



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107759552 B

(45)授权公告日 2020.08.25

(21)申请号 201710800749.8

(22)申请日 2017.09.07

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107759552 A

(43)申请公布日 2018.03.06

(73)专利权人 云南中烟工业有限责任公司
地址 650231 云南省昆明市五华区红锦路
367号云烟科技园C区

(72)发明人 孔维松 倪朝敏 王晓辉 李晶
刘欣 米其利 李雪梅 李松
伊奥尔 王迪 李迎华 许健
韩莹 端凯 周敏 胡秋芬
杨光宇

(74)专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108

代理人 谢嘉 旃习涵

(51)Int.Cl.
C07D 311/30(2006.01)
C07D 311/40(2006.01)
A24B 15/24(2006.01)
A24B 15/40(2006.01)

审查员 杨森

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

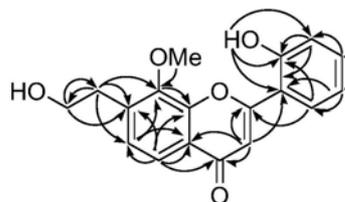
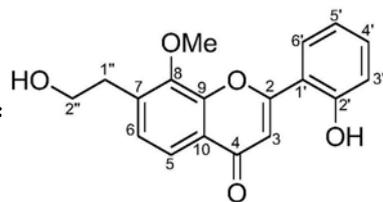
(54)发明名称

一种具有抗氧化活性的黄酮类化合物及其
制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种具有抗氧化活性的黄酮
类化合物及其制备方法和应用。该黄酮类化合物
从烟草根茎中分离得到,其分子式为C₁₈H₁₆O₅,具

有下述结构式:



化合物命名为:2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧
基-黄酮,英文名:2'-hydroxy-7-(3-
hydroxypropyl)-8-methoxy-flavone。以烟草根
茎为原料,经浸膏提取、硅胶柱层析、高效液相色
谱分离得到。实验结果显示该化合物具有良好的
抗氧化活性和清除自由基活性,作为香料抗氧化
剂使用,能有效抑制其氧化变质,显著延长其保
质期,且不影响卷烟抽吸品质。

CN 107759552 B

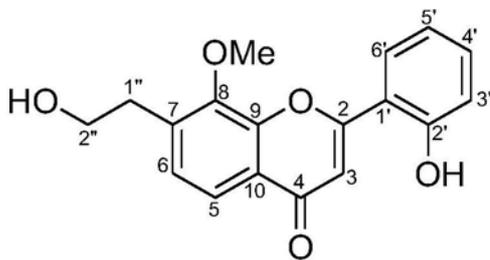
1. 一种具有抗氧化活性的黄酮类化合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 浸膏提取:将烟草根茎粉碎到20~40目,用有机溶剂超声提取2~5次,每次30~60分钟,合并提取液、过滤,减压浓缩提取液,静置,滤除沉淀物,浓缩成浸膏;所述的有机溶剂为70%~100%的丙酮、90%~100%的乙醇或90%~100%的甲醇;

(2) 硅胶柱层析:浸膏上硅胶柱层析,装柱硅胶为160~200目,用量为浸膏重量2~10倍量;以氯仿-丙酮溶液进行梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经TLC监测,合并相同的部分;所述的梯度洗脱,氯仿-丙酮溶液的体积配比分别为1:0、9:1、8:2、7:3、1:1和0:1;

(3) 高效液相色谱分离:将柱层析洗脱液7:3的部分经高效液相色谱分离纯化,即得所述的黄酮类化合物;所述的高效液相色谱分离纯化是以45%~55%的甲醇为流动相,流速15~25ml/min,以21.2×250mm,5μm的ZorbaxPrepHT GF反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为360nm,每次进样150~300μL,收集33.2min的色谱峰,多次累加后蒸干;

所述的黄酮类化合物具有下述结构式:



其分子式为 $C_{18}H_{16}O_5$,命名为:2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮,英文名:2'-hydroxy-7-(3-hydroxypropyl)-8-methoxy-flavone。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:步骤(2)中,浸膏在上硅胶柱层析前,先用重量比1.5~3倍量的丙酮或甲醇溶解,然后用浸膏重量0.5~1.5倍的80~100目硅胶拌样。

一种具有抗氧化活性的黄酮类化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于烟草化学技术领域,具体是涉及一种首次从烟草根茎中提取得到的黄酮类化合物,该化合物具有良好的抗氧化活性。同时,本发明还涉及该化合物的制备方法,以及该化合物在抑制香料氧化变质方面的应用。

背景技术

[0002] 烟草是世界上化学成分最为复杂的植物,次生代谢产物非常丰富,经过几十年的研究,目前已从烟草中鉴定出来的单体化学物质超过3000多种,而且还有许多成分尚未鉴定出来。烟草除主要用于卷烟抽吸用途外,还可从中提取多种有利用价值的化学成分,从中发现有开发利用价值的先导性化合物。烟草根茎为烟叶生产过程中的废弃物,但烟草根茎中也富含大量有综合利用价值的成分,如:烟草植株中含有大量植物纤维,烟茎可以压制纤维板或制成活性炭等等;烟草茎秆中还含有相当多的果胶和果胶酶、树脂,果胶是多种工业大规模使用的化工产品。用烟草的根茎及低次档烟叶,可提取烟碱。烟碱有杀菌,止血功能,能防治农作物害虫及家畜皮肤寄生虫。

[0003] 黄酮类化合物泛指两个具有酚羟基的苯环(A-与B-环)通过中央三碳原子相互连接而成的一系列化合物,其基本母核为2-苯基色原酮。黄酮类化合物结构中常连接有酚羟基、甲氧基、甲基、异戊烯基等官能团。此外,它还常与糖结合成苷。黄酮的功效是多方面的,它是一种很强的抗氧化剂,阻止氧化的能力是维生素E的十倍以上,这种抗氧化作用可以阻止细胞的退化、衰老,也可阻止癌症的发生。黄酮还可以改善血液循环,降低胆固醇,改善心脑血管疾病。国内外研究证实,黄酮类化合物的功效作用与化学结构密切相关,可进一步研究和开发更多的黄酮类化合物,从中寻找有效的先导化合物和活性基团。

[0004] 本发明从烟草种植废弃物(烟草根茎)中分离得到一种具有良好抗氧化活性的黄酮类化合物,该化合物及其在抑制香料氧化变质方面的应用尚未见到相关报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种新的黄酮类化合物。

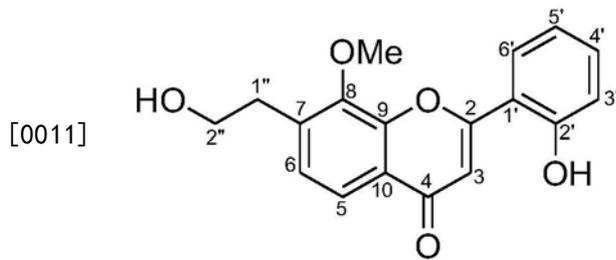
[0006] 本发明的另一个目的是提供一种制备所述黄酮类化合物的方法。

[0007] 本发明的目的还在于提供所述的黄酮类化合物在抑制香料氧化变质中的应用。

[0008] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现。

[0009] 除非另有说明,本发明所采用的百分数均为质量百分数。

[0010] 一种黄酮类化合物,是从烟草根茎中提取分离得到,其分子式为 $C_{18}H_{16}O_5$,具有下述结构式:



[0012] 该化合物为黄色胶状物，命名为：2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮，英文名：2'-hydroxy-7-(3-hydroxypropyl)-8-methoxy-flavone。

[0013] 一种制备所述黄酮类化合物的方法，以烟草根茎为原料，经浸膏提取、硅胶柱层析、高效液相色谱分离得到，具体包括以下步骤：

[0014] (1) 浸膏提取：将烟草根茎粉碎到20~40目，用有机溶剂超声提取2~5次，每次30~60分钟，合并提取液、过滤，减压浓缩提取液，静置，滤除沉淀物，浓缩成浸膏；所述的有机溶剂为70%~100%的丙酮、90%~100%的乙醇或90%~100%的甲醇；

[0015] (2) 硅胶柱层析：浸膏上硅胶柱层析，装柱硅胶为160~200目，用量为浸膏重量2~10倍量；以氯仿-丙酮溶液进行梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经TLC监测，合并相同的部分；

[0016] (3) 高效液相色谱分离：将柱层析洗脱液7:3的部分经高效液相色谱分离纯化，收集25~35min的色谱峰，多次累加后蒸干，即得所述的黄酮类化合物。

[0017] 步骤(2)中，浸膏在上硅胶柱层析前，先用重量比1.5~3倍量的丙酮或甲醇溶解，然后用浸膏重量0.5~1.5倍的80~100目硅胶拌样。

[0018] 步骤(2)中，所述的梯度洗脱，氯仿-丙酮溶液的体积配比分别为1:0、9:1、8:2、7:3、1:1和0:1。

[0019] 步骤(3)中，所述的高效液相色谱分离纯化是以45%~55%的甲醇为流动相，流速15~25ml/min，以21.2×250mm，5μm的ZorbaxPrepHT GF反相制备柱为固定相，紫外检测器检测波长为360nm，每次进样150~300μL，收集33.2min的色谱峰，多次累加后蒸干。

[0020] 本发明所述的黄酮类化合物的结构通过以下方法进行测定。该黄酮类化合物为黄色胶状物，HRESI-MS显示其准分子离子峰为335.0888[M+Na]⁺ (计算值335.0895)，结合¹H NMR和DEPT谱确定其分子式为C₁₈H₁₆O₅，不饱和度为11。红外光谱中显示了羟基(3440)、羰基(1665)和芳环(1612、1553和1420cm⁻¹)的共振吸收峰。而紫外光谱在210、255、360nm有最大吸收也说明了化合物中可能存在芳环结构。化合物的¹H和¹³C NMR数据(如表1)显示其含有18个碳和16个氢，包括1个1,2,3,4-四取代的苯环(C-5~C-10, H-5、H-6)，1个1,2-二取代的苯环(C-1'~C-6', H-3'~H-6')，1个α,β-不饱和羰基(C-2~C-4, H-3)，1个羟乙基(δ_C32.8t和63.2t, δ_H2.64(t)7.2和3.60(t)7.2)，1个甲氧基(δ_C61.2q; δ_H3.83s)，以及1个酚羟基(δ_H10.82)。根据典型的2个苯环、α,β-不饱和羰基和双键信号，可推测该化合物1为黄酮类化合物。根据H-3和C-2、C-4、C-10、C-1'，H-5和C-4、C-9、C-10，以及H-6'和C-2的HMBC相关(图-3)可进一步确认化合物1为黄酮类结构。

[0021] 化合物的母体确定后，其余的取代基，羟乙基、甲氧基和酚羟基可视为黄酮上的取代基。化合物的HMBC谱中(如图3)可观察到甲氧基氢(δ_H3.83)与C-8(δ_C153.7)的HMBC相关，可推测该甲氧基分别取代在C-8位；根据H₂-1''(δ_H2.64)和C-6(δ_C126.4)、C-7(δ_C132.4)、C-8

($\delta_{\text{C}}153.7$), H₂-2'' ($\delta_{\text{H}}3.60$) 和 C-7 ($\delta_{\text{C}}132.4$), 以及 H-6 ($\delta_{\text{H}}6.76$) 和 C-1'' ($\delta_{\text{C}}32.8$) 的 HMBC 相关, 可证实羟乙基取代在 C-7 位; 酚羟基取代在 C-2' 可通过酚羟基氢 ($\delta_{\text{H}}10.82$) 和 C-1' ($\delta_{\text{C}}119.2$)、C-2' ($\delta_{\text{C}}158.5$) 和 C-3' ($\delta_{\text{C}}116.1$) 的 HMBC 相关得到确认。另外典型的苯环上质子信号 [H-5, $\delta_{\text{H}}7.54$ (d) 8.2; H-6, $\delta_{\text{H}}6.76$ (d) 8.2; H-3', $\delta_{\text{H}}6.92$ (d) 7.6; H-4', $\delta_{\text{H}}7.31$ (t) 7.6; H-5', $\delta_{\text{H}}6.86$ (t) 7.6; H-6', $\delta_{\text{H}}7.72$ (d) 7.6] 也可证实本发明黄酮化合物的 B 环为 7,8-位二取代, C 环为 2'-位单取代。至此, 化合物的结构得到确定, 化合物命名为: 2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮。

[0022] 表-1 化合物 1 的核磁共振数据 (500/125MHz, 溶剂为 CDCl₃)

No.	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult, J, Hz)	No.	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult, J, Hz)
2	163.3 s		2'	158.5 s	
3	106.7 d	6.63 s	3'	116.1 d	6.92 (d) 7.6
4	177.1 s		4'	131.3 d	7.31 (t) 7.6
5	124.7 d	7.54 (d) 8.2	5'	121.8 d	6.86 (t) 7.6
6	126.4 d	6.76 (d) 8.2	6'	128.5 d	7.72 (d) 7.6
7	132.4 s		1''	32.8 t	2.64 (t) 7.2
8	153.7 s		2''	63.2 t	3.60 (t) 7.2
9	150.9 s		-OMe-8	61.2 q	3.83
10	122.2 s		Ar-OH		10.82 s
1'	119.2 s				

[0025] 化合物的红外、紫外和质谱数据: UV (MeOH), λ_{max} ($\log \epsilon$) 360 (3.72)、255 (3.89) 和 210 (4.34) nm; IR (KBr) ν_{max} 3440、1665、1612、1553、1420、1392、1154 和 1058 cm^{-1} ; ¹H NMR 和 ¹³C NMR data (CDCl₃, 500 和 125MHz), Table 1; 正离子模式 ESIMS m/z 335; 正离子模式 HRESIMS m/z 335.0888 [M+Na]⁺ (C₁₈H₁₆NaO₅ 计算值为 335.0895)。

[0026] 对所述的黄酮类化合物进行抗氧化活性测试, 抗氧化活性以清除 DPPH 自由基能力的大小表示; 以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为初筛浓度, 测定其清除脂性自由基 DPPH 的活性。取一块 costar 96 孔板, 加入新鲜配制的 DPPH 乙醇溶液 ($6.5 \times 10^5 \text{mol}/\text{L}$) 190 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 加入待测样品 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 空白孔加 10 μL 生理盐水, 充分混匀, 用封板膜封板后室温下避光静置 30 分钟, 于 UV2401 分光光度计上测定各孔吸光度值, 测定波长为 517 nm; 样品对脂性自由基 DPPH 清除率按下式计算:

$$[\text{0027}] \quad \text{DPPH清除率}(\%) = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

[0028] $A_{\text{空白}}$: 空白对照组吸光度值; $A_{\text{样品}}$: 加样品组吸光度值。

[0029] 样品平行 5 次检测, 计算半数清除浓度 IC₅₀ 测定结果为 3.87 $\mu\text{g}/\text{L}$, 表明该化合物具有良好的抗氧化活性。

[0030] 将所述的黄酮类化合物添加到香料中, 添加量为 0.01%, 0.02% 和 0.05%, 观察其变质情况。结果表明: 对照香料的保质期仅为 15 个月, 添加 0.01%, 0.02% 和 0.05% 的本发明化合物后, 对于三个不同的添加量, 其保质期可分别延长到 25 个月、32 个月和 40 个月, 说

明所述的黄酮类化合物具有很好的延缓香料中香气成分的氧化,具有延长其保质期的功效。因此,所述的黄酮类化合物能够用于抑制香料的氧化变质。

[0031] 所述的黄酮类化合物在制备香料抗氧化剂中的应用。

[0032] 本发明从烟草根茎中提取的黄酮类化合物,具有良好的抗氧化活性和清除自由基活性,能显著延长香料的保质期。该化合物来源于烟草种植废弃物烟草根茎,原料来源成本很低,实现了烟草废弃物的综合利用。而且,毒理学检测结果表明该化合物安全无毒,提取工艺简单、容易实现;该化合物添加于香料中,能有效抑制香料的氧化变质,显著延长其保质期。

附图说明

[0033] 图1为本发明黄酮类化合物的核磁共振碳谱(^{13}C NMR);

[0034] 图2为本发明黄酮类化合物的核磁共振氢谱(^1H NMR);

[0035] 图3为本发明黄酮类化合物的关键HMBC相关图。

具体实施方式

[0036] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的详细说明,但附图和实施例并不是对本发明技术方案的限定,所有基于本发明教导所作出的变化或等同替换,均应属于本发明的保护范围。

[0037] 本发明所述的烟草根茎不受产地和限制,均可以实现本发明。

[0038] 实施例1

[0039] 烟草根茎样品取于云南玉溪,品种为k326,取干燥的烟草根茎5.6kg,粗粉碎至30目,用70%的丙酮超声提取4次,每次60分钟,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩至体积的1/4;静置,滤除沉淀物,浓缩成225g的浸膏;在浸膏中加入500g的丙酮溶解,然后加入100目硅胶320g拌样,拌样后,用200目硅胶1.4kg装柱;用体积比分别为1:0、9:1、8:2、7:3、1:1和0:1的氯仿-丙酮混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经TLC监测,合并相同的部分,得到6个部分A-F,其中,对收集到的样品D(7:3)部分22.5g,再以52%的甲醇为流动相,流速20ml/min,21.2×250mm,5 μm 的ZorbaxPrepHT GF反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为360nm,每次进样200 μL ,收集33.2min的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述黄酮类化合物。

[0040] 实施例2

[0041] 烟草根茎样品取于云南大理,取干燥的烟草根茎6.3kg,粗粉碎至35目,用70%的丙酮超声提取4次,每次50分钟,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩至体积的1/4;静置,滤除沉淀物,浓缩成185g的浸膏;在浸膏中加入420g的丙酮溶解,然后加入100目硅胶218g拌样,拌样后,用200目硅胶1.5kg装柱;用体积比分别为1:0、9:1、8:2、7:3、1:1和0:1的氯仿-丙酮混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经TLC监测,合并相同的部分,得到6个部分A-F,其中,对收集到的样品D(7:3)部分48.6g,再以52%的甲醇为流动相,流速20ml/min,21.2×250mm,5 μm 的ZorbaxPrepHT GF反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为360nm,每次进样200 μL ,收集33.2min的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述黄酮类化合物。

[0042] 实施例3

[0043] 对实施例1制备得到的黄酮类化合物的结构通过以下方法进行测定;所得化合物为黄色胶状物,HRESI-MS显示其准分子离子峰为335.0888[M+Na]⁺(计算值335.0895),结合¹H NMR和DEPT谱确定其分子式为C₁₈H₁₆O₅,不饱和度为11。红外光谱中显示了羟基(3440)、羰基(1665)和芳环(1612、1553和1420cm⁻¹)的共振吸收峰。而紫外光谱在210、255、360nm有最大吸收也说明了化合物中可能存在芳环结构。化合物的¹H和¹³C NMR数据(如表1)显示其含有18个碳和16个氢,包括1个1,2,3,4-四取代的苯环(C-5~C-10,H-5、H-6),1个1,2-二取代的苯环(C-1'~C-6',H-3'~H-6'),1个α,β-不饱和羰基(C-2~C-4,H-3),1个羟乙基(δ_c32.8t和63.2t,δ_H2.64(t)7.2和3.60(t)7.2),1个甲氧基(δ_c61.2q;δ_H3.83s),以及1个酚羟基(δ_H10.82)。根据典型的2个苯环、α,β-不饱和羰基和双键信号,可推测该化合物1为黄酮类化合物。根据H-3和C-2、C-4、C-10、C-1',H-5和C-4、C-9、C-10,以及H-6'和C-2的HMBC相关(图-3)可进一步确认化合物1为黄酮类结构。化合物的母体确定后,其余的取代基,羟乙基、甲氧基和酚羟基可视为黄酮上的取代基。化合物的HMBC谱中(如图2)可观察到甲氧基氢(δ_H3.83)与C-8(δ_c153.7)的HMBC相关,可推测该甲氧基分别取代在C-8位;根据H₂-1''(δ_H2.64)和C-6(δ_c126.4)、C-7(δ_c132.4)、C-8(δ_c153.7),H₂-2''(δ_H3.60)和C-7(δ_c132.4),以及H-6(δ_H6.76)和C-1''(δ_c32.8)的HMBC相关,可证实羟乙基取代在C-7位;酚羟基取代在C-2'可通过酚羟基氢(δ_H10.82)和C-1'(δ_c119.2)、C-2'(δ_c158.5)和C-3'(δ_c116.1)的HMBC相关得到确认。另外典型的苯环上质子信号[H-5,δ_H7.54(d)8.2;H-6,δ_H6.76(d)8.2;H-3',δ_H6.92(d)7.6;H-4',δ_H7.31(t)7.6;H-5',δ_H6.86(t)7.6;H-6',δ_H7.72(d)7.6]也可证实本发明黄酮化合物的B环为7,8-位二取代,C环为2'-位单取代。至此,化合物的结构得到确定,化合物命名为:2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮。

[0044] 实施例4

[0045] 重复实施例3,有以下不同点:取实施例2制备的化合物进行测定,为黄色胶状物,确认实施例2制备的化合物为相同的黄酮类化合物——2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮。

[0046] 实施例5

[0047] 对实施例1化合物进行了抗氧化活性测试,抗氧化活性以清除DPPH自由基能力的大小表示;以50μg/mL为初筛浓度,测定其清除脂性自由基DPPH的活性。取一块costar 96孔板,加入新鲜配制的DPPH乙醇溶液(6.5×10⁵mol/L)190μL/孔,加入待测样品10μL/孔,空白孔加10μL生理盐水,充分混匀,用封板膜封板后室温下避光静置30分钟,于UV2401分光光度计上测定各孔吸光度值,测定波长为517nm;样品对脂性自由基DPPH清除率按下式计算:

$$[0048] \text{DPPH清除率}(\%) = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

[0049] A_{空白}:空白对照组吸光度值;A_{样品}:加样品组吸光度值。

[0050] 样品平行5次检测,计算半数清除浓度IC₅₀测定结果为3.87μg/L,表明化合物具有良好的抗氧化活性。

[0051] 实施例6

[0052] 化合物的延长香料保质期效果测试:

[0053] 把实施例1或2所得任一黄酮类化合物添加到卷烟调香用香料中,添加量为0.01%,0.02%和0.05%,观察其质变情况。结果表明:对照香料的保质期仅为15个月,添加

0.01%, 0.02% 和 0.05% 的本发明化合物后, 对于三个不同的添加量, 其保质期可分别延长到其保质期可分别延长到 25 个月、32 个月和 40 个月, 说明本发明化合物具有很好的延缓香料中香气成分的氧化, 具有延长其保质期的功效。

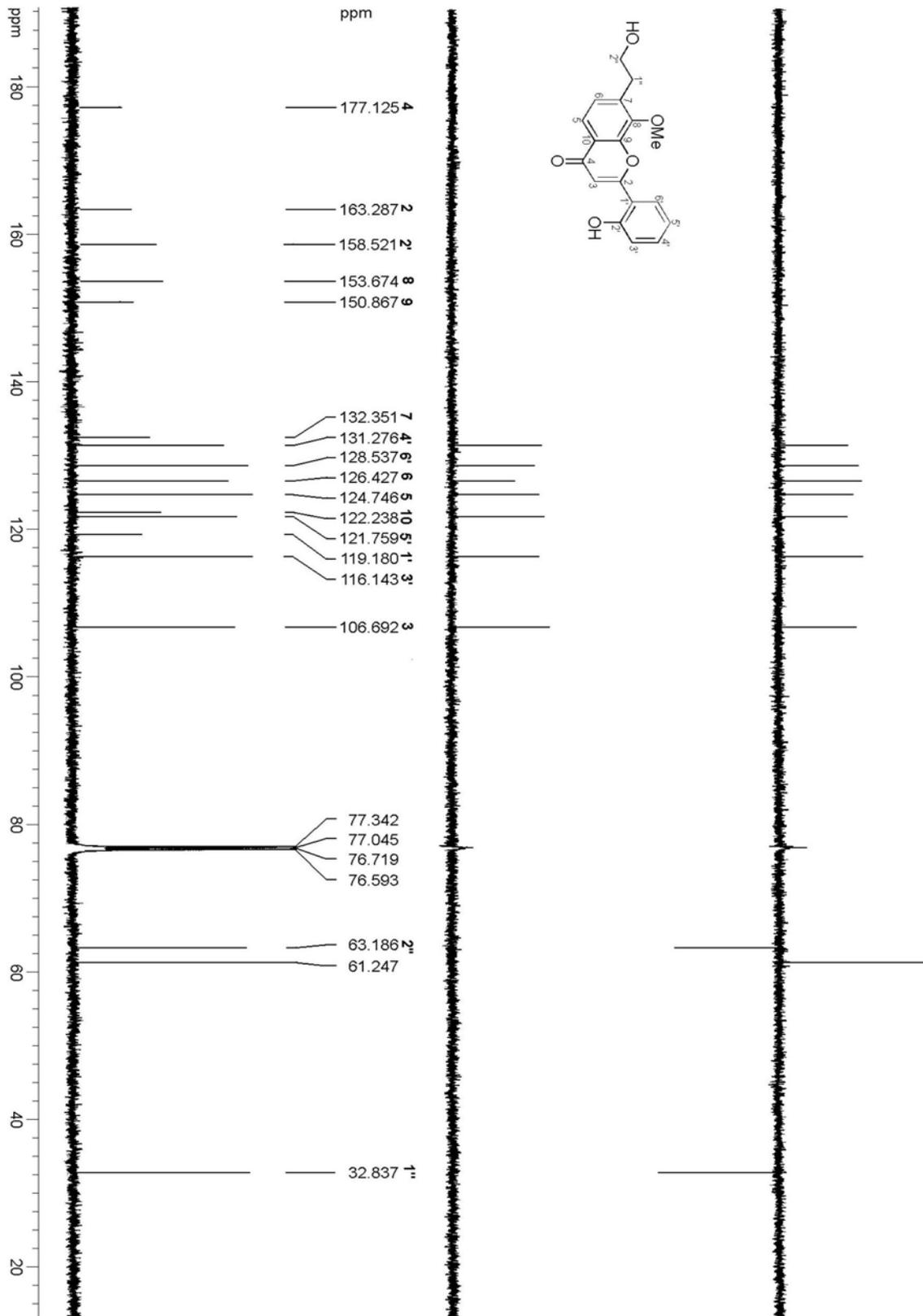


图1

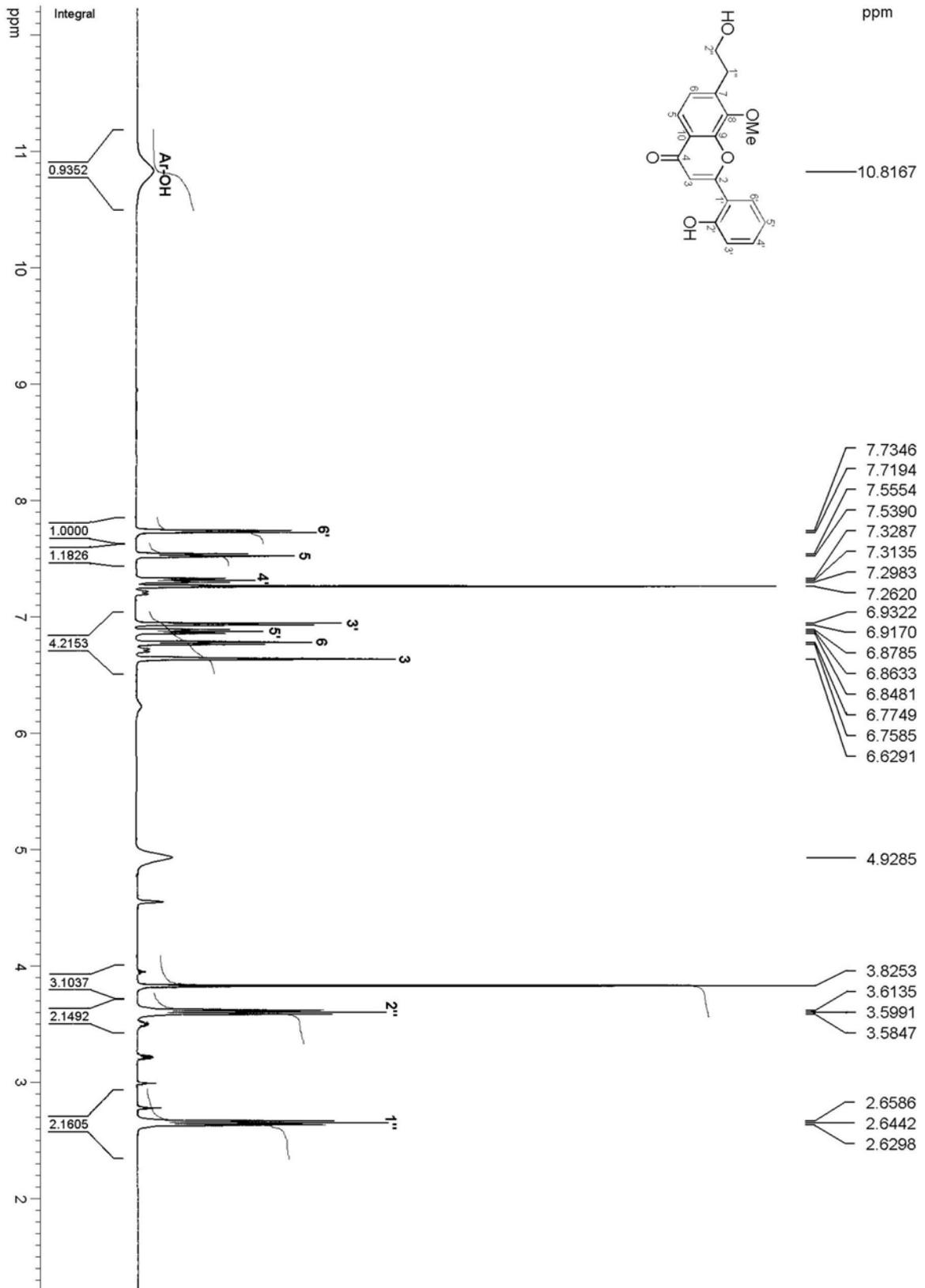


图2

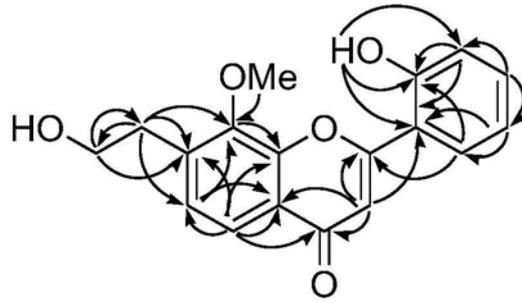


图3