

棒柄花昔 A 对照品的制备研究*

Preparation of Reference Substance of PPGA from *Cleidion brevipetiolatum*

黄艳^{1,2},刘元^{1,2},陈小刚^{1,2},宋志钊^{1,2},林霄^{1,2},刘布鸣^{1,2**}

HUANG Yan^{1,2}, LIU Yuan^{1,2}, CHEN Xiao-gang^{1,2}, SONG Zhi-zhao^{1,2}, LIN Xiao^{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:【目的】建立从棒柄花(*Cleidion brevipetiolatum* Paxet Hoffm)中制备棒柄花昔 A (PPGA)对照品的方法。【方法】利用硅胶柱层析、重结晶和反相制备高效液相色谱对棒柄花的乙醇提取物进行分离纯化,以 HPLC 对棒柄花昔 A 进行纯度检查和含量测定,并通过 UV, IR, MS, ¹HNMR 等对其进行结构确证。【结果】从棒柄花叶中分离、纯化出棒柄花昔 A 对照品,质量分数 $W > 98.0\%$ 。【结论】所建立的制备方法简单,制备出的棒柄花昔 A 对照品符合中药化学对照品的相关要求,可作为棒柄花药材和含棒柄花成药质量控制,以及中药药效物质基础的化学对照品。

关键词:棒柄花 棒柄花昔 A 对照品 制备

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)03-0264-03

Abstract:【Objective】A separation method was established to prepare reference substance of PPGA from leave of *Cleidion brevipetiolatum* Paxet Hoffm. 【Methods】Ethanol-extract of the leave of *Cleidion brevipetiolatum* Paxet Hoffm was isolated and purified by RP-HPLC combining with column chromatography and recrystallization. Its structure was identified by UV, IR, MS, ¹HNMR. 【Results】PPGA was completely separated from leave of *Cleidion brevipetiolatum* Paxet Hoffm. The purity of the reference substance was not less than 98.0%. 【Conclusion】The method is simple and convenient, by which the prepared compound is accorded with the relative standards 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: *Cleidion brevipetiolatum* Paxet Hoffm, PPGA, reference substance, preparation

收稿日期:2014-04-30

修回日期:2014-05-11

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

* 广西科技攻关重大专项(桂科重 12118005-2-2)资助。

** 通讯作者:刘布鸣(1956-),男,研究员,主要从事中药、天然药化学成分与质量标准研究。E-mail:liubuming@alyun.com.cn。

【研究意义】安全和有效是评价药物的关键,如何保证药物的安全有效是中药现代化必须解决的首要问题。中药化学对照品是药品标准中用于鉴别、检测、含量测定等标准物质,是确定中药的真伪优劣的对照,是控制药品质量必不可少的工具。然而,现有的中药化学对照品种和数量远远不能满足众多中药品种的质量控制需求,品质规格有待提高和完善。可见高纯度的中药化学对照品的制备研究显得尤为

重要。棒柄花系以大戟科棒柄花属植物棒柄花 (*Cleidion brevipetiolatum* Paxet Hoffm.) 叶, 别名大树三台, 分布于广东、广西、贵州、云南, 有消炎解表、利湿解毒、通便的功能, 常用于治疗感冒、急慢性肝炎、疟疾、膀胱炎^[1~2]。棒柄花苷 A (PPGA) 是棒柄花的主要有效成分, 可作为棒柄花药材及其制剂的主要质量控制指标性成分, 因此对其制备进行研究具有重要意义。【前人研究进展】棒柄花药材收载于广西壮族自治区壮药质量标准第一卷^[3], 棒柄花的化学成分已有很多文献报道^[4~9]。目前, 对于棒柄花苷 A 的研究多是分离、含量测定等方面的研究。【本研究切入点】目前未见有报道棒柄花苷 A 对照品的研究, 且棒柄花药材和含棒柄花的复方药物均缺乏有效的特征成分定量的质量控制手段。【拟解决的关键问题】通过对棒柄花苷 A 对照品的制备进行研究, 可作为棒柄花药材和含棒柄花成药的质量控制研究提供化学对照品来源。

1 材料与方法

1.1 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; UC3250 制备型高效液相 (威玛龙色谱科技仪器有限公司); 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), 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。棒柄花药材经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为大戟科棒柄花属植物棒柄花 (*Cleidion brevipetiolatum* Paxet Hoffm.)。

1.2 方法

1.2.1 粗品的提取分离

取大戟科植物棒柄花的叶子 5 kg, 粉碎成 100 目以下, 体积分数 50% 的乙醇提取 3 次, 滤过, 合并滤液, 回收乙醇, 得乙醇提取物, 经硅胶柱层析, 用氯仿-甲醇体积比 (100:0~95:5) 梯度洗脱, 收集氯仿-甲醇体积比 (95:5) 洗脱部分, 用 TCL 检测, 收集含有棒柄花苷 A 的流分, 合并, 浓缩, 得到棒柄花苷 A 粗结晶。

1.2.2 对照品的制备

将粗结晶用制备型 RP-HPLC 进行制备 (色谱柱—C-18 柱; 流动相 (体积比)—乙腈: 水=22:78; 检测波长—255 nm; 流速—5 mL/min), 收集棒柄花苷 A 组分, 并对所收集的每一份洗脱液利用 HPLC

检测 (色谱柱—C-18 柱; 流动相 (体积比)—乙腈: 体积分数 0.2% 磷酸溶液=28:72; 检测波长—255 nm; 流速—1 mL/min) 合并保留时间相同而且纯度在 98% 以上的棒柄花苷 A, 减压浓缩, 得到纯度大于 98% 以上的棒柄花苷 A 白色粉末。

2 结果与分析

2.1 对照品的结构确证

制备得到的对照品为白色粉末, 溶于甲醇、乙醇、丙酮, mp 190~192 °C。UV (EtOH) λ_{\max} : 255 nm。IR (KBr) ν_{\max} : 3397 cm^{-1} , 1607 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} 。MS (EI) m/z : 296。¹H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz, TMS) δ ppm: 7.28 (2H, $J=8.4$ Hz, H-2, H-6), 6.94 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, H-5), 6.35 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7), 6.14 (1H, dq, $J=16.0, 6.6$ Hz, H-8), 5.32 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-1'), 3.69~3.14 (5H, m, H-2'-6'), 1.81 (3H, dd, $J=6.6, 1.2$, H-9)。¹³C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz, TMS) δ ppm: 131.2 (C-1), 126.8 (C-2, C-6), 116.2 (C-3, C-5), 156.5 (C-4), 130.3 (C-7), 123.6 (C-8), 18.3 (C-9), 100.5 (C-1'), 73.3 (C-2'), 77.1 (C-3'), 69.8 (C-4'), 76.7 (C-5'), 60.8 (C-6')。以上数据与棒柄花苷 A 的文献 [7] 报道一致, 因此确证该化合物为棒柄花苷 A。结构见图 1。

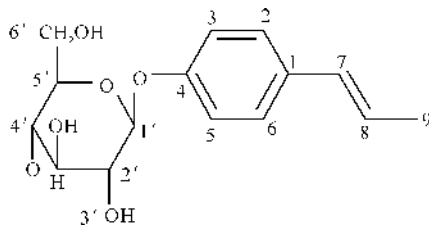


图 1 棒柄花苷 A 的结构式

Fig. 1 The Structure of PPGA

2.2 对照品的纯度检查

2.2.1 薄层色谱法检查

取制备得到的对照品棒柄花苷 A 适量, 用甲醇制 1 mg/mL 的溶液, 在同一硅胶 G 板上, 按不同的点样量梯度点样, 点样量分别为 20 μg , 40 μg , 60 μg , 80 μg , 100 μg 。用 3 个不同系统的展开剂: 系统 (1) 醋酸乙酯-乙醇 (体积比 9:1); 系统 (2) 石油醚-乙酸乙酯-甲醇 (体积比 3:6:1); 系统 (3) 氯仿-甲醇 (体积比 8:2); 置展开缸分别展开, 展距: 15 cm。定位: 喷以质量分数 10% 乙醇磷钼酸溶液, 晾干, 在 105 °C 烘至斑点显色清晰, 置白光下检视; 结果在薄层色谱中, 可见单一的荧光斑点 (图 2), 3 种展开剂系统, 5 个不

同浓度的梯度点样,均为单一斑点,未见杂质斑点。

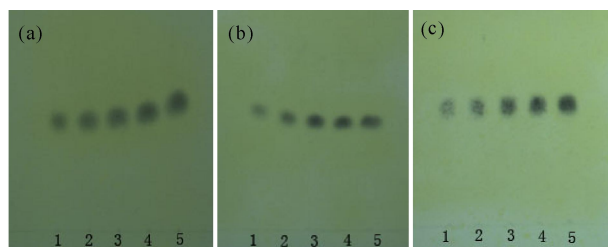


图2 棒柄花苷 A 薄层色谱

Fig. 2 The thin-layer chromatography of PPGA

(a)系统 1,(b)系统 2,(c)系统 3

(a)System one,(b)System two,(c)System three

2.2.2 高效液相色谱法纯度检查

精密称取于 105 °C 干燥至恒重的对照品适量,加流动相制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,色谱条件: Ecosil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 10 μm), 流动相为乙腈: 体积分数 0.2% 磷酸溶液(28:72); 检测波长为 255 nm; 进样量为 10 μL; 流速为 1 mL/min, 柱温为室温。在该色谱条件下, 对照品棒柄花苷 A 的 HPLC 图见图 3, 用二级管阵列检测器 DAD 进行峰纯度检查为单一纯物质峰, 5 点紫外光谱图完全重合(图 4), 用面积归一化法计算棒柄花苷 A 含量为 99.03%。改变流动相和波长, 甲醇: 体积分数 0.2% 磷酸溶液(48:52), 255 nm 为检测波长和乙腈: 体积分数 0.2% 磷酸溶液(28:72), 210 nm 为检测波长分别检测, 结果对照品为一个主峰, 改变流动相分析未见有异常峰。

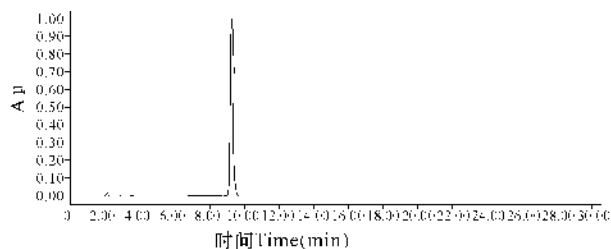


图3 棒柄花苷 A 的 HPLC

Fig. 3 The HPLC of PPGA

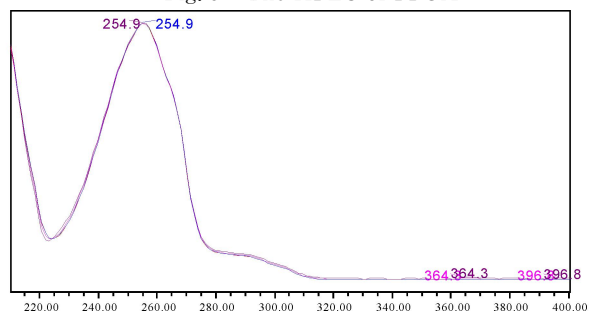


图4 棒柄花苷 A 5 点紫外光谱

Fig. 4 The five points of PPGA in UV

3 结论

棒柄花苷 A 为棒柄花的特征和有效成分, 适合

作为中药化学对照品。本实验提取、分离、纯化得到的棒柄花苷 A, 符合中药化学对照品的相关要求, 可作为棒柄花药材和含棒柄花成药质量控制, 以及中药药效物质基础研究用的化学对照品。

参考文献:

- [1] 冉先德. 中华药海[M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 1993: 1856.
Ran X D. The sea of Chinese medicine[M]. Harbin: Harbin Press, 1993: 1856.
- [2] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 623.
Chinese Medicine Company. Traditional Chinese medicine resources to Chinese records[M]. Beijing: Science and Technology Press, 1994: 623.
- [3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局编. 广西壮族自治区壮药质量标准第一卷[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008: 188.
Guangxi Food and Drug Administration. The quality standard of Zhuang medicine in Guangxi (I)[M]. Nanning: Science and Technology Press in Guangxi, 2008: 188.
- [4] Lu W J, Zou J, Chen J Y, et al. Two new compounds from *Cleidion brevipetiolatum* [J]. Fitoterapia, 2007, 78 (7,8): 614.
- [5] Cheng Y Y, Li S F, Zhang Y, et al. Cleidbrevoids A~C, new clerodane diterpenoids from *Cleidion brevipetiolatum* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(6): 1100.
- [6] 李翠红, 羊晓东, 赵静峰, 等. 棒柄花的化学成分研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2005, 27(3): 249-251.
Li C H, Yang X D, Zhao J F, et al. Studies on chemical constituents of *Cleidion brevipetiolatum* [J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences, 2005, 27(3): 249-251.
- [7] 陈家源, 牙启康, 卢文杰, 等. 广西产棒柄花的化学成分研究[J]. 广西科学, 2009, 16(4): 432-434.
Chen J Y, Ya Q K, Lu W J, et al. Study on the chemical constituent from *Cleidion brevipetiolatum* in Guangxi [J]. Guangxi Sciences, 2009, 16(4): 432-434.
- [8] 刘布鸣, 卢文杰, 牙启康, 等. 棒柄花中反式-4-(1-丙烯基)苯酚-β-D-吡喃葡萄糖苷的化学结构分离鉴定[J]. 广西科学, 2005, 12(3): 214-215.
Liu B M, Lu W J, Ya Q K, et al. Structure analysis for Trans-4-(1-Propenyl)-Phenol-β-D-glucopyranoside from *Cleidion brevipetiolatum* [J]. Guangxi Sciences, 2005, 12(3): 214-215.
- [9] 李翠红, 周红娇, 羊晓东, 等. 棒柄花的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(6): 514-515.
Li C H, Zhou H J, Yang X D, et al. The chemical study on *Cleidion brevipetiolatum* [J]. Natural Product Research and Development, 2004, 16(6): 514-515.

(责任编辑: 尹 闯)