

欹木中银椴苷的提取及测定

魏惠珍¹, 郭强¹, 冯育林¹, 张武岗¹, 杨世林¹, 金浩鑫², 饶毅^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 研究欹木中银椴苷的提取分离及对银椴苷进行质量控制。**方法** 采用乙醇回流法提取药材, 然后经过大孔树脂、减压硅胶柱色谱、洗脱, 得到银椴苷单体, 采用 Cosmosil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (55:45), 检测波长为 320 nm, 体积流量 1.0 mL/min。**结果** 银椴苷能够很好地分离出来, 质量分数为 98%, 银椴苷在 0.041~0.513 μg 呈良好的线性关系 ($r=0.9997$); 平均回收率为 100.05%, RSD 为 1.50%。**结论** 运用此方法能将银椴苷较好地提取分离, 同时测定方法不仅操作简单、准确, 且重复性好, 可用于欹木中银椴苷的测定。

关键词: 欹木; 银椴苷; 质量控制; 提取分离; 黄酮类

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)05-0714-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.022

Extraction and determination of tiliroside from *Loropetalum chinense*

WEI Hui-zhen¹, GUO-Qiang¹, FENG Yu-lin¹, ZHANG Wu-gang¹, YANG Shi-lin¹, JIN Hao-xin², RAO Yi¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: **Objective** To research the separation, extraction, and quality control of tiliroside from *Loropetalum chinense*. **Methods** The herbs were extracted using ethanol reflux extraction, and then through macroporous resin, depressure silica gel column chromatography, and elution, tiliroside monomer was obtained. Content was determined by the C₁₈ column, mixture of methanol-0.1% phosphoric acid (55:45) as mobile phase at 1.0 mL/min, and UV detection wavelength at 320 nm were used for the determination. **Results** Tiliroside can be a good separation of the monomer, with the content of 98%; Tiliroside was better in linear relationship in the range of 0.041—0.513 μg ($r=0.9997$). The recovery rate was 100.05%, RSD = 1.50%. **Conclusion** Using this method, tiliroside can be better extracted and separated, Meanwhile the determination method is very stable and accurate, and has good repeatability, which can be used for the quality control of tiliroside from *L. chinense*.

Key words: *Loropetalum chinense* (R. Brown) Oliv.; tiliroside; quality control; extraction and separation; flavonoids

欹木 *Loropetalum chinense* (R. Brown) Oliv. 为金缕梅科欹木属植物, 收载于《中国药典》1977年版(一部), 是民间常用的草药, 具有清热解毒、收敛止血的功效^[1-2]。欹木有白花欹木和红花欹木之分, 药用方法为茎叶混合加入花制成汤剂煎服或者鲜花、茎叶捣烂外敷^[3]。欹木的主要成分为鞣质、有机酸、黄酮类成分^[4], 有研究报道其黄酮类成分具有良好的抗氧化活性^[5]。本实验通过提取、分离, 首次从欹木中得到黄酮类成分银椴苷, 并以此

为测定指标, 建立了欹木药材质量标准同时比较了白花欹木和红花欹木茎、叶中银椴苷的量, 为欹木入药提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪 (Waters2695 分离单元, Waters2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站); AB104—N 型电子分析天平; AUW220D 型电子分析天平 KQ—250DB 型数控超声波清洗器;

收稿日期: 2013-08-14

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (2009BAD3B03)

作者简介: 魏惠珍 (1965—), 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药质量控制新技术研究。

Tel: (0791)87119651 E-mail: weihuihen101@126.com

*通信作者 饶毅 (1964—), 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药质量控制研究。Tel: (0791)87119609 E-mail: raoyi99@126.com

Millipore—Q 纯水器 (美国 Millipore 公司); HH—4 型数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); Bruker avance 600 型核磁共振仪; HPD 400 大孔吸附树脂 (沧州宝恩化工有限公司)。

1.2 材料

白花欒木药材 (产地: 江西景德镇、江西抚州、浙江杭州), 红花欒木药材 (产地: 江西景德镇、江西抚州、浙江杭州), 以上药材经江西中医学院中药鉴定室付小梅教授鉴定为欒木 *Loropetalum chinense* (R. Brown) Oliv.。甲醇有色谱纯和分析纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

银槲苷对照品 自行提取精制, 经 ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 等鉴定结构, 质量分数均大于 98% (归一化法计算)。

2 方法与结果

2.1 银槲苷提取分离

取白花欒木药材 17 kg, 粉碎, 以 8 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 回收溶剂, 减压干燥。提取物采用 HPD-400 大孔树脂进行分离纯化, 得水洗脱物及 10%、70%、95% 乙醇洗脱物。70% 乙醇洗脱物 (516.2 g), 甲醇溶解, 100~200 目硅胶拌样后进行减压硅胶 (300~400 目) 柱色谱, 醋酸乙酯-甲醇梯度洗脱 (1:0→1:1), 共得 10 个流分 (Fr. A~J)。

取 Fr. A (98.75 g), 甲醇溶解, 滤过, 沉淀反复重结晶得 Lor-4, 上层溶液, 挥干溶剂, 再用醋酸乙酯溶解, 进行聚酰胺柱色谱, 醋酸乙酯-甲醇梯度洗脱 (1:0→1:1), 共得 8 个流分 (Fr. A1~8)。取 Fr. A6 反复 ODS 柱色谱, 甲醇水梯度洗脱, 再经 MCI-gel 柱色谱, 甲醇水梯度洗脱, 得 Lor-9。

2.2 银槲苷的结构鉴定

化合物 Lor-9 为黄色粉末, 可溶于甲醇, 盐酸镁粉反应呈阳性, 提示该化合物具有黄酮结构。苷元部分: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO) δ : 6.16 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 8.00 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.86 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 5.23 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.37~3.41 (2H, m, H-2'', 5''), 4.28 (1H, dd, $J=2, 12$ Hz, Ha-6''), 4.04 (1H, dd, $J=6.4, 12$ Hz, Hb-6''), 7.35 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2''', 6'''), 6.79 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3''', 5'''), 7.37 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7'''), 6.11 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8'''); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO) δ : 156.92 (C-2), 133.55 (C-3), 177.88 (C-4), 161.63

(C-5), 99.23 (C-6), 164.63 (C-7), 94.14 (C-8), 156.83 (C-9), 104.36 (C-10), 121.24 (C-1'), 131.29 (C-2', 6'), 115.56 (C-3', 5'), 160.26 (C-4'), 101.45 (C-1''), 74.60 (C-2''), 76.71 (C-3''), 70.45 (C-4''), 74.71 (C-5''), 63.44 (C-6''), 125.41 (C-1'''), 130.61 (C-2''', 6'''), 116.23 (C-3''', 5'''), 160.26 (C-4'''), 145.06 (C-7'''), 114.12 (C-8'''), 166.63 (C-9''')。ESI-MS m/z : 593 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 碎片离子 m/z : 447, 285, 269。结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据分析, 确定该化合物分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$ 。将该化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献数据^[6]对照基本一致, 故该化合物为银槲苷。结构见图 1。

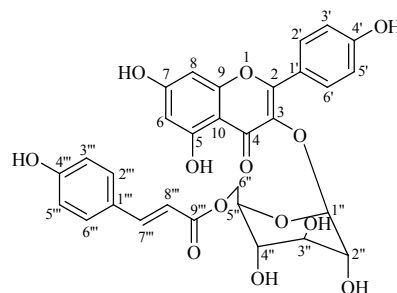


图 1 银槲苷化学结构

Fig. 1 Chemical structure of tiliroside

2.3 银槲苷的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Cosmosil C_{18} 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (55:45), 检测波长为 320 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL 。在此色谱条件下, 银槲苷峰型较好, 并且能够较好地分离。色谱图见图 2。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取银槲苷对照品 5.13 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得 25.2 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 摇匀, 即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 取白花欒木药材粉碎, 过 4 号筛, 取白花欒木药材粉末 1 g, 精密称定, 置平底烧瓶瓶中, 精密加入甲醇约 50 mL, 称定质量, 回流提取 1.5 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足损失的质量, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3.4 提取溶剂考察 精密称取白花欒木药材 1 g, 置 50 mL 平底瓶中, 精密加入 50%、80%、100% 甲醇 50 mL, 称质量, 回流 1 h, 放冷, 补充质量, 摇匀, 滤过, 即得。测得 50%、80%、100% 甲醇提取银槲苷的质量分数分别为 0.404、0.476、0.510 mg/g。

2.3.5 回流时间考察 精密称取白花欒木药材 1 g,

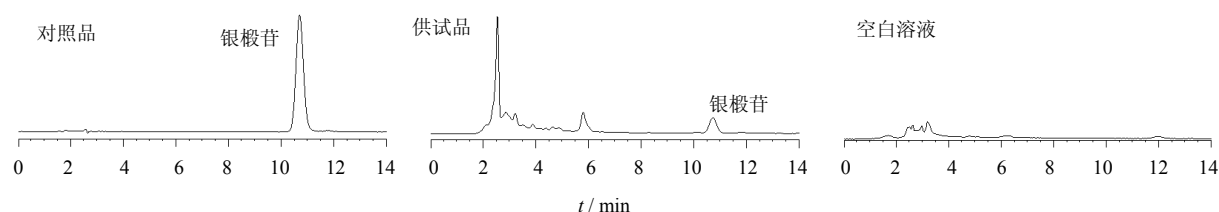


图2 欐木中银槭苷的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC of tiliroside in *L. chinense*

置 50 mL 平底瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称质量, 回流 1、1.5、2 h, 放冷, 称重补质量, 摇匀, 滤过, 即得。测得 1、1.5、2 h 下提取银槭苷的质量分数分别为 0.509 8、0.519 8、0.504 5 mg/g。

2.3.6 线性关系的考察 分别精密吸取浓度为 20.52 $\mu\text{g/mL}$ 的银槭苷对照品溶液 2、5、10、15、20、25 μL , 注入液相色谱仪器, 测定, 以银槭苷对照品的进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程为 $Y=23\,544\,848X+3\,996$, $r=0.999\,7$ 。结果表明银槭苷对照品在 0.041~0.513 μg 呈良好的线性关系。

2.3.7 精密度试验 精密吸取银槭苷对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 结果银槭苷峰面积的 RSD 值为 1.54%。

2.3.8 重复性试验 取同白花欐木药材粉末 6 份,

按“2.3.3”项下的方法制备供试品溶液并进行测定。结果样品中银槭苷的平均质量分数为 0.05%, RSD 为 0.67%。

2.3.9 稳定性试验 取供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、24 h 后进样, 共 6 次, 结果银槭苷峰面积的 RSD 为 0.96%, 表明样品溶液在 24 h 内溶液较稳定。

2.3.10 加样回收率试验 取已测定的白花欐木药材粉末 0.5 g (6 份), 精密称定, 精密加入银槭苷对照品溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$) 50 mL, 按“2.3.3”项下的方法制备供试品溶液并进行测定, 计算回收率。结果银槭苷平均回收率为 100.05%, RSD 为 1.50%。

2.3.11 样品测定

取不同产地不同批次的白花欐木和红花欐木的茎、叶, 按“2.3.3”项下的方法制备供试品溶液并进行测定, 计算银槭苷的质量分数, 结果见表 1。

表1 欐木的茎和叶中银槭苷的测定结果

Table 1 Determination of tiliroside in stems and leaves of *L. chinense*

产地	批号	银槭苷 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
		白花欐木茎	白花欐木叶	红花欐木茎	红花欐木叶
江西景德镇	20090813	0.233	1.245	0.023	1.060
	20090921	0.325	1.259	0.021	1.040
	20091103	0.295	1.326	0.019	0.808
	20100712	0.315	1.284	0.025	1.003
	20100916	0.289	1.401	0.018	0.982
江西抚州	20100611	0.332	1.673	0.032	1.235
	20100709	0.421	1.474	0.047	1.152
	20100912	0.325	1.866	0.039	1.584
	20110512	0.553	1.238	0.058	1.382
	20110713	0.424	1.625	0.037	1.272
浙江杭州	20100414	0.624	1.933	0.055	0.932
	20100711	0.454	1.672	0.045	0.984
	20100917	0.528	1.718	0.027	0.853
	20101021	0.576	2.023	0.037	1.312
	20101102	0.483	1.695	0.017	1.232

3 讨论

通过对白花檵木药材一系列提取分离,主要得到两类黄酮和多酚类化合物,其中黄酮类成分中以银槲苷量最高,且是首次从得檵木中提取获得。已有文献报道白花檵木花中的槲皮素和山柰酚的测定方法^[7],本实验建立的檵木中银槲苷的测定方法简单、准确、重复性好,可作为檵木药材的指标成分,有效控制檵木的药材质量。

本实验对提取溶剂、提取时间进行了考察,得出以甲醇回流 1.5 h 较好,同时对甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液三者作为流动相进行了比较,考虑其分离效果,最终选择了以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相。通过对不同产地白花檵木和红花檵木中的银槲苷进行测定,得出银槲苷主要存在于檵木叶中,且白花檵木茎中银槲苷量也较高。入药时为白花檵木茎叶混合,所以推测银槲苷在白花檵木中可能具有重要的药用价值。

参考文献

- [1] 李雪晶,高叶,周小江. 檵木叶中槲皮素的含量测定 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(2): 46-50.
- [2] 游璐茜,吴振,赵玉芬. 枳木中槲皮素、山柰酚、杨梅素含量的高效液相色谱法测定 [J]. 化学通报, 2009(10): 896-900.
- [3] 游璐茜. 檵木中化学成分的提取分离及初步研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2009.
- [4] 刘英慧,陈晓玲,黄琪,等. 高效液相色谱法测定檵木叶中没食子的含量 [J]. 中南药学, 2012, 10(1): 33-35.
- [5] 潘晓军,吕圭源,陈素红,等. 白花檵木花黄酮提取及其抗氧化活性的研究 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(26): 75-76.
- [6] 冯育林,徐丽珍,杨世林. 蜀葵花的化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1610-1612.
- [7] 潘晓军,吕圭源,陈素红,等. RP-HPLC 同时测定白花檵木花中的槲皮素和山柰酚 [J]. 光谱实验室, 2012, 29(3): 1717-1720.