

· 论著 ·

高纯度单体制备及结构鉴定芹菜籽中3种苯酐成分

陈雯慧, 沈刚, 陈海生 (第二军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 分离和鉴定芹菜籽中苯酐类化合物。方法 采用硅胶柱色谱、制备薄层色谱方法分离纯化苯酐类化学成分, 用波谱分析技术鉴定化合物结构。结果 从芹菜籽中分离制备得到3种主要的苯酐类化合物, 分别鉴定为芹菜甲素、芹菜乙素和新蛇床内酯。结论 采用该法制备的样品纯度大于98%, 可作为对照品使用。

[关键词] 芹菜籽; 芹菜甲素; 芹菜乙素; 新蛇床内酯; 结构鉴定

[中图分类号] R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)02-0138-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.010

High purity preparation and identification of three phthalide compounds from *Apium graveolens*

CHEN Wenhui, SHEN Gang, CHEN Haisheng (Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** Isolation, purification and structure identification of phthalides from *Apium graveolens* L. **Methods** Silica gel column and preparative TLC chromatography were used to isolate and purify the phthalide compounds. The structures of those compounds were determined through spectral analysis. **Results** Three pure compounds were identified as 3-n-butylphthalide, sedanenolide and sedanolide. **Conclusion** Three pure phthalide compounds can be used as analytical reference standard for quantitative analysis of *A. graveolens*.

[Key words] *Apium graveolens*; 3-n-butylphthalide; sedanenolide; sedanolide; structure identification

芹菜(*Apium graveolens* L.), 是伞形科旱芹属植物^[1]。芹菜籽是芹菜的种子, 维吾尔医学认为芹菜籽有散气、消肿、利尿、开通阻滞、降血压等功效, 在维吾尔药中主要用于治疗高血压、关节炎、类风湿关节炎、气滞性子宫炎、腹水等疾病^[2]。芹菜籽中富含苯酐类化合物, 如芹菜甲素、芹菜乙素和新蛇床内酯等。据文献报道, 芹菜甲素有抗脑缺血^[3,4]和抗惊厥、抗癫痫作用, 同时对神经细胞有一定的保护作用^[5]。本课题组前期对芹菜籽进行研究, 发现其乙酸乙酯部位有良好的黄嘌呤氧化酶抑制活性、抗炎镇痛和降尿酸作用。芹菜籽中的苯酐类化合物为油状液体, 一般难以分离得到高纯度的样品。为了研究其生物活性和用于定量分析, 笔者对芹菜籽中的主要苯酐类成分进行了制备分离, 从醋酸乙酯部位分离得到3个化合物, 波谱分析测定3个化合物分别为芹菜甲素(1)、芹菜乙素(2)、新蛇床内酯(3)。经TLC和HPLC检测(图1), 3个化合物的纯度均

大于98%, 可用于定量分析的对照品。

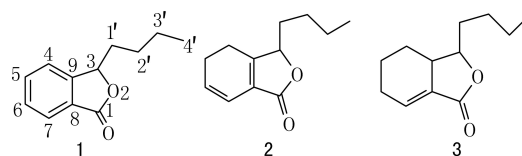


图1 芹菜甲素(1)、芹菜乙素(2)、新蛇床内酯(3)的化学结构

1 材料和方法

1.1 仪器 液相色谱仪(岛津 SPD-10A); 核磁共振仪(Bruker DRX-400型); 质谱仪[Mat-212磁式(EI-MS); Q-ToF micro(ESI-MS)]; 紫外分光光度计(Cary 100 Conc)。

1.2 试剂 甲醇为色谱纯; 乙醇、石油醚、丙酮均为分析纯; 薄层层析硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司), 规格: 20 cm×20 cm, 涂层厚度: 0.4~0.5 mm。硅胶 100~200目; 200~300目(烟台江友硅胶开发有限公司)。

2 芹菜籽的分离纯化

取芹菜籽药材 1 kg, 用 8 倍量的浓度为 80% 的

[基金项目] 上海市中药现代化专项资助(09dZ1974000)

[作者简介] 陈雯慧, 本科. E-mail: xiaohuihui@163.com

[通讯作者] 陈海生, 教授. 研究方向: 天然药物化学. Tel: (021) 81871250; E-mail: hschen2012@163.com

乙醇热回流提取3次,每次约1.5 h。过滤后所得的滤液浓缩至浸膏状(约200 ml),加入520 ml的95%乙醇,加热使其充分溶解,用(100~200目)硅胶480 g拌样,装柱,层析硅胶(100~200目)520 g。用乙酸乙酯作为冲洗剂,冲洗4个柱体积(约5 L),所得滤液浓缩至浸膏状,干燥至恒重,得提取浸膏为37 g。取5 g浸膏,加适量无水乙醇,加热溶解,用(100~200目)硅胶适量拌样,上硅胶柱(硅胶70 g,200~300目)。用石油醚-乙酸乙酯(15:1)洗脱。TLC检查,相同流份合并浓缩,共分为三段:第一段为小极性和色素部分(弃之),第二段含有新蛇床内酯和芹菜甲素,第三段含有芹菜乙素和芹菜甲素。将第二段用适量的乙酸乙酯溶解,用薄层硅胶板制备,展开剂为正己烷-丙酮(10:1),分别展开2次,制备新蛇床内酯和芹菜甲素的粗品,将所得新蛇床内酯和芹菜甲素粗品再以相同条件重复层析制备一次。将第三段用上述方法制备芹菜乙素和芹菜甲素,将两次所得芹菜甲素合并,最终得到芹菜甲素112 mg(得率0.08%)、芹菜乙素480 mg(0.36%)、新蛇床内酯425 mg(0.31%)。

3 3个化合物的纯度检查

3.1 TLC检查 采用2种溶剂系统分别进行层析

展开,3个化合物的TLC检查结果见图2。

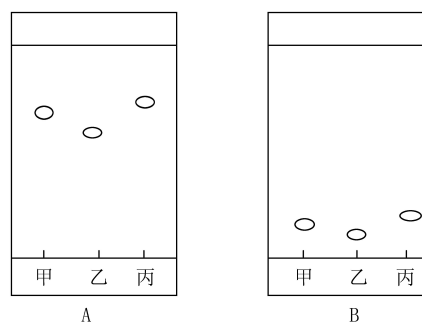


图2 芹菜甲素(甲)、芹菜乙素(乙)、新蛇床内酯(丙)的TLC图

A. 展开剂:正己烷-丙酮(5:1); B. 展开剂:石油醚-丙酮(10:1); 显色:香草醛-浓硫酸试剂,喷洒后加热

3.2 HPLC检查 色谱条件:色谱柱: C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m),流动相为甲醇-水(60:40),检测波长:235 nm,流速:1.0 ml/min,进样量:10 μ l,柱温:25 $^{\circ}$ C。结果见图3。

图3显示经硅胶柱色谱、薄层色谱分离得到的高纯度单一组分,即芹菜甲素、芹菜乙素、新蛇床内酯3个化合物,其纯度均大于98.0%,三者皆可作为定量分析的对照品。

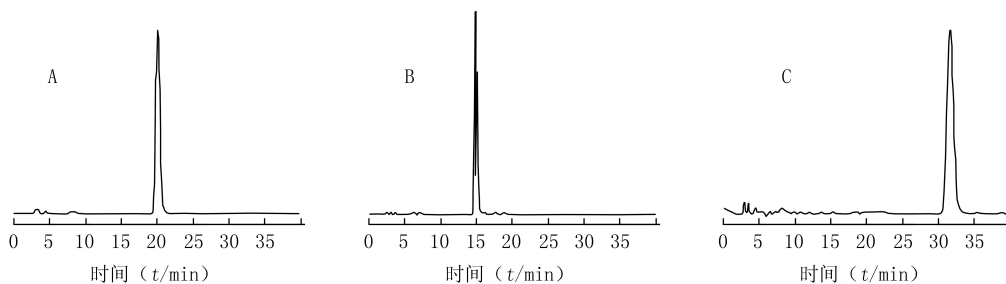


图3 芹菜甲素(A)、芹菜乙素(B)、新蛇床内酯(C)的HPLC图

4 结构鉴定

4.1 化合物(1)的结构鉴定 无色油状物,Dragendorff试剂反应阳性,显橘黄色。HRESI-MS m/z : 191.1065 $[M+H]^+$,分子式 $C_{12}H_{14}O_2$; UV λ_{max} (nm): 228, 272; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.62 (3 H, dd, $J=9.3, 4.9$, H-4'), 1.07~1.83 [6 H, m, H-(1', 2', 3')], 5.20 (1 H, dd, $J=7.8, 4.1$, H-3), 7.17 (1 H, m, H-4), 7.24 (1 H, m, H-6), 7.40 (1 H, m, H-5), 7.61 (1 H, d, $J=7.6$, H-7); ^{13}C NMR及DEPT (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.00~34.58 (s, C-1', 2', 3', 4'), 81.60 (s, C-3), 121.92 (s, C-6), 125.78 (s,

C-4), 126.29 (s, C-8), 129.17 (s, C-7), 134.12 (s, C-5), 150.29 (s, C-9), 170.83 (s, C-1); 上述数据与文献[6]报道的丁基苯酞波谱数据一致,确定化合物(1)的结构为3-n-丁基苯酞(3-n-butylphthalide),即芹菜甲素。

4.2 化合物(2)的结构鉴定 无色油状物,HRESI-MS m/z : 193.1228 $[M+H]^+$,分子式 $C_{12}H_{16}O_2$; UV λ_{max} (nm): 275; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.86 (3 H, t, $J=7.1$, H-4'), 1.2~1.8 [6 H, m, H-(1', 2', 3')], 2.44 (4 H, m, $J=7.5$, H-4, 5), 4.88 (1 H, dd, H-3), 5.87 (1 H, m, H-6), 6.18 (1 H, dd, $J=9.7, 2.0$, H-7); ^{13}C NMR及DEPT (75 MHz, $CDCl_3$), δ : 13.90~22.78 (s,

C-1', 2', 3', 4'), 26.94 (s, C-4), 31.12 (s, C-5), 82.71 (s, C-3), 117.13 (s, C-7), 128.51 (s, C-6), 124.79 (s, C-9), 128.50 (s, C-8), 161.58 (s, C-1); 以上波谱数据与文献[7]报道的 4, 5-二氢-3-丁基苯酞一致, 确定化合物(2)的结构为 4, 5-二氢-3-丁基苯酞(sedanenolide), 即芹菜乙素。

4.3 化合物(3)的结构鉴定 无色油状物, HRESI-MS m/z : 195.1365 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{12}H_{18}O_2$; UV λ_{max} (nm): 223; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.89 (3 H, m, H-4'), 1.10~1.57 [6 H, m, H-(1', 2', 3')], 1.81~2.52 (6 H, m, H-4, 5, 6), 3.46 (1 H, m, H-9), 3.94 (1 H, m, H-3), 6.75 (1 H, q, $J=3.3$, H-7); ^{13}C NMR 及 DEPT (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.10 (s, C-4'), 20.99~34.55 (s, C-1', 2', 3', 4, 5, 6), 43.30 (s, C-9), 85.57 (s, C-3), 131.39 (s, C-8), 135.42 (s, C-7), 170.46 (s, C-1); 以上数据与文献[8]报道的新蛇床内酯波谱数据一致, 确定化合物(3)的结构为新蛇床内酯(sedanolidide)。

5 讨论

苯酞类化合物是一类常见的具有生物活性的天然产物, 许多常用中药都含有该类成分。由于苯酞类化合物的理化性质特殊, 一般很难得到高纯度的样品, 以作为有关药材及其制剂质量评价的对照品。本实验提供了制备该类化合物的一种方法。笔者在实验过程中发现, 芹菜甲素和芹菜乙素在结构上相

似, 极性比较相近, 从 HPLC 图上看到两者的保留时间也比较接近, 因此, 在薄层硅胶板制备过程中, 用正己烷-丙酮(10:1)作为展开剂, 需连续展开 2 次或 3 次, 方可达到完全分离, 得到单一成分。在制备过程中发现, 化合物芹菜乙素在单体状态下可缓慢转化为芹菜甲素, 保存于低温有利于其结构的稳定。

【参考文献】

- [1] 吾不力卡斯木·吾不力艾山. 芹菜的心血管药理作用及临床应用分析[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(19): 35.
- [2] 王文宝, 马华夏. 芹菜籽化学成分及药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2012, 33(1): 49-51.
- [3] 张会群. 丁苯酞的药理作用与药动学研究及临床评价[J]. 医学信息, 2014(39): 266.
- [4] 廖艳彪, 彭立辉, 卢明. 丁基苯酞对血管性痴呆的认知功能的影响[J]. 医学综述, 2014, 20(18): 3343-3345.
- [5] 端木寅, 王源, 梁爽, 等. 丁苯酞脑缺血治疗作用的相关药理学研究进展[J]. 中药药理与临床, 2012(3): 126-130.
- [6] Yang H, Hu GY, Chen J, *et al.* Synthesis, resolution, and antiplatelet activity of 3-substituted 1(3H)-isobenzofuranone [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17(18): 5210-5213.
- [7] Fazal SS, Ansari MM, Singla RK, *et al.* Isolation of 3-n-Butyl Phthalide & Sedanenolide from *Apium graveolens* Linn [J]. Indo Glob J Pharm Sci, 2012, 2(3): 258-261.
- [8] Wang J, Yang JB, Wang AG, *et al.* Studies on the chemical constituents of *Ligusticum sinense* [J]. J Chin Med Mater, 2011, 34(3): 378-380.

【收稿日期】 2016-06-15 【修回日期】 2016-08-22

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 111 页)

- [20] Wang YH, Hong YL, Feng Y, *et al.* Comparative pharmacokinetics of senkyunolide I in a rat model of migraine versus normal controls [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 37(2): 91-97.
- [21] 朱黎霞, 张英丰. 基于微透析技术结合液质联用的丹酚酸 B 正常和高脂血症大鼠药动学比较研究[J]. 中草药, 2015, 46(1): 90-96.
- [22] 冯彬彬, 张建海, 牛小花, 等. 川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素在模型与正常大鼠体内药动学比较研究[J]. 中草药, 2015, 46(10): 1493-1497.
- [23] Wu Y, Ai Y, Wang F, *et al.* Simultaneous determination of four secoiridoid and iridoid glycosides in rat plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a comparative pharmacokinetic study [J]. Biomed chromatogr: BMC, 2015, 30(2): 97-104.
- [24] Wu Y, Wang F, Ai Y, *et al.* Simultaneous determination of seven coumarins by UPLC-MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and arthritic rats after oral administration of Huo Luo Xiao Ling Dan or single-herb

extract [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015, 991: 108-117.

- [25] 姜丽, 高萌, 屈飞, 等. 基于 HPLC-MS/MS 研究麻杏石甘汤在正常及 RSV 肺炎感染模型大鼠体内的药动学[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2649-2655.
- [26] Gong XH, Li Y, Zhang RQ, *et al.* The synergism mechanism of Rhubarb Anthraquinones on constipation elucidated by comparative pharmacokinetics of Rhubarb extract between normal and diseased rats [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2015, 40(4): 379-388.
- [27] 孟祥乐, 李红伟, 韩永龙, 等. 栀子-连翘药对大鼠体内药动学变化特征研究[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(17): 2003-2009, 2024.
- [28] Zeng XY, Dong S, He NN, *et al.* Comparative pharmacokinetics of arctigenin in normal and type 2 diabetic rats after oral and intravenous administration [J]. Fitoterapia, 2015, 105: 119-126.

【收稿日期】 2016-12-05 【修回日期】 2016-12-27

【本文编辑】 李睿旻