

藏药镰形棘豆中鼠李柠檬素对照品的制备

姜华^{1*}, 郭敏¹, 沈敏娟²

(1. 甘肃省中医药研究院, 兰州 730050; 2. 吴江市第一人民医院, 江苏 吴江 215200)

[摘要] 目的: 建立镰形棘豆中鼠李柠檬素对照品的制备方法。方法: 运用硅胶柱色谱、Sephndex LH-20 凝胶色谱柱等分离纯化的方法制备鼠李柠檬素, 采用薄层色谱法和高效液相色谱面积归一化法检测纯度, 波谱法鉴定其结构。结果: 制备的化合物为鼠李柠檬素, 纯度 >98%。结论: 该制备方法效率高, 所得鼠李柠檬素对照品纯度高, 符合中药化学对照品的相关技术要求, 可用于大量制备中药定性、定量分析使用的对照品。

[关键词] 镰形棘豆; 鼠李柠檬素; 对照品

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0124-03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1743.030.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:43

Preparation of *Rhamnocitrin* Reference Substances from *Oxytropis Falcata*

JIANG Hua^{1*}, GUO Min¹, SHEN Min-juan²

(1. Gansu Academy of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China;

2. The First People's Hospital of Wujiang, Wujiang 215200, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the preparation of *rhamnocitrin* reference substances from *Oxytropis falcata*. **Method:** Separated using silica gel column chromatography preliminarily, and then separated and purified *rhamnocitrin* by Sephdex LH-20 column, thin-layer chromatography and area normalization of HPLC was used to detect purity, spectral analysis identified its structure. **Result:** The preparation of compounds of *rhamnocitrin*, had a purity of more than 98%. **Conclusion:** The preparation method has high efficiency, the reference substance induced has high purity and meet the relevant technical requirements of traditional Chinese medicine chemical reference substance, can be used for mass production of the reference substance used for traditional Chinese medicine qualitative and quantitative analysis.

[Key words] *Oxytropis falcata* Bunge; *rhamnocitrin*; reference substances

镰形棘豆为豆科棘豆属(*Oxytropis*)多年生草本植物,主要产于我国青海、甘肃南部、四川西部等省区,海拔2 700~4 600 m的河滩、沙地、沟谷、山坡、灌丛、草甸。藏药药典《晶珠本草》记载其全草入

药,藏语称“莪达夏”。它的根及根茎或全草入药,药材表面多为黄褐色,质韧,干枯,气异,味微苦,具有显著的清热解毒、消炎镇痛之功效,用于治疗疫疔、中毒病、黄水病、便秘、炭疽、外敷治疮疖肿痛^[1],是我国青藏高原常用的民间草药之一。该品种现收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》藏药(第一册)。

镰形棘豆主要含有生物碱、黄酮等化合物^[2-3],其中黄酮类成分具有抗菌、抗氧化自由基、抗肿瘤、止咳等活性^[4-7]。作者通过柱色谱法^[8-9]对镰形棘豆进行了分离纯化,经 IR, MS, ¹HNMR, ¹³C-NMR确

[收稿日期] 20110919(013)

[基金项目] 甘肃省中医药科技项目(06-298-30);中国科学院西部特色民族药资源标准化研究(KGCX2-SW-213-08)

[通讯作者] *姜华,博士,研究员,硕士生导师,从事中(藏)药有效成分筛选及质量分析, Tel: 0931-2687224, E-mail: huajiang931@sina.com

定其化学结构,得到了主要的黄酮醇化合物鼠李柠檬素。通过抗氧化自由基^[6]以及抑菌^[7]等实验证明鼠李柠檬素是该药材的主要活性成分之一。本实验采用总黄酮粗提、再经硅胶柱色谱分离、Sephndex LH-20 凝胶色谱柱纯化等方法制备高纯度的鼠李柠檬素,方法简便,为药材及相关制剂的质量控制及药效等研究提供对照物质。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 100 series LC/MSD Trap 型液相质谱联用仪,美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(G1322A 脱气机、G1311A 四元泵、G1316A 柱温箱、G1315B DAD 检测器、HP Chemstation system 工作站),美国 Varian INOVA-400 FT NMR (TMS 为内标),德国 Bruker IFS66v/S 型红外光谱仪,岛津 Perkin-Elmer Lambda UV-35 型紫外光谱仪,XT-4A 型显微熔点测定仪。

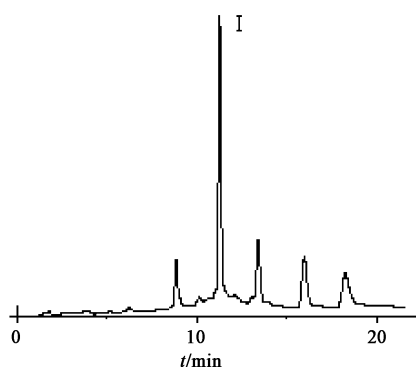
镰形棘豆药材由甘肃省甘南藏医药研究院提供,经兰州大学药学院马志刚教授鉴定为镰形棘豆 *Oxytropis falcata* Bunge。柱色谱硅胶(200~300目)、薄层色谱用硅胶 G(青岛海洋化工厂);凝胶 Sephadex LH-20 25~100 μm (Amersham Pharmacia Biotech 公司);甲醇为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮组分的提取 取镰形棘豆药材 3 kg,用 18,12,8 倍量水的煮沸 3 次,每次 2 h,合并水煎液,滤过,滤液减压浓缩至膏状(1:5~6),加入乙醇,使其含醇量达到 70%,搅拌数次,静置 24 h 后,滤出乙醇溶液,残渣重复用乙醇洗滤多次,直至乙醇溶液颜色为淡黄色,减压浓缩至膏状,再以 5 倍于浸膏质量的水溶解,加入 HCl,使溶液酸量达到 4%~5%,水解液静置 12 h 倾去上清液,残渣用水洗至 pH 6~7,脱水,浸膏在 60~70 °C 烘干,得总黄酮提取物重 33.4 g,收率 1.12%。

2.2 总黄酮组分的 HPLC 分析 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相甲醇-0.5% 乙酸水溶液二元线性梯度洗脱[0~3 min(45:55),3~25 min(65:35)];检测波长 300 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,所有组分在 20 min 内出完,色谱图见图 1。

2.3 鼠李柠檬素分离、纯化 取总黄酮 2 g,用 200~300 目硅胶拌样,晾干,200~300 目硅胶干法装柱反复柱色谱,用氯仿-甲醇从 40:20~20:40 为洗脱溶剂依次梯度洗脱,等份法接样,洗脱过程中各



I. 鼠李柠檬素

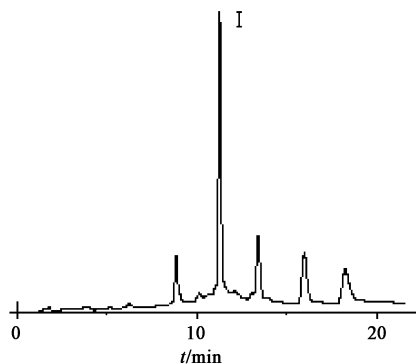
图 1 镰形棘豆总黄酮组分 HPLC

组分以 TLC 检测,相同组分合并,经硅胶柱色谱分离后,通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,以甲醇洗脱进行纯化,再经重结晶得化合物 I(26 mg)。

2.4 纯度检测

2.4.1 薄层色谱检测 取自制的化合物 I,加甲醇配制成 3 g·L⁻¹ 的溶液,作为供试品溶液。分别取 2,3,4,5 μL 点在同一含 0.3% 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上。以甲苯-醋酸乙酯-甲酸(5:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% AlCl₃ 乙醇溶液,置紫外光灯(254 nm)下检视,结果主成分呈单一斑点,未见杂质斑点,符合化学对照品的要求。

2.4.2 面积归一化法 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.4% 磷酸水溶液-甲醇(20:80),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 350 nm,柱温 30 °C,进样量取 3 g·L⁻¹ 的自制化合物 I 溶液 10 μL 注入液相色谱仪。用面积归一化法计算,确定所得化合物 I 的质量分数为 98.3%,符合化学药品用于含量测定的要求(鼠李柠檬素 HPLC 色谱图见图 2)。



I. 鼠李柠檬素

图 2 鼠李柠檬素 HPLC

2.5 结构鉴定 鲜黄色针晶, $C_{16}H_{12}O_6$, mp 222 ~ 224 °C, 盐酸-镁粉反应阳性, 三氯化铁反应阳性。EI⁻ MS m/z : 300 [M]⁺, 299, 284, 271, 257。¹H-NMR (DMSO- d_6) δ : 12.46 (1H, s, 5-OH), 10.15 (1H, s, 4'-OH), 9.53 (1H, s, 3-OH), 8.08 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 2',6'-H), 6.93 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 3',5'-H), 6.73 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 8-H), 6.36 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 6-H), 3.84 (3H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 176 (C-4), 164.7 (C-7), 160.3 (C-9), 159.2 (C-5), 156 (C-4'), 147 (C-2), 135.9 (C-3), 129.5 (C-2', 6'), 121.5 (C-1'), 115.4 (C-3', 5'), 104.0 (C-10), 97.4 (C-6), 92.0 (C-8), 56.0 (OCH₃)。经与文献波谱^[3]数据核对, 鉴定此化合物 I 为山柰素-7-甲醚, 即鼠李柠檬素 (rhamnocitrin)。化学结构式见图 3。

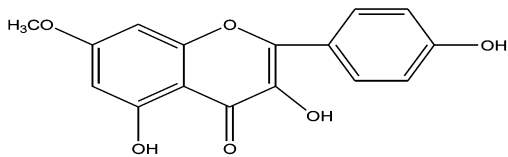


图 3 鼠李柠檬素化学结构

3 讨论

对镰形棘豆药材的提取首先采用了水提醇沉、酸水解的方法, 分离得到的总黄酮组分, 主要成分鼠李柠檬素含量高, 组分中杂质少, 可在进一步分离纯化鼠李柠檬素的过程中, 减少有毒溶剂甲醇的用量和柱色谱的次数, 提高了分离效率。本方法制得的化合物经各项指标的测试符合标准品的指标要求, 符合国家食品药品监督管理局颁布的“中药新

药质量标准用对照品研究的技术要求”的相关规定, 专属性强, 具有质量控制意义, 为药材及相关制剂的质量控制及药效物质基础研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] 罗达尚. 中华藏本草 [M]. 北京: 民族出版社, 1997: 139.
- [2] 确生. 藏药镰形棘豆化学成分的研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2003.
- [3] 吕芳, 徐筱杰. 藏药镰形棘豆中黄酮化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 318.
- [4] 闫海燕. 镰形棘豆中两种黄酮的结构及生物活性研究 [J]. 宝鸡文理学院学报: 自然科学版, 2008, 28(2): 120.
- [5] 魏群, 贺幼平, 李经才. 镰形棘豆总黄酮甙元对下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统的药理作用 [J]. 中华医学杂志, 1979, 59(11): 677.
- [6] Jiang H., Zhan W. Q., Liu X., et al. Antioxidant activities of extracts and flavonoid compounds from *Oxytropis falcata* [J]. Nat Prod Res [J]. 2008, 18(22): 1650.
- [7] Jiang Hua, Hu Jun-ru, Zhan Wen-qiang, et al. Screening for fractions of *Oxytropis falcata* with antibacterial activity [J]. Nat Prod Res [J]. 2009, 23(10): 953.
- [8] 裴慧, 朱玲英, 钱士辉. RP-HPLC 测定急性子中 2 种黄酮苷成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 131.
- [9] 桑育黎, 郝延军, 陈沉. HPLC 测定独一味胶囊中 8-epideoxyloganic acid 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 107.

[责任编辑 顾雪竹]