

3 讨论

热稳定性试验表明, 此酶在 30~ 60 ℃稳定性较差, 保温 150 min 酶活基本降至原来的 20%, 提示在炮制过程中温度的控制至关重要。pH 值稳定性试验表明, 在 pH 5.0~ 7.0 比较稳定, 而 pH 值低于 4 时酶的稳定性较差, 尤其是在酸性条件下酶活下降较快。保存稳定性试验表明, 在 4 ℃下保存 10 d 酶活性仍较高, 保存稳定性较好。基本的酶学性质为青黛炮制过程中浸泡环节温度和 pH 值的控制提供了依据, 对阐明炮制原理奠定了基础。

本研究试图证明马蓝叶细胞外存在 β -葡萄糖苷酶, 并研究它的最佳酶解条件, 以证明马蓝叶的浸泡过程是由 β -葡萄糖苷酶水解吲哚苷为吲哚酚的过程。并在此研究基础上, 确证了由马蓝叶中获取吲哚酚可以利用马蓝叶中的细胞外酶, 而不需要通过

发酵获取 β -葡萄糖苷酶, 这样不仅大大缩短了生产时间, 而且使生产环境和浸泡液的卫生条件得到了很大的改善, 还为马蓝叶的再利用拓宽了道路。

参考文献:

- [1] Woodward J, Wiseman A. Fungal and other β -glucosidase, their properties and applications [J]. *Enzyme Microbial Technology*, 1982(4): 73-79
- [2] 董尚胜, 童启庆. 栀子花中糖苷酶的分离及其与醇系香气形成的关系[J]. 浙江大学学报, 2000, 26(1): 89-92
- [3] 董尚胜, 童启庆. 茉莉花中 β -D-葡萄糖苷酶活性差异[J]. 福建茶叶, 1998(4): 9-10
- [4] 赵 芹, 童启庆. 茶叶香气水解酶研究动态[J]. 福建茶叶, 1999(1): 5-7
- [5] 郭雯飞. 茶叶香气生成机理的研究[J]. 中国茶叶加工, 1996(4): 34-37
- [6] 江昌俊, 李叶云. 茶叶中 β -D-葡萄糖苷酶测定条件的研究[J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26(2): 212-215
- [7] 骆耀平, 董尚胜, 童启庆, 等. 17 个茶树品种新梢生育过程中 β -葡萄糖苷酶的变化[J]. 茶叶科学, 1997, 17(增刊): 104-107
- [8] 王华夫, 游小青. 茶叶中 β -葡萄糖苷酶活性测定[J]. 中国茶叶, 1996(3): 16-17

毛鸡骨草中异夏佛塔苷对照品的制备研究

宁丽娟^{1,2}, 叶志文³, 欧彪³, 汪豪^{1,2*}, 叶文才^{2,4}, 赵守训²

(1 中国药科大学 现代中药教育部重点实验室, 江苏 南京 210009; 2 中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 210009; 3 广西玉林制药有限责任公司, 广西 玉林 537001; 4 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632)

摘要:目的 建立毛鸡骨草中异夏佛塔苷对照品的制备分离方法。方法 取毛鸡骨草药材醇提浸膏的正丁醇萃取部分用硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇(90:10~70:30)梯度洗脱, 收集异夏佛塔苷富集流份, 继续采用低压 C_{18} 柱色谱及制备 HPLC 进行分离纯化, 通过 NMR、MS 等波谱方法鉴定化合物结构, 经 TLC、HPLC-UV 及 MS 联用等技术进行质量分数检测。结果 从毛鸡骨草中制备分离的异夏佛塔苷对照品, 质量分数 > 99%。结论 本法得到的异夏佛塔苷对照品符合中药化学对照品的相关技术要求, 为药材毛鸡骨草和含毛鸡骨草的成方制剂的质量控制及药效物质基础研究提供化学对照品。

关键词: 毛鸡骨草; 异夏佛塔苷; 对照品; 制备高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1464-03

Preparation of isoschaftoside reference substance from *Abrus mollis*

NING Liruan^{1,2}, YE Zhiwen³, OU Biao³, WANG Hao^{1,2}, YE Wencai^{2,4}, ZHAO Shouxun²

(1 Key Laboratory of Modern Chinese Medicines, China Pharmaceutical University, Ministry of Education, Nanjing 210009, China; 2 Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3 Guangxi Yulin Pharmaceutical Co., Ltd., Yulin 537001, China; 4 Institute of Traditional Chinese Medicine

and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **Objective** To establish a preparative method for reference substance of isoschaftoside from *Abrus mollis*. **Methods** The *n*-butanol fraction from the ethanol extract of *A. mollis* was subject to column chromatography on silica gel eluted with a gradient of CHCl₃-MeOH (90:10 to 70:30). The collected fraction of isoschaftoside was successively purified by low-pressure ODS column and preparative HPLC. Its structure was identified by spectroscopic analysis and the purity was detected by TLC and HPLC-UV-MS. **Results** The TLC and HPLC analysis showed that the purity of the reference substance

* 收稿日期: 2010-03-23

基金项目: 科技部“十一五”重大新药创制项目(2009ZX09103-315); 广西科学研究与技术开发项目(桂科攻 0815005-1)

作者简介: 宁丽娟, 女, 硕士生。Tel: 15850686765 E-mail: lijuan_ning621@gmail.com

* 通讯作者 汪豪 Tel: (025) 86185376 E-mail: btwanghao@yahoo.com.cn

was more than 99%. **Conclusion** The reference substance of isoschaftoside acquired by this method could meet the relative demands of the chemical reference substance in Chinese materia medica. It could be used as a reference standard of the quality control and the research of herbal medicine.

Key words: *Abrus mollis* Hance; isoschaftoside; reference substance; preparative HPLC

鸡骨草为豆科相思子属植物鸡骨草 *Abrus cantoniensis* Hance 和毛鸡骨草 *A. mollis* Hance 的干燥全草。本品具有清热利湿、舒肝止痛、活血散瘀的功效, 临床用于治疗急慢性肝炎、肝硬化腹水、胃痛、风湿痹痛等症^[1]。毛鸡骨草又名大叶鸡骨草, 为广西特产药材, 也是广西玉林制药有限公司生产的中药名优产品“鸡骨草胶囊”等肝胆疾病治疗系列中成药的主要原料, 年需求量 2 000 t 以上。为了寻找广西特产药材毛鸡骨草治疗肝病的药效活性成分, 本课题组对毛鸡骨草进行了较为系统的药效物质基础研究, 发现毛鸡骨草治疗肝炎的主要药效活性成分为芹菜素黄酮碳苷类化合物, 其中异夏佛塔苷(芹菜素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷, 结构式见图 1) 的量较大^[2-3]。《中国药典》2005 年版一部鸡骨草药材质量标准只收录了显微、化学法鉴别等项目。本实验以毛鸡骨草为原料, 采用制备高效液相色谱等分离方法制备异夏佛塔苷化学对照品并进行标准物质研究, 为药材毛鸡骨草和含毛鸡骨草的成方制剂的质量控制及药效物质基础研究奠定基础。

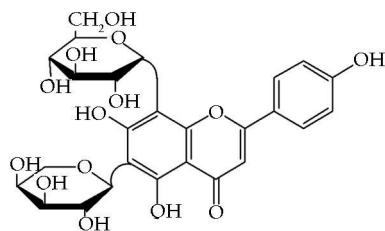


图 1 异夏佛塔苷的结构式

Fig 1 Structure of isoschaftoside

1 仪器与材料

X-4 型熔点测定仪; Shimadzu 8400 型红外光谱仪(KBr 压片); Bruker Avance 500 型核磁共振仪(¹H-NMR 500 MHz, ¹³C-NMR 125 MHz); Shimadzu 2020 型液质联用仪(包括 LD-20AD 高压二元泵, SPD-M20A 型二级管阵列检测器, SIL-20AC 自动进样器, CTD-20AC 柱温箱, LC-2020 型单级四级杆质谱, LC MSsolution 工作站); Agilent 1100 型制备高效液相色谱仪(G1361 型高压二元泵, G1365B 型 MWD 检测器)。

柱色谱及薄层色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂生产; 聚酰胺板为浙江黄岩化工厂生产; C₁₈ 薄层色

谱板及柱色谱用 C₁₈ (40~ 63 μm) 均为 Merck 公司产品; 其他试剂均为分析纯。

毛鸡骨草药材采自广西玉林市, 经广西玉林制药有限公司叶志文高级工程师鉴定为毛鸡骨草 *Abrus mollis* Hance 的干燥地上部分, 模式标本保存于中国药科大学天然药物化学教研室。

2 方法与结果

2.1 原料处理: 取毛鸡骨草药材 5 kg, 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并醇提液, 减压浓缩至浸膏状, 加水混悬, 分别用石油醚、氯仿及正丁醇萃取, 取正丁醇部位浓缩成浸膏(200 g), 加硅胶拌样, 上样于硅胶柱(200~ 300 目), 以氯仿-甲醇(90: 10~ 70: 30)梯度洗脱, 取(80: 20)的洗脱流份上样于 Sephadex LH-20 柱, 甲醇洗脱, 合并黄酮碳苷富集流份, 继续采用 C₁₈ 低压色谱柱(40~ 63 μm, 200 g)分离, 30% 甲醇洗脱, 所得流份经 TLC 检视。TLC 条件为聚酰胺, 乙醇-水(40: 60)展开, 2% AlCl₃ 乙醇溶液显色, UV 365 nm 检视。合并异夏佛塔苷富集流份, 减压回收至干, 得异夏佛塔苷粗品(750 mg, 质量分数约 65%)。

2.2 色谱条件

2.2.1 制备型 HPLC 条件: Waters RCM Nova Pak HR C₁₈ Cartridge(300 mm × 25 mm, 6 μm); 流动相为甲醇-水(30: 70); 体积流量 20 mL/min; 检测波长 272 nm; 进样量 1.0 mL(25 mg/mL, MeOH)。

2.2.2 分析型 HPLC 条件: Agilent Zorbax C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 40 °C; 流动相为甲醇-水(30: 70); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 272 nm; 进样量 20 μL(100 μg/mL, MeOH)。

2.3 对照品的制备分离: 取异夏佛塔苷粗品加甲醇配制成 25 mg/mL 的溶液, 制备高效液相色谱法多次进样分离纯化, 每次进样量为 1 mL, 收集保留时间为 7.0 min 色谱峰(制备 HPLC 色谱图见图 2, 虚线内为制备收集范围), 减压回收至干后置恒温干燥箱(60 °C)干燥 24 h, 得到黄色无定性粉末(220 mg)。

3 样品的检测

3.1 薄层色谱检测: 取异夏佛塔苷自制品, 加甲醇配制成 2 mg/mL 的溶液, 分别点样 5 μL 于硅胶 G 薄层色谱板和聚酰胺色谱薄膜。其中硅胶 G 薄层色谱

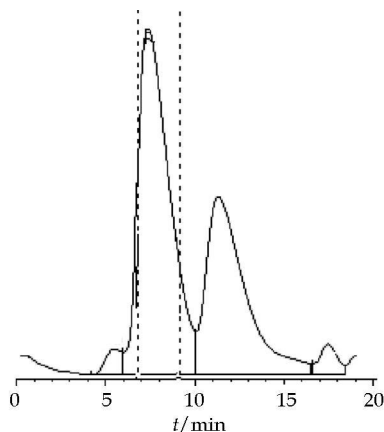


图2 异夏佛塔苷的制备高效液相色谱图

Fig 2 Preparative HPLC chromatogram of isoschaftoside

开剂: 正丁醇-醋酸-水(4:1:5, 上层), 聚酰胺薄层色谱展开剂: 乙醇-水(40:60)。显色剂: 2% AlCl_3 乙醇溶液。105 °C加热5 min, 紫外光灯(365 nm)下检视, 见单一黄色荧光主成分斑点, 无杂质斑点。

3.2 HPLC-UV 检测: 取异夏佛塔苷自制品, 加甲醇配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 按照 2.2.2 项下条件分析, 面积归一化法定量, 结果自制品的质量分数为 99.01%, HPLC-UV 质量分数检查图谱见图 3。改变流动相为乙腈-水(18:82)进行质量分数检查, 质量分数均 > 98%。

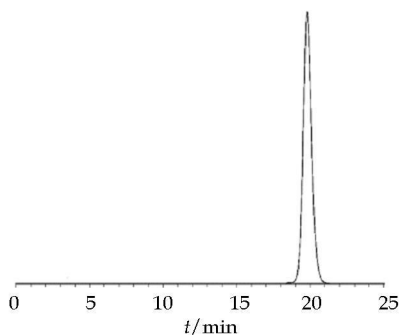


图3 异夏佛塔苷的 HPLC-UV 质量分数检查图谱

Fig 3 HPLC-UV Chromatogram of isoschaftoside

3.3 HPLC-MS 检测: 取异夏佛塔苷自制品, 加甲醇配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 进样 20 μL , 液质联用仪检测。质谱条件: ESI 源, 负离子模式, 离子源电压 4.5 V, 采用总离子流监测(TIC)方式, 扫描进样物质的总离子流, 扫描范围(m/z)为 50~2000, 扫描间隔 0.5 s, HPLC-MS 质量分数检查图谱见图 4。可知样品经高效液相色谱柱分离, 仅产生一个显著的离子峰, 该离子峰经选择性离子监测发现其负离子质荷比为 563 的化合物, 未见其他离子峰。

4 结构鉴定

淡黄色粉末, AlCl_3 反应阳性, 盐酸-镁粉反应阳

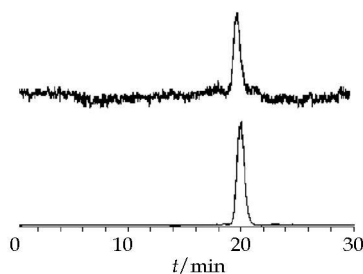


图4 异夏佛塔苷的 HPLC-MS 质量分数检查图谱

Fig 4 HPLC-MS Spectra of isoschaftoside

性, mp 200~201 °C; Positive ESI-MS m/z : 563 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, 结合 ^1H 、 ^{13}C -NMR 信息推断该化合物的分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$ 。IR (KBr) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3362 (OH), 1649 (C=O), 1582 (C=C), 1520 (C=C), 1090 (C-O)。 ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.80 (5-OH), 7.99 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J=8.2$ Hz, H-3', 5'), 6.73 (1H, s, H-3), 4.80 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-1''' of Glc), 4.65 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-1'' of Ara)。 ^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 163.5 (C-2), 102.3 (C-3), 181.8 (C-4), 161.1 (C-5), 108.2 (C-6), 161.1 (C-7), 104.4 (C-8), 154.8 (C-9), 102.3 (C-10), 121.6 (C-1'), 128.7 (C-2', 6'), 115.8 (C-3', 5'), 158.4 (C-4'), 74.3 (C-1'' of Ara), 74.0 (C-2'' of Ara), 71.0 (C-3'' of Ara), 70.0 (C-4'' of Ara), 68.6 (C-5'' of Ara), 73.3 (C-1''' of Glc), 70.6 (C-2''' of Glc), 78.9 (C-3''' of Glc), 70.5 (C-4''' of Glc), 81.8 (C-5''' of Glc), 61.2 (C-6''' of Glc)。综合以上信息, 与文献对照^[4], 确证该化合物为异夏佛塔苷(isoschaftoside)。

5 讨论

毛鸡骨草的保肝降酶的药效活性成分为芹菜素黄酮碳苷类化学成分, 本课题组选择异夏佛塔苷作为本植物特征性指标成分并进行标准物质研究, 专属性强, 具有质量控制意义, 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, 为药材毛鸡骨草和含毛鸡骨草的成方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] 《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999
- [2] 刘卓伟, 阙兆麟, 叶志文, 等. 毛鸡骨草地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(6): 415-417
- [3] 汪豪, 熊非, 刘卓伟, 等. 黄酮碳苷类化合物在制备治疗和预防肝炎药物中的应用[P]. 中国专利: 200710134589.4, 2008-04-16
- [4] Chen X, Nigel C, Peter J, et al. Flavone C-Glycosides from *Viola yedoensis* Makino [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(10): 1204-1207.