

小蓟中蒙花苷对照品的制备和鉴定

王 娇¹, 许 浚², 张铁军^{2,3,4*}, 吴雪松⁵

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193

4. 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室(天津), 天津 300193

5. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 研究从小蓟药材中制备蒙花苷对照品的制备方法和鉴定技术。方法 采用石油醚脱脂、碱溶解酸沉淀法对70%乙醇小蓟药材提取物进行分离纯化, 通过 UV、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 进行结构鉴定, TLC 和 HPLC 法对产品进行纯度检测。结果 从小蓟中分离、纯化得到蒙花苷对照品。经 TLC 法检查无杂质斑点, HPLC 法检测质量分数达 97%。结论 该方法制备的蒙花苷对照品符合中药化学对照品的相关要求, 可作为小蓟药材及其制剂质量控制以及中药药效物质基础研究的化学对照品。

关键词: 小蓟; 蒙花苷; 对照品; 制备

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)03-0325-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.015

Preparation and identification of linarin reference substance from *Cirsium setosum*

WANG Jiao¹, XU Jun², ZHANG Tie-jun^{2,3,4}, WU Xue-song⁵

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Engineering Laboratory of Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine (Tianjin), Tianjin 300193, China

5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the preparation method and identification technique of linarin reference substance from *Cirsium setosum*. **Methods** The 70% ethanol extract of *C. setosum* was isolated and purified with petroleum ether defatting, alkali dissolution and acid deposition. Structural identification was carried out by UV, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR, and purities were determined by TLC and HPLC methods. **Results** Linarin reference substances in *C. setosum* were isolated and purified. There were no impurity spots by TLC check, and the mass fraction of HPLC detection was up to 97%. **Conclusion** The linarin reference substance prepared by this method complies with the relevant requirements of the chemical markers in Chinese materia medica (CMM), and could be used as chemical reference substance of *C. setosum* and quality control for its preparations, as well as the study on the pharmacodynamic material basis of CMM.

Key words: *Cirsium setosum* (Willd.) MB.; linarin; reference substances; preparation

蒙花苷又名刺槐苷, 是小蓟药材化学检验的对照品和质量控制的成分指标, 是一种广泛存在于酢浆草科酢浆草, 菊科野菊花、密蒙花等植物中的天然黄酮苷类成分^[1-2]。现代药理学研究表明, 蒙

花苷具有抗炎镇痛的作用^[3], 能够抑制炎症介导素类的肿瘤坏死因子、白细胞介素的表达^[4], 有选择性地抑制乙酰胆碱酯酶^[5], 预防成骨细胞被过氧化氢诱导的功能性障碍^[6], 并且对大鼠晶状体的醛糖

收稿日期: 2013-02-25

作者简介: 王 娇 (1988—), 女, 哈尔滨人, 天津医科大学生药学专业硕士研究生。Tel: (022) 23006843 E-mail: jiaojiao369@yahoo.cn

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

还原酶有抑制活性^[7]。在其多种来源中,小蓟药材来源广,价格低,并且蒙花苷在其中的含量稳定,不少于 0.7%^[8]。因此从小蓟药材中提取蒙花苷可以有效地节约成本。本实验从小蓟中提取、分离和纯化蒙花苷,制备蒙花苷对照品,为制定和完善小蓟及其制剂的质量标准提供蒙花苷对照品,同时本研究选用常规的溶剂法分离纯化蒙花苷,工艺、设备简单,操作方便,生产成本低,适用于工业化生产。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱; LC 3000 半制备高效液相色谱仪 (UV3000 紫外检测器, P3050 高压输液泵, CXTH-3000 色谱工作站); UV—1601 型紫外—可见分光光度计; R 系列旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); DZF—6050 型真空干燥箱 (上海精宏科学仪器有限公司); Bruker AV—400 型核磁共振仪 (TMS 为内标); AB204—N 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Anke LXJ—IIIB 离心机 (上海安亭科学仪器厂); HS—3120 超声波清洗器 (奥特赛恩斯机器有限公司)。

蒙花苷对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号 0727-200105;聚酰胺薄膜 (浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);甲醇 (色谱纯,天津市康科德科技有限公司);其他化学试剂均为市售分析纯试剂。

小蓟药材购自陕西省咸阳市,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为菊科植物刺儿菜 *Cirsium setosum* (Willd.) MB. 的地上部分。

2 方法与结果

2.1 制备工艺

取小蓟药材 10 kg,加入 70%乙醇热回流提取 3 次,每次 1.5 h,每次溶剂量分别为药材的 13 倍。合并 3 次滤液,减压回收至无醇味,收集浓缩液,静置过夜,滤过,收集沉淀,沉淀用石油醚脱脂后,得蒙花苷粗品 145.8 g (蒙花苷质量分数为 48%)。

取蒙花苷粗品 100 g,加 5%氢氧化钠 1 000 mL 和 95%乙醇 2 000 mL 混合溶液溶解,溶液滤过,收集滤液,加浓盐酸调节 pH 值至中性,析出沉淀,抽滤,收集沉淀,沉淀用 70%乙醇清洗,干燥,即得蒙花苷纯品 (32 g)。

2.2 理化性质及结构鉴定

样品结晶经显微熔点测定仪测定, mp 279~280 °C,盐酸—镁粉反应呈樱红色;酸水解后溶液与斐林试剂反应呈阳性,三氯化铝反应呈黄色;氧

氯化锆—枸橼酸反应鲜黄色消退,说明有 5 位羟基、无 3 位游离羟基。提示为黄酮苷类化合物。

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 268, 326。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.07 (3H, d, *J*=6.4 Hz, Rha-H-6), 3.85 (3H, s, H-4-OCH₃), 4.55 (1H, brs, Rha-H-1), 5.05 (1H, d, *J*=7.2 Hz, Glc-H-1), 6.44 (1H, s, H-6), 6.77 (1H, d, H-8), 6.92 (1H, s, H-3), 7.13 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3', 5'), 8.03 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2', 6')。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.9 (C-2), 103.8 (C-3), 181.9 (C-4), 161.2 (C-5), 99.9 (C-6), 162.9 (C-7), 94.7 (C-8), 156.9 (C-9), 105.5 (C-10), 122.7 (C-1'), 128.4 (C-2', C-6'), 114.7 (C-3', C-5'), 162.4 (C-4'), 55.5 (-OCH₃), 99.7 (Glc-C-1), 73.1 (Glc-C-2), 76.3 (Glc-C-3), 70.7 (Glc-C-4), 75.7 (Glc-C-5), 66.1 (Glc-C-6), 100.5 (Rha-C-1), 70.3 (Rha-C-2), 69.6 (Rha-C-3), 72.1 (Rha-C-4), 68.3 (Rha-C-5), 17.8 (Rha-C-6)。以上数据与文献报道的蒙花苷^[9]一致,故确定该成分为蒙花苷。

2.3 纯度考察

2.3.1 薄层色谱法测定 取蒙花苷样品适量,加甲醇制成 0.05 mg/mL 的溶液。吸取上述溶液各 5、10、15 μ L 点于同一聚酰胺薄膜薄上,分别在 4 块薄层板上采用乙酰丙酮—丁酮—乙醇—水 (1:3:3:13)、丙酮—水 (1:1)、甲醇—水 (1:1) 和异丙醇—水 (3:2) 4 种展开剂展开,晾干,喷以三氯化铝试液,置紫外光灯 (365 nm) 下检视,均为 1 个斑点,无杂质斑点,计算得 R_f 值分别为 0.53、0.49、0.16、0.81。

2.3.2 高效液相色谱法测定

色谱条件 Thermo ODS-2 柱色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇—2%冰醋酸溶液 (55:45), 检测波长: 326 nm, 体积流量: 1 mL/min, 柱温: 30 °C。

对照品溶液的制备 取蒙花苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 55.5 μ g/mL 的溶液。

供试品溶液的制备 取蒙花苷样品适量,精密称定,加甲醇制成 53.5 μ g/mL 溶液。

依次吸取蒙花苷对照品、供试品溶液 10 μ L 注入液相色谱仪测定。采集时间比保留时间延长 1 倍以上,检测结果按外标法、面积归一化法计算,结果蒙花苷样品的质量分数分别为 98.23%、97.41%,符合定量分析用对照品要求,见图 1。

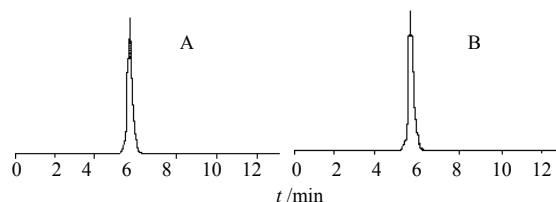


图1 蒙花苷对照品(A)和样品(B)的高效液相色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of linarin reference substance (A) and sample (B)

2.3.3 二极管阵列检测器(DAD)法检查 二极管阵列检测器(DAD)采用二极管阵列元件,能够获得“在流”的全部光谱信息,快速得到色谱组分的吸收光谱,基于DAD检测器获得三维的色谱-光谱数据,可直观地判断色谱峰的纯度^[10]。

在“2.3.2”项中色谱条件下,200~400 nm用DAD检测器记录色谱图,检查主成分峰的纯度,见图2。结果表明,主成分峰的质量分数为99.13%;三点光谱图完全重合,表明主成分峰为单一物质峰。

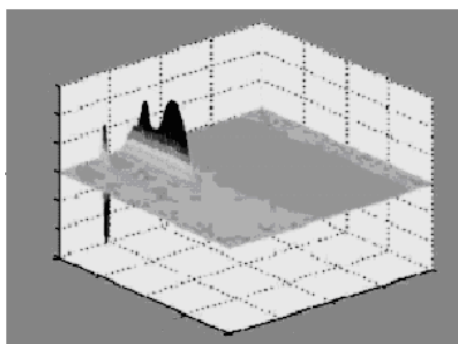


图2 蒙花苷色谱-光谱三维图
Fig. 2 Chromatography spectrum three-dimensional graph of linarin

3 讨论

为了使有效成分提取完全,本研究前期采用70%乙醇提取,加热回流3次,每次回流1.5 h,提取液减压回收至无醇味,滤过,得蒙花苷粗品沉淀。含有蒙花苷的沉淀部分主要是脂溶性成分,主要是色素类、甾醇类成分。这些杂质极性大小不相同,为除杂带来了困难,实验考察了重结晶、HPD-300型大孔树脂、中性氧化铝、碱溶酸沉法、石油醚脱脂碱溶酸沉法进一步纯化等方法纯化蒙花苷粗品。结果中性氧化铝法得到的蒙花苷纯度和转移率均较低;重结晶、HPD-300型大孔吸附树脂和碱溶酸沉法得到的蒙花苷纯度和转移率均有提高,但纯度在

90%左右;石油醚脱脂碱溶酸沉进一步法得到的蒙花苷纯度和转移率均有明显提高,故最后选用此法作为蒙花苷纯化的方法,并进一步优化溶剂用量比例,最终得到纯度97%以上的蒙花苷。

本实验可以在较短时间里采用常规的提取分离设备从10 kg小蓟中制备出至少30 g符合《中国药典》2010年版一部标准的蒙花苷对照品,可见溶剂法是一种极为有效的天然植物黄酮苷纯化方法。高纯度蒙花苷的制备为制定完善小蓟及其制剂的质量标准提供了蒙花苷对照品。本实验所用试剂经济、低毒,实验方法快速、简便、安全,纯化效果好,具有工业化生产应用价值,值得深入研究。

参考文献

- [1] 宋宏刚,裴彩云,赵韶华,等.不同产地野菊花药材中蒙花苷及总黄酮含量测定[J].中成药,2008,30(4):556-559.
- [2] 柯睿,朱恩圆,俞桂新.小蓟的质量标准研究[J].时珍国医国药,2010,21(7):1662-1663.
- [3] Martínez-Vázquez M, Ramírez Apan T O, Lastra A L, et al. A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata* [J]. *Planta Med*, 1998, 64(2): 134-137.
- [4] Han S, Sung K H, Yim D, et al. The effect of linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophages cell line RAW264.7. [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(2): 170-177.
- [5] Oinonen P P, Jokela J K, Hatakka A I, et al. Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis* [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77(6): 429-434.
- [6] Kim Y H, Lee Y S, Choi E M. Linarin isolated from *Buddleja officinalis* prevents hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Cell Immunol*, 2011, 268(2): 112-116.
- [7] Patel R, Nagueh S F, Tsybouleva N, et al. Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 317-324.
- [8] 中国药典[S].一部.2010:45.
- [9] 许浚,张铁军,龚苏晓,等.小蓟止血活性部位的化学成分研究[J].中草药,2010,41(4):542-544.
- [10] 刘宝,周莉莉,王骏,等.基于二极管阵列检测器的色谱峰纯度的快速直观鉴定[J].光谱实验室,2011,28(4):1684-1689.