

山香圆叶药材中鞣花酸的提取分离与含量测定

杨小玲^{1,2}, 刘地发¹, 刘伟³, 谢宁^{1,2}, 程帆¹, 刘鹏¹, 欧阳婷¹, 吕武清^{4*}

(1. 江西青峰药业有限公司, 江西 赣州 341000; 2. 江西山香药业有限公司, 江西 赣州 341000;
3. 中国药科大学, 南京 210009; 4. 江西省中医药研究院, 南昌 330046)

[摘要] 目的: 建立山香圆叶药材中鞣花酸的制备工艺及含量测定方法, 比较不同产地山香圆叶药材中鞣花酸的含量。方法: 采用溶剂提取、大孔树脂及反相硅胶柱色谱和重结晶等提取分离手段得到鞣花酸对照品; 用高效液相色谱法测定山香圆叶药材中鞣花酸的含量, Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸(19:81), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 ℃。结果: 所得鞣花酸的纯度在 98.5% 以上, 鞣花酸进样量在 0.020 0 ~ 0.400 8 μg 线性关系良好($r = 0.999 8$), 平均回收率为 101.25%; 10 个产地的山香圆叶中鞣花酸含量在 0.37% ~ 1.56%。结论: 提取分离工艺得到的鞣花酸纯度高, 可作为含量测定用对照品; 含量测定方法简便、快速、定量准确, 可用于山香圆叶中鞣花酸的含量测定; 不同产地山香圆叶药材中鞣花酸的含量差异明显, 为山香圆叶药材的资源开发提供了参考依据。

[关键词] 山香圆叶; 鞣花酸; 提取分离; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0054-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100054

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000089.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:57

Separation and Determination of Ellagic Acid from *Turpinia arguta*

YANG Xiao-ling^{1,2}, LIU Di-fa¹, LIU Wei³, XIE Ning^{1,2}, CHENG Fan¹,
LIU Peng¹, OUYANG Ting¹, LV Wu-qing^{4*}

(1. Jiangxi Qinfeng Pharmaceutical Co. Ltd, Ganzhou 341000, China;
2. Jiangxi Shanxiang Pharmaceutical Co. Ltd, Ganzhou 341000, China;
3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
4. Jiangxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the methods for extraction, isolation and determination of ellagic acid from *Turpinia arguta*, and to compare its contents from different areas. **Method:** The ellagic acid reference substance was isolated by solvent extraction, macroporous adsorption resin, reverse phase silica gel column chromatography and recrystallization techniques. Then determined it by the method of HPLC from *T. arguta*, the chromatographic column was UltimateXB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid, the flow rate was at 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 30 ℃. **Result:** The purity of ellagic acid obtained was higher than 98.5%, and the average recovery was 101.25%. The good linearity was achieved in the range of 0.020 0-0.400 8 μg. Ellagic acid content of *T. arguta* from 10 different areas was between 0.37% and 1.56%. **Conclusion:** Ellagic acid obtained from the method was with high purity, and it can be adopted as the reference substance. This method was simple, rapid and

[收稿日期] 20131012(005)

[基金项目] 国家“十二五”重大新药创制科技重大专项(2011ZX09102-009-03)

[第一作者] 杨小玲, 本科, 高级工程师, 从事中药生产及质量控制研究, Tel: 0797-7020085, E-mail: yxl660104@163.com

[通讯作者] * 吕武清, 本科, 研究员, 从事中药新药及质量控制技术研究, Tel: 0791-88512906, E-mail: jxzyyjs@163.com

accuracy, it can be used to determine the contents of ellagic acid from *T. arguta*. The contents of ellagic acid were different in *T. arguta* from different areas. The result provided a reference for development of *T. arguta* resource.

[Key words] *Turpinia arguta*; ellagic acid; extraction and isolation; determination

山香圆叶性寒、味苦,功能清热解毒、利咽消肿^[1],具有抗炎、抗菌、镇痛以及调节免疫功能的作用,总黄酮是其主要活性成分^[2-4];鞣花酸及其衍生物具有抗氧化、抗癌变、抗突变作用,还兼备抗菌、抗病毒作用,也是发挥山香圆功效的物质基础之一^[5-8]。山香圆属中包括 18 种及其变种山香圆^[9],《中国药典》2010 年版一部收录了锐尖山香圆及其变种。锐尖山香圆的分布非常广泛,不同产地的山香圆叶中女贞苷和野漆树苷含量参差不齐^[10]。本文采用简单有效的方法提取分离精制了山香圆叶中的鞣花酸,并采用高效液相色谱法对 10 个产地山香圆叶药材中鞣花酸的含量进行了测定和比较,为山香圆叶药材质量标准的制定及资源开发利用提供参考依据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(Agilent),ML204 型分析天平(德国,赛托利斯),Bruker AV-500 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司),Micro-mass Qauttro icro ES-CL 质谱仪。

山香圆叶药材采于江西安远(20130715)、江西崇义(20130717)、福建三明(20130825)、重庆酉阳(20130627)、湖南桃川(20130629)、湖南怀化(20130703)、湖北来凤(20130624)、广西全州(20130711)、广西车田(20130713)、广东连州(20130823)等 10 个产地。经江西省中医药研究院虞金宝研究员鉴定为省沽油科植物山香圆 *Turpinia arguta* Seem. 的干燥叶。

AB-8 型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),CG161 型大孔树脂(美国罗门哈斯公司),ODS-C₁₈ 色谱柱(50 μm,日本 YMC 公司),乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇、磷酸均为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 鞣花酸的提取分离 山香圆叶(9 kg)粉碎,用 60% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并提取液,浓缩至 0.1 g·mL⁻¹,滤过,通过 AB-8 型大孔树脂柱,依次用水、20% 乙醇、50% 乙醇、95% 乙醇洗脱,收集 50% 乙醇洗脱液,浓缩,浓缩液通过 CG161 型大孔树脂柱,依次用水、20% 乙醇、40% 乙醇洗脱,收集 40% 乙醇洗脱部分,浓缩,浓缩液经 ODS-C₁₈ 柱色谱得目标物粗品,用甲醇重结晶后

得淡黄色粉末。经高效液相色谱归一法测定,其纯度 ≥98.5%。

2.2 鞣花酸的结构鉴定 淡黄色粉末(甲醇)。EI-MS m/z 301 [M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ:7.47 (2H, s, H-5,5');¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ:159.0 (C-7,7'), 148.0 (C-4,4'), 139.5 (C-3,3'), 136.3 (C-2,2'), 112.2 (C-1,1'), 110.1 (C-5,5'), 107.5 (C-6,6')。以上数据与文献报道^[11]一致,故鉴定此化合物为鞣花酸。

2.3 鞣花酸的含量测定

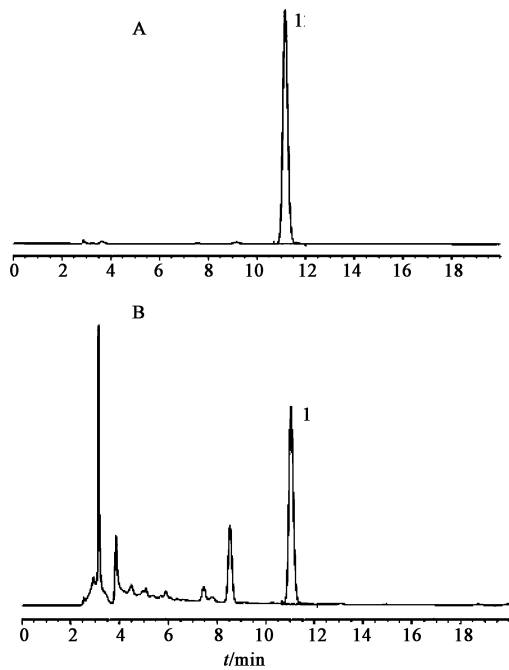
2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取经减压干燥后的鞣花酸对照品 20.04 mg,置 200 mL 量瓶中,加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液;再量取贮备液 10 mL 置 50 mL 量瓶中,加 50% 乙醇稀释至刻度,摇匀,即得(20.04 mg·L⁻¹)。

2.3.2 供试品溶液的制备 取山香圆叶粉末(过三号筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,用 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(19:81),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,鞣花酸对照品用甲醇溶解制成 10.0 mg·L⁻¹ 的溶液,经紫外扫描得出鞣花酸最大吸收波长为 254 nm,故检测波长为 254 nm;进样量 10 μL。在上述色谱条件下,鞣花酸能获得好的分离度与峰对称性(图 1)。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取 2.3.1 项下鞣花酸对照品贮备液 1.0,3.0,6.0,10.0,12.0,15.0,20.0 mL 置 50 mL 量瓶中,加 50% 乙醇稀释定容至刻度,摇匀,按 2.3.3 项下色谱条件测定,分别进样 10 μL,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程得 $Y = 1.018 1 \times 10^4 X - 175.06$ ($r = 0.999 8$),结果表明鞣花酸进样量在 0.020 0~0.400 8 μg 具有良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密吸取山香圆叶药材(湖南怀化)供试品溶液 10 μL,按 2.3.3 项下色谱条件测定,重复进样 6 次,记录鞣花酸的峰面积,计算鞣花酸的含量、平均值及 RSD。结果鞣花酸的平均含量为 0.95%,RSD 0.46%,表明该仪器用于本品的



A. 对照品; B. 供试品; 1. 鞣花酸

图 1 山香圆叶 HPLC

表 1 山香圆叶药材中鞣花酸加样回收率试验

取样量 /mg	样品中 质量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
50.42	0.478 0	0.990 7	102.34	101.25	1.12
50.48	0.478 6	0.991 7	102.42		
50.25	0.476 4	0.974 3	99.38		
50.37	0.477 5	0.981 7	100.64		
50.26	0.476 5	0.983 6	101.22		
50.36	0.477 4	0.985 8	101.48		

注:加入量均为 0.501 0 mg。

表 2 不同产地山香圆叶药材中鞣花酸的含量(以干燥品计) %

产地	鞣花酸	产地	鞣花酸
江西安远(20130715)	0.48	湖北来凤(20130624)	1.29
江西崇义(20130717)	0.57	重庆酉阳(20130627)	1.08
福建三明(20130825)	0.37	广西全州(20130711)	0.94
湖南怀化(20130703)	1.09	广西车田(20130713)	0.79
湖南桃川(20130629)	1.15	广东连州(20130823)	1.56

定量分析具有良好的精密度。

2.3.6 稳定性试验 取山香圆叶药材(湖南怀化)供试品溶液,按 2.3.3 项下色谱条件,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 各进样 1 次,记录鞣花酸的峰面积,计算鞣花酸的含量、平均值及 RSD。结果鞣花酸的平均含量为 0.96%, RSD 0.37%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 取山香圆叶药材(湖南怀化)6 份,精密称定,按 2.3.2 项下供试品溶液的制备方法制备,按 2.3.3 项下色谱条件测定,记录鞣花酸的峰面积,计算鞣花酸的含量、平均值及 RSD。结果鞣花酸的平均含量为 0.95%, RSD 1.70%,表明方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取山香圆叶药材(湖南怀化,鞣花酸含量为 0.948%)6 份,每份 0.05 g,精密称定,分别加入鞣花酸对照品贮备液 5 mL,按 2.3.2 项下供试品溶液的制备方法制备,按 2.3.3 项下色谱条件测定,记录鞣花酸的峰面积,计算鞣花酸的回收率及 RSD。结果鞣花酸的平均回收率为 101.25%, RSD 1.12%,表明该方法回收率良好,见表 1。

2.3.9 样品测定 分别精密称取 10 个产地的山香圆叶药材各 3 份,按 2.3.2 项下供试品溶液的制备方法制备,按 2.3.3 项下色谱条件测定,计算各产地鞣花酸的含量,结果见表 2。

3 讨论

本文考察了热回流和超声提取对鞣花酸含量测定的影响,结果表明热回流提取法提取更完全,提取效果明显优于超声提取,故选择了热回流法。综合考察了以水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇,以及 30% 甲醇、50% 甲醇、甲醇作为提取溶剂,提取时间分别为 0.5, 1.0, 1.5 h 时的提取效率,结果表明提取溶剂对鞣花酸的含量影响较大,而提取时间影响较小,综合考虑,提取工艺确定为 50% 乙醇加热回流 1 h。

本文所测结果显示 10 个产地山香圆叶药材中鞣花酸的含量存在显著差异。江西和福建产山香圆叶中鞣花酸的含量明显低于重庆、湖南、湖北、广西、广东等 7 个地区产该药材中鞣花酸的含量。不同产地山香圆叶中鞣花酸的含量差异与树龄、气候、采收季节有何关系有待于进一步研究。

《中国药典》2010 年版一部规定山香圆叶以女贞苷、野漆树苷作为含量测定指标成分^[1],研究表明^[11-12],能满足药典标准的山香圆叶主产于江西赣南地区,而其他产区(如广东、广西、福建及湖北)的山香圆叶中女贞苷和野漆树苷的含量较低甚至微量。本文研究结果表明,全国各主要产地的山香圆叶中均含有较高含量的鞣花酸,为山香圆叶药材质量标准的制定及资源开发利用提供依据。

不同产地龙脑樟叶挥发油成分的 GC-MS 分析

张宇思¹, 王成章^{1,2*}, 周昊^{1,2}, 陈虹霞¹, 叶建中¹, 陶冉¹

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 生物质化学利用国家工程实验室, 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 南京 210042;
2. 中国林业科学研究院林业新技术研究所, 北京 100091)

[摘要] 目的: 分析比较江西吉安、湖南新晃、浙江淳安、福建厦门 4 个产地龙脑樟叶挥发油的化学成分。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取龙脑樟叶挥发油, 运用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对其化学成分进行分析。结果: 江西吉安产龙脑樟叶挥发油共鉴定出 44 种成分, 占总含量的 99.16%, 其中右旋龙脑占 53.17%; 湖南新晃产龙脑樟叶挥发油共鉴定出 33 种成分, 占总含量的 97.84%, 其中右旋龙脑占 32.71%; 浙江淳安产龙脑樟叶挥发油共鉴定出 34 种成分, 占总含量的 98.1%, 其中右旋龙脑占 41.89%; 福建厦门产龙脑樟叶挥发油共鉴定出 25 种成分, 占总含量的 99.58%, 其中右旋龙脑占 60.74%。结论: 不同产地龙脑樟叶挥发油成分在组成和含量上有一定的差异。

[关键词] 龙脑樟叶; 不同产地; 挥发油; 右旋龙脑; 气质联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0057-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100057

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000090.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:58

Chemical Components of Volatile Oil in *Cinnamomum camphora* chvar borneol Leaf from Different Habitats by GC-MS

ZHANG Yu-si¹, WANG Cheng-zhang^{1,2*}, ZHOU Hao^{1,2}, CHEN Hong-xia¹, YE Jian-zhong¹, TAO Ran¹

[收稿日期] 20131227(011)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2011BAD33B02); 对俄科技合作专项(2014DFR31300)

[第一作者] 张宇思, 博士生, 从事天然产物化学研究, E-mail: nmczhang@126.com

[通讯作者] *王成章, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事天然产物研究与利用, E-mail: wangczhs@sina.com

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 28.
- [2] 张磊, 李俊, 余世春, 等. 山香圆总黄酮的抗炎作用[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(3): 185.
- [3] 孙敬雷, 刘秀荣, 武海艳, 等. 山香圆化学成分及药理活性的研究进展[J]. 食品与药品, 2011, 13(11): 441.
- [4] 张磊, 李俊, 余世春, 等. 山香圆总黄酮对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2006, 41(5): 539.
- [5] John L M, Gene J G. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review[J]. Hort Science, 1991, 26(1): 10.
- [6] Osawa T, Ide A, Su J D, et al. Inhibition of lipid peroxidation by ellagic acid[J]. J Agric Food Chem, 1987, 35(5): 808.
- [7] Su J D, Osawa T, Kawakishi S, et al. Tannin antioxidants from *Osbeckia Chinensis* [J]. Phytochemistry, 1988, 27(5): 1315.
- [8] Ohemeng K A, Schwender C F, Fu K P, et al. DNA gyrase inhibitory and Antibacterial activity of some flavones[J]. Bioorg Med Chem Lett, 1993, 3(2): 225.
- [9] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 1 卷[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 26.
- [10] 孙敬勇, 孙洁, 武海艳, 等. 山香圆叶化学成分研究[J]. 食品与药品, 2012, 14(5): 162.
- [11] 林佳, 李琰, 徐丽珍. 石榴叶的化学成分研究[J]. 中南药学, 2005, 3(2): 70.
- [12] 王爱民, 王海军, 等. UPLC 测定鸡眼睛药材中鞣花酸类化合物的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 32325.

[责任编辑 顾雪竹]