

联二萘酚手性溶剂化试剂鉴定黄烷酮类天然产物手性的研究

王莉雯¹, 李岩², 龚虹卉¹, 胥婕¹, 王发美¹, 张婷¹, 秦大莲², 郭凯¹
西南医科大学:1.基础医学院;2.药学院(泸州 646000)

【摘要】目的 手性黄烷酮类天然产物存在于多种中药材或食品中,有多样化的生物活性,是具有重要研究价值的药物先导化合物。本研究探讨如何高效、经济地鉴定黄烷酮类天然产物的手性。**方法** 以联二萘酚(binaphthol, BINOL)类化合物作为手性溶剂化试剂(chiral solvation agent, CSA),选择9种含ABX自旋耦合系统的黄烷酮类天然产物作为待测底物,通过核磁共振测试氢谱的变化进行手性识别,并计算其对映体过量值(enantiomeric excess, ee),再选择其中4种样品进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)手性拆分,激发态圆二色谱(exciton circular dichroism, ECD)绝对构型测试。**结果** 9种样品加入S型BINOL均能够通过核磁共振氢谱进行识别,并计算出ee值。4种样品通过HPLC能够拆分为8个对映异构单体,均能通过ECD判定出绝对构型,证明4种样品是鲜屑混合物。**结论** 在核磁共振氢谱中,运用BINOL溶剂化试剂能够经济、高效地识别含ABX自旋耦合系统黄烷酮类天然产物的手性,判断其是否为天然来源的鲜屑混合物,并计算出ee值。

【关键词】 联二萘酚;手性溶剂化试剂;黄烷酮;手性研究

【中图分类号】 R917

文献标志码 A

DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2024.06.015

Identification of chirality of flavanone natural products by bis(dinaphthyl)phenol chiral solvation reagents

WANG Liwen¹, LI Yan¹, GONG Honghui¹, XU Jie¹, WANG Famei¹, ZHANG Ting¹, QIN Dalian², GUO Kai²

1. School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

【Abstract】Objective Chiral flavanone natural products exist in various Chinese medicinal herbs or foods, with diverse biological activities, and are important lead compounds for drug research. This study explored how to efficiently and economically identify the chirality of natural products of flavanones. **Methods** Binaphthol (BINOL) compounds were used as chiral solvation reagents, and 9 natural products of flavanones containing ABX spin coupling systems were selected as test substrates. The changes in hydrogen spectra were detected by nuclear magnetic resonance for chiral recognition, and the enantiomeric excess (ee) values were calculated. Four of the samples were then selected for high performance liquid chromatography (HPLC) chiral separation, and excited circular dichroism (ECD) absolute configuration testing. **Results** Nine samples added to S-type BINOL can be identified by nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy and ee values can be calculated. Four samples can be separated into eight enantiomers by HPLC, and their absolute configurations can be determined by ECD, proving that the four samples are a mixture of scalemic mixture. **Conclusion** In nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy, the use of BINOL solvent reagents can economically and efficiently identify the chirality of natural products containing ABX spin coupled system flavanones, determine whether they are natural source scalemic mixtures, and calculate ee values.

【Key words】 Binaphthol; Chiral solvation reagents; Flavanone; Chirality research

黄烷酮类天然产物广泛存在于桔梗科水果外果皮、松树、甘草等具有食用或药用价值的植物中,有抗炎、抗氧化、抗肿瘤细胞、抗致病菌、抗血管新生、抑

制神经退行性疾病等多种生物活性,一直以来是天然药物先导化合物研究的热点^[1-9]。黄烷酮类化合物的结构中包含一个2,3-二氢-2-苯基苯并呋喃-4-酮骨

基金项目: 四川省自然科学基金(2024NSFSC1641);四川省科技计划联合创新专项项目(2022YFS0620-C3);泸州市科技计划项目(2022-JYJ-148);西南医科大学校级科研项目(2021ZKMS007)

通信作者: 郭凯, E-mail: guokai@swmu.edu.cn

引用本文: 王莉雯, 李岩, 龚虹卉, 等. 联二萘酚手性溶剂化试剂鉴定黄烷酮类天然产物手性的研究[J]. 西南医科大学学报, 2024, 47(2): 544-551.

DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2024.06.015.

架,其C-2位是一个手性立体中心,C-2位和C-3位构成了ABX自旋耦合系统(图1)。因此,黄烷酮类化合物具有光学活性,其中,天然来源黄烷酮一般以对映异构体过量的鲜屑混合物形式存在^[10]。

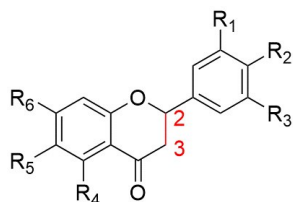


图1 黄烷酮类化合物的2,3-二氢-2-苯基苯并呋喃-4-酮骨架
Figure 1 2,3-dihydro-2-phenylbenzofuran-4-one skeleton of flavanone compounds

注:红色标注为C-2手性立体中心和ABX自旋耦合系统。

化学探针的核磁共振波谱手性识别技术是近年来药物化学领域迅速发展的新兴技术,具有操作简单、样本量小、成本低等优点^[11]。如何选择经济、灵敏的探针,并扩展能够进行手性识别的天然来源底物范围,是探针手性识别的研究热点和挑战之一。本研究选取中药材和食品中,具有生物活性的9种含ABX自旋耦合系统的黄烷酮天然产物作为样品,使用联二萘酚(binaphthol, BINOL)试剂(S)-(-)-1,1'-联-2-萘酚作为手性识别探针,研究浓度梯度等条件对待测底物的影响,摸索最优测试条件,在核磁共振氢谱中识别9种黄烷酮天然产物的手性。

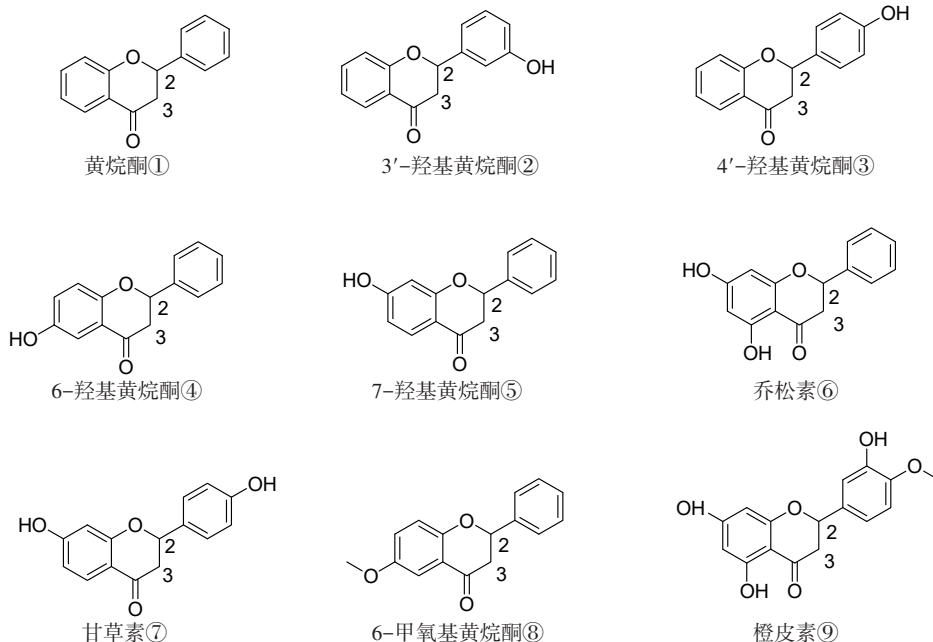


图3 9种黄烷酮类化合物的结构式
Figure 3 Structural formulas of 10 flavanone compounds

1.2 方法

1.2.1 样品干燥 将黄烷酮样品置于真空干燥箱中,20℃干燥一夜(干燥剂五氧化二磷)。

1.2.2 样品与试剂适宜测试摩尔浓度比的筛选 选取9

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 薄层层析(Thin Layer Chromatography, TLC)板(GF254,青岛海洋化工厂);真空干燥箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)仪(Bruker AV-600,德国Bruker公司);激发态圆二色谱(exciton circular dichroism, ECD)光谱仪(Chirascan,英国Applied Photophysics Ltd公司);高效液相色谱仪(Waters 2487,美国Waters公司);手性柱色谱柱(CHIRALPAK OD-H,0.46 cm I.D. × 15 cm L日本大赛璐化学工业株式会社)。

1.1.2 试剂 (S)-(-)-1,1'-联-2-萘酚(图2),简称S-BINOL(购自上海阿达玛斯试剂有限公司);黄烷酮①;3'-羟基黄烷酮②;4'-羟基黄烷酮③;6-羟基黄烷酮④;7-羟基黄烷酮⑤;乔松素⑥;甘草素⑦;6-甲氧基黄烷酮⑧;橙皮素⑨(图3,购自成都克洛玛生物科技有限公司)。

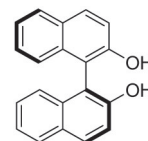


图2 (S)-(-)-1,1'-联-2-萘酚的结构式
Figure 2 Chemical structure of BINOL

个待测样品中,结构最简单、基础的黄烷酮①作为待测底物。将黄烷酮①与S-BINOL分别溶解于适量氘代氯仿,分别以梯度摩尔浓度比1:1,1:2,1:3,1:6,1:9混合。待测样品和试剂混合后,装入干净核磁管进行一

维核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)测试。

1.2.3 联二萘酚对黄烷酮类天然产物的手性识别 经过1.2.2实验筛选后,取黄烷酮①与S-BINOL分别溶解于氘代氯仿,以摩尔浓度比1:3混合,其余黄烷酮天然产物与S-BINOL分别溶解于氘代丙酮,以摩尔浓度比1:9混合,装入干净核磁管进行 $^1\text{H-NMR}$ 测试。

1.2.4 $^1\text{H-NMR}$ 分析黄烷酮类天然产物手性 分析加入S-BINOL前后的核磁氢谱,解析待测样品氢谱裂分峰型归属,并根据归属后的裂分峰面积进行积分获得非外消旋混合物样品对映异构体比例,计算对映异构体过量值(enantiomeric excess, ee)。

1.2.5 黄烷酮类天然产物的手性拆分 选择无羟基、单羟基、二羟基、三羟基取代的4种黄烷酮天然产物通过高效液相色谱仪进行手性拆分,分别是:黄烷酮①、3'-羟基黄烷酮②、甘草素⑦、橙皮素⑨。进样量为5 μL ,洗脱体系为正己烷:乙醇(体积比为50%:50%),洗脱体系流速为1 mL/min。

1.2.6 $^1\text{H-NMR}$ 分析黄烷酮类对映异构单体手性 取黄烷酮①、3'-羟基黄烷酮②、甘草素⑦、橙皮素⑨拆分后的对映异构单体,按照样品与S-BINOL试剂摩尔浓度比1:3进行测试,分析加入S-BINOL前后的核磁氢谱,解析待测样品氢谱裂分峰型归属。

1.2.7 ECD鉴定黄烷酮对映异构单体绝对构型 通过1.2.5步骤拆分出的黄烷酮对映异构单体,溶解于甲醇,稀释到0.1 mg/mL,测定其ECD,结合黄酮类圆二色谱解析经验规则进行绝对构型鉴定^[12]。

1.2.8 $^1\text{H-NMR}$ 分析黄烷酮对映异构单体手性 将通过1.2.5步骤拆分后的黄烷酮①对映异构单体和S-BINOL分别溶解于氘代氯仿,按照摩尔浓度比1:3进行混合,其余样品对映异构单体和S-BINOL分别溶解于氘代丙酮,按照摩尔浓度比1:3进行混合。分析黄烷酮对映异构单体和S-BINOL混合前后的核磁氢谱,计算样品结构中C-2和C-3位的氢谱峰H-2和H-3的化学位移,计算比较H-2和H-3化学位移之差的绝对值 $|\Delta\delta_{\text{H}2}|$ 和 $|\Delta\delta_{\text{H}3}|$ 。

2 结果

2.1 样品与试剂的最适摩尔浓度比

取黄烷酮①与S-BINOL以梯度摩尔浓度比1:1、1:2、1:3、1:6、1:9进行核磁共振测试。核磁共振氢谱显示,摩尔浓度比1:1时,样品H-3基本无分裂效果;1:6时,分裂效果出现,但不明显;1:3和1:9时,分裂效果明显(图4)。因此,样品与试剂的最适摩尔浓度比为1:3和1:9。综合裂分效果和经济性,以黄烷酮①与S-BINOL摩尔浓度比以1:3作为后续测试摩尔浓度比,其余样品与S-BINOL摩尔浓度比以1:9作为后续测试摩尔浓度比,黄烷酮①、3'-羟基黄烷酮②、甘草素⑦、橙

皮素⑨拆分后的对映异构单体与S-BINOL摩尔浓度比以1:3作为后续测试摩尔浓度比。

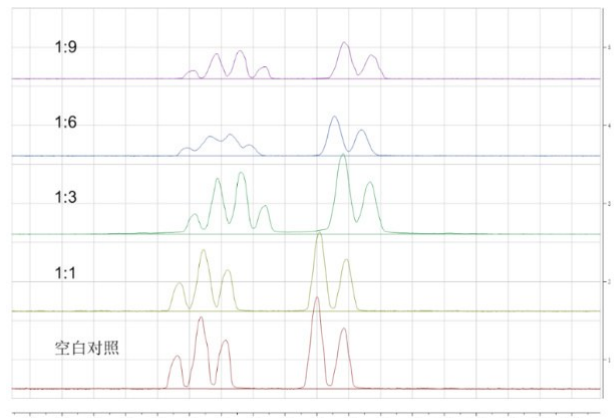


图4 S-BINOL加入前后黄烷酮①H-3核磁共振氢谱图对比
Figure 4 $^1\text{H-NMR}$ of flavanone ① H-3 before and after the addition of S-BINOL

注:由下至上分别为只有黄烷酮①,黄烷酮①与S-BINOL摩尔浓度当量比为1:1、1:3、1:6、1:9。

2.2 黄烷酮类天然产物的手性识别

2.2.1 黄烷酮①的手性识别 黄烷酮①在加入S-BINOL后,其核磁共振氢谱中C-3位对应的H-3峰向高场移动,耦合常数减小,峰型出现裂分现象;C位对应的H-2峰向高场移动,耦合常数减小(图5,表1)。根据文献^[12],可以计算出所测黄烷酮对映异构体相对构型S*/R*比为:43.29/56.71, R*的ee值为13.4%。

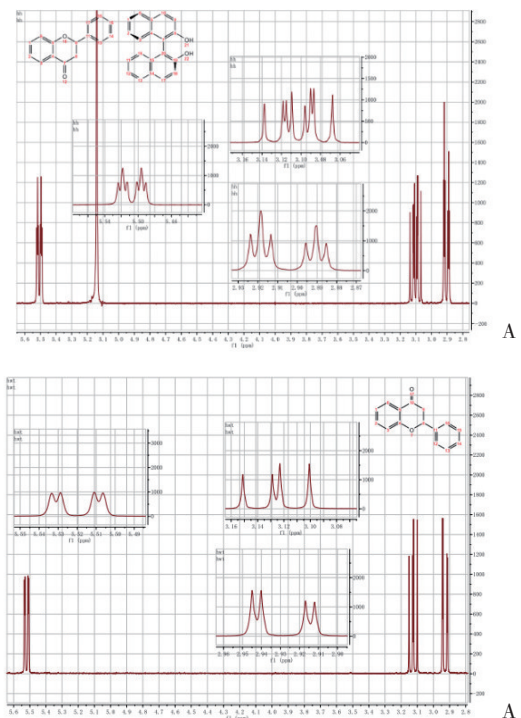


图5 S-BINOL加入前后黄烷酮①核磁共振氢谱图
Figure 5 $^1\text{H-NMR}$ of flavanone ① before and after the addition of S-BINOL

注:A:S-BINOL未加入黄烷酮①的核磁共振氢谱图;B:S-BINOL加入黄烷酮①后的核磁共振氢谱图。

表1 黄烷酮①加入S-BINOL前后其H-3与H-2的核磁¹H-NMR化学位移值

Table 1 ¹H-NMR chemical shift values of H-3 and H-2 of flavanone① before and after the addition of S-BINOL

测试类型	H3a		H3b		H2	
黄烷酮 (CDCl ₃)						
黄烷酮+S- BINOL(1:3, CDCl ₃)	S*: 2.924	R*: 2.919	S*: 3.137	R*: 3.115	S*: 5.524	R*: 5.518

2.2.2 单羟基取代黄烷酮的手性识别 3'-羟基黄烷酮

②、4'-羟基黄烷酮③、6-羟基黄烷酮④、7-羟基黄烷酮⑤均为单羟基取代黄烷酮。加入S-BINOL后,上述单羟基黄烷酮的核磁共振氢谱中H-3峰均出现裂分现象,向低场移动,耦合常数减小;同时,H-2峰均出现裂分现象,向低场移动,耦合常数减小(图6,表2)。根据氢谱结果,计算出上述单羟基黄烷酮的对映异构体相对构型S*/R*比例分别为:50.25/49.75、50.76/49.24、50.50/49.50、50.80/49.20,对映异构体R*的ee值分别为:-0.5%、-1.52%、-1%、-1.6%。

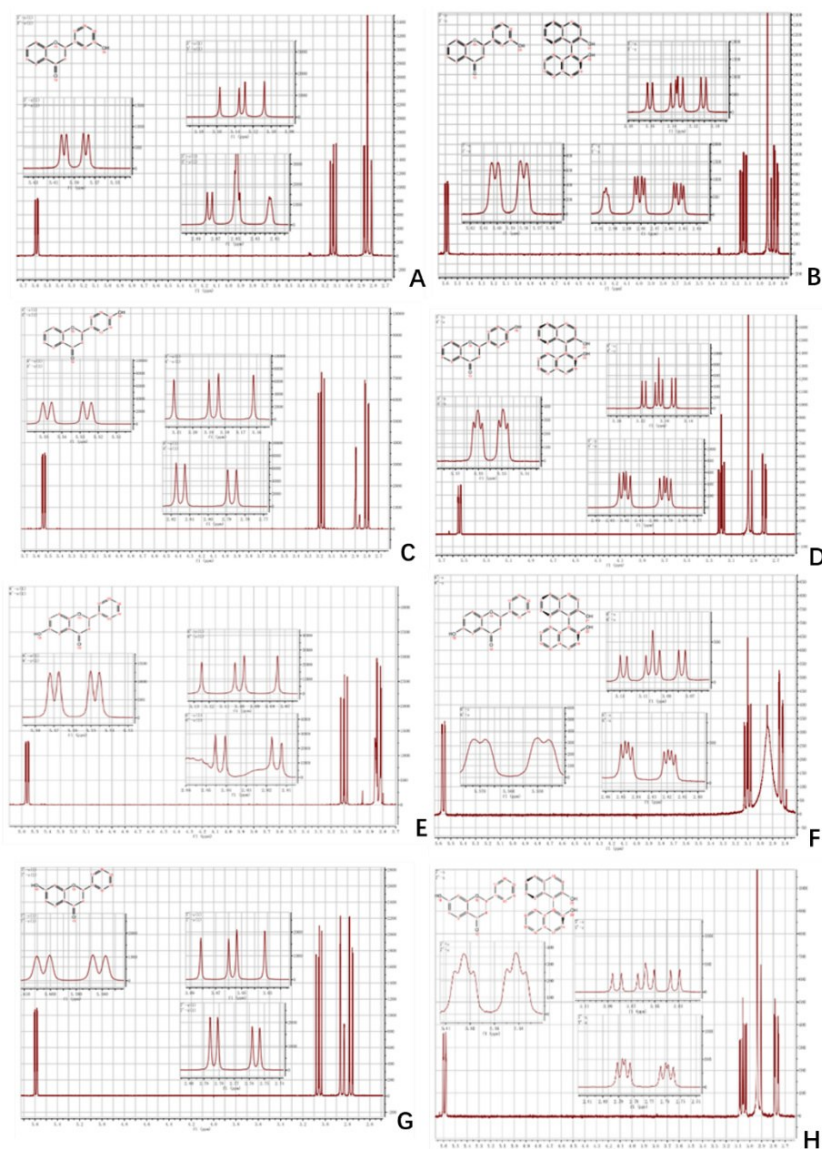


图6 S-BINOL加入前后单羟基取代黄烷酮②、③、④、⑤核磁共振氢谱图

Figure 6 ¹H-NMR of monohydroxyl substituted flavanones②,③,④,⑤ before and after the addition of S-BINOL

注:A:S-BINOL未加入单羟基取代黄烷酮②;B:S-BINOL加入单羟基取代黄烷酮②;C:S-BINOL未加入单羟基取代黄烷酮③;D:S-BINOL加入单羟基取代黄烷酮③;E:S-BINOL未加入单羟基取代黄烷酮④;F:S-BINOL加入单羟基取代黄烷酮④;G:S-BINOL未加入单羟基取代黄烷酮⑤;H:S-BINOL加入单羟基取代黄烷酮⑤。

2.2.3 双羟基取代黄烷酮的手性识别 乔松素⑥、甘草素⑦为双羟基取代黄烷酮。加入S-BINOL后,双羟基取代黄烷酮⑥、⑦核磁共振氢谱中H-3峰出现裂分现象,均向低场移动,耦合常数减小;同时,H-2峰出现裂

分现象,向低场移动,耦合常数减小(图7,表3)。根据氢谱结果,计算出所测双羟基取代黄烷酮⑥、⑦对映异构体相对构型S*/R*比例为:55.56/44.44、52.35/47.65,对映异构体R*的ee值分别为:-11.12%、-4.7%。

表2 S-BINOL加入前后单羟基取代黄烷酮②、③、④、⑤H-3与H-2的¹H-NMR化学位移值
Table 2 NMR ¹H-NMR chemical shift values of monohydroxy substituted flavanones②,③,④,⑤ H-3 and H-2 before and after the addition of S-BINOL

测试类型	H3a	H3b	H2
3'-羟基黄烷酮(氘代丙酮)	2.879	3.157	5.602
3'-羟基黄烷酮+S-BINOL(1:9,氘代丙酮)	S*: 2.884 R*: 2.879	S*: 3.162 R*: 3.141	S*: 5.604 R*: 5.599
4'-羟基黄烷酮(氘代丙酮)	2.817	3.212	5.550
4'-羟基黄烷酮+S-BINOL(1:9,氘代丙酮)	S*: 2.824 R*: 2.819	S*: 3.218 R*: 3.196	S*: 5.554 R*: 5.550
6-羟基黄烷酮(氘代丙酮)	2.845	3.125	5.572
6-羟基黄烷酮+S-BINOL(1:9,氘代丙酮)	S*: 2.850 R*: 2.845	S*: 3.130 R*: 3.208	S*: 5.572 R*: 5.568
7-羟基黄烷酮(氘代丙酮)	2.786	3.082	5.605
7-羟基黄烷酮+S-BINOL(1:9,氘代丙酮)	S*: 2.791 R*: 2.786	S*: 3.086 R*: 3.064	S*: 5.606 R*: 5.602

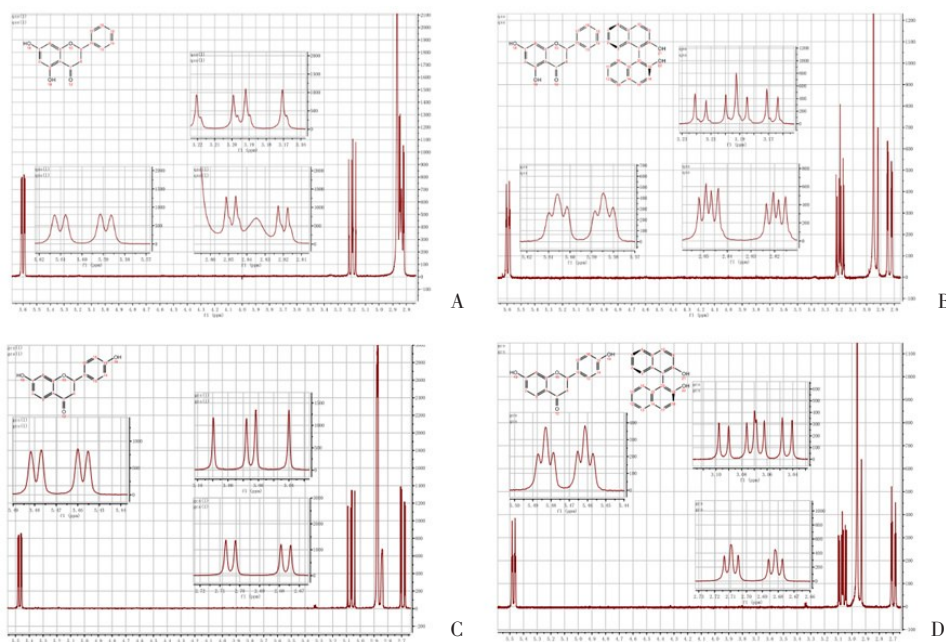


图7 S-BINOL加入前后双羟基取代黄烷酮⑥、⑦核磁共振氢谱图

Figure 7 ¹H-NMR of dihydroxy substituted flavanones⑥,⑦ before and after the addition of S-BINOL

注:A: S-BINOL未加入双羟基取代黄烷酮⑥;B: S-BINOL加入双羟基取代黄烷酮⑥;C: S-BINOL未加入双羟基取代黄烷酮⑦;D: S-BINOL加入双羟基取代黄烷酮⑦。

表3 S-BINOL加入前后双羟基取代黄烷酮⑥、⑦H-3与H-2的¹H-NMR化学位移值
Table 3 ¹H-NMR chemical shifts of H-3 and H-2 of dihydroxysubstituted flavanones⑥and⑦ before and after the addition of S-BINOL

测试类型	H3a	H3b	H2
乔松素(氘代丙酮)	2.707	3.090	5.482
乔松素+S-BINOL(1:9)	S*: 2.852 R*: 2.847	S*: 3.221 R*: 3.200	S*: 5.610 R*: 5.606
甘草素(氘代丙酮)	2.707	3.090	5.482
甘草素+S-BINOL(1:9)	S*: 2.714 R*: 2.710	S*: 3.098 R*: 3.076	S*: 5.487 R*: 5.483

2.2.4 单甲氧基取代黄烷酮的手性识别 6-甲氧基黄烷酮⑧、橙皮素⑨为单甲氧基取代黄烷酮。加入S-BINOL后,单甲氧基取代黄烷酮核磁共振氢谱中,6-甲氧基黄烷酮⑧ H-3峰出现裂分现象,裂分后的对映异构体峰分别向高、低场移动,耦合常数减小;H-2峰出现裂分现象,向高场移动,耦合常数减小。橙皮素⑨ H-3峰出现裂分现象,裂分后的对映异构体分别向高、低场移动,耦合常数减小;H-2峰出现裂分现象,向低场移动,耦合常数减小(图8,表4)。根据氢谱结果,计

算出所测单甲氧基取代黄烷酮⑧、⑨相对构型对映异构体S*/R*比为:51.81/48.19、64.51/35.49,对映异构体R*的ee值分别为:-3.62%、-29.02%。

2.3 黄烷酮类天然产物的手性拆分

通过高效液相色谱手性柱对代表性黄酮天然产物黄烷酮①、3'-羟基黄烷酮②、甘草素③、橙皮素④进行手性拆分,结果成功获得4种黄烷酮天然产物的8个R*/S*对映异构体单体化合物(图9)。从图中可以看出,4种黄烷酮天然产物都得到了很好的拆分,分别形成了8

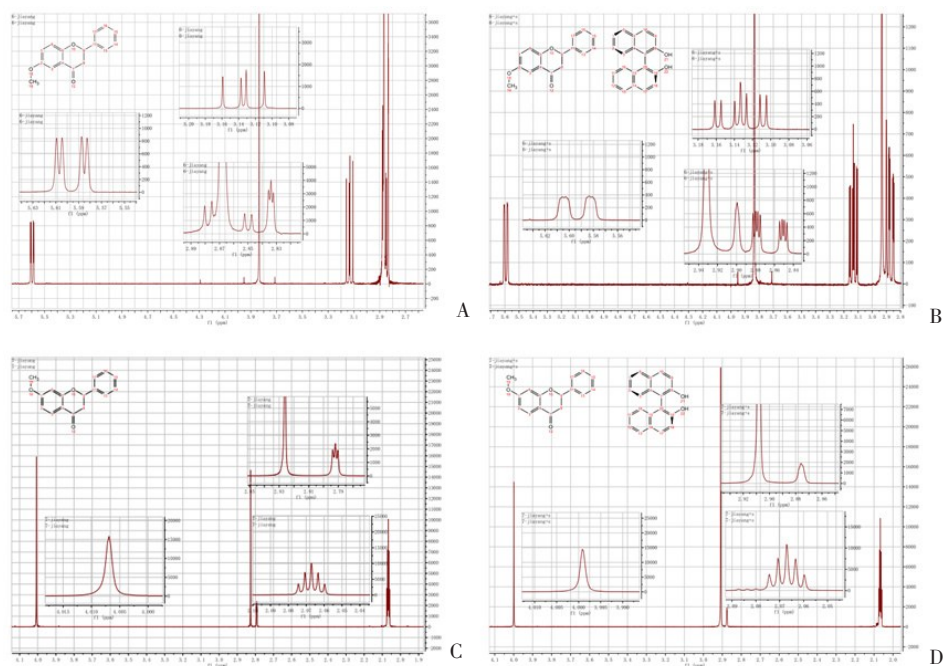


图8 S-BINOL加入前后单甲氧基取代黄酮⑧、⑨核磁共振氢谱图

Figure 8 $^1\text{H-NMR}$ of methoxy substituted flavanones⑧, ⑨ before and after the addition of S-BINOL

注:A:S-BINOL未加入单甲氧基取代黄酮⑧;B:S-BINOL加入单甲氧基取代黄酮⑧;C:S-BINOL未加入单甲氧基取代黄酮⑨;D:S-BINOL加入单甲氧基取代黄酮⑨。

表4 S-BINOL加入前后甲氧基取代黄酮⑧、⑨H-3与H-2的 $^1\text{H-NMR}$ 化学位移值

Table 4 $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of methoxy substituted flavanones⑧, ⑨ H-3 and H-2 before and after the addition of S-BINOL

测试类型	H3a	H3b		H2	
6-甲氧基黄酮(氘代丙酮)	2.880	3.159		5.609	
6-甲氧基黄酮+S-BINOL(1:9)	S*: 2.883 R*: 2.878	S*: 3.162 R*: 3.140	S*: 5.605 R*: 5.603		
橙皮素(氘代丙酮)	2.788	3.197		5.471	
橙皮素+S-BINOL(1:9)	S*: 2.796 R*: 2.791	S*: 3.206 R*: 3.185	S*: 5.479 R*: 5.475		

个对映异构体单峰。黄酮①对映异构体单峰分别出现于29.33分钟、36.82分钟,分别标示为1S*、1R*。3'-羟基黄酮②对映异构体单峰分别出现于34.89分钟、60.71分钟,分别标示为2S*、2R*。甘草素⑦对映异构

体单峰分别出现于38.09分钟、53.92分钟,分别标示为7S*、7R*。橙皮素⑨对映异构体单峰分别出现于38.70分钟、48.02分钟,分别标示为10S*、10R*。

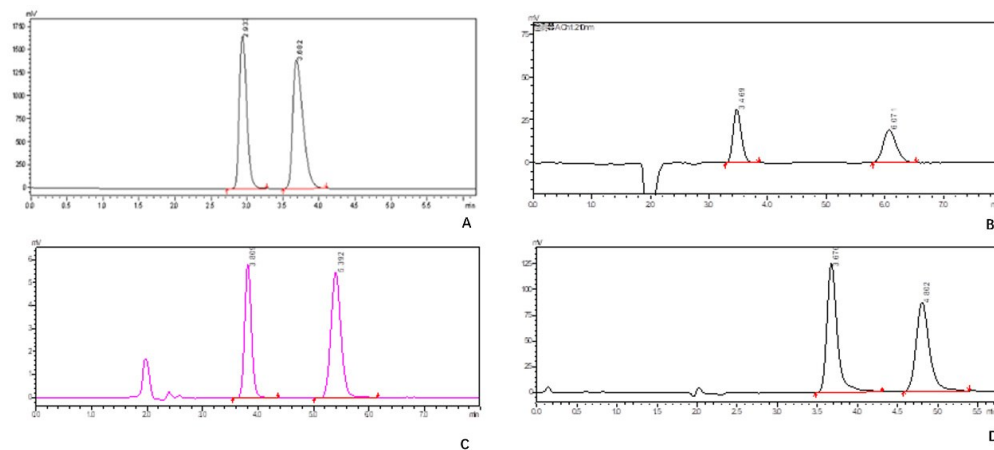


图9 高效液相手性色谱柱对黄酮①、3'-羟基黄酮②、甘草素⑦、橙皮素⑨手性拆分吸收峰谱图

Figure 9 High performance liquid chromatography (HPLC) chiral column for chiral resolution absorption peak of natural products including flavanone①, 3'-hydroxyflavanone②, glycyrrhizin⑦, and hesperetin⑨

注:A:黄酮①手性拆分吸收峰谱图;B:3'-羟基黄酮②手性拆分吸收峰谱图;C:甘草素⑦手性拆分吸收峰谱图;D:橙皮素⑨手性拆分吸收峰谱图。

2.4 鉴定黄烷酮类天然产物对映异构体的绝对构型

高效液相色谱手性柱拆分到的对映异构单体 $1S^*$ 、 $1R^*$ 、 $2S^*$ 、 $2R^*$ 、 $7S^*$ 、 $7R^*$ 、 $9S^*$ 、 $9R^*$ ，分别通过激发态圆二色谱(ECD)测试,结合黄酮类圆二色谱解析经验规则

进行绝对构型鉴定^[12]。经过测试分析得出: $1S^*$ 、 $2S^*$ 、 $7S^*$ 、 $9S^*$ 前峰绝对构型是S,可分别标示为 $1S$ 、 $2S$ 、 $7S$ 、 $9S$ (图 10), $1R^*$ 、 $2R^*$ 、 $7R^*$ 、 $9R^*$ 后峰绝对构型是R(图 11),可分别标示为 $1R$ 、 $2R$ 、 $7R$ 、 $9R$ 。

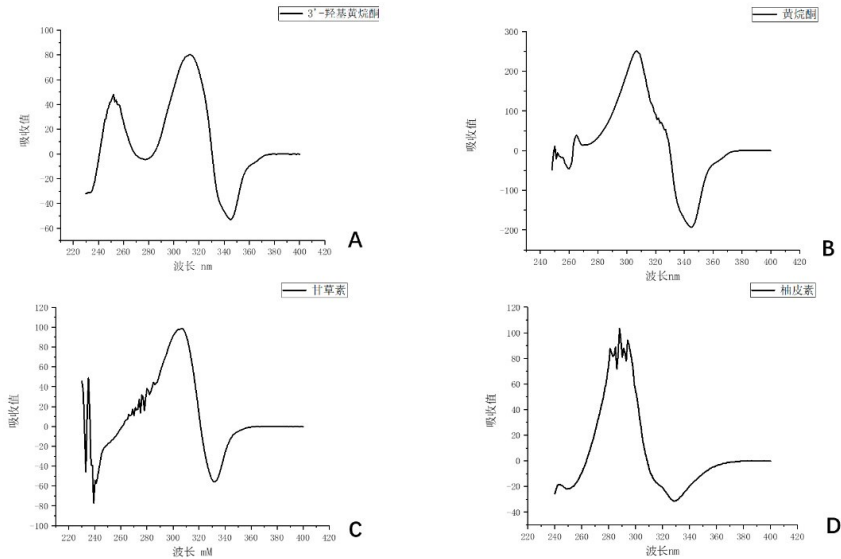


图 10 激发态圆二色谱测 $1S^*$ 、 $2S^*$ 、 $7S^*$ 、 $9S^*$ 前峰绝对构型

Figure 10 Excited-state circular dichroism measurements of $1S^*$, $2S^*$, $7S^*$, and $9S^*$ prepeak absolute configurations

注:A: $1S^*$ 前峰绝对构型; B: $2S^*$ 前峰绝对构型; C: $7S^*$ 的前峰绝对构型; D: $9S^*$ 的前峰绝对构型(从400nm到200nm的cotton效应由负到正)。

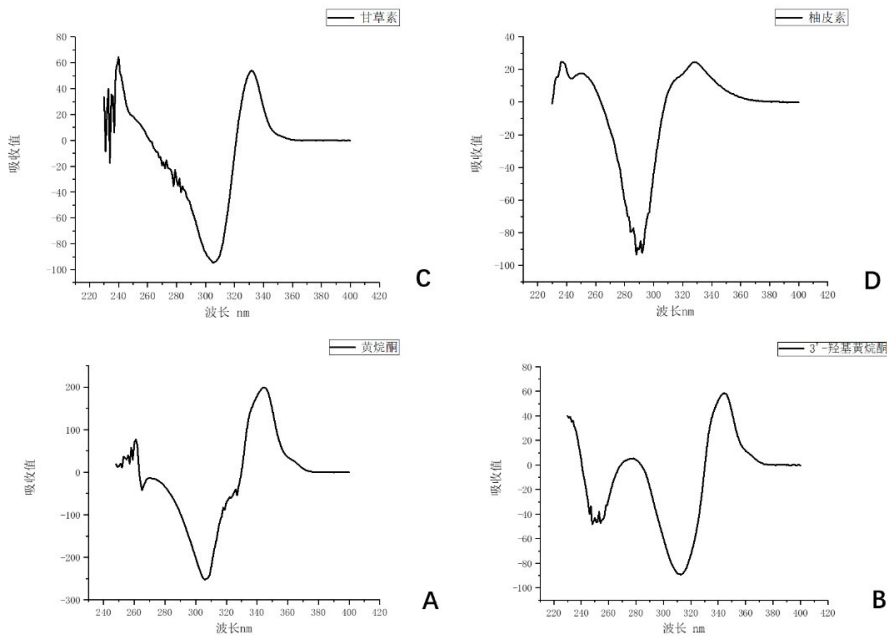


图 11 激发态圆二色谱测 $1R^*$ 、 $2R^*$ 、 $7R^*$ 、 $9R^*$ 后峰绝对构型

Figure 11 Excited state circular dichroism measurements of $1R^*$, $2R^*$, $7R^*$, $9R^*$ post peak absolute configurations

注:A: $1R^*$ 前峰绝对构型; B: $2R^*$ 前峰绝对构型; C: $7R^*$ 前峰绝对构型; D: $9R^*$ 前峰绝对构型。

3 讨论

对于黄烷酮天然产物的手性研究,已有X-射线晶体衍射、激发态圆二色谱(ECD)等技术。然而,这些技术都有一定局限,例如,两种技术都需要纯化出单体化

合物,无法对非外消旋混合物进行检测;X-射线晶体衍射测试需要对化合物进行晶体培养,对晶体制备质量要求高,耗时费力^[13-14];激发态圆二色谱(ECD)技术在黄烷酮单体化合物手性测试中有所应用,但依赖于经验数据积累^[7]和量子化学计算,依然耗时费力^[15],且只

能应用于部分类型的黄烷酮。因此,研究开发更灵敏、高效、广谱的核磁探针识别黄烷酮天然产物手性技术,具有重要的基础应用价值。

当前主要有三种类型探针用于核磁波谱手性识别:手性溶剂化试剂(chiral solvation agent, CSA)、手性镧系位移试剂(Chiral Lanthanide Shift Reagent, CLSR)、手性衍生试剂(Chiral Derivatizing Agent, CDA)。其中, CDA测试法需要与待测底物形成共价键,这在一定程度上破坏待测化合物结构,且测试完后回收化合物比较困难,不利于产量少,来源稀有的天然产物研究^[16]。CLSR测试法则需要较为稀有的镧系金属配合物作为探针,其经济实用性受到限制^[17]。CSA测试法是利用手性试剂与待测化合物形成氢键,通过待测化合物核磁波谱数据的变化来识别化合物手性的方法。相比于前两种方法,CSA测试法不破坏待测化合物的结构,在减少样品损失,试剂的经济性上更具优势^[18]。

在CSA中,联二萘酚(BINOL)类化合物,因其具有独特的轴手性、共轭萘环各向异性等特征,已日益成为核磁手性识别探针领域的重要研究对象。既往研究报道显示, BINOL的羟基可以与底物形成氢键,萘环则产生屏蔽或去屏蔽作用,达到手性识别效果^[19]。BINOL及其衍生化合物已应用于补骨脂二氢黄酮甲醚^[13]、磺胺类^[20]、胺^[21]、羧酸^[22]、亚砷^[23]、异丙嗪^[24]、奥美拉唑^[25]等活性天然产物的手性识别。然而,利用BINOL探针作为CSA对黄烷酮天然产物进行手性识别的研究还较为欠缺。在以往的研究中,仅DU等^[12]用(S)-3,3'-Dibromo-1,1'-bi-2-naphthol作为CSA,成功识别了5种天然来源黄烷酮(Bavachinin, bavachin, farrerol, hesperetin, naringenin)的手性,这5种黄烷酮均在4',7位存在羟基或甲氧基取代。

既往研究发现,自然界具有药用价值的植物天然产物中存在着大量对映异构单体组成的鲜屑混合物^[10]。植物天然产物中对映异构单体含量的变化与植物的生长状态存在联系^[26],也可能影响天然产物的生物活性。目前,对于具有重要药用价值的天然来源黄烷酮鲜屑混合物的手性判断, ee值计算,以及混合物 ee值与来源植物生长状态、生物活性的关系,相关研究还较为稀缺。另一方面,由于联二萘酚类化合物(BINOL)能与待测化合物成氢键,且有强屏蔽或去屏蔽效应,是一类较好的手性溶剂化试剂(CSA)。黄烷酮类天然产物11含有特征性的苯并吡喃酮,黄烷酮饱和的吡喃酮部分由于2位连接苯环,其2位、3位形成了孤立ABX自旋耦合系统。所以,在这类天然产物中加入联二萘酚后,由于氢键效应和芳香环的各向异性效应,使得天然产物中的对映异构体在核磁图谱里面发生差异性化学位移变化,这种差异在核磁图谱上显示为天然产物相关峰形的裂分,根据这些裂分可以识别

天然产物的手性,判断是否为鲜屑或外消旋混合物,进而根据对映异构体氢谱相关峰型的积分计算混合物 ee值,这样就可能快速、准确地识别黄烷酮类天然产物的手性。

本研究使用更经济的试剂(S)-(-)-1,1'-联-2-萘酚(S-BINOL)进一步扩大检测范围,选择具有代表性的9种单羟基、二羟基、三羟基取代黄烷酮类天然产物进行了核磁共振氢谱手性识别。首先,本研究优化出了待测样品与试剂的适宜摩尔浓度比为1:3和1:9。其次,在样品与试剂的适宜摩尔浓度比下,分析样品H-2和H-3核磁共振氢谱,结果显示9种黄烷酮类天然产物H-2和H-3的核磁共振氢谱均发生了裂分,并根据H-2和H-3的核磁共振氢谱裂分后的峰型积分,计算出了9种黄烷酮类天然产物的对映异构体S*/R*比,以及R*的 ee值。随后,从9种黄烷酮类天然产物中选择具有代表性的黄烷酮①、3'-羟基黄烷酮②、甘草素⑦、橙皮素⑨,通过高效液相色谱手性柱进行手性拆分,获得8个对映异构单体,并通过激发态圆二色谱鉴定8个对映异构单体的绝对构型。以上研究证明了S-BINOL能够识别黄烷酮类天然产物的手性,判断出黄烷酮类天然产物是鲜屑消旋混合物,并计算出鲜屑消旋混合物的 ee值,该方法选择了更经济的探针,并拓展了可测样品的范围,丰富了BINOL作为核磁手性识别探针的信息,为快速、准确识别这类天然产物的手性,分析其对映异构体单体含量的变化提供了有效路径。

此外,异黄烷酮类化合物^[27]与黄酮类化合物结构相似,也含有特征性的苯并吡喃酮ABX自旋耦合系统,因此,在以后的研究中可以扩大测试范围,增加待测样品种类,探索用BINOL试剂测试更多结构更复杂、含ABX自旋耦合系统的多手性中心天然产物,研究天然产物手性与本身的生物活性,天然来源植物生长状态的关系。

4 结论

本研究运用更经济的(S)-(-)-1,1'-联-2-萘酚(S-BINOL)首次系统性识别了9种单羟基、二羟基、三羟基取代天然来源黄烷酮,扩大了BINOL作为手性溶剂化试剂识别天然类黄烷酮底物的范围,验证了BINOL作为手性溶剂化试剂可以识别含ABX自旋耦合系统的天然来源黄烷酮的假说,有利于进一步研究和开发BINOL的天然产物手性识别机制和功能。

5 参考文献

- [1] BARRECA D, GATTUSO G, BELLOCCO E, et al. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties[J]. *Biofactors*, 2017, 43(4): 495-506.
- [2] ALAM F, MOHAMMADIN K, SHAFIQUE Z, et al. Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: a review[J]. *Phytother Res*,

- 2022,36(4): 1417-1441.
- [3] ADDI M, ELBOUZIDI A, ABID M, *et al.* An overview of bioactive flavonoids from *Citrus* fruits[J]. *Appl Sci*, 2021, 12(1): 29.
- [4] VU NK, KIM CS, HA MT, *et al.* Antioxidant and antidiabetic activities of flavonoid derivatives from the outer skins of *Allium cepa* L[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(33): 8797-8811.
- [5] 王凤. 柑橘黄酮酮缓解动脉粥样硬化的作用机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [6] 熊光, 张红燕. 黄酮酮类化合物的抗菌活性 QSAR 研究[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(29): 77-81.
- [7] 柑橘类水果含抗氧化剂黄酮酮 可预防肥胖所致疾病[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(8): 37.
- [8] 赵淑慧, 赵艳敏, 杨家俊. 黄酮酮类化合物药理活性及应用研究[J]. *粮食与食品工业*, 2016, 23(6): 50-51, 55.
- [9] 杜荣蓉. 阿尔茨海默病的临床用药分析及银杏叶制剂与柑橘黄酮酮活性成分药物治疗的系统评价[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [10] FINEFIELD JM, SHERMAN DH, KREITMAN M, *et al.* Enantiomeric natural products: occurrence and biogenesis[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(20): 4802-4836.
- [11] 杜国稳, 陈连辉. 核磁共振技术在手性识别方面的应用[J]. *化工技术与开发*, 2017, 46(4): 29-31, 51.
- [12] DU GX, LI YS, MA SN, *et al.* Efficient determination of the enantiomeric purity and absolute configuration of flavanones by using (S)-3, 3'-dibromo-1, 1'-bi-2-naphthol as a chiral solvating agent[J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(12): 2968-2974.
- [13] SLADE D, FERREIRA D, MARAIS JPJ. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(18): 2177-2215.
- [14] ZAKI MA, DHAMMIKA NANAYAKKARA NP, HETTA MH, *et al.* Bioactive formylated flavonoids from *Eugenia rigida*: isolation, synthesis, and X-ray crystallography[J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(9): 2341-2349.
- [15] POLAVARAPU PL. Structural analysis using chiroptical spectroscopy: insights and cautions[J]. *Chirality*, 2016, 28(6): 445-452.
- [16] 葛锐, 朱园园, 王海峰, 等. 手性化合物绝对构型确定的方法与应用[J]. *有机化学*, 2022, 42(2): 424-433.
- [17] SWARBRICK JD, KARAS JA, LI J, *et al.* Structure of micelle bound cationic peptides by NMR spectroscopy using a lanthanide shift reagent[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56(19): 2897-2900.
- [18] 吴超飞. 手性溶剂化法识别的研究进展[J]. *辽宁化工*, 2018, 47(6): 546-548.
- [19] 陈依萍. 基于联萘二酮骨架手性位移试剂的设计、合成与应用研究[D]. 温州: 温州大学, 2018.
- [20] GROLEAU RR, CHAPMAN RSL, LOWE JP, *et al.* BINOL as a chiral solvating agent for sulfiniminoboronic acids[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(46): 16801-16809.
- [21] CHAUDHARY P, YADAV GD, SINGH S. A simple protocol for determination of enantiopurity of amines using BINOL derivatives as chiral solvating agents via (1)H- and (19)F-NMR spectroscopic analysis[J]. *RSC Adv*, 2022, 12(39): 25457-25464.
- [22] LI GW, MA MS, WANG GF, *et al.* Efficient enantiodifferentiation of carboxylic acids using BINOL-based amino alcohol as a chiral NMR solvating agent[J]. *Front Chem*, 2020, 8: 336.
- [23] KAWANAMI T, ISHIZUKA K, FURUNO H, *et al.* Efficient 1H NMR chiral discrimination of sulfoxides caused by the dynamic nature of (R, R)-3', 3''-biBINOL[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 2017, 28(11): 1587-1590.
- [24] BOROWIECKI P. Enantiodifferentiation of promethazine using (S)-(-)-BINOL as the NMR chiral solvating agent: determination of the enantiomeric purity and performance comparison with traditional chiral HPLC[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 2015, 26(1): 16-23.
- [25] REDONDO J, CAPDEVILA A, LATORRE I. Use of (S)-BINOL as NMR chiral solvating agent for the enantiodiscrimination of omeprazole and its analogs[J]. *Chirality*, 2010, 22(5): 472-478.
- [26] ARREAGA-GONZÁLEZ HM, RODRÍGUEZ-GARCÍA G, DEL RÍO RE, *et al.* Configurational variation of a natural compound within its source species. the unprecedented case of areolal in *Piptothrix areolare*[J]. *J Nat Prod*, 2019, 82(12): 3394-3400.
- [27] YI JY, DU GX, YANG YX, *et al.* Chiral discrimination of natural isoflavanones using (R)- and (S)-BINOL as the NMR chiral solvating agents[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 2016, 27(22-23): 1153-1159.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2024-03-08;修回日期:2024-09-09)

(上接第530页)

- [8] 李幼凤. 小儿包皮环切术后全程护理干预的效果观察[J]. *中国医药指南*, 2023, 21(12): 173-176.
- [9] 刘灵芝, 和国候, 方梦娇. 小儿包皮环切术后居家康复现状分析与对策[J]. *云南医药*, 2023, 44(5): 90-92.
- [10] 白金萍, 张毓洛, 张伟, 等. 小儿包皮环切手术年龄及部分常用术式的选择[J]. *西南军医*, 2021, 23(S1): 359-362.
- [11] 于宝华, 刘丽, 孙劲松, 等. 男童包皮发育及父母对环切术接受情况的调查[J]. *中国妇幼健康研究*, 2016, 27(9): 1044-1046.
- [12] 祝怡君, 顾英娟. 包皮环切术患儿家长决策冲突现状及其影响因素分析[J]. *全科护理*, 2022, 20(6): 783-785.
- [13] 陈元浩, 李高, 曾嵩, 等. 改良三段法行一次性包皮缝合器下包皮环切术的术后疗效研究[J]. *中国临床医生杂志*, 2023, 51(8): 952-955.
- [14] 凌华林. 改良式包皮环切术和传统包皮环切术治疗小儿包皮过长和包茎的效果比较[J]. *基层医学论坛*, 2023, 27(32): 28-30.
- [15] 王振. 小儿包皮环切术围手术期的临床护理体会[J]. *饮食保健*, 2017, 4(24): 237.
- [16] 陈志军, 苏泳施, 高艳纳, 等. "全程完全无痛理念"下优质服务在儿童包皮切割缝合器手术围术期的应用. 特别健康, 2024(4): 162-164.
- [17] 张馨丹. 基于复方利多卡因乳膏的多模式镇痛方案在小儿包皮环切术中的应用[D]. 西南医科大学, 2020.
- [18] 王猛. 多元化镇痛下应用一次性包皮缝合器行包皮环切术的疗效分析[J]. *养生保健指南*, 2021(35): 16.
- [19] 王霄, 王小宁, 苏磊, 等. 在线问卷调查的质量控制方法研究[J]. *统计理论与实践*, 2023(4): 60-65.
- [20] 胡雪飞, 邱凡珂, 潘秋予, 等. 科普重点人群对高校科普基地融入地方公共文化服务的态度与需求研究[J]. *经济师*, 2020(3): 9-11.
- [21] 庞利. 高校科普服务社会的使命和路径[J]. *广州开放大学学报*, 2024, 24(2): 87-91, 111-112.
- [22] 车畅. 新媒体时代医疗健康科普的传播与管理策略研究[J]. *科技传播*, 2023, 15(23): 13-16.
- [23] 王佳丽, 张孝文, 蓝玉, 等. 健康中国视域下医学生与普通居民科普信息需求研究[J]. *中国医药科学*, 2023, 13(2): 173-177.
- [24] 周莉萍, 李晓, 王海琳, 等. 陪伴护理在舒适化快速康复流程下儿童包皮环切术中的应用[J]. *妇儿健康导刊*, 2023, 2(3): 140-142.
- [25] 李影, 孙圣文, 刘勤. 亲情快乐护理在小儿包皮环切术围术期中的应用[J]. *中国美容医学*, 2023, 32(2): 178-181.
- [26] 陈晓红, 李显著, 程波. 主被动音乐治疗对包皮环切术儿童心理及依从性的影响研究[J]. *泸州医学院学报*, 2015, 38(5): 502-504.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2024-03-12;修回日期:2024-09-02)