

HPLC 指纹图谱,较好地反映出全方整体成分质与量的分布情况,为三黄泻心汤及其类方的物质基础和配伍、配比规律研究提供分析方法,为中药复方研究提供思路。

参考文献:

[1] 早苗富士子. 三黄泻心汤及其组成生药的降压作用 [J]. 国

外医学: 中医中药分册, 2003, 25(1): 55.

[2] 蒋爱品. 三黄泻心汤的药理研究概况 [J]. 北京中医, 2001, 20(5): 45-46.

[3] 王 晶, 郭 平, 王 浩. 三黄泻心汤抗大鼠脑缺血再灌注损伤的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2003, 10(6): 338.

[4] 李秋贵. 金匱要略汤证论治 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000.

从骨碎补中制备新北美圣草苷和柚皮苷对照品的研究

岳春华^{1,2,3}, 李顺祥^{2,3*}

(1. 广东药学院, 广东 广州 510006; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013; 3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007)

摘 要:目的 建立从骨碎补中制备新北美圣草苷和柚皮苷对照品的方法。方法 结合大孔树脂富集、硅胶柱色谱、中性氧化铝吸附、Sephadex LH-20 柱色谱和重结晶方法对骨碎补乙醇提取物进行分离纯化,通过 MS、IR、UV、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 进行结构鉴定。结果 制备得到的新北美圣草苷和柚皮苷质量分数分别为 99.5%、99.3%。结论 建立的制备方法简单,对照品质量分数高,可作为骨碎补药效物质基础研究和骨碎补药材质量控制的对照品。

关键词: 骨碎补; 新北美圣草苷; 柚皮苷; 对照品

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0529-03

Preparation of neoeriocitrin and naringin reference substances from *Drynaria fortunei*

YUE Chun-hua^{1,2,3}, LI Shun-xiang^{2,3*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410013, China; 3. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: **Objective** To establish a separation method for neoeriocitrin and naringin reference substances from *Drynaria fortunei*. **Methods** The extract of *D. fortunei* was isolated and purified by macro porous resin, silica gel column chromatography, neutro-aluminum oxide adsorbing, Sephadex LH-20 column chromatography, and recrystallizations. The structures of neoeriocitrin and naringin were identified by MS, IR, UV, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. **Results** The contents of neoeriocitrin and naringin were 99.5% and 99.3%, respectively. **Conclusion** The developed method is simple with lower cost, by which neoeriocitrin and naringin can be used as reference substances for the qualitative and quantitative analysis of Chinese herbal medicine.

Key words: *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm.; neoeriocitrin; naringin; reference substance

骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎,具有补肾强骨、养伤止痛之功效。在临床上广泛应用于肾虚腰痛、耳鸣耳聋、牙齿松动、跌扑闪挫、筋骨骨折等症^[1]。骨碎补中最能体现其特征的成分是黄酮类化合物,其中新北美圣草苷和柚皮苷的量较高,是骨碎补的主要成分^[2~6]。《中国药典》2005 年版规定柚皮苷为骨碎补药材质量控制指标成分。市场上无新北美圣草苷对

照品出售,限制了骨碎补的进一步开发与研究。本实验结合大孔树脂富集、硅胶柱色谱、中性氧化铝吸附、Sephadex LH-20 柱色谱和重结晶方法对骨碎补乙醇提取物进行分离纯化,得到新北美圣草苷和柚皮苷,为骨碎补药材及其复方提供标准物质。

1 仪器与药品

Waters 510 高效液相色谱仪(配 Waters486 紫外检测器)(美国 Waters 公司), Varian INOVA—

收稿日期: 2007-08-20

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A43); 湖南省科技厅计划项目(05FJ4049); 湖南省教育厅课题(04C452); 湖南省卫生厅中医药科研基金课题(24303)

作者简介: 岳春华(1982—),女,硕士,主要从事中药化学、制药工程研究。 Tel: (020)39352118 E-mail: yuechunhua2004@126.com

* 通讯作者 李顺祥 Tel: (0731)8807173 E-mail: lishunxiang@hotmail.com

400 核磁共振仪(美国 Varian 公司), Quadrapole 质谱仪(英国 Manchester 公司), LC-MS (Thermo finnigan) 联用仪(美国 finnigan 公司), GC-17 AQP-5000(日本岛津公司), WQF 410 FT-IR(北京第二光学仪器厂), UV-2450(日本岛津公司), X-5 控温型显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司), Büchi 旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司)。

骨碎补药材购于湖南省双牌县药材公司, 经湖南省中医药研究院生药室谢昭明研究员鉴定; 羧甲基纤维素钠(广东汕头市西陇化工厂), 薄层色谱硅胶、柱色谱硅胶(200~300 目, 青岛海浪硅胶干燥剂生产厂), LSA-10 大孔吸附树脂(西安蓝晓科技有限公司), Sephadex LH-20(瑞士药物生物技术公司); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取液的制备: 称取骨碎补药材 1 kg, 粉碎成 1~2 cm 碎块, 第一次加 10 倍量 50% 乙醇回流提取 1.5 h, 第二次加 8 倍量 50% 乙醇回流提取 1.0 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇至无醇味, 浓缩至体积 2 L, 即得骨碎补提取液。

2.2 大孔树脂富集纯化: LSA-10 大孔吸附树脂 500 g, 用乙醇浸泡 24 h, 倾去上浮物, 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。取骨碎补提取液 2 L 吸附于大孔吸附树脂柱, 用蒸馏水洗柱至近无色, 15% 乙醇洗除杂, 后用 20% 乙醇、80% 乙醇洗柱, 收集 20% 乙醇洗部分和 80% 乙醇洗部分浓缩分别得干膏 5.46、3.86 g。

2.3 柚皮苷和新北美圣草苷的制备: 硅胶 200~300 目 250 g, 三氯甲烷湿法装柱, 20% 乙醇洗部分干膏(5.46 g)加甲醇溶解, 用 10 g 硅胶拌样均匀后蒸干, 研细上样, 以三氯甲烷-甲醇(19:1→3:1)洗脱, 收集洗脱部分, 用薄层色谱检验且合并斑点相同部分, 得新北美圣草苷部分, 浓缩后热水重结晶, 结晶用制备薄层色谱分离, 制备薄层条件为醋酸乙酯-甲酸-水-苯(12:2.5:3:1)上层, 刮板后甲醇洗脱, 浓缩, 重结晶即得新北美圣草苷 260 mg; 母液蒸干, 甲醇溶解上 Sephadex LH-20, 以甲醇洗脱, 反复柱色谱分离得新北美圣草苷 60 mg。80% 乙醇洗部分干膏(3.86 g)加中性氧化铝 8 g 和活性炭 1 g, 研匀, 乙醇回流提取, 提取液浓缩, 50% 乙醇重结晶, 即得柚皮苷 300 mg。

2.4 柚皮苷的结构确定: 白色结晶, 易溶于甲醇、热水, 微溶于水, 熔点: 172~173 °C, $C_{27}H_{32}O_{14}$ 。UV

(MeOH) $\lambda_{\max}$ nm: 326、283。IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3 428、2 928、1 645、1 585、1 519、1 455。ES-MS m/z : 603、580、273、272。 1H -NMR (CD_3OD) δ : 7.32、6.82、6.19、6.18、5.38、5.27、5.14、3.2~3.9、2.76~3.10、1.30。 ^{13}C -NMR (CD_3OD) δ : 78.9、43.9、198.4、158.6、96.9、166.5、97.9、164.8、104.9、130.7、129.1、116.5、164.7、99.4、80.6、78.1、71.2、78.9、62.3、102.4、72.1、72.2、73.9、69.9、18.2。以上波谱数据与文献报道^[7]的柚皮苷一致, 确定其结构为柚皮苷。

2.5 新北美圣草苷的结构确定: 浅黄色结晶, 易溶于甲醇、热水, 微溶于水, 熔点: 192~193 °C, $C_{27}H_{32}O_{15}$ 。UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm: 326.4、283.8、214.8。IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3 404、1 641、1 294、1 174、1 090。EI-MS m/z : 288 $[M-308(Glc+Rha)]^+$ 、153、136; APCI-MS m/z : 630.7 $[M-H+2H_2O]^+$ 、595 $[M-H]^+$; APCI-MS₂ m/z : 459(100%, $[M-H+136]^+$)、287 $[M-H-308(Glc+Rha)]^+$ 。 1H -NMR (DMSO) δ : 12.06(1H, d, 5-OH)、9.12~9.07(2H, 3', 4'-OH)、6.75~6.89(3H, 2', 5', 6'-H)、6.10(2H, s, 6, 8-H)、5.44(1H, dd, $J=5.0$ Hz, 2-H)、5.14(1H, d, Glc-1-H)、4.65(1H, m, Rha-1-H)、3.19~3.67(10H, m, Sugar-H)、2.50(2H, m, 3-H)、1.15(3H, d, $J=5.0$ Hz, Rha-6-H)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD) δ : 80.5(C-2)、43.9(C-3)、198.5(C-4)、164.8(C-5)、97.9(C-6)、166.5(C-7)、97.0(C-8)、164.5(C-9)、105.0(C-10)、131.5(C-1')、119.5(C-2')、146.4(C-3')、146.9(C-4')、116.5(C-5')、115.0(C-6')、99.4(Glc-C-1)、80.5(Glc-C-2)、78.9(Glc-C-3)、72.2(Glc-C-4)、79.3(Glc-C-5)、62.4(Glc-C-6)、102.4(Rha-C-1)、78.1(Rha-C-2)、74.0(Rha-C-3)、71.3(Rha-C-4)、70.0(Rha-C-5)、18.1(Rha-C-6)。波谱数据与文献报道^[6,8]的新北美圣草苷一致, 确定其结构为新北美圣草苷。

2.6 薄层色谱法定性鉴别: 将制备所得柚皮苷和新北美圣草苷分别点样于薄层板, 分别采用醋酸乙酯-甲酸-水-苯(12:2.5:3:1)上层、三氯甲烷-甲醇-水(5:1:0.5)下层、正己烷-丙酮-醋酸(7.5:7:0.1)展开, 三氯化铝试液为显色剂, 置紫外灯(365 nm)下检视, 柚皮苷呈亮绿色斑点, 新北美圣草苷呈亮黄色斑点。

2.7 高效液相色谱法定量分析: 色谱柱 Hypersil ODS₂ C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-

1%冰醋酸(35:65)、甲醇-0.1%磷酸水(梯度洗脱)、乙腈-0.4%冰醋酸(19:81);检测波长 283 nm、360 nm;柱温:30℃;体积流量:1.0 mL/min。在不同的色谱条件下,柚皮苷和新北美圣草苷均为一个主峰,改变流动相分析,未见异常峰,用面积归一化法计算,二者质量分数分别为 99.3%、99.5%。其中甲醇-1%冰醋酸(35:65),283 nm 下检测图谱见图 1。

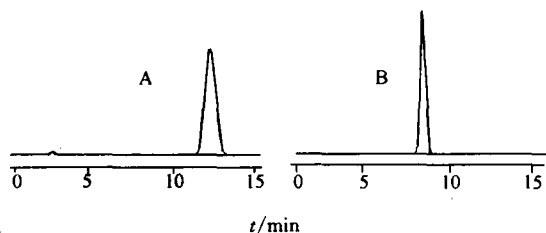


图 1 新北美圣草苷(A)和柚皮苷(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of neoeriocitrin (A) and naringin (B)

3 讨论

柚皮苷和新北美圣草苷均为骨碎补的活性成分,量高,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,符合对照品的质量分数要求,因而可作为对照品使用,供骨碎补药材及其复方中药的定性、定量分析。

大孔树脂精制时,具有吸附容量大、洗脱效率高等优点,使柚皮苷和新北美圣草苷的量提高,除去糖

类等多数杂质。富集样品上硅胶柱色谱分离后,所得新北美圣草苷部分由于柚皮苷和新北美圣草苷结构很相近,需采用制备薄层色谱或 Sephadex LH-20 反复柱色谱分离才能达到分离效果。

利用柚皮苷和新北美圣草苷在中性氧化铝中的吸附性能不同,将新北美圣草苷吸附在中性氧化铝上,而柚皮苷可在乙醇回流时解吸附,从而分离得到柚皮苷,经反复重结晶得到质量分数 99.3% 的柚皮苷白色结晶。被吸附在中性氧化铝上的新北美圣草苷可以在酸性乙醇超声条件下解吸附,但在酸性乙醇条件下回流会有部分转变成柚皮苷,说明新北美圣草苷在酸性高温条件下不稳定。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 李顺祥,龙 勉,张志光. 骨碎补的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(11): 75-78.
- [3] 李顺祥,张志光,龙 勉. 不同产地骨碎补的柚皮苷测定[J]. 中南药学, 2003, 1(2): 103-104.
- [4] 李顺祥,张志光,龙 勉,等. 骨碎补超微饮片的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1634-1637.
- [5] 徐传河,杨松松. 中药骨碎补化学成分研究(一): 槲蕨根茎化学成分研究[J]. 辽宁中医学院学报, 1984, 1(1): 49-52.
- [6] Li F, Meng Z, Xiong Y, et al. Stimulative activity of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. extracts and two of its flavonoids on the proliferation of osteoblastic like cells [J]. *Pharmazie*, 2006, 61: 962-965.
- [7] 陈德昌. 中药化学对照品工作手册[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000.
- [8] Kosuge K, Mitsunaga K, Koike K, et al. Studies on the constituents of *Ailanthus integrifolia* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42(8): 1669-1671.

高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法测定人工培养 蛹虫草多糖的单糖组成

杨 威¹,殷 茵¹,宋丽艳^{1,2},赵 昱²,于荣敏^{1*}

(1. 暨南大学药学院,广东 广州 510632; 2. 浙江大学药学院,浙江 杭州 310038)

摘 要:目的 采用高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法测定人工培养蛹虫草多糖的单糖组成。方法 以人工培养蛹虫草子实体为原料,利用热水和稀碱液分别对其水溶性多糖成分进行提取,分离得到 6 种人工蛹虫草水溶性多糖化合物。其中水提部分主要分离得到 3 种精多糖 P50、P70-1 和 P70-2,碱提部分则分离得到 3 种精多糖 CBP-1、CBP-2 和 CBP-3。高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法分别对上述 6 种精多糖的单糖组成成分进行了测定。结果 除 CBP-3 为葡聚糖外,其他 5 个多糖均为由 D-甘露糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖组成的杂多糖。结论 采用高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱法进行多糖化合物的单糖组成成分测定,无需进行衍生化,可达到简便、高效、准确地进行单糖组成分析之目的。

关键词:人工蛹虫草;多糖;单糖;高效阴离子交换-脉冲安培检测色谱

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0531-05

收稿日期:2007-06-10

基金项目:广州市科技计划项目(2006Z3-E5031)

作者简介:杨 威(1982-),男,湖南岳阳人,暨南大学 2004 级硕士研究生,主要从事现代生物技术与中药现代化相关内容研究。

* 通讯作者 于荣敏 Tel: (020)85220386 E-mail: tyrm@jnu.edu.cn