,含量测定

中图分类号:O629.9

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2011)05-0537-05

DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00415

基于离子液体的特性及其在有机物萃取中的应用效果,与传统有机溶剂相比,离子液体是一种环境友好溶剂。离子液体的特征在于具有温度区间大、溶解范围广、良好的化学和热稳定性;另一方面离子液体几乎没有蒸气压,同时具有不挥发、不易燃烧和爆炸等许多优点。尤其在蒸馏、分离等处理过程中,不会因为挥发造成损失以及对环境造成污染和危害,因而在天然产物提取分离中,离子液体被认为是传统挥发性有机溶剂的理想替代品^[1-2],显示出广阔的应用前景。自1998年以来,Huddleston等^[3]首次用离子液体[Bmim]BF₄萃取苯及苯的衍生物以来,离子液体优于传统溶剂的分配性能和萃取能力,进一步得到国内外广泛的研究与关注^[4-7]。本文选取具有重要药用价值的鹿藿为研究对象,探讨了离子液体用于天然产物有效成分的提取和分离、以及离子液体在提取工艺上应用的可行性。

鹿藿(*Rhynchosia volubilis* Lour),为豆科鹿藿属植物,多年生缠绕草本,广泛分布于我国的江浙一代,以鹿藿根入药^[8]。前期作者的药效学研究证明,鹿藿根的70%乙醇提取物具有显著的抗生育和抑菌作用^[9]。进一步的植物化学研究表明,异黄酮为其中有效活性成分之一。常规用植化分离手段,其分离效果不佳,加上该植物脂溶性成分极少,因此寻求新的分离纯化技术,建立抗雄性生育活性异黄酮有效成分的提取工艺,始终是该研究的主要任务之一。本文尝试利用室温离子液体[Bmim]BF₄作为提取分离溶剂,从鹿藿根的提取物中通过纯化,获得了3种异黄酮类化合物。同时对鹿藿提取物中异黄酮的含量进行了测定,在工艺上实现了离子液体的循环利用。本研究为天然产物的药用物质基础研究,选择了一种新的绿色溶剂,从而拓展了分离纯化的方法和手段。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

UV-2000型紫外分光光度计(上海秦迈仪器有限公司);DPX-400型超导核磁共振仪NMR(瑞士Bruker公司);液相色谱-质谱联用仪LC-MS(Q-TOF,美国安捷伦Agilent 6520);旋转蒸发仪FR52A(上海亚荣生化仪器厂);循环水真空泵SHE-D(Ⅲ)(巩义市英峪仪器厂);柱层析用硅胶0.075~0.15 mm(青岛海洋化工厂)。^{[Bmim]BF₄}离子液体纯度99.00%(购自安阳河南利华制药有限公司)。异黄酮的测定以木豆酮为标准品。木豆酮标准对照品纯度达99.90%,河南科技大学天然产物研究所保存。

异黄酮标准溶液配制:称量木豆酮 5.1 mg,用离子液体[Bmim]BF₄ 定容至 10 mL,摇匀;再吸取上述木豆酮溶液 1.00 mL 置容量瓶中,加离子液体[Bmim]BF₄定容至 5.00 mL,即为制备的异黄酮标准溶液,计算标准溶液浓度为 102 mg/L。

提取物的原材料为鹿藿根的乙醇浸膏。

1.2 实验方法

1.2.1 异黄酮类化合物的提取和样品溶液的制备 取鹿藿的 70% 的乙醇粗体物浸膏 5 g,搅拌状态下,加入 15 mL 离子液体,用木豆酮标准品对照和薄层色谱检测,继续搅拌 8 h,静置后倒出上清液(离子液相),即为制得的提取异黄酮类化合物的样品溶液。

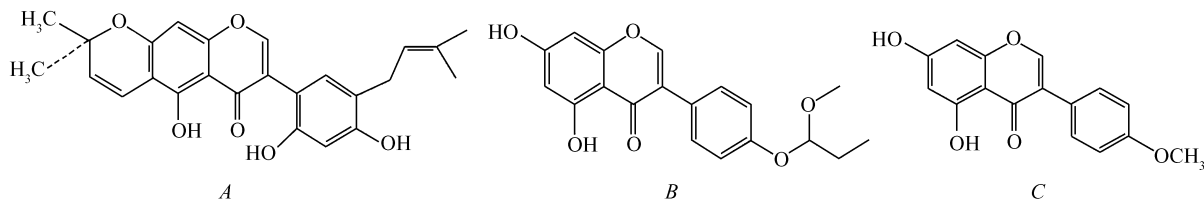
1.2.2 异黄酮类化合物的含量测定 用紫外分光光度法测定样品中异黄酮的浓度^[10]:在最大吸收波长为 270 nm 处,测定样品溶液的吸光度值,根据一系列标准溶液测定的标准工作曲线,计算鹿藿乙醇浸膏中异黄酮的含量。

1.2.3 异黄酮类化合物的分离纯化和离子液的回收 用硅胶柱层析法,分离和纯化样品溶液。柱填料为硅胶,展开剂用环己烷/乙酸乙酯梯度洗脱,收集不同馏分。对获得的单体化合物,经化学分析和波谱学分析检测(NMR,MS),然后对化合物进行鉴定和表征。同时对收集的净离子液进行合并,回收后再循环利用到异黄酮的提取液中。

2 结果与讨论

2.1 异黄酮化合物的提取分离与结构鉴定

以 70% 的鹿藿乙醇浸膏为原料,用[Bmim]BF₄ 离子液体作为提取剂,通过柱色谱分离纯化和波谱分析鉴定,得到 3 个异黄酮类的化合物,它们分别是木豆酮、3-[4'-(1"-甲氧基)-丙基氧代]-苯基-5,7-二羟基异黄酮和 3-(4'-甲氧基)-苯基-5,7-二羟基异黄酮(鸡豆黄素 A)^[11-12]。它们的化学结构式如 Scheme 1 所示。该类化合物在植物鹿藿中为首次报道。作为抗男性生育有效成分,鹿藿中异黄酮含量若以木豆酮计,结果获得生药中总异黄酮的含量为 0.73%。



Scheme 1 The structures of cajanone(A), 3-[4'-(1"-methoxy)-propoxy]-phenyl-5,7-dihydroxy-isoflavone(B) and biochanin A(C)

对 3 个化合物结构进行了鉴定。

木豆酮(Cajanone):黄色透明胶状物,HRESIMS m/e :423.181 2[M+1]⁺(C₂₅H₂₇O₆ 计算值423.180 8)。

¹H NMR(400 MHz,CDCl₃), δ_{H} :1.44(3H,s,Me),1.42(3H,s,Me),1.73(3H,s,Me),1.71(3H,s,Me),3.21(2H,d, $J=7$ Hz,H-1''),4.58(1H,dd, $J=10,5$ Hz,H-3),4.47(1H,dd, $J=11,5$ Hz,H-2),4.60(1H,dd, $J=11,10$ Hz,H-2ax),5.26(1H,t-like m,H-2''),5.62(1H,d, $J=10$ Hz,H-5''),5.87(1H,s,H-8),6.47(1H,s,H-3'),6.58(1H,d, $J=10$ Hz,H-4''),6.82(1H,s,H-6'),7.28,7.00(1H each,br s,OH),12.05(1H,s,C-5-OH);光谱数据与文献^[11]报道一致,经鉴定是木豆酮化合物。其结构式如 Scheme 1(A)所示。

3-[4'-(1"-甲氧基)-丙基氧代]-苯基-5,7-二羟基异黄酮(3-[4'-(1"-methoxy)-propoxy]-phenyl-5,7-dihydroxy-isoflavone):黄色无定性粉末,¹H NMR(400 MHz,MeOD), δ_{H} :8.054(1H,s,H-2),6.21(1H,d, $J=2.0$ Hz,H-6),6.34(1H,d, $J=2.4$ Hz,H-8),6.84(2H,dd, $J=8.4$ Hz,H-2'),7.36(2H,dd, $J=8.8$ Hz,H-3'),5.33(1H,m,CH),3.47(3H,s,OCH₃),2.05(2H,m,CH₂),0.86(3H,m,CH₃)。基于该化合物的波谱数据的分析和与文献报道的化合物数据对照^[11-12],该化合物被推断为 3-[4'-(1"-甲氧基)-丙基氧代]-苯基-5,7-二羟基异黄酮。其结构式如 Scheme 1(B)所示。

鸡豆黄素 A (Biochanin A):黄色无定性粉末,在¹H NMR(400 MHz, MeOD), δ_{H} : 8.05 (1H, s, H-2), 6.22 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.34 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.84 (2H, dd, J = 8.8 Hz, H-2'), 7.36 (2H, dd, J = 8.4 Hz, H-3'), 3.34 (3H, s, OCH₃)。该化合物的波谱数据与文献报道的化合物鸡豆黄素 A (Biochanin A) 基本一致^[12], 因此该化合物被鉴定为鸡豆黄素 A。其结构式如 Scheme 1(C) 所示。

2.2 离子液体的选择

实验显示,标准品木豆酮不溶于疏水性离子液体 [Bmim]PF₆, 而溶于亲水性离子液体, 如氯化 1-丁基-3-甲基咪唑盐 ([Bmim]Cl) 和 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([Bmim]BF₄)。亲水性离子液体选择性萃取实验表明, 由于 [Bmim]Cl 离子液体亲水性更强, 在非水相中分配比过小, 造成液-液萃取分离困难, 所以液液分离选择 [Bmim]BF₄ 离子液体。

2.3 吸收波长的选择

在 200 ~ 400 nm 分别测定标准溶液和制得的提取的异黄酮类化合物的样品溶液的吸光度, 如图 1 所示。从图 1 可以看出, 二者在 270 nm 处均有 1 个最大吸收峰, 且最大吸收峰周围没有干扰, 因此 270 nm 作为此实验的测定波长。

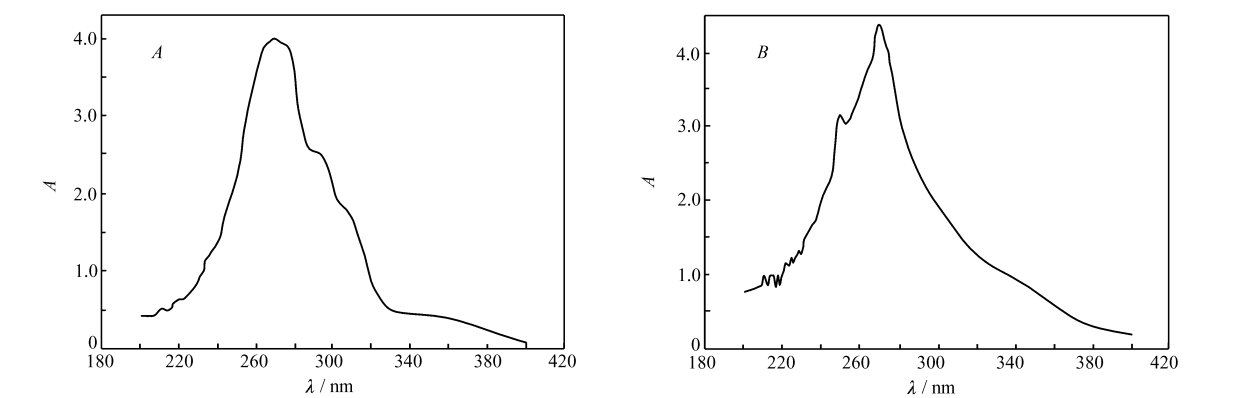


图1 标准溶液和异黄酮样品溶液的吸收光谱
Fig.1 UV-Vis absorption spectra of the standard sample(A) and isoflavone(B) solutions

2.4 标准曲线的绘制

精密吸取标准溶液分别为 0.2、0.3、0.4、0.6、0.9 和 1.2 mL, 各置于 10 mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 待测。用 1 mL 离子液体 [Bmim]BF₄ 加蒸馏水至 10 mL 作空白对照, 以 270 nm 处所测吸光度 A 为因变量, 不同体积的标准溶液质量浓度 ρ 为自变量, 用最小二乘法做直线回归分析, 得回归方程: $A = 0.0459\rho - 0.006051$ ($r = 0.9941, n = 6$)。结果表明, 标准溶液质量浓度在 2.04 ~ 12.22 mg/L 范围内, 吸光度与浓度的线性关系良好, 结果见表 1。

表1 标准溶液浓度与吸光度的关系

Table 1 Corelation between the concentration of standard solution and absorbance

Vol. of standard solution/mL	0.2	0.3	0.4	0.6	0.9	1.2
Conc. of standard solution/(mg·L ⁻¹)	2.04	3.06	4.08	6.12	8.92	12.22
Absorbance A	0.100	0.142	0.176	0.250	0.416	0.566

2.5 方法的重复性、精密度和样品的稳定性实验

2.5.1 重复性实验 取 0.01 mL 异黄酮标准溶液和 1.0 mL [Bmim]BF₄ 离子液体置 10 mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 分置 6 个试管中, 于 270 nm 处平行测定吸光度值并作重复性实验, 结果见表 2。计算其吸光度的相对标准偏差 RSD = 2.73%, 表明该方法重复性良好。

表2 吸光度的重复性实验结果

Table 2 UV-Vis absorption values of the repetition tests

Sample No.	1	2	3	4	5	6
Absorbance A	0.163	0.166	0.162	0.168	0.172	0.173

2.5.2 精密度实验 取表 2 中的 1 号样品溶液,于 270 nm 处连续测定其吸光度 6 次,所测吸光度值依次为 0.165、0.163、0.162、0.164、0.163 和 0.160。计算吸光度的相对标准偏差 RSD = 1.06%,表明该实验的仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性实验 取表 2 中的 1 号样品溶液,于 270 nm 处分别在 0.5、1、2、4、6 和 8 h 时测定其吸光度,所测吸光度值依次为 0.164、0.161、0.160、0.158、0.155 和 0.151。计算吸光度的相对标准偏差 RSD = 2.93%,表明样品在 8 h 内稳定性良好。

2.6 加样回收率和样品中异黄酮含量的测定

取一定量样品溶液,分别加入适量标准溶液,制备成供试品溶液。回收率测定数据见表 3。

表 3 加样回收率分析
Table 3 The average recovery yield of the added index

Sample/ μg	Added/ μg	Found/ μg	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
10.12	4.59	15.22	103.47	99.94	3.66
8.56	6.08	14.67	100.20		
9.10	9.12	17.52	96.16		

用紫外分光光度法测定鹿藿乙醇浸膏中异黄酮含量:取 0.01 mL 样品溶液和 0.5 mL [Bmim]BF₄ 离子液体置 5 mL 容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,分置 3 个试管中,仍以离子液体作空白对照,于 270 nm 处平行测定其吸光度。测定结果如表 4 所示。

表 4 乙醇浸膏中异黄酮含量的测定
Table 4 The contents of isoflavone in the ethanol extract

Sample	Absorbance	Average	$\rho(\text{Isoflavone})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
1	0.249	0.230	4.95
2	0.235		
3	0.206		

2.7 离子液体回收实验

将柱层析收集的富含离子液体的馏分[Bmim]BF₄,减压蒸除溶剂,回收得到离子液体纯品(纯度核磁氢谱检测达 97% 以上),回收率高达 76.7%。说明离子液体经过简单处理后可以再生,因而在提取分离中能够循环利用。

3 结 论

以 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([Bmim]BF₄) 离子液体为提取剂,利用有效成分异黄酮在水及离子液体中分配比的不同,以及在该体系中离子液体与溶质分子间所具有的特征化学键力的作用,经充分搅拌后,实现了离子液体选择性提取分离鹿藿中的异黄酮成份的效果。该研究从鹿藿根的 70% 乙醇粗提物中,设计利用[Bmim]BF₄离子液体分离其中有效成分,最终成功分离纯化得到 3 个异黄酮类化合物为木豆酮(Cajanone)、3-[4'-(1"-甲氧基)-丙基氧代]-苯基-5,7-二羟基异黄酮和鸡豆黄素 A(Biochanin A)。它们均是首次从植物鹿藿中分离得到,其中 3-[4'-(1"-甲氧基)-丙基氧代]-苯基-5,7-二羟基异黄酮是一个新的异黄酮类化合物。进一步用紫外吸收光谱法建立了植物鹿藿中异黄酮含量的测定方法。

参 考 文 献

[1] Liu J F, Jiang G B, Jönsson J Å, *et al.* Application of Ionic Liquids in Analytical Chemistry[J]. *Trends Anal Chem*, 2005, **24**:20-27.

[2] Wilkes J S. Properties of Ionic Liquid Solvents for Catalysis[J]. *J Mol Catal A:Chem*, 2004, **214**:11-17.

[3] Huddleston J G, Willauer H D, Swatoski R P, *et al.* Temperature Ionic Liquids as Novel Media for ‘Clean’ Liquid-Liquid Extraction[J]. *Chem Commun*, 1998, **16**:1765-1766.

[4] FAN Jing, FAN Yunchang, CUI Fengling, *et al.* Extraction of Aminobenzene Sulfonic Acids with Room-temperature Ionic Liquids [J]. *Acta Chim Sin*, 2006, **64**(14):1495-1499 (in Chinese).

- 樊静,范云场,崔凤灵,等. 室温离子液体对氨基苯磺酸的萃取性能[J]. 化学学报,2006,**64**(14):1495-1499.
- [5] GU Yanlong, SHI Feng, DENG Youquan. Study on the Extraction Separation of BSA in Ionic Liquid Aqueous Twophase System[J]. *Acta Chim Sin*, 2004, **62**(5):532-536 (in Chinese).
- 顾彦龙,石峰,邓友全. 离子液体双水相体系萃取分离牛血清白蛋白研究[J]. 化学学报,2004, **62**(5):532-536.
- [6] LIU Qingfen, HU Xuesheng, WANG Yuhong. Study on The Aqueous Two - phase Ionic Liquids Extraction Separation Penicillin[J]. *Chinese Sci Bull*, 2005, **50**(8):756-759 (in Chinese).
- 刘庆芬,胡雪生,王玉红. 离子液体双水相萃取分离青霉素[J]. 科学通报,2005, **50**(8):756-759.
- [7] DENG Fanzheng, GUO Dongfang. Partition of Rutin in Ionic Liquid Aqueous Two-phase System[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2007, **24**(7):838-840 (in Chinese).
- 邓凡政,郭东方. 芦丁在离子液体双水相中分配性能[J]. 应用化学,2007, **24**(7):838-840.
- [8] XU Huimin, HU Lian, XIONG Chengliang. Herb Medicine Deer of Antibacterial Experiment Research[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2006, **18**:435-437 (in Chinese).
- 徐惠敏,胡廉,熊承良. 中药鹿藿的抑菌实验研究[J]. 天然产物研究与开发,2006, **18**:435-437.
- [9] WANG Jiangang, XIONG Chengliang, YIN Weiping, *et al.* Inhibitory Effect on Male Mouse Procreation and Chemical Composition Analysis of *Rhynchosia volubilis* Ethyl Acetate Extract[J]. *China J Chinese Mat Med*, 2007, **32**(11):1072-1076.
- 王建刚,熊承良,尹卫平,等. 鹿藿醋酸乙酯提取物抗雄性小鼠生育研究及成分分析[J]. 中国中药杂志,2007, **32**(11):1072-1076.
- [10] CUI Lijian, HUANG Yun, DU Shujuan, *et al.* Ultraviolet Spectrophotometry in SSP Iso-Flavone Content[J]. *Hebei Tradit Chinese Med Pharmacol*, 2004, **19**(3):32-33 (in Chinese).
- 崔力键,黄芸,杜淑娟,等. 紫外分光光度法测定淡豆豉中异黄酮的含量[J]. 河北中医药学报,2004, **19**(3):32-33.
- [11] Munekazu I, Masayoshi O, Yokoko K, *et al.* Flavonoid Compounds in Roots of *Sophora Tetraptera*[J]. *Phytochemistry*, 1995, **39**(3):667-671.
- [12] Yoshiaki S, Sanae Y, Yoshiaki S, *et al.* Isoflavanones in Roots of *Sophora Secundiflora*[J]. *Phytochemistry*, 1997, **44**(4):715-718.

Extraction and Separation of Isoflavonoids from *Rhynchosia volubilis* Lour Using Ionic Liquid

GUO Yanyan, YIN Weiping*, LIU Pu, HU Ya, YAN Mengjie, SUN Xiangqian
(School of Chemical Engineering and Pharmaceutics, Henan University of
Science & Technology, Luoyang 471003)

Abstract The ionic liquids have been known as “green” or “environmentally friendly” solvents and show potentials to replace traditional solvents. A new approach was set up for the extraction and separation of isoflavonoids from the *Rhynchosia volubilis* Lour using the 1-butyl-3-methyl tetrafluoroborate ([Bmim]BF₄) ionic liquid. Three isoflavonoids were obtained from the 70% alcohol extract of *Rhynchosia volubilis*. Based on the spectra analysis, their structures have been confirmed to be cajanone, 3-[4'-(1"-methoxy)-propoxy]-phenyl-5,7-dihydroxy-isoflavone and Biochanin A, in which the 3-[4'-(1"-methoxy)-propoxy]-phenyl-5,7-dihydroxy-isoflavone is a novel compound. The result had shown that the [Bmim]BF₄ could extract isoflavones effectively and selectively. A protocol for determining the content of each component in the isoflavonoid was established. The overall pharmacognosical content of isoflavone was 0.73% using cajanone as the standard and its maximum absorption (270 nm) as the determination wavelength. The average recovery rate and relative standard deviation was 99.94% and 3.66%, respectively. The recycling rate of the ionic liquid was 76.7%.

Keywords *Rhynchosia volubilis* Lour, ionic liquid, extraction and isolation, isoflavonoids compound, content determination