

壮、瑶药小槐花中异柠檬酚的分离鉴定及含量测定研究

陆国寿¹, 叶勇^{2*}, 卢文杰^{1,3}, 黄周锋¹, 蓝艳妮², 曾繁强², 黄伟城²

¹广西中医药研究院, 南宁 530022; ²广西医科大学, 南宁 530021; ³广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022

摘要: 采用硅胶色谱柱分离纯化的方法从小槐花药材中分离得到一种黄酮类化合物, 根据理化性质及光谱数据鉴定其为异柠檬酚。采用 HPLC 法对异柠檬酚的含量进行测定, HPLC 分析条件如下: 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液 (70:30), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 270 nm, 柱温为 35 °C。实验结果表明异柠檬酚在 0.011~0.242 μg 范围与其峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率为 99.76%, RSD 为 1.42% (n=6), 不同采集地的小槐花药材中异柠檬酚的含量存在一定差异。

关键词: 小槐花; 异柠檬酚; 分离纯化; HPLC

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Isolation, Purification and Determination of Yukovanol in *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC

LU Guo-shou¹, YE Yong^{2*}, LU Wen-jie^{1,3}, HUANG Zhou-feng¹,
LAN Yan-ni², ZENG Fan-qiang², HUANG Wei-cheng²

¹Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China; ²Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ³Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China

Abstract: A flavonoid was isolated from *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC by silica gel column chromatography. The structure of the isolated compound was elucidated on the basis of spectral characteristics and identified as yukovanol. The content of yukovanol in *D. caudatum* was determined by HPLC. The chromatographic separation were carried out using the following condition; Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with methanol-0.2% phosphoric acid (70:30) as mobile phases. The flow rate was 1.0 mL/min. The UV detection wavelength was 270 nm and the column temperature was 35 °C. The results showed that the linear range of yukovanol were 0.011-0.242 μg, the yukovanol average recovery as 99.76%, RSD = 1.42% (n=6). Distinct differences were found among *D. caudatum* samples produced in different places.

Key words: *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC; yukovanol; isolation and purification; HPLC

小槐花 [*Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.]

为豆科山蚂蝗属植物, 为广西壮族、瑶族常用药材, 广西中药材标准^[1]、广西壮族自治区壮药质量标准^[2]、中国瑶药学^[3]均将其收载, 壮药名为棵文沾、瑶药名为握麻红, 其分布于广西、安徽、浙江、江西等省。壮医认为其味甜、苦, 平, 调龙路, 通气道谷道, 清热毒, 止血, 用于心头痛(胃痛), 白冻(泄泻), 月经不调, 疝疝(疝积), 贫痧(感冒), 北嘻(乳痈), 狼尹(疝肿)。瑶药认为其味苦, 性凉, 清热解毒, 消积, 散瘀利水, 健脾开胃, 用于治咳嗽、吐血、水肿、胃

脘痛、小儿疝积、跌打损伤、痈疮溃疡、烧烫伤溃烂。为了探明小槐花的化学物质基础及其含量, 本实验从小槐花药材分离鉴定得到了异柠檬酚, 并采用高效液相色谱法对其含量进行了测定。

1 仪器与材料

1.1 仪器

IR-470 红外光谱仪(日本岛津公司), DRX-500 MHz 超导核磁共振仪(瑞士布鲁克公司), 岛津高效液相色谱仪 LC-20A, 色谱工作站 LC SOLUTION, 分析天平 XS205(海特勒托利多有限公司), ZDM-83-1 型电热熔点仪(江苏科教玻璃仪器厂), 数控超声波清洗器 KQ-500DB(昆明市超声仪器有限公司), 数显恒温水浴锅 HH-S2(金坛市医疗仪器厂), 循环水式多用

收稿日期: 2013-08-19 接受日期: 2013-12-12

基金项目: 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053175); 广西中药质量标准研究重点实验室主任基金项目(201101); 广西科技研究与技术开发计划项目子课题项目(1355001-4-8)

* 通讯作者 Tel: 86-013978679458; E-mail: yong-ye@163.com

真空泵 SHB-III(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 材料与试剂

小槐花药材采于广西鹿寨县等地,由广西中医药研究院何开家主任中药师鉴定为小槐花[*Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.]。异柠檬酚对照品为从小槐花中提取分离获得,经结构鉴定并采用 HPLC 归一化法测定含量大于 98% 后使用;HPLC 用试剂为色谱纯;其它试剂为分析纯。

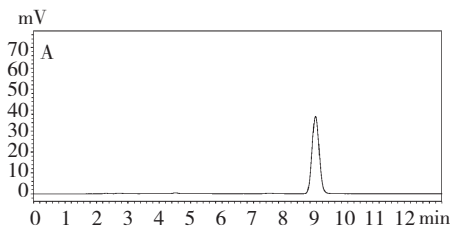
2 方法与结果

2.1 提取分离

小槐花药材 13.0 kg,粉碎后采用 10 倍量 95% 乙醇回流提取 4 次,每次 2 h,合并提取液,减压回收乙醇,得浸膏,浸膏加水混悬,依次用石油醚(60~90℃),乙酸乙酯萃取,回收溶剂后分别得到石油醚部位及乙酸乙酯部位。取石油醚部位进行柱层析硅胶色谱分离,用石油醚-乙酸乙酯(100:0→70:30)梯度洗脱,共收集得到 159 个流份。采用薄层鉴别将各流份分别合并,第 137~139 流份合并后经反复柱层析及重结晶得黄色针状结晶(42 mg)。

2.2 结构鉴定

黄色针状结晶(石油醚-乙酸乙酯)。mp. >250℃。IR (KBr) cm^{-1} : 3444, 3058, 2979, 2867, 1630, 834。 ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ : 7.36 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.84 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5'), 6.42 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-1''), 5.91



(1H, s, H-6), 5.51 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-2''), 5.02 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-2), 4.56 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-3), 1.39 (6H, d, $J = 10.8$ Hz, H-4'', 5''); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ : 198.94 (C-4), 164.62 (C-5), 163.70 (C-7), 159.29 (C-4'), 158.21 (C-9), 130.35 (C-2', 6'), 129.09 (C-1'), 127.83 (C-2''), 116.24 (C-3', 5'), 116.21 (C-1''), 103.24 (C-8), 102.42 (C-10), 98.26 (C-6), 85.05 (C-2), 79.36 (C-3''), 73.59 (C-3), 28.71 (C-4''), 28.45 (C-5''). 以上数据与文献^[4]对照基本一致,故鉴定该化合物为异柠檬酚(Yukovanol)。异柠檬酚化学结构图见图 1。

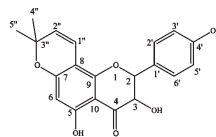


图 1 异柠檬酚的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of yukovanol

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适应性

采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液(70:30);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 270 nm;柱温为 35℃;理论塔板数按异柠檬酚计不低于 3000。对照品及样品色谱图见图 2。

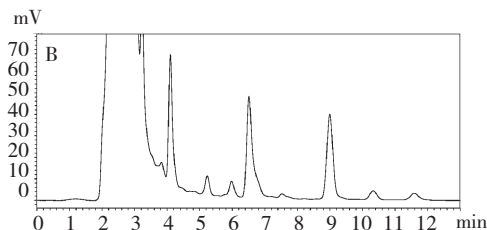


图 2 异柠檬酚对照品(A)与小槐花样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of yukovanol standard (A) and *D. caudatum* sample (B)

2.3.2 对照品溶液的制备

称取异柠檬酚对照品约 5 mg,精密称定,置 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得浓度为 0.55 mg/mL 的对照品储备液,备用;精密量取 0.55 mg/mL 的对照品储备液 1.0 mL 置 50 mL 棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 0.011 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备

将小槐花药材适量,粉碎,过 40 目筛,称取药材

粉末约 1 g,精密称定,置 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 55% 甲醇 25 mL,称重,超声(350 W, 50 kHz)提取 50 min,放冷,甲醇补足重量,摇匀,静置,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.4 线性关系的考察

取浓度为 0.011 mg/mL 的异柠檬酚溶液,按“2.3.1”色谱条件和测定方法,分别以不同的体积(1.4、8、12、16、20 μL)进样。以对照品进样量(μg)为横坐标 X,色谱峰面积为纵坐标 Y,绘制得标准曲

线并进行线性回归,计算得回归方程为 $Y = 3400000X - 1248.1$, $R = 1.0000$ 。结果表明,在线性范围 $0.011 \sim 0.242 \mu\text{g}$ 内,异柠檬酚进样量与峰面积均呈良好线性关系。

2.3.5 精密度实验

精密吸取浓度为 0.011 mg/mL 异柠檬酚对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,按“2.3.1”色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,以异柠檬酸峰面积积分值计算, RSD 为 0.16% ,结果表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性实验

精密吸取同一供试品溶液 $10 \mu\text{L}$,按“2.3.1”色谱条件分别于 0、2、4、8、10、12 h 进样,测定峰面积,以异柠檬酸峰面积积分值计算, RSD 为 1.26% 。结果表明,供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.7 重复性实验

取同一批小槐花药材粉末,称取 6 份,每份约 1 g ,精密称定,按“2.3.3”项下样品溶液制备方法制备得供试品溶液,按“2.3.1”色谱条件下进样,测定峰面积,以外标法计算。经测定,样品中异柠檬酚的平均含量为 0.036% , RSD 为 1.58% 。结果表明,该方法重复性较好。

2.3.8 加样回收率试验

取已知含量(含量为 0.036%)的小槐花药材粉末 6 份,每份约 0.5 g ,精密称定,分别精密加入异柠檬酚对照品溶液 (0.55 mg/mL , 0.4 mL),按“2.3.3”项下样品溶液制备方法制备,按“2.3.1”色谱条件进样,进样量为 $10 \mu\text{L}$,测定,计算得加样回收率平均值为 99.76% , RSD 为 1.42% ($n = 6$) (表 1)。

表 1 异柠檬酚的加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Table 1 Sample recovery test of yukovanol ($n = 6$)

编号 No.	样品中量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	0.1805	0.2200	0.3969	98.36		
2	0.1817	0.2200	0.4044	101.23		
3	0.1805	0.2200	0.3994	99.50		
4	0.1811	0.2200	0.4031	100.91	99.76	1.42
5	0.1810	0.2200	0.4026	100.71		
6	0.1802	0.2200	0.3955	97.86		

2.3.9 样品含量测定

取不同采集地点的小槐花药材,分别按“2.3.

3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3.1”色谱条件测定,记录峰面积,外标法计算含量,结果见表 2。

表 2 不同采集地的小槐花药材中异柠檬酚的含量 ($n = 3$)

Table 2 Content of yukovanol detected in *D. caudatum* samples from different places ($n = 3$)

采集地 Acquisition place	1	2	3	平均值 Average (%)
鹿寨	0.036	0.037	0.038	0.037
宜州	0.023	0.024	0.024	0.024
融水	0.028	0.030	0.031	0.030

3 讨论

小槐花 *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. 为豆科山蚂蝗属植物,为广西壮、瑶民族常用药材,分布于广西、安徽、浙江、江西等省。目前,小槐花的相关药材质量标准比较落后,广西中药材标准^[1]、广西壮族自治区壮药质量标准^[2]中收载的小槐花药材项下均没有薄层鉴别和含量测定项目。鉴于此,

本实验拟通过对其中化学成分进行分离鉴定及含量测定研究,为提高小槐花药材及其制剂的质量标准提供参考方法,亦希望借此促进小槐花药材的深入开发和应用。

异柠檬酚 (Yukovanol) 为从小槐花药材中分离得到的一个黄酮类化合物。目前,异柠檬酚的相关研究文献较为罕见^[5,6],主要集中在化学分离纯化、抗肿瘤活性方面,但尚未见异柠檬酚含量测定方法

研究的相关文献报道,本文属首次对异柠檬酚的含量测定方法进行研究,为异柠檬酚的研究开发提供了依据。

异柠檬酚溶于甲醇,故本实验采用甲醇为提取溶剂,对甲醇浓度,甲醇用量,提取时间进行了考察。结果表明,采用55%甲醇为提取溶剂,溶剂量为25 mL/1 g样品,超声(350 W,50 kHz)提取50 min可获得较好的提取效果。实验结果表明,本实验采用的HPLC法测定小槐花中的异柠檬酚的含量,方法简单方便,操作性强,具有较好的稳定性、重现,为小槐花质量控制方法提供了参考,为异柠檬酚含量测定方法的研究提供了重要依据。

参考文献

- Guangxi Municipal Health Bureau(广西卫生厅). Guangxi Chinese medicine standard(广西中药材标准). Guangxi: Guangxi Science and Technology Press,1990. 24.
 - Guangxi Food and Drug Administration(广西食品药品监督管理局). Guangxi Zhuang medicine quality standard(广西壮药质量标准). Guangxi: Guangxi Science and Technology Press,2008. 49.
 - Qin XY(覃迅云),Luo JY(罗金裕),Gao ZG(高志刚). Chinese Yao medicine(中国瑶药学). Beijing:National Publishing House,2002. 934.
 - Ito C,Sato K,Ok T,*et al.* Two flavanones from *Citrus species*. *Phytochemistry*,1989,28:3562-3564.
 - Gan N(干宁),Li TH(李天华),Yang X(杨欣),*et al.* Constituents in *Desmodium blandum* and their antitumor activity. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*,2009,40:852-856.
 - Wu Y(吴瑶),Luo Q(罗强),Sun CL(孙翠玲),*et al.* Chemical constituents contained in *Desmodium caudatum*. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*,2012,37:1788-1792.
 - Guangxi Municipal Health Bureau(广西卫生厅). Guangxi Chinese medicine standard(广西中药材标准). Guangxi: Guangxi Science and Technology Press,1990. 24.
 - Guangxi Food and Drug Administration(广西食品药品监督管理局). Guangxi Zhuang medicine quality standard(广西壮药质量标准). Guangxi: Guangxi Science and Technology Press,2008. 49.
 - Qin XY(覃迅云),Luo JY(罗金裕),Gao ZG(高志刚). Chinese Yao medicine(中国瑶药学). Beijing:National Publishing House,2002. 934.
 - Ito C,Sato K,Ok T,*et al.* Two flavanones from *Citrus species*. *Phytochemistry*,1989,28:3562-3564.
 - Gan N(干宁),Li TH(李天华),Yang X(杨欣),*et al.* Constituents in *Desmodium blandum* and their antitumor activity. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*,2009,40:852-856.
 - Wu Y(吴瑶),Luo Q(罗强),Sun CL(孙翠玲),*et al.* Chemical constituents contained in *Desmodium caudatum*. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*,2012,37:1788-1792.
- (上接第1502页)
- Hannan J,Ali L,Rokeya B,*et al.* Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. *Brit J Nutr*,2007,97:514-521.
 - Kaviarasan S,Ramamurthy N,Gunasekaran P,*et al.* Induction of alcohol-metabolizing enzymes and heat shock protein expression by ethanol and modulation by fenugreek seed polyphenols in Chang liver cells. *Toxicol Mech Method*,2009,19:116-122.
 - Kaviarasan S. Fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum*) seed extract prevents ethanol-induced toxicity and apoptosis in Chang liver cells. *Alcohol Alcoholism*,2006,41:267-273.
 - Mueller M,Hobiger S,Jungbauer A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem*,2010,122:987-996.
 - Vyas S,Agrawal RP,Solanki P,*et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of *Trigonella foenum-graecum* (seed) extract. *Acta Pol Pharm*,2008,65:473-476.
 - Madhava Naidu M,Shyamala B,Pura Naik J,*et al.* Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *LWT-Food Sci Technol*,2011,44:451-456.
 - He YF,Lv HH,Wang XY,*et al.* Isolation and purification of six bioactive compounds from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. using high-speed counter-current chromatography. *Sep Sci Technol*,2014,49:580-587.
 - Shi GF(史高峰),Wang HY(王红玉),Chen XF(陈学福),*et al.* Purification of total flavonoids from *Stevia rebaudiana* waste. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*,2013,25:104-109.
 - Li WX(刘伟霞),Yang JX(杨建雄). Optimization of extraction technology of forsythiaside and phillyrin in Forsythia suspense leaves based on response surface methodology. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*,2012,24:1098-1104.