

亮叶杨桐叶中山茶苷 A 对照品的制备及鉴定*

Preparation and Identification of Reference Substance of Camellianin A from Leave of *Adinandra nitida* Merr. ex Li

黄艳^{1,2}, 李文琪^{1,2}, 刘元^{1,2}, 张宁宁^{1,2}, 李振麟^{1,2}, 刘布鸣^{1,2**}

HUANG Yan^{1,2}, LI Wen-qi^{1,2}, LIU Yuan^{1,2}, ZHANG Ning-ning^{1,2}, LI Zhen-lin^{1,2}, LIU Bu-ming^{1,2}

(1. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022; 2. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西南宁 530022)

(1. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要: 为了研究从亮叶杨桐(*Adinandra nitida* Merr. ex Li)叶中制备山茶苷 A 对照品的方法, 利用硅胶柱层析、重结晶和反相制备高效液相色谱对亮叶杨桐乙醇提取物进行分离纯化, 以 HPLC 对山茶苷 A 进行纯度检查和含量测定, 并通过各种波谱手段等对其进行结构确证。结果从亮叶杨桐叶分离、纯化出山茶苷 A 对照品, 质量分数 > 99.0%。该方法制备出的山茶苷 A 对照品符合中药化学对照品的相关要求, 可以作为亮叶杨桐药材和含亮叶杨桐成药质量控制, 以及中药药效物质基础用的化学对照品。

关键词: 亮叶杨桐 山茶苷 A 对照品 制备

中图分类号: R284.2, O657 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)01-0079-03

Abstract: To establish a separation method for reference substance of camellianin A from leave of *Adinandra nitida* Merr. ex Li, ethanol-extract of the leave of *Adinandra nitida* Merr. ex Li was isolated and purified by RP-HPLC combining with column chromatography and recrystallization. Its structure was identified by spectral analysis. The results showed that Camellianin A was completely separated from leave of *Adinandra nitida* Merr. ex Li. The purity of the reference substance was no less than 99.0%. The compound prepared by the above-mentioned method is accorded with the relative demands of chemical reference substance in Chinese materia medica. It can be used as a reference substance for the quality control and the research of herbal medicine.

Key words: *Adinandra nitida* Merr. ex Li, camellianin A, reference substance, preparation

亮叶杨桐(*Adinandra nitida* Merr. ex Li)系山茶科(Theaceae)杨桐属(*Adinandra*)植物, 又名亮

叶黄瑞木, 亮叶红淡木, 俗称石崖(芽)茶^[1], 主要分布在我国广西、广东和贵州等省区, 资源丰富。广西民间使用亮叶杨桐叶作为代茶饮料已有悠久历史, 并具有较明显的消炎、解毒、止血和降压等功效^[2]。民间还常用以治疗腮腺炎、痢疾和高血压等疾病^[3]。亮叶杨桐中主要含有黄酮类、三萜皂苷等化合物^[4~7], 其中黄酮类成分具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤等活性^[8~12]。其中, 山茶苷 A 是亮叶杨桐叶中主要的黄酮类物质, 含量可高达 25% 以上^[13]。袁尔东^[10]等人

收稿日期: 2012-12-28

作者简介: 黄艳(1987-), 助理研究员, 硕士研究生, 主要从事中药、天然药化学成分与质量标准研究。

* 广西卫生厅重点课题, 广西中药质量标准研究重点实验室系统性研究项目(桂中重系 201201)资助。

** 通讯作者: 刘布鸣, 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药、天然药化学成分与质量标准研究。E-mail: liubuming@yahoo.com.cn。

采用大孔树脂法对亮叶杨桐叶山茶苷 A 进行分离纯化,但是其纯度只达到 91.7%,未能达到对照品纯度(大于 98%)的要求。目前山茶苷 A 对照品的研究未见有报道,亮叶杨桐药材和含亮叶杨桐的复方药物均缺乏有效的特征成分定量的质量控制手段。因此,本实验采用 80%乙醇提取亮叶杨桐叶子得到浸膏,再经硅胶柱色谱、重结晶和制备 HPLC 等方法制备山茶苷 A 对照品,方法简便,为药材及相关制剂的质量控制和药效基础研究提供对照物质。

1 仪器和材料

日本岛津 UV-2550 型紫外光谱仪;德国 Bruker TENSOR 27FT IR 红外光谱仪;德国 BRUKER AVANCE 600 核磁共振波谱仪;美国 Thermo fisher LTQ Orbitrap Velos 质谱仪;美国 Waters 1525、Waters 2998 检测器液相色谱仪。200~300 目柱层析硅胶(青岛海洋化工公司出品),氘代甲醇,内标 TMS;甲醇、乙腈为色谱纯;水为重蒸馏水;其它溶媒为分析纯。亮叶杨桐药材经广西中医药研究院助理研究员黄云峰鉴定为山茶科杨桐属植物亮叶杨桐(*Adinandra nitida* Merr. ex Li),采自广西金秀。

2 方法和结果

2.1 对照品的制备

2.1.1 药材提取和化合物分离

亮叶杨桐叶子 10kg,粉碎,80%的乙醇回流提取 2 次,滤过,合并滤液,减压浓缩至无醇味,得亮叶杨桐浸膏。

将浸膏经硅胶柱色谱(200~300 目柱层析硅胶),用醋酸乙酯-甲醇(100:5~100:20)梯度洗脱,收集醋酸乙酯-甲醇(100:20)洗脱部分,用 TCL 检测,收集含有山茶苷 A 的流分,合并,浓缩,用甲醇氯仿重结晶,得到山茶苷 A 粗结晶。

2.1.2 制备 HPLC 分离纯化山茶苷 A 对照品

将粗结晶用适量 80%甲醇溶解,上制备 HPLC,色谱条件:色谱柱为 Kromasil C-18 柱(10mm×250mm,10 μm),流动相为乙腈-水(21:79),检测波长为 330nm,流速为 6ml/min,柱温为室温,进样量为 1ml,按色谱峰收集山茶苷 A 组分,并对所收集的每一份洗脱液利用分析 HPLC 检测,色谱条件:色谱柱为 C-18 柱;流动相为乙腈:0.2%磷酸溶液=21:79;检测波长 330nm;流速 1ml/min)合并保留时间相同而且纯度大于 98%以上的山茶苷 A,减压浓缩,得到纯度大于 98%以上的山茶苷 A 对照品。该对照品为白色粉末。

2.2 对照品的结构确证

将制备得到的白色粉末热溶于甲醇,mp 196~197°C。UV λ^{E₁OH} max nm:263,330。IR ν_{KBr} max cm⁻¹:3385(-OH),1732(-O-C=O),1632(共轭-C=O),1600、1515、1495、1450(苯环)。MS(ESI) m/z:643[M+Na]⁺,621[M+H]⁺,475,271。¹HNMR(MeOD,600MHz,TMS)δ_{ppm}:1.20(3H,d,C6''-H3),1.85(3H,s,AcCH₃),3.30~4.45(10H,m),5.30(1H,s,H-1'''),5.44(1H,s,H-1''),6.51(1H,s,H-6),6.54(1H,s,H-3),6.63(1H,s,H-8),6.92(2H,d,J=8.8,H-3',H-5'),7.18(2H,d,J=8.8,H-2',H-6')。¹³C NMR(MeOD,125MHz,TMS)δ ppm:164.5(C-2),106.6(C-3),179.5(C-4),158.9(C-5),100.9(C-6),162.4(C-7),97.7(C-8),160.9(C-9),108.8(C-10),123.3(C-1'),129.1(C-2',6'),117.0(C-3',5'),163.7(C-4'),101.8(C-1''),74.2(C-2''),78.3(C-3''),79.6(C-4''),75.0(C-5''),64.1(C-6''),99.4(C-1'''),71.7(C-2'''),72.3(C-3'''),72.2(C-4'''),70.3(C-5'''),18.1(C-6'''),172.6(OCOCH₃),20.4(OCOCH₃)。以上数据与文献[4]报道的山茶苷 A 一致,因此确证该化合物为山茶苷 A(Camellianin A)。结构见图 1。

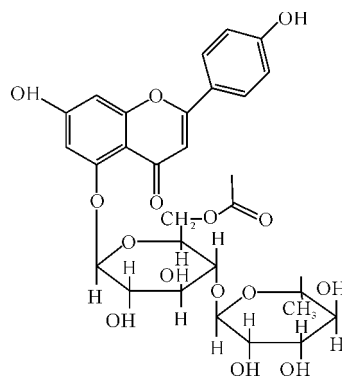


图 1 山茶苷 A 的结构式

Fig. 1 The Structure of Camellianin A

2.3 对照品的纯度检查

2.3.1 薄层色谱法检查

取制备得到的对照品山茶苷 A 适量,用甲醇制 1mg/ml 的溶液,在同一聚酰胺薄膜上,按不同的点样量梯度点样,点样量分别为 0.5 μg、1 μg、3 μg、5 μg、10 μg。用 3 个不同系统的展开剂:(1)乙醇-丙酮-水(7:5:6);(2)甲醇-冰醋酸-水(9:0.5:0.5);(3)乙醇-水(1:1)进行展开,喷以 3%三氯化铝乙醇溶液,晾干,105°C 加热 1min,置紫外灯(365nm)下检视。结果在薄层色谱中,可见蓝色的单一荧光斑点,均未见有杂质斑点。

2.3.2 高效液相色谱法纯度检查

精密称取于 105℃ 干燥至恒重的对照品山茶苷 A 适量,加 80% 甲醇水溶液制成每 1ml 含 1mg 的溶液,色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6mm × 250mm, 10 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液 (21 : 79); 检测波长 330nm; 进样量 10 μl; 流速为 1ml/min, 柱温为室温。在该色谱条件下,对照品山茶苷 A 的 HPLC 色谱见图 2,用二级管阵列检测器 DAD 进行峰纯度检查为单一纯物质峰,用面积归一化法计算山茶苷 A 含量为 98.5%。改变流动相和波长,甲醇-0.2% 磷酸溶液 (46 : 54), 330nm 为检测波长和乙腈-0.2% 磷酸溶液 (21 : 79), 260nm 为检测波长分别检测,结果对照品为 1 个主峰,改变流动相分析未见有异常峰。

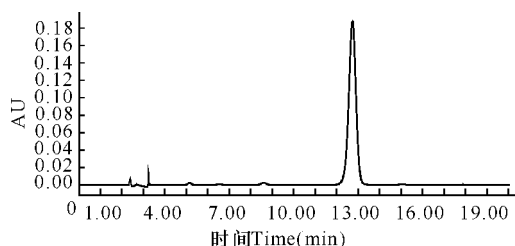


图 2 山茶苷 A 的 HPLC 色谱
Fig. 2 HPLC of Camellianin A

3 结束语

山茶苷 A 为亮叶杨桐的特征和有效成分,适合作为中药化学对照品。本实验提取、分离、纯化得到的山茶苷 A,符合中药化学对照品的相关要求,可以作为亮叶杨桐药材和含亮叶杨桐中成药质量控制,以及中药药效物质基础研究用的化学对照品。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 50 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 28-29.
- [2] 陈美珍, 余杰, 余纲哲, 等. 野生石芽茶营养成分与药用成分的分析[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(1): 85.
- [3] 袁萍, 王国亮, 钱少华, 等. 石崖茶活性成分分析[J]. 食品科学, 1999(8): 75.
- [4] 王英, 陈四宝, 倪洁, 等. 亮叶杨桐的化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(5): 407-409.
- [5] 王英, 叶文才, 殷志琦, 等. 亮叶杨桐的三萜皂苷类成分[J]. 药学学报, 2008, 43(5): 504-508.
- [6] 刘元, 李振麟, 张宁宁, 等. 亮叶杨桐的化学成分研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 2012, 21(17): 62-63.
- [7] 刘元, 宋志钊, 李文琪. 亮叶杨桐指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 71-73.
- [8] 袁尔东, 肖仔君, 刘本国, 等. 亮叶杨桐叶总黄酮提取及抑菌活性的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 305-308.
- [9] 余杰, 陈美珍. 亮叶杨桐中类黄酮提取及其抗氧化、抑菌作用的研究[J]. 汕头大学学报: 自然科学版, 1997, 1(2): 52-58.
- [10] 袁尔东, 宁正祥, 刘本国. 亮叶杨桐叶中山茶苷 A 的分离纯化及其抗氧化性能的研究[J]. 食品工业科技, 2008(4): 212-214.
- [11] 刘本国, 战宇, 宁正祥. 亮叶杨桐叶黄酮类提取物的鉴定及其抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(1): 6-10.
- [12] 袁尔东, 王菊芳, 刘本国. 亮叶杨桐叶类黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009(14): 105-109.
- [13] 刘本国. 亮叶杨桐叶中类黄酮的提取、鉴定与修饰[D]. 广州: 华南理工大学, 2007.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 78 页 Continue from page 78)

社团联等,其中有 3 个正好在本文选取的 50 个用户之内。综合来看,桂林理工大学学生会和桂工之声在该条微博中起到核心的作用,这与前面的中间人分析、派系分析等的结果基本吻合。类似的例子在新浪微博“桂林理工大学”片区中还有很多,在此不一一列举。

参考文献:

- [1] 刘军. 整体网分析讲义: UCINET 软件实用指南[M]. 上海: 上海人民出版社, 2009.
- [2] 周涛, 汪秉宏, 韩筱璞, 等. 社会网络分析及其在舆情和疫情防控中的应用[J]. 系统工程学报, 2010, 12: 742-753.
- [3] 平亮, 宗利永. 基于社会网络中心性分析的微博信息传播研究——以 Sina 微博为例[J]. 中国科技信息, 2010, 6: 163-164.

- [4] 尹书华. 基于复杂网络的微博用户关系网络特性研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2011, 12: 57-61.
- [5] Barabasi A L, Albert R, Jeong H, et al. Power-Law distribution of the world wide web[J]. Science, 2000, 287(5641): 2115.
- [6] Wasserman S, Faust K. Social network analysis: methods and applications[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- [7] Barabosi A. Statistical mechanics of complex networks[J]. Rev Mod Phys, 2002, 74(1): 47-97.
- [8] 黄艳. 微博的媒体特征以及传播媒体的应对[J]. 东南传播, 2011(1): 84-87.
- [9] 王陆. 典型的社会网络分析软件工具及分析方法[J]. 中国电化教育, 2009(4): 95-100.
- [10] 林聚任. 社会网络分析: 理论、方法与应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 2009.

(责任编辑: 尹 闯)