

## 山茱萸中马钱苷和莫诺苷对照品的制备

李小娜<sup>1,2</sup>, 霍长虹<sup>1</sup>, 殷 玮<sup>1</sup>, 张兰桐<sup>1\*</sup>

(1. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017; 2. 华北煤炭医学院 药理学系, 河北 唐山 063000)

**摘要:**目的 研究从山茱萸中制备马钱苷和莫诺苷对照品的方法。方法 结合大孔树脂富集、硅胶柱色谱、制备 HPLC 法对山茱萸水提醇沉提取物进行分离纯化, 通过 UV、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、MS 波谱学方法对其分离产物进行结构鉴定。结果 所得马钱苷和莫诺苷用归一化法定量, 质量分数均大于 98%。结论 本法简便, 制备成本低, 所得马钱苷和莫诺苷可作为中药定性、定量分析使用的对照品。

**关键词:** 山茱萸; 马钱苷; 莫诺苷; 对照品; 制备

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)08-1168-03

### Preparation of loganin and morroniside reference substances from *Fructus Corni*

LI Xiao-na<sup>1,2</sup>, HUO Chang-hong<sup>1</sup>, YIN Wei<sup>1</sup>, ZHANG Lan-tong<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University; Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Pharmacy, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

**Abstract: Objective** To establish a separation method of loganin and morroniside reference substance from *Fructus Corni*. **Methods** After extracted with hot water and precipitated with alcohol, the extract of *Fructus Corni* was isolated and purified by macroporous resin, silica gel column chromatography, and preparative HPLC. Loganin and morroniside were identified by UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and MS. **Results** The contents of loganin and morroniside was higher than 98% by normalization method of HPLC. **Conclusion** The developed method is simple with lower cost, by which loganin and morroniside can be used as reference substances for the qualitative and quantitative analysis of Chinese herbal medicine.

**Key words:** *Fructus Corni*; loganin; morroniside; reference substance; preparation

山茱萸为山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 为我国传统珍贵中药材, 有补肝肾、涩精气、固虚脱的功效<sup>[1]</sup>。马钱苷(loganin)和莫诺苷(morroniside)同属环烯醚萜苷类, 为山茱萸中主要药效成分。马钱苷具有调节免疫、抗炎和抗休克作用, 莫诺苷具有苦补健胃和预防糖尿病性血管病的作用<sup>[2~5]</sup>。《中国药典》2005 年版规定以测定马钱苷的量控制山茱萸药材的质量。目前关于马钱苷和莫诺苷提取分离方法的研究报道较少, 且仅限于硅胶柱色谱系统分离。马钱苷价格较贵, 市场上更无莫诺苷对照品出售, 限制了对山茱萸进一步的开发与研究。本实验结合大孔树脂富集、硅胶柱色谱分离、制备 HPLC 法对山茱萸水提醇沉提取物进行分离纯化, 制备马钱苷和莫诺苷对照品, 为山茱萸药材及其复方中药分析提供标准物质。

### 1 仪器与药品

美国 Waters 高效液相色谱仪(Waters 1525

Pump, Waters 2996 Photodiode Array Detector, Waters 2487 dual  $\lambda$  Absorbance Dedetector); Empower 软件; Christ Alpha2—4LSC 型冷冻干燥机; Heidolph2 旋转蒸发器; LG16—W 型离心机(北京医用离心机厂)。

山茱萸药材购于河南省南阳市并经本院生药学教研室鉴定; 马钱苷、莫诺苷对照品(河北医科大学药学院提取、精制, 经归一化法定测定质量分数大于 99.3%); 甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Tedia 试剂公司), 其他试剂均为分析纯; CMC-Na、薄层色谱硅胶、柱色谱硅胶(100~200 目, 青岛海洋化工分厂), AB-8 大孔吸附树脂(天津光复精细化工研究所)。

### 2 方法与结果

2.1 生药的提取: 称取山茱萸粗粉(60 目)500 g, 6 倍水浸泡过夜, 煎煮提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 加入 4 倍量乙醇, 搅匀, 冷藏过夜, 滤过, 滤液回收乙醇, 减压浓缩至无乙醇味, 即得山茱萸提

收稿日期: 2005-12-28

基金项目: 河北省药理学重点学科资助项目; 河北省科技厅资助项目(012761176)

作者简介: 李小娜(1971—), 女, 在读博士, 主要从事中药药效物质基础与药理学研究。

\* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311) 86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

取液约 300 mL。

### 2.2 化合物的分离

2.2.1 大孔树脂富集苷类<sup>[6]</sup>: AB-8 大孔吸附树脂 500 g, 用乙醇浸泡 2 d, 倾去上浮物后湿法装柱, 用乙醇洗至流出液与水混合不呈现白色乳浊现象即可, 然后以大量蒸馏水洗净柱中乙醇, 水浸泡备用; 再生时用 90% 乙醇洗脱至流出液无色, 以大量水洗净去醇即可。如果树脂颜色较深, 用一定浓度的酸或碱除去吸附性杂质, 最后再用水洗至流出液呈中性。

取山茱萸提取液 300 mL 吸附于大孔树脂柱, 先用 2 000 mL 蒸馏水洗脱, 后用 30% 乙醇 2 500 mL 洗脱, 取 30% 乙醇洗脱部分浓缩, 得约 15 g 浸膏。

2.2.2 马钱苷和莫诺苷的制备<sup>[7]</sup>: 硅胶(100~200 目) 600 g 干法装柱, 取富集所得浸膏, 加等量硅胶拌样, 上样后柱色谱分离, 用氯仿-甲醇溶剂系统以 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1 梯度洗脱, 分别收集氯仿-甲醇 5:1 和 4:1 馏份, 根据薄层色谱检查, 合并相同的斑点部分, 其中马钱苷部分浓缩后用甲醇清洗即得白色结晶约 0.7 g; 莫诺苷部分通过制备型高效液相色谱分离纯化, 收集液冷冻干燥后得白色粉末约 0.3 g。制备色谱条件: Waters Symmetry Prep™ C<sub>18</sub> 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 7 μm); 流动相: 甲醇-水(32:68); 柱温: 30 ℃; 体积流量: 3 mL/min; 检测波长: 239 nm; 进样量: 100 μL。收集保留时间为 5 min 的组分, 见图 1。

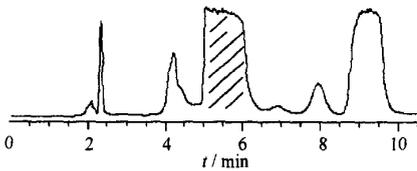


图 1 莫诺苷的制备高效液相色谱图

Fig. 1 Preparative HPLC chromatogram of morroniside

### 2.3 结构确定

2.3.1 马钱苷: 白色结晶, 易溶于甲醇、水, UV: λ<sub>max</sub><sup>MeOH</sup> 235.8 nm。MS: *m/z* 408<sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub>), 449<sup>-</sup> (M-H+HAc)。<sup>1</sup>H-NMR 谱(500 MHz, CH<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>) δ: 7.362 (1H, s, 3-H), 5.135 (1H, d, 1-H); <sup>13</sup>C-NMR 谱(500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>) δ: 167.143 (11-C), 150.706 (3-C), 112.213 (4-C), 96.152 (1-C), NMR 数据与文献报道<sup>[8]</sup>一致, 确定其结构为马钱苷。

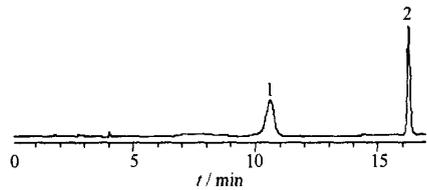
2.3.2 莫诺苷: 白色结晶, 易溶于甲醇、水, UV: λ<sub>max</sub><sup>MeOH</sup> 239.4 nm。MS: *m/z* 425<sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub>), 405<sup>-</sup>

(M-H)。<sup>1</sup>H-NMR 谱(500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>) δ: 7.492 (1H, s, 3-H), 5.768 和 5.706 (7-α, 7-β, 1H, d, 1-H); <sup>13</sup>C-NMR 谱(500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>) δ: 166.461 (11-C), 152.914 (3-C), 110.574 和 109.803 (4-C), 95.139 和 94.285 (1-C), NMR 数据与文献报道<sup>[8]</sup>一致, 确定其结构为莫诺苷。

### 2.4 定性鉴定和定量测定

2.4.1 薄层色谱法: 将制备所得马钱苷和莫诺苷分别点样于硅胶 G 板上, 以马钱苷和莫诺苷对照品溶液为对照, 氯仿-甲醇(7:3)为展开剂, 展开, 晾干, 以 10% 硫酸乙醇溶液为显色剂, 105 ℃ 加热 10 min, 结果马钱苷供试品为一个紫红色斑点, R<sub>f</sub> 值为 0.45, 莫诺苷为一个黄棕色斑点, R<sub>f</sub> 值为 0.55。

2.4.2 高效液相色谱法: 色谱条件: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(32:68)、乙腈-甲醇-0.2% 甲酸(12:8:82)、乙腈-水(梯度洗脱); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长分别为 236 nm 和 239 nm; 柱温: 30 ℃。在不同色谱条件下, 马钱苷和莫诺苷对照品均为一个主峰, 改变流动相分析未见异常峰, 用 HPLC 面积归一化法计算两者的质量分数均达 98% 以上。其中乙腈-水梯度洗脱时, 莫诺苷保留时间为 11.6 min, 马钱苷的保留时间为 16.3 min, 见图 2。



1-莫诺苷 2-马钱苷

1-morrnonside 2-loganin

图 2 马钱苷和莫诺苷对照品的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of loganin and morroniside reference substances

### 3 讨论

3.1 马钱苷和莫诺苷均为山茱萸的活性成分, 量较高, 性质稳定, 用上述制备方法进行提取、分离、纯化、操作方便, 重现性好, 符合对照品的纯度要求, 因而可作为对照品使用, 供山茱萸药材及其复方中药的定性、定量分析。

3.2 大孔树脂精制苷类具有吸附容量大、洗脱效率高等优点, 使马钱苷和莫诺苷的量提高, 在预处理的前提下不失为一种提取苷类的优良吸附剂。把富集后的样品通过硅胶柱色谱处理, 可以去除样品中大量的杂质, 进一步分离纯化, 此时可以得到马钱苷粗

品,甲醇清洗后即可。硅胶柱色谱分离得到的莫诺苷粗品含有多种杂质,很难结晶且纯度达不到对照品的要求,故进一步进行制备高效液相色谱分离纯化。

3.3 曾将硅胶柱色谱后得到的莫诺苷粗品进行薄层色谱制备,未能得到莫诺苷结晶且纯度不够;制备高效液相色谱分离后经冷冻干燥得到质量分数达 99% 的莫诺苷白色的结晶。

致谢:华北制药集团新药中心牛长群老师帮助测定质谱和核磁共振谱。

#### References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.  
 [2] Wang T S, Pan Y, Yin F, et al. Effect of loganin and synephrine rabbit model with severe hemorrhagic shock [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1999, 15 (6): 345-346.  
 [3] Guo L L, Zhou Y, Wang X D, et al. Effect of the extract of

the fruit of *Cornus officinalis* on rat splenic lymphocytic proliferation [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2001, 24 (3): 38-40.

- [4] Recio M C, Giner R M, Manez S, et al. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents [J]. *Planta Med*, 1994, 60 (3): 232-234.  
 [5] Xu H Q, Hao H P, Zhang X, et al. Morroniside protects cultured human umbilical vein endothelial cells from damage by high ambient glucose [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25 (4): 412-415.  
 [6] Pi W X, Cai B C, Pan Y, et al. Study on enrichment process of *Cornus officinalis* glycosides with macroporous resin and active carbon [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27 (8): 583-584.  
 [7] Xu L Z, Li H Y, Tian L, et al. Studies on the chemical constituents of common *Macrocarpium* (*Cornus officinalis*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26 (2): 62-65.  
 [8] Han S Y, Pan Y, Ding G, et al. Application of  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  on structure identification of iridoids from *Fructus Corni* [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中医学刊), 2004, 22 (1): 56-59.

## 大孔树脂吸附法富集野菊花总黄酮的工艺研究

盛萍<sup>1</sup>, 帕丽达·阿不力孜<sup>2</sup>, 刘波<sup>1</sup>, 刘宏炳<sup>1</sup>

(1. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

**摘要:**目的 研究大孔树脂吸附法富集野菊花总黄酮的工艺条件及参数。方法 以野菊花总黄酮为考察指标, 考察大孔树脂富集野菊花总黄酮的最佳工艺条件。结果 野菊花提取液(50 mg 生药/mL) 5 mL 上大孔树脂柱(150 mm×10 mm), 吸附 30 min 后, 先用 100 mL 蒸馏水洗脱除去杂质, 然后用 70% 乙醇 100 mL 洗脱, 洗脱速度为 2 mg/mL, 洗脱剂用量为 9 倍量树脂, 树脂可重复使用 3 次, 采用此条件为最佳工艺。结论 AB-8 型大孔树脂在所确定的工艺条件下, 可较好的吸附分离野菊花总黄酮。其 70% 乙醇洗脱物中总黄酮质量分数达 4.34% 以上, 总黄酮收率为 84.47% 以上。采用此法可以较好的富集野菊花中的有效成分。

**关键词:**野菊花; 总黄酮; 大孔吸附树脂

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)08-1170-04

### Enrichment processing of total flavone of *Chrysanthemum indicum* with macroporous adsorption resin

SHENG Ping<sup>1</sup>, PA Li-da · A Bu-Lizi<sup>2</sup>, LIU Bo<sup>1</sup>, LIU Hong-bing<sup>1</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

**Key words:** *Chrysanthemum indicum* L.; total flavone; macroporous adsorption resin

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 具有疏风清热、消肿解毒的功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明野菊花总黄酮是其降压、抗菌、抗病毒的主要有效成分<sup>[2]</sup>。大孔吸附树脂是一种具有多孔立体结构人工合成的聚合物吸附剂, 是在离子交换剂和其他吸附剂的应用基础上发展起来的一类新型树脂, 是依靠它和被吸附分子

之间的范德华力, 通过它巨大的比表面积进行吸附而工作的。合成吸附剂有大的比表面积和类似活性炭颗粒的内细孔结构, 这些多孔特性使之从水溶液中有效地吸附有机化合物, 且具有选择性吸附有机化合物的能力, 可用于皂苷、黄酮、蒽醌、生物碱、水溶性酚性成分等的富集, 其吸附性能、吸附条件参数因化合物的理化性质不同而不同<sup>[3]</sup>。本实验采用该