

水飞蓟主要有效成分分离与分析方法概述

湖北省药品检验所(武汉 430064)

定天明* 施蕴华

中国药品生物制品检定所

田颂九 孙曾培

中国药科大学

张正行

水飞蓟 *Silybum marianum* L. Gaertn. 又名水飞雉, 是菊科水飞蓟属植物, 原产南欧、北非, 以民间草药用于治疗肝胆疾病, 具有抗肝胆中毒, 保护肝细胞膜, 改善肝功能的生理活性^[1,2]。我国早在 50 年代初, 由英国引入作观赏, 70 年代初开始研究其医药功效。国内外学者对水飞蓟的有效成分进行了大量的研究, 并开发出产品益肝灵片及复方益肝灵片均载入部颁标准, 国外也有利肝隆(LEGALON)片剂和胶囊剂, 笔者就其主要化学成分、提取分离及分析方法作一概述。

1 化学成分

20 世纪 60~80 年代末, 以 Wagner 为代表的药理学工作者从水飞蓟中分离提取有效成分称之为水飞蓟素(silymarin), 是一类新型的具有 C₆ 取代基的黄酮类化合物, 即以二氢黄酮醇和苯丙素类衍生物缩合而成的黄酮木脂素类(flavonolignans), 主要含水飞蓟宾(silybin or silybinin)、异水飞蓟宾(isosilybin or isosilybinin)、水飞蓟宁(silydianin)和水飞蓟亭(silychristin)^[3~7]。

1975 年竹本常松等^[8]从水飞蓟种子中除获得了上述水飞蓟宾等异构体外, 并获得两种新的黄酮醇木脂体。经红外, 紫外及核磁共振等分析, 确定它们的结构分别为 2,3-脱氢水飞蓟宾(2,3-dehydrosilybin)和 2,3-脱氢水飞蓟亭(2,3-dehydrosilychristin)。Bandopadhyay 等^[9]曾从水飞蓟种子中分离得天然脱氢水飞蓟宾, 即 2,3-脱氢水飞蓟宾。1979 年 Merlini 等^[10,11]分离得到异水飞蓟宾(isosilybin), 并且推测水飞蓟宾和异水飞蓟宾可能分别为两个非对映体的混合物(C₂, C₃ 是同一结构; C_{2'}, C_{3'} 是反式结构), 它们成为治疗肝胆疾病的主要有效成分^[12]。

2 有效成分的提取分离

水飞蓟素提取分离方法多采用有机溶媒渗漉和热回流, 结合国内外报道^[13~16]综合成下述方法:

2.1 醋酸乙酯法: 水飞蓟种子粗粉 500 g, 加汽油 1 000 mL, 加热回流 3 h, 提取 3 次, 得脱油种子粗粉, 水浴上减压蒸干残存汽油, 用醋酸乙酯 1 000 mL 回流 3 h, 提取 4 次, 提取液加活性炭 1 g 回流 1 h, 滤过, 滤液加水 100 mL, 振摇, 洗涤 4~5 次, 减压回收溶剂至干(如有油液应倾去), 用 90% 乙醇 200 mL 稍加溶解, 用汽油 80 mL 振摇洗涤 4~5 次, 醇液减压回收至干, 加醋酸乙酯 200 mL 溶解, 过滤, 滤液减压回收至干得水飞蓟素。

2.2 乙醇法: 脱脂后的水飞蓟种子粗粉, 加入工业乙醇 250 mL, 以后每次加 200 mL, 加热回流 3 次, 每次 1.5 h, 合并乙醇液, 回收乙醇得浓缩液, 醋酸乙酯萃取液减压回收至干, 得浅黄色粉末, 加 3 倍量石油醚放置 24 h 过滤, 干燥, 得水飞蓟素。

2.3 采用“罐组成强制循环逆流提取”新工艺: 结合强制循环法和逆流法, 将提取周期由渗漉法的 3 d, 热回流法的 2 d 缩短到 16 h。经极差分析, 认为影响收率的主要因素是液固比及循环时间, 其次是循环速度。实验证明, 最佳工艺条件是液固比为 5:1, 每次循环 3.5 h, 循环速度 8~12 次/小时。

3 主要有效成分分析方法

3.1 测定水飞蓟总量采用比色法: 称取相当于水飞蓟素样品, 加甲醇溶解, 作为供试品溶液。精密称取 70 mg 水飞蓟宾对照品置 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 作对照品溶液。取供试品溶液、对照品溶液、甲醇各 1 mL 置 10 mL 棕色量瓶中, 加 2.0 mL 二硝基苯肼硫酸试液, 盖塞, 置(50±1)℃加热器中放置 50 min, 冷却后, 甲醇稀释至刻度。各取 2.0 mL 上述溶液置 100 mL 容量瓶中, 加 3.0 mL 氢氧化四甲基胺的甲醇溶液, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 静置 30 min 后, 在 490 nm 处测定吸收度, 得水飞蓟素的含量。

3.2 水飞蓟素主要有效成分分离测定方法

* 定天明 1986 年南京药学院毕业, 副主任药师, 湖北省药检所从事药品检验工作, 现师从中国药科大学张正行教授和中国药品生物制品检定所田颂九研究员攻读在职硕士学位, 从事水飞蓟中主要有效成分分析研究。

3.2.1 双波长薄层色谱扫描法:吴知行等^[4]采用CS-910在硅胶G-0.6%CMC板上以氯仿-丙酮-甲酸(9:2:1)二次展开,对水飞蓟宾及水溶性衍生物和制剂进行分析, $\lambda_s=288\text{ nm}$, $\lambda_R=430\text{ nm}$ 。每1 mL含水飞蓟1 mg的无水乙醇溶液作对照品溶液,计算对照品和样品的峰面积与浓度的关系,即得供试品中水飞蓟宾的含量。罗淑荣等^[17]采用CS-930对益肝灵片中活性成分水飞蓟宾与水飞蓟亭进行了分离测定。以展开剂甲苯-醋酸乙酯-冰醋酸(2:1:0.5)展开,挥尽溶剂后显色(0.4%二氯氧锆的无水乙醇溶液)。 $\lambda_s=300\text{ nm}$, $\lambda_R=365\text{ nm}$,反射锯齿扫描,由标准品水飞蓟宾和水飞蓟亭的斑点与供试品斑点的吸收峰面积与浓度之比求得供试品中水飞蓟宾和水飞蓟亭的含量。

3.2.2 HPLC法:Martinelli等^[18]采用HPLC法定量分析人体血浆和尿液中水飞蓟宾的含量。色谱条件:正相柱A. Lichrosorb Diol(150 mm × 3 mm, id),流动相(正己烷-乙醇=70:30)用120 $\mu\text{L/L}$ 的85%的磷酸酸化,流速0.8 mL/min,检测波长214 nm,此方法未将水飞蓟宾与异水飞蓟宾分离测定。90年代初,Mascher等^[19]采用Rp-HPLC法对血浆中游离和结合的水飞蓟宾和异水飞蓟宾进行分离测定。色谱条件:Nucleosil 120-3 C₁₈(80 mm × 4 mm id),流动相甲酸-0.02 mol/L磷酸(1:1),流速1.0 mL/min,检测波长285 nm,水飞蓟宾与异水飞蓟宾的保留时间分别为3.1,3.4 min。此方法较适用于水飞蓟素的药代动力学等的测定。Ricrling等^[20]采用柱切换电化学检测的HPLC法和反相紫外检测的HPLC技术将血浆中游离的总的水飞蓟宾和异水飞蓟宾进行分离测定。内标物质为橙皮素(5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮酮,C₁₆H₁₄O₅)。水飞蓟宾与异水飞蓟宾的保留时间分别为28.8和32.2 min,内标保留时间为18.8 min。最近,笔者采用Rp-HPLC法对水飞蓟素制剂中水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟宁和水

飞蓟亭进行分离测定。色谱条件:柱Shim-Pack VP-ODS-(150 mm × 4.6 mm id 5 μm),流动相甲醇与混合溶剂(水-二氧六环=9:1)按梯度洗脱,流速为1.5 mL/min,检测波长288 nm,柱温40℃。样品中水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾与异水飞蓟宾的保留时间为8,10,23和27 min。

4 小结

水飞蓟素是混合黄酮类化合物,且以水飞蓟宾的非对映体组成。因此,国内外许多药学工作者力图将它们分离测定,仅偶见对水飞蓟和异水飞蓟宾进行了分离测定的报道,但对水飞蓟宾的其它非对映体未见有分离测定的报道。作者在查阅大量文献资料时发现国内外有些学者将水飞蓟素(混合物)误作为水飞蓟宾(单体),应引起注意。

参考文献

- 1 李晓玉. 国外医学-药学分册,1975,(2):243
- 2 刘笃宽. 陕西中医,1984,5(4):37
- 3 Wagner H, *et al.* *Arzneim Forsch*,1968,18:688
- 4 吴知行,等. 南京药学院学报,1981,(2):28
- 5 Abraham D J, *et al.* *Tetrahedron Lett*,1970,31:2675
- 6 常凤岗,等. 南京药学院学报,1985,16(4):12
- 7 Wagner H, *et al.* *Tetrahedron Lett*,1971,22:1985
- 8 竹本常松,等. 药学杂志(日),1975,95(8):1017
- 9 Bandorpedhyay M N, *et al.* *Indian J*,1972,10:808
- 10 Merlini L, *et al.* *J Chem Soc Chem Commun*,1979,16:696
- 11 Merlini L, *et al.* *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1980, 3:775
- 12 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册. 北京:人民卫生出版社,1986:958
- 13 Halbach G, *et al.* *Planta Med*,1971,19(4):295
- 14 尹淑兰,等. 中医药学报,1993,2:295
- 15 张俊华. 中国药学杂志,1991,26(8):490
- 16 江士恺. 中成药研究,1987,9(9):5
- 17 罗淑章,等. 中成药,1988,10(11):35
- 18 Martinelli E M, *et al.* *J Liquid Chromatogr*,1991,14(7):1285
- 19 Mascher H, *et al.* *J Liquid Chromatogr*,1993,16(13):2777
- 20 Rickling B, *et al.* *J Chromatogr*,1995,B267 670

(1999-03-19 收稿)

(上接第627页)

提液1滴于滤纸上,加1%茚三酮丙酮溶液,加热后即显浅灰紫色。4)取该品粉末少许,滴加硝酸液1 mL,显淡黄色。

2.3.4 1)取木薯粉末0.5 g,置试管中加稀盐酸数滴,试管中悬挂1条三硝基苯酚试纸,用软木塞塞紧,置水浴中加热10 min后,试纸呈砖红色。2)紫外吸收光谱:取本品粉末2 g,加10 mL石油醚(60℃~90℃)洗涤1次,再加1 mol/L氢氧化钠液20 mL,振摇提取,滤过,滤液用酸中和后,置分液漏斗中,以

20 mL乙醚提取,提取液照分光光度法测定,在220 nm和256 nm波长处有最大吸收峰。

3 小结

以上是笔者在基层医院工作多年积累的一点经验。方法简便,便于操作。在山药货源紧张时,更应对其进行鉴别。山药的易混品、伪品,质量、功效不及山药,特别是木薯对人体有毒副作用,不能药用,应认真识别,不可作山药使用。

(1999-01-24 收稿)