

# 尖尾枫中毛蕊花糖苷的分离鉴定及含量测定

高微, 刘布鸣\*, 陈明生, 黄艳

(广西中医药研究院 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

**[摘要]** 目的:对尖尾枫中毛蕊花糖苷进行提取分离鉴定及含量测定。方法:采用95%乙醇对尖尾枫药材进行提取,利用柱色谱和制备型高效液相色谱法对提取物进行分离纯化,通过理化性质鉴别和波谱数据鉴定其结构;采用高效液相色谱法测定尖尾枫中毛蕊花糖苷的含量,ECOSIL ODS-EXTEND 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长334 nm,柱温25℃,进样量10 μL。结果毛蕊花糖苷在0.051 9~0.829 6 μg线性关系良好( $r=0.999 7$ ),平均加样回收率为99.13%,RSD 1.80%。结论:毛蕊花糖苷为首次从该植物中分离得到;该测定方法简便可行,重复性好,为尖尾枫药材的质量控制提供了可靠的检测方法。

**[关键词]** 尖尾枫;毛蕊花糖苷;分离鉴定;含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0060-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014210060

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1100.001.html>

**[网络出版时间]** 2014-09-15 11:00

## Isolation and Determination of Verbascoside from *Callicarpa longissima*

GAO Wei, LIU Bu-ming\*, CHEN Ming-sheng, HUANG Yan

(Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science,

Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the isolation and determination of verbascoside from *Callicarpa longissima*. **Method:** Verbascoside was extracted by 95% ethanol, isolated and purified by column chromatography and PHPLC from the stem and branch of *C. longissima*. A HPLC method was set up to determine the content of verbascoside in *C. longissimae*, using ECOSIL ODS-EXTEND (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, and acetonitrile-0.2% phosphoric acid water solution as the mobile phase, the UV detection wavelength was at 334 nm, with the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> at room temperature. **Result:** A good linear was obtained in the range of 0.051 9-0.829 6 μg and the average recovery was 99.13% (RSD 1.80%). **Conclusion:** Verbascoside was isolated from *C. longissima* for the first time. The method can provide useful references to quality control of *C. longissima*.

**[Key words]** *Callicarpa longissima*; verbascoside; isolation; determination

尖尾枫系广西特色瑶族药“虎牛钻风”中七十二风的粘手风<sup>[1]</sup>,常用于治疗风湿骨痛、跌打损伤、腹痛、产后风、骨折、毒蛇咬伤等<sup>[2]</sup>。本课题组已对尖尾枫脂溶性成分以及三氯甲烷部位化学成分进行

了研究<sup>[3]</sup>,发现尖尾枫中含有萜类、黄酮类、脂肪酸类等化学成分,Liu等<sup>[4]</sup>人从尖尾枫中分离出4个新的二萜类化合物。本课题组从尖尾枫的乙酸乙酯部位分离得到了毛蕊花糖苷化合物,并对尖尾枫中

**[收稿日期]** 20131121(009)

**[基金项目]** 广西青年基金项目(桂科青0991039)

**[第一作者]** 高微,硕士,助理研究员,从事中药、天然药化学成分与质量标准研究,Tel:0771-5883405,E-mail:gao.w1236@163.com

**[通讯作者]** \*刘布鸣,研究员,从事中药、天然药化学成分与质量标准研究,Tel:0771-5883405,E-mail:liubuming@aliyun.com

毛蕊花糖苷的含量进行了测定。为有效地开发和利用尖尾枫药材地上部分,更好的对尖尾枫药材地上部分的质量进行控制提供了方法研究。

## 1 材料

AM-400 MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司),UV2550 型紫外-可见分光光度仪(日本岛津公司),UC3250 型制备型高效液相色谱仪、UC3282 型高效液相色谱仪(包括 UC3292 型紫外检测仪,WM2010 型通用多媒体色谱工作站,威玛龙色谱科技仪器有限公司),Sephadex LH-20 凝胶柱(Pharmacia 公司),柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂)。毛蕊花糖苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111530-201208),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

尖尾枫药材地上部分,采集于广西省桂平市木乐镇、鸡荆镇、梧州藤县。经广西中医药研究院何开家主任药师鉴定为马鞭草科尖尾枫 *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr. 的全草。

## 2 方法与结果

**2.1 提取与分离** 取尖尾枫药材地上部位,阴干,粉碎,取 14 kg,95% 乙醇回流提取 3 次,过滤,合并提取液,滤过,减压回收乙醇,得浸膏 1 320 g,将浸膏分散于水中,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯部位挥去溶剂得浸膏 86 g。取乙酸乙酯部位浸膏与硅胶拌样,湿法装柱,上样,进行硅胶柱色谱分离,三氯甲烷-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱,共得到 31 个流份。在三氯甲烷-甲醇(3:1)的洗脱部分得到白色粗粉末,经 Sephadex LH-20 凝胶柱和制备型高效液相色谱分离得到化合物 A(50 mg)。

**2.2 化合物鉴定** 白色无定形粉末,分子式  $C_{29}H_{36}O_{15}$ 。 $^1H-NMR$ (400 MHz,  $D_2O$ ),结果提示芳香区共 8 个氢,  $\delta_H$  6.85(1H, d,  $J = 2.0$  Hz),  $\delta_H$  6.84(1H, d,  $J = 8.0$  Hz),  $\delta_H$  6.73(1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), 这 3 个氢组成一个 ABX 系统,  $\delta_H$  7.17(1H, d,  $J = 2.0$  Hz),  $\delta_H$  7.11(1H, dd,  $J = 8.4, 2.0$  Hz),  $\delta_H$  6.93(1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 这 3 个氢也组成一个 ABX 系统,说明分子中存在两个苯环,且均为三取代。  $\delta_H$  7.67(1H, d,  $J = 16$  Hz),  $\delta_H$  6.37(1H, d,  $J = 16$  Hz) 为一典型的反式双键上的氢信号。  $\delta_H$  2.82(2H, t,  $J = 7.2$  Hz) 为苯乙醇苷元 7 位上的两个氢的特征信号,  $\delta_H$  5.10(1H, d,  $J = 1.6$  Hz),  $\delta_H$  4.44(1H, d,  $J = 8.0$  Hz) 分别为鼠李糖、葡萄糖端基氢信号,  $\delta_H$  1.04(3H, d,  $J = 6.4$  Hz) 鼠李糖上甲基氢信号。 $^{13}C-NMR$ (100 MHz,  $D_2O$ ) 谱中共出现 29 个碳,其中苯乙醇苷元  $\delta_C$ :

131.5( $C_1$ ), 116.3( $C_2$ ), 142.4( $C_3$ ), 143.9( $C_4$ ), 116.8( $C_5$ ), 121.3( $C_6$ ), 34.5( $C_7$ ), 71.2( $C_8$ ); 咖啡酰基  $\delta_C$ : 126.8( $C_1$ ), 115.4( $C_2$ ), 144.5( $C_3$ ), 147.5( $C_4$ ), 116.8( $C_5$ ), 123.0( $C_6$ ), 147.5( $C_7$ ), 113.8( $C_8$ ), 168.3( $C_9$ ); 葡萄糖基  $\delta_C$ : 102.1( $C_1$ ), 74.0( $C_2$ ), 80.8( $C_3$ ), 68.9( $C_4$ ), 73.7( $C_5$ ), 60.2( $C_6$ ); 鼠李糖基  $\delta_C$ : 101.6( $C_1$ ), 69.5( $C_2$ ), 70.4( $C_3$ ), 71.9( $C_4$ ), 70.0( $C_5$ ), 17.2( $C_6$ )。光谱数据与文献<sup>[7]</sup>报道基本一致。取化合物 A 和毛蕊花糖苷对照品进行薄层色谱及高效液相色谱比较,二者在薄层色谱中相同位置处有斑点,高效液相色谱图相同时间处出峰。因此鉴定化合物 A 为毛蕊花糖苷。

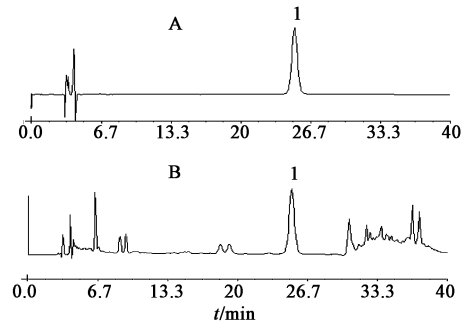
## 2.3 定量分析

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取毛蕊花糖苷对照品适量,加 50% 甲醇配制成  $1.037 g \cdot L^{-1}$  的对照品储备液。精密量取上述储备液,加 50% 甲醇稀释成  $103.7 mg \cdot L^{-1}$  的毛蕊花糖苷对照品溶液。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 取尖尾枫叶部位粉末 0.2 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声提取 1 h,放冷至室温,补足质量,摇匀,过滤,再用  $0.45 \mu m$  微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

**2.3.3 色谱条件** ECOSIL ODS-EXTEND 色谱柱( $4.6 mm \times 250 mm, 5 \mu m$ );流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~25 min, 18%~17% A; 25~27 min, 17%~25% A; 27~40 min, 25% A),流速  $1.0 mL \cdot min^{-1}$ ,检测波长 334 nm,柱温  $25^\circ C$ ,进样量  $10 \mu L$ 。

**2.3.4 专属性试验** 取对照品溶液按色谱条件进样,记录色谱图,结果供试品溶液色谱图,在与毛蕊花糖苷对照品相同时间处出峰,理论塔板数大于 5 000,分离度大于 2(见图 1)。



1. 毛蕊花糖苷

图 1 对照品(A)和尖尾枫叶供试品(B)HPLC

**2.3.5 线性关系考察** 精密量取  $103.7 mg \cdot L^{-1}$  的

毛蕊花糖苷对照品溶液 0.5, 2.0, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成系列浓度的对照品溶液, 在色谱条件下测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制标准曲线。回归方程为  $Y = 1.6 \times 10^6 X + 7.5 \times 10^4$  ( $r = 0.9997$ ), 表明毛蕊花糖苷在 0.0519 ~ 0.8296  $\mu\text{g}$  线性关系良好。

**2.3.6 精密度试验** 取供试品溶液, 按色谱条件连续进样 6 次, 测定, 峰面积 RSD 0.99%, 表明精密度良好。

**2.3.7 稳定性试验** 取供试品溶液, 按色谱条件于 12 h 内每间隔 2 h 进样, 结果毛蕊花糖苷面积的 RSD 2.25%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

**2.3.8 重复性试验** 精密称取尖尾枫叶粉末 0.2 g, 照供试品溶液的制备方法制备 6 份, 按色谱条件进行测定。结果毛蕊花糖苷平均质量分数 16.46  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 1.8%。

**2.3.9 加样回收率试验** 取已知毛蕊花糖苷含量的尖尾枫叶粉末 0.1 g, 共 9 份, 精密称定, 置于 1~9 号锥形瓶中, 分别精密加入毛蕊花糖苷对照品溶液 ( $1.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.2, 1.5, 1.8 mL, 按照供试品溶液的制备方法制备, 按色谱条件测定。结果见表 1。

表 1 毛蕊花糖苷加样回收率试验

称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.106	1.742	1.32	3.060	99.82		
0.103	1.699	1.32	2.996	98.22		
0.108	1.770	1.32	3.104	101.0		
0.105	1.722	1.65	3.328	97.31		
0.106	1.747	1.65	3.382	99.12	99.13	1.80
0.102	1.673	1.65	3.262	96.31		
0.102	1.680	1.98	3.678	100.9		
0.103	1.689	1.98	3.696	101.3		
0.105	1.719	1.98	3.661	98.08		

**2.3.10 不同产地样品** 精密称取不同产地尖尾枫叶粉末各 0.2 g, 按供试品溶液的制备方法制备, 按色谱条件测定, 结果毛蕊花糖苷含量分别为桂平木乐镇 12.39  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 桂平鸡荆镇 11.22  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 梧州藤县 15.45  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

**2.3.11 不同药材部位样品** 分别精密称取梧州藤县药材的茎、枝叶、花粉 0.2 g, 按供试品溶液的制

备方法制备, 按色谱条件测定, 结果毛蕊花糖苷质量分数分别为茎 1.558  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 枝叶 14.79  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 花 2.734  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

### 3 讨论

依次选用甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇为提取溶剂进行比较, 结果 4 种溶剂提取率差别不大, 但用 50% 甲醇提取干扰杂质较少。考察了水浴回流和超声处理 2 种提取方法, 两种方法提取率差别不明显, 而超声提取方法简单易操作, 故采用超声提取。对超声提取 0.5, 1, 1.5, 2 h 进行了比较, 结果表明超声提取 1 h 基本可以将供试品中的毛蕊花糖苷提取完全。

曾参照《中国药典》紫珠叶中毛蕊花糖苷含量测定方法<sup>[6]</sup>, 以乙腈-0.5% 磷酸水溶液 (17:83) 为流动相等梯度洗脱, 结果此方法对于尖尾枫叶材分离效果不理想, 耗费流动相和时间。通过反复试验, 选用乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相, 采用梯度洗脱, 结果色谱峰峰形尖锐, 毛蕊花糖苷特征峰在 25 min 左右出峰, 可与其他杂质峰较好的分离, 样品检测 40 min 完成, 节省了实验成本和时间。

比较了 3 个产地的尖尾枫中毛蕊花糖苷的含量, 其中以梧州藤县最高 (15.45  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ); 同时比较了同一产地尖尾枫不同药材部位毛蕊花糖苷含量, 结果茎、叶、花三者在此色谱条件下色谱峰相似, 均可测出毛蕊花糖苷, 但其含量差别较大, 以叶中含量最高, 茎和花的毛蕊花糖苷含量较低。

### [参考文献]

[1] 戴斌, 李钊东. “虎牛钻风”类传统瑶药的调查研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1998(2):28.

[2] 江苏新医药学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986:875.

[3] 高微, 刘布鸣, 冯军, 等. 尖尾枫脂溶性成分分析[J]. 广西科学, 2012, 19(2):147.

[4] Liu Y W, Cheng Y B, CHIA-C L, et al. Bioactive diterpenes from *Callicarpa longissima* [J]. J Nat Prod, 2012, 75:689.

[5] Toshio Miyase, Akira Koizumi, Akira Ueno, et al. Studies on the Acyl Glycosides from *Leucoseptum japonicum* (MIQ.) Kitamura et Murata [J]. Chem Pharm Bull, 1982, 30(8):2732.

[6] 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, 2010:320.

[责任编辑 顾雪竹]