杉寄生中酚性化合物的提取分离及含量测定

莫凯荃[1]，许沛虎[1]，卢文杰[2,3*]，黄周锋[2]，黄建猷[2]，陆国寿[2]
(1. 武汉理工大学，武汉 430070；2. 广西中医药研究院，南宁 530022；
3. 广西中药质量标准研究重点实验室，南宁 530022)

[摘要] **目的**:建立杉寄生药材中鞣花酸和 3,3′-二甲氧基鞣花酸的提取分离及含量测定方法。**方法**:采用溶剂提取、硅胶柱色谱和重结晶等提取分离手段得到酚性化合物鞣花酸和 3,3′-二甲氧基鞣花酸;建立其 HPLC 含量测定方法:采用 Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2%磷酸水溶液(47∶53),流速 0.8 $mL\cdot min^{-1}$,检测波长 254 nm,柱温 25 ℃。**结果**:鞣花酸在 0.030 6~0.551 2 μg 与峰面积呈良好的线性关系(r=0.999 8),平均回收率为 101.25%,RSD 0.9%;3,3′-二甲氧基鞣花酸在0.018 9~0.339 5 μg 与其峰面积呈良好的线性关系(r=0.999 8),平均回收率 101.34%,RSD 1.5%。**结论**:鞣花酸和 3,3′-二甲氧基鞣花酸为首次从杉寄生药材中分得,并建立了其 HPLC 含量测定方法,该方法简便、快速、具有较好的稳定性和重复性,可用于上述 2 种化合物含量同时测定。

[关键词] 杉寄生；鞣花酸；3，3′-二甲氧基鞣花酸；提取分离
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)03-0075-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030075
[网络出版地址] http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160928.1611.004.html
[网络出版时间] 2016-9-28 16:11

Separation and Determination of Phenolsin *Macrosolen cochinchinensis*

MO Kai-quan[1], XU Pei-hu[1], LU Wen-jie[2,3*], HUANG Zhou-feng[2],
HUANG Jian-you[2], LU Guo-shou[2]
(1. *Wuhan University of Technology*, *Wuhan* 430070, *China*;
2. *Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences*, *Nanning* 530022, *China*;
3. *Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards*, *Nanning* 530022, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish the method for extraction, isolation and determination of ellagic acid and 3, 3-di-*O*-methylellagic acid from *Macrosolen cochinchinensis*. **Method**: The ellagic acid and 3, 3-di-*O*-methylellagic acid were isolated by solvent extraction, silica gel column chromatography and recrystallization techniques. Then HPLC content determination method was established: Eclipse XDB-C_{18} chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with methanol-0.2% phosphoric acid (47∶53) as the mobile phase; the flow rate was 0.8 $mL\cdot min^{-1}$; UV detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was 25 ℃. **Result**: Ellagic acid showed good linear relationship within 0.030 6-0.551 2 μg (r=0.999 8) and its average recovery rate was 101.25%, RSD 0.9%. 3, 3-di-*O*-methylellagic acid showed good linear relationship within 0.018 9-0.339 5 μg (r = 0.999 8) and its average recovery rate was 101.34%, RSD 1.5% (n = 6). **Conclusion**: The ellagic acid and 3, 3-di-*O*-methylellagic acid were obtained from *M. cochinchinensis* for the first time, and the HPLC method was established for content determination. This method was simple, rapid and with

[收稿日期] 20160302(013)
[基金项目] 广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019204);广西卫生厅中医药科技专项(GZPT1230)
[第一作者] 莫凯荃,在读硕士,从事天然产物化学研究,Tel:18172032140,E-mail:mkq44@163.com
[通讯作者] * 卢文杰,主任药师,从事天然产物化学研究,Tel:0771-5868989,E-mail:luwenjie0771@163.com

great stability and repeatability, which could be used to determine the contents of above two components from *M. cochinchinensis*.

[Key words] *Macrosolenco chinchinensis*; ellagic acid; 3, 3-di-*O*-methylellagic acid; extraction and separation

杉寄生为广西民间习用药材,具有祛风除湿、活血止痛、补肝肾、止痢、止咳的功效,主要用于风湿痹痛、痔疮肿痛、腰膝酸痛、咳嗽、痢疾等[1]。主要分布于华南、西南及福建、西藏等地。目前,杉寄生还未被收录于《中国药典》及各地方药品标准上,仅在《中华本草》及一些地方植物名录中有杉寄生的相关介绍。本课题组前期已进行过一些杉寄生药材的相关研究[2-3],为进一步明确杉寄生的化学组成,为开发以杉寄生为原料的产品提供更全面的理论依据,笔者对其进行了更深入的化学成分研究并从中分离鉴定得到 2 个酚性化合物,分别为鞣花酸及 3,3′-二甲氧基鞣花酸。鞣花酸具有明显的抗氧化作用,还对多种癌变有一定的抑制作用,甚至能引起癌细胞的凋亡[4-5],3,3′-二甲氧基鞣花酸同样对肝癌细胞的增殖有着较好的抑制作用[6]。2 个化合物均为首次从杉寄生中分得,同时建立了它们的 HPLC 含量测定方法,为杉寄生药材的质量标准的制定及该药物资源的进一步开发和利用提供依据。

1 材料

XS205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),AEL-200 型电子天平(湘仪岛津公司),IR-470 型红外光谱仪,LC-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),ZF-2 型三用紫外仪(上海安亭电子仪器厂),DRX-500 MHz 型超导核磁共振仪(瑞士布鲁克公司),威玛龙色谱工作站(南宁市威玛龙色谱科技有限公司),密度计(上海医用仪表厂,规格 0.600 ~ 2.000,刻度 0.001),HH-S2 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),KQ2200 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司),SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)。

3 批杉寄生药材于 2015 年 1 月采于广西南宁市、金秀县、上林县,由广西中医药研究院何开家主任中药师鉴定杉寄生为桑寄生科植物鞘花 *Macrosolen cochinchinensis* 的茎枝。鞣花酸及 3,3′-二甲氧基鞣花酸对照品为从杉寄生中提取分离获得,经结构鉴定并采用 HPLC 归一化法测定纯度 >98%。

硅胶 H,硅胶 G(青岛海洋化工有限公司),石油醚(60 ~ 90 ℃,国药集团化学试剂有限公司)。HPLC 用甲醇为色谱纯(德国默克股份两合公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取分离 称取杉寄生干药材 3.0 kg,粉碎成粗粉,用适量 60% 乙醇提取 5 次,每次 2 h,滤过,滤液合并,减压回收乙醇,得浸膏。浸膏加水混悬,依次用石油醚(60 ~ 90 ℃),乙酸乙酯,正丁醇萃取,回收溶剂后分别得到石油醚部位,乙酸乙酯部位及正丁醇部位。取乙酸乙酯部位进行硅胶柱色谱分离,以乙酸乙酯-甲醇(100∶0 ~ 50∶50)混合溶剂洗脱,共收集 93 个流分(1 ~ 93)。采用薄层色谱法合并组分相同的流分,得到 P1(40 ~ 55)部位 4.8 g。

P1 部位样品再经聚酰胺色谱分离,用丙酮进行洗脱,共收集 96 个流分(P1-1 ~ P1-96)。采用聚酰胺薄膜检视合并组分相同的流分(P1-10 ~ P1-14, P1-77),过滤,得到 2 个粗结晶,经过重结晶并用聚酰胺薄膜进行检视处理直至得到单一的斑点。由此得到较纯的单体化合物 **1**,**2**。

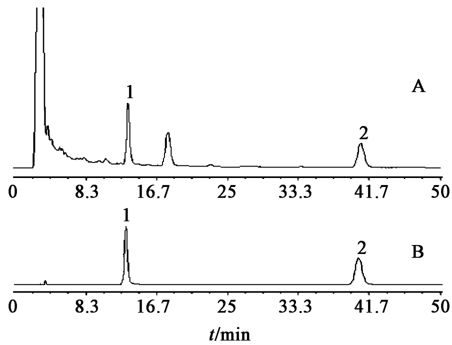
2.2 结构鉴定 化合物 **1** 黄色粉末状结晶(甲醇),EI-MS *m/z* 330 [M]$^+$;^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 10.77 (2H, br s, HO-4,4′), 7.51 (2H, s, H-5,5′), 4.04 (6H, s, 2 × OCH_3);^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 158.4 (C-7,7′), 152.2(C-4,4′), 141.1(C-2,2′), 140.2(C-3,3′), 112.0(C-6,6′), 111.6(C-1,1′), 111.5(C-5,5′), 61.0(2 × CH_3)。以上数据与文献[7]一致,鉴定为 3,3′-二甲氧基鞣花酸 (3,3′-di-*O*-methylellagic acid)。

化合物 **2** 黄色粉末状结晶(甲醇),EI-MS *m/z* 302 [M]$^+$;^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 7.37 (2H, s, H-5,5′);^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 159.5(C-7,7′), 148.6(C-3,3′), 140.2(C-5,5′), 136.3(C-4,4′), 112.8(C-6,6′), 109.2(C-1,1′), 105.5(C-2,2′)。以上数据与文献[8]一致,鉴定为鞣花酸(ellagic acid)。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适应性试验 Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 磷酸水溶液(47∶53),流速 0.8 mL·min^{-1},

检测波长 254 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL。在此条件下鞣花酸的理论板数不低于3 000。3,3′-二甲氧基鞣花酸的理论板数不低于5 000。对照品及样品的色谱见图 1。



A. 供试品;B. 混合对照品;1. 鞣花酸;2. 3,3′-二甲氧基鞣花酸

图 1 杉寄生药材 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Macrosolen cochinchinensis*

2.3.2 对照品储备液的制备 精密称取鞣花酸对照品 15.31 mg,3,3′-二甲氧基鞣花酸对照品 9.43 mg,置于同一 250 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声溶解并用甲醇稀释至刻度,即为对照品储备液。鞣花酸的质量浓度为 61.24 $mg \cdot L^{-1}$,3,3′-二甲氧基鞣花酸的质量浓度为 37.72 $mg \cdot L^{-1}$。

2.3.3 供试品溶液的制备 取经粉碎的药材(60 目)约 0.5 g,精密称定,精密加入 60% 乙醇 25 mL,称定质量,水浴上回流提取 60 min,放冷,再称定质量,用 60% 乙醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3.4 线性关系的考察 分别从对照品储备液中精密移取 0.5,1,3,5,7,9 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加入甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,即得系列浓度的混合对照品溶液。分别取上述 6 个不同浓度的对照品溶液 10 μL,按 **2.3.1** 项下色谱条件进样测定,以对照品溶液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果得出鞣花酸的线性方程 $Y = 27\,856X + 3\,884.5$ ($r = 0.999\,8$);3,3′-二甲氧基鞣花酸的线性方程 $Y = 39\,151X - 4\,588.1$ ($r = 0.999\,8$)。表明鞣花酸对照品溶液进样量在 0.030 6~0.551 2 μg 呈良好线性关系,3,3′-二甲氧基鞣花酸对照品溶液进样量在0.018 9~0.339 5 μg 呈良好线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密吸取鞣花酸质量浓度为 18.372 $mg \cdot L^{-1}$和 3,3′-二甲氧基鞣花酸质量浓度为 11.316 $mg \cdot L^{-1}$的对照品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪中,按 **2.3.1** 项下色谱条件,连续进样 6 次,测定峰面积。结果鞣花酸峰面积 RSD 0.2%,3,3′-二甲基鞣花酸峰面积 RSD 0.3%,表明所用高效液相色谱仪精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取杉寄生药材(产地广西上林)粉末约 0.5 g,精密称定,按供试品制备方法制备,室温保存,分别在 0,2,4,8,12,24 h 精密吸取供试品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 **2.3.1** 项下色谱条件进样测定,考察其稳定性。结果样品中鞣花酸峰面积的 RSD 0.5%,3,3′-二甲氧基鞣花酸峰面积的 RSD 1.0%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取杉寄生药材(产地广西上林)粗粉约 0.5 g,精密称定质量,共取 6 份,按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL,按 **2.3.1** 项下色谱条件进样测定,计算鞣花酸质量分数为 0.738 $mg \cdot g^{-1}$,其 RSD 1.6%;3,3′-二甲氧基鞣花酸的质量分数为 0.443 $mg \cdot g^{-1}$,其 RSD 2.5%。表明重复性良好。

2.3.8 加样回收试验 精密吸取对照品储备液 3 mL至 100 mL 圆底烧瓶中,水浴上挥干溶剂,平行制备 6 份,再在每一份中加入已知含量的杉寄生药材(产地广西上林)粉末约 0.25 g,精密称定,按 **2.3.3** 项下照供试品溶液的制备方法制备。精密吸取供试品溶液 10 μL,按 **2.3.1** 项下色谱条件分别测定各样品中鞣花酸,3,3′-二甲氧基鞣花酸的含量,计算回收率(杉寄生药材中鞣花酸质量分数以 0.738 $mg \cdot g^{-1}$计,3,3′-二甲氧基鞣花酸的质量分数以 0.443 $mg \cdot g^{-1}$计),结果见表 1,2。

表 1 鞣花酸加样回收率试验

Table 1 Sample recovery test of ellagic acid

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.251 3	0.186	0.370	100.38	101.25	0.9
0.253 4	0.187	0.373	101.09		
0.251 5	0.186	0.370	100.54		
0.256 8	0.190	0.379	103.05		
0.252 5	0.186	0.372	101.14		
0.254 1	0.188	0.374	101.31		

注:加入量均为 0.184 mg。

2.3.9 样品含量测定 取 3 批不同采集地点的杉寄生药材,分别按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,外标法计算含量,结果见表 3。

表 2　3,3′-二甲氧基鞣花酸加样回收率试验

Table 2　Sample recovery test of 3,3-di-*O*-methylellagic acid

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.251 3	0.111	0.223	98.76	101.34	1.5
0.253 4	0.112	0.227	101.15		
0.251 5	0.111	0.226	100.97		
0.256 8	0.114	0.230	102.74		
0.252 5	0.112	0.228	102.83		
0.254 1	0.113	0.228	101.59		

注:加入量均为0.113 2 mg。

表 3　各产地杉寄生药材中鞣花酸,3,3′-二甲氧基鞣花酸的质量分数测定

Table 3　Content of ellagic acid and 3,3-di-*O*-methylellagic acid in *Macrosolen cochinchinensis* samples from different places　$mg \cdot g^{-1}$

产地	鞣花酸	3,3′-二甲氧基鞣花酸
广西金秀	1.437	0.479
广西南宁	1.764	0.164
广西上林	0.738	0.443

3　讨论

采用 HPLC 测定杉寄生中鞣花酸及 3,3′-二甲氧基鞣花酸时,分别比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2% 磷酸、乙腈-0.2% 磷酸等流动相。根据色谱图的出峰时间、分离度、峰形等情况,经多次实验研究,发现甲醇-0.2% 磷酸(47:53)作为流动相时分离效果较好且其他成分无干扰,故选其作为流动相。

本文考察了超声和乙醇回流 2 种提取方法对鞣花酸及 3,3′-二甲氧基鞣花酸含量测定的影响,结果表明,乙醇回流法提取得更完全,提取效果明显优于超声提取,故选择了乙醇回流。分别考察了多种溶剂的提取效果,包括甲醇,50% 乙醇,60% 乙醇,70% 乙醇,95% 乙醇,结果表明 60% 乙醇的提取效率相对最高。进而考察了以 60% 乙醇为提取溶剂对杉寄生药材进行不同时间的提取,发现 1 h 即能提取完全。综合考虑后确定以 60% 乙醇加热回流 1 h 作为提取工艺。

本实验利用硅胶柱色谱和重结晶等技术分离得到的两种酚性化合物鞣花酸和 3,3′-二甲氧基鞣花酸均为首次从杉寄生药材中分得。鞣花酸的含量测定方法较多[9],但用 HPLC 法测定杉寄生药材中鞣花酸含量未见报道,本文建立杉寄生药材中鞣花酸和 3,3′-二甲氧基鞣花酸的含量测定方法。实验结果表明,本实验建立的 HPLC 含量测定方法简单方便,操作性强,具有较好的稳定性及重复性,为杉寄生药材质量控制方法提供了参考,为鞣花酸及 3,3′-二甲氧基鞣花酸含量测定方法的研究提供了重要依据。不同产地杉寄生药材中鞣花酸及 3,3′-二甲氧基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。

［参考文献］

[1]　国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 2 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:600-601.

[2]　陆国寿,叶勇,黄周锋,等. HPLC 法测定杉寄生中落新妇苷的含量[J]. 中医药导报,2014,20(5):96-87.

[3]　陆国寿,陈家源,谭晓,等. 杉寄生化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):44-46.

[4]　文琪,曲福,王翠花. 树莓的营养保健价值与市场前景浅析[J]. 北方园艺,2007(6):114-115.

[5]　李素琴,袁其朋,徐建梅. 鞣花酸的生理功能及工艺开发研究现状[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(5):71-74.

[6]　楼一层,周园,易辉. 3,3′-二甲氧基鞣花酸对 HepG2 细胞增殖影响及其分子机制研究[J]. 中国药师,2010,13(8):1067-1068.

[7]　WU S H, SHEN Y M, CHEN Y W, et al. Chemical constituents from the Stem Bark of Trewia Nudiflora[J]. Chem Nat Compound,2009,45(4):536-538.

[8]　李琳波,马天波,肖月星,等. 青岛老鹳草化学成分的研究[J]. 中草药,2000,31(2):92-93.

[9]　周本宏,吴振华,刘春,等. 高效液相色谱法测定石榴皮中鞣花酸的含量[J]. 广东药学院学报,2005,6(21):693-694.

［责任编辑　顾雪竹］