

中药滴水珠中 Neoechinulin A 的分离及测定

王 琦， 赵云丽， 高晓霞， 王欣杨， 于治国*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 :采用柱色谱法对中药滴水珠中的有效成分 Neoechinulin A 进行分离纯化 ,运用现代波谱技术进行结构鉴定 ,采用反相高效液相色谱法测定其含量。色谱条件 :Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm ,5 μm) ,流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(体积比为 63:37) ,流速为 1.0 mL/min ,柱温为 30 ℃ ,检测波长为 225 nm ,进样量为 10 μL。结果表明 ,Neoechinulin A 的质量浓度在 2.0 ~ 40.0 mg/L 范围内与其峰面积有良好的线性关系($r = 0.999\ 5$) ;方法的加样回收率为 98.3% ~ 101.1%。该方法简便、快速、准确 ,可作为中药滴水珠质量控制的一个有效方法。
关键词 :反相高效液相色谱法 ;吲哚类生物碱 ;Neoechinulin A ;滴水珠 ;中药
中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)04-0509-04 栏目类别 :技术与应用

Isolation and determination of Neoechinulin A
in Cordate Pinellia Tuber

WANG Qi , ZHAO Yunli , GAO Xiaoxia , WANG Xinyang , YU Zhiguo*

(School of Pharmacy , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China)

Abstract : The Neoechinulin A in Cordate Pinellia Tuber was isolated by column chromatography and identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR). A method of reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) for the determination of the Neoechinulin A in Cordate Pinellia Tuber was developed. The chromatography was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm , 5 μm) with a mixture of methanol and 0.1% phosphoric acid solution (63:37 , v/v) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 225 nm and the column oven temperature was set at 30 ℃. The volume of injection was 10 μL. There was a good linear relationship ($r = 0.999\ 5$) between the mass concentration and the peak area of Neoechinulin A in the range of 2.0 – 40.0 mg/L. The recovery was 98.3% – 101.1%. The method is rapid and simple with good accuracy , reproducibility and suitable for the quality control of Cordate Pinellia Tuber from different sources.
Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ; indole alkaloids ; Neoechinulin A ; Cordate Pinellia Tuber ; Chinese herbal drug

滴水珠(Cordate Pinellia Tuber)为天南星科半夏属草本植物心叶半夏(*Pinellia cordata* N. E. Br.)的干燥块茎 ,具有解毒止痛、行瘀消肿之功效^[1] ,用于治疗毒蛇咬伤、胃痛、头痛、腰痛、痈疮肿毒与跌打损伤等 ,内服外用皆可 ,临床常用于肿瘤病人的消肿止痛 ,效果甚佳^[2]。目前国内外关于滴水珠化学成分及质量控制方面的研究报道甚少 ,仅有初步确定该药材中含有淀粉、生物碱类化合物、油酸、多种氨基酸、β-谷甾醇及其 D-葡萄糖苷的报道^[3] ,滴水珠的具体有效成分尚不明确。本文从研究滴水珠化学成分入手 ,分离得到吲哚类生物碱 Neoechinulin A(结构式见图 1)。Neoechinulin A

具有抑制霍乱弧菌、抗肿瘤、抗氧化和清除自由基等药理活性^[4,5] ,故以此为指标成分 ,采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对其含量进行测定。结果表明该方法准确、快速、专属性强 ,可用于滴水珠的深入研究及质量控制。

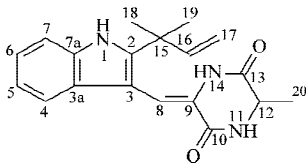


图 1 Neoechinulin A 的结构式
Fig. 1 Structure of Neoechinulin A

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括 LC-10ATvp 输液泵,SPD-10Avp 可变波长紫外检测器;N2010 色谱数据处理系统;Avance-600 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);2010A-LC/MS(日本 Shimadzu 公司);Sephadex LH-20(大连开米隆科技有限公司);柱色谱用硅胶 G 和薄层色谱用硅胶 G、GF254(青岛海洋化工厂)。

甲醇、乙腈(均为色谱纯),二次蒸馏水(自制),磷酸、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(均为分析纯),95%乙醇(医用)。滴水珠药材购自安徽、浙江药材公司(经沈阳药科大学袁久志副教授鉴定为正品)。

1.2 分离与鉴定

1.2.1 提取与分离

取滴水珠药材 6 kg,以 10 倍量 95%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,减压浓缩得浸膏 112 g。浸膏用 5 倍量水分散后,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等体积萃取各 3 次,其中乙酸乙酯萃取液经浓缩后得粗提物约 8.0 g,作为样品备用。

取柱色谱用硅胶 G(200~300 目)280 g,加入二氯甲烷搅拌均匀,湿法装柱,柱直径与柱床高度比为 1:15,保留体积为 600 mL。取样品 8.0 g,用少量二氯甲烷溶解,与柱色谱用硅胶 G(100~200 目)

12.0 g 混合磨匀,上样,用二氯甲烷(A)-甲醇(B)梯度洗脱,A 与 B 的体积比分别为 100:0(4 000 mL),100:1(4 000 mL),50:1(3 600 mL),30:1(3 600 mL),20:1(4 800 mL),15:1(4 200 mL),10:1(3 400 mL),1:1(6 000 mL),得 200 个流分(Fr₁ 1~200,每个流分的体积约 200 mL)。将 Fr₁ 79~86(二氯甲烷-甲醇的体积比为 50:1 时洗脱下来的流分)浓缩,点样于 20 cm×20 cm 的制备薄层板上(采用薄层色谱用硅胶 G 铺板,厚度 0.5~1 mm),以氯仿-甲醇(体积比为 8:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置于紫外灯(365 nm)下检视,标记色带并将其刮下,装入玻璃小柱,用甲醇洗脱。将洗脱液浓缩后,过装填 Sephadex LH-20 的色谱柱(1 cm×100 cm),用甲醇洗脱,流速 0.5 mL/min;每 5 mL 收集一个流分,共收集 25 个流分(Fr₂ 1~25),对各流分均进行薄层色谱分析,将比移值相同部分合并。Fr₂ 18~20 以甲醇重结晶后,得淡黄色无定形粉末。

1.2.2 结构鉴定

该粉末易溶于甲醇、氯仿。电喷雾质谱(ESI-MS)解析结果为 m/z 346[$M + Na$]⁺、 m/z 322[$M - H$]⁻,提示其相对分子质量为 323。结合核磁共振氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)数据推测其分子式为 C₁₉H₂₁O₂N₃。其¹H-NMR、¹³C-NMR 及异核多键相关谱(HMBC)归属见表 1。参考文献[6],其结构鉴定为 Neoechinulin A,HPLC 纯度为 99.5%。

表 1 Neoechinulin A 的 NMR 数据(DMSO-d₆)
Table 1 NMR data of Neoechinulin A (DMSO-d₆)

No.	¹³ C-NMR (150 MHz)	¹ H-NMR (600 MHz)	HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation) (C-H)
1		11.05 (1H, brs, 1-NH)	126.0 (3a), 103.5 (3), 135.2 (7a), 144.0 (2)
2	144.0		
3	103.5		
3a	126.0		
4	118.9	7.18 (1H, d, J=8.4 Hz, 4-H)	120.8 (6), 126.0 (3a), 135.2 (7a), 103.5 (3)
5	119.4	6.99-7.03 (1H, m, 5-H)	110.2 (8), 111.6 (7), 118.9 (4), 120.8 (6), 126.0 (3a)
6	120.8	7.07-7.09 (1H, m, 6-H)	118.9 (4), 135.2 (7a)
7	111.6	7.42 (1H, d, J=8.4 Hz, 7-H)	119.4 (5), 126.0 (3a)
7a	135.2		
8	110.2	6.89 (1H, s, 8-H)	126.0 (3a), 144.0 (2), 160.0 (10), 166.5 (13)
9	125.0		
10	160.0		
11		8.33 (1H, brs, 11-NH)	125.0 (9), 166.5 (13), 50.6 (12)
12	50.6	4.15 (1H, q, J=7.0 Hz, 12-H)	160.0 (10), 166.5 (13), 19.7 (20)
13	166.5		
14		8.66 (1H, brs, 14-NH)	110.2 (8), 125.0 (9), 160.0 (10), 166.5 (13), 50.6 (12)
15	39.1		
16	145.2	6.08 (1H, dd, J=17.4 Hz, 10.2 Hz, 16-H)	27.3 (18), 27.5 (19)
17	111.7	5.05 (1H, dd, J=10.8 Hz, 1.2 Hz, 17-H) 5.02 (1H, dd, J=17.4 Hz, 1.2 Hz, 17-H)	145.2 (16)
18	27.3	1.48 (6H, s, 18-CH ₃ , 19-CH ₃)	111.7 (17), 144.0 (2), 145.2 (16)
19	27.5		111.7 (17), 144.0 (2), 145.2 (16)
20	19.7	1.37 (3H, d, J=7.2 Hz, 20-CH ₃)	166.5 (13), 50.6 (12)

1.3 含量测定

1.3.1 色谱条件

色谱柱 :Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm , 5 μm) ;流动相 :甲醇-0.1% 磷酸溶液(体积比为 63 :37) ;流速 1.0 mL/min ;柱温 30 ℃ ;检测波长 225 nm ;进样量 :10 μL。

1.3.2 对照溶液的制备

取 Neoechinulin A 适量 ,精密称定 ,置于 25 mL 容量瓶中 ,加乙腈溶解并稀释至刻度 ,摇匀 ,得 0.2 g/L 对照储备液。精密量取对照储备液 1.0 mL ,置于 10 mL 量瓶中 ,加入乙腈稀释至刻度 ,摇匀 ,得 0.02 g/L 对照溶液。

1.3.3 供试溶液的制备

取经 40 ℃ 干燥的滴水珠粉末(过 60 目筛)约 2.0 g ,精密称定 ,用浓氨水 3 mL 润湿后再加氯仿 40 mL 于室温下浸泡 12 h ,超声提取 45 min 后过滤 ,回收溶剂。残渣用乙腈溶解 ,并转移至 2 mL 量瓶 ,稀释至刻度 ,摇匀 ,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。取续滤液作为供试液 ,在 1.3.1 节条件下测定 ,以外标法计算其含量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

参照文献[7 8]分别对甲醇-水、甲醇-水-磷酸、乙腈-水、乙腈-水-磷酸在不同配比下组成的流动相进行考察 ,发现以 1.3.1 节中甲醇-水-磷酸系统为流动相时色谱峰峰形好 ,保留时间短 ,柱效高 ,分离度理想 ;检测波长选择其最大吸收波长 225 nm。

2.2 HPLC 系统适用性试验

取供试溶液 10 μL 进样 ,目标组分的保留时间约 10.3 min ,与相邻峰的分度度均大于 1.5 ,理论板数不低于 12 000/m。

供试溶液及对照溶液的色谱图见图 2。

2.3 提取条件的选择

2.3.1 提取方法

因 Neoechinulin A 为脂溶性生物碱且易溶于氯仿 ,故参照文献[9]选择以氯仿为提取溶剂的亲脂性有机溶剂提取法。取经 40 ℃ 干燥的滴水珠药材(产地 :安徽 ,批号 :0805)粉末(过 60 目筛)约 2.0 g ,精密称定 ,加浓氨水 3 mL 润湿后 ,考察了用不同体积的氯仿、不同浸泡时间及采用回流提取和超声提取的提取效果。结果表明 ,采用 20 倍量氯仿浸提 12 h 后进行超声处理 ,提取物中杂质少 ,待测物的提取效率高 ,且两种方法含量相差不大(见表 2)。因超声方法操作简便 ,故最终选用碱化后亲脂性有机溶剂超声提取法。

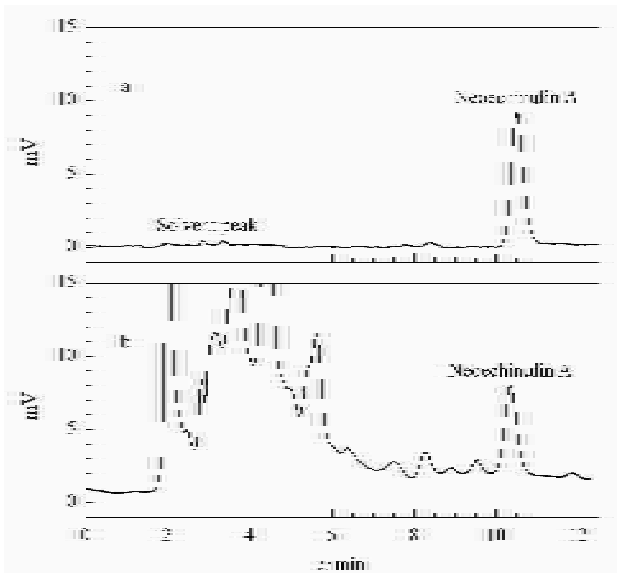


图 2 Neoechinulin A (a)对照溶液和(b)供试溶液的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of (a) control and (b) a sample of Neoechinulin A

表 2 样品中 Neoechinulin A 提取方法的比较(n = 3)
Table 2 Comparison of extraction methods for Neoechinulin A in samples (n = 3)

Method	V(Chloroform)/ mL	Soaking time/h	Sample amount/g	Content/ (μg/g)
Ultrasonic	40	6	2.026	7.633
	40	12	2.009	8.806
	40	24	2.009	8.832
	20	12	2.010	5.193
	60	12	2.011	8.811
Reflux	40	6	2.005	8.662
	40	12	2.008	8.783
	40	24	2.004	8.807

2.3.2 超声提取时间

按 1.3.3 节“ 浸泡 12 h ”前所述步骤制备供试溶液 ,对其进行超声处理 ,考察不同超声提取时间对待测物含量的影响 ,发现超声提取 45 min 即可提取完全(见表 3) ,最终选择超声提取时间为 45 min。

表 3 样品中 Neoechinulin A 超声提取时间的比较(n = 3)
Table 3 Comparison of ultrasonic extraction time for Neoechinulin A in samples (n = 3)

Extraction time/min	Sample amount/g	Content/(μg/g)
30	2.014	7.455
45	2.009	8.806
60	2.006	8.814

2.4 制备待测溶液的溶剂的选择

取两份等量的 Neoechinylin A 粉末 ,分别用等体积的甲醇和乙腈溶解 ,室温下放置 7 d 后进行色谱分析。发现在以甲醇为溶剂的待测溶液的色谱图中 ,除了目标物峰外 ,还出现了多个杂质峰 ,且主峰峰面积减小 ;以乙腈为溶剂时 ,目标组分很稳定(见图 3)。故选择乙腈为制备待测溶液的溶剂。

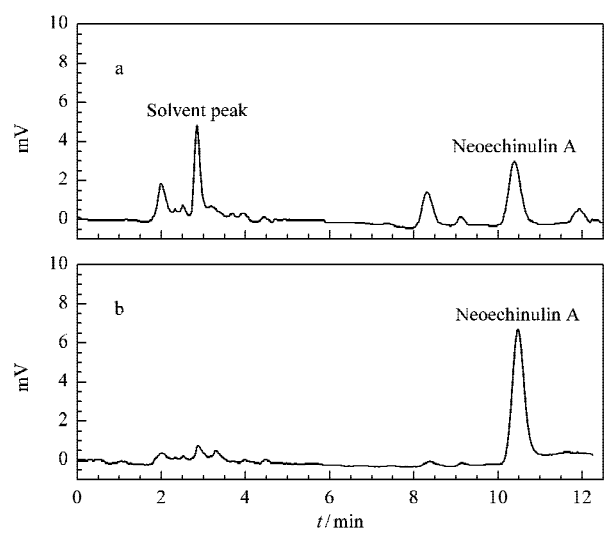


图 3 以(a)甲醇和(b)乙腈为溶剂配制的 Neoechinulin A 对照溶液的稳定性

Fig. 3 Stability of Neoechinulin A control solution using (a) methanol and (b) acetonitrile as solvents

The solutions were stored at room temperature for 7 days.

2.5 方法学确证

2.5.1 线性范围

分别精密量取对照储备液 0.1 ,0.2 ,0.5 ,1.0 ,1.5 和 2.0 mL ,置于 10 mL 容量瓶中 ,加乙腈稀释至刻度 ,摇匀 ,得系列标准溶液。分别进样 10 μL ,以标准溶液的质量浓度(mg/L)为横坐标 *X*、色谱峰面积为纵坐标 *Y* 绘制标准曲线 ,得到的回归方程为 $Y = 8.91 \times 10^3 X - 70.11$ ($r = 0.999\ 5$) ,表明 Neoechinulin A 在 2.0 ~40.0 mg/L 范围内呈良好的线性关系。

2.5.2 定量限

将对照储备液稀释 ,以信噪比(*S/N*)为 10 时的相应质量浓度为定量限 ,其定量限为 60 μg/L。

2.5.3 精密度

精密吸取同一供试溶液 10 μL ,重复进样 6 次 ,记录色谱图 ,测量峰面积 ,其相对标准偏差(*RSD*)为 1.7% ,表明仪器的精密度良好。

取同一滴水珠样品(产地 :安徽 ,批号 :0805) ,按 1.3.3 节所述平行制备 6 份供试溶液进行测定 ,Neoechinulin A 的平均含量(按生药计)为 8.78 μg/g ,其 *RSD* 为 1.9% ,表明方法的精密度良好。

2.5.4 溶液的稳定性

取新制备的同一份供试溶液 ,分别在室温下放置 0 ,1 ,2 ,4 ,8 ,12 h 后进样 ,记录色谱图 ,测量峰面积 ,用当日新配制的对照溶液按外标法计算 ,*RSD* 为 1.5% ($n = 6$) ,表明供试溶液在 12 h 内稳定。

2.5.5 回收率

称取已知含量的滴水珠样品(产地 :安徽 ,批

号 :0805)9 份 ,每份 1.0 g ,精密称定 ,分别精密加入对照溶液 0.22 ,0.44 和 0.66 mL ,每个样品按 1.3.3 节所述平行制备 3 份 ,在 1.3.1 节色谱条件下进样分析 ,计算得出的回收率结果见表 4。

表 4 Neoechinulin A 的回收率($n = 3$)

Table 4 Recovery of Neoechinulin A ($n = 3$)					
No.	Original/μg	Added/μg	Found/μg	Recovery/%	RSD/%
1	8.86	4.40	13.21	98.9	1.4
2	8.79	8.80	17.69	101.1	1.9
3	8.85	13.20	21.82	98.3	1.0

2.6 样品测定

取不同产地、不同批次的滴水珠药材 ,按 1.3.3 节所述制备供试溶液进行 Neoechinulin A 含量的测定。结果表明 ,Neoechinulin A 的含量分别为 :安徽药材(批号 :0803)6.91 μg/g、安徽药材(批号 :0805)8.80 μg/g、安徽药材(批号 :0806)14.15 μg/g、安徽药材(批号 :0811)7.97 μg/g、浙江药材 4.86 μg/g。

3 结语

本文所建立的测定 Neoechinulin A 含量的方法简便、快速、准确、线性范围广 ,可以作为滴水珠药材质量控制的一个有效方法。

参考文献 :

[1] Song L R , Hong X , Ding X L , et al. Dictionary of modern traditional Chinese materia medica. Beijing : People 's Medical Publishing House (宋立人 , 洪恂 , 丁绪亮 , 等. 现代中药学大辞典. 北京 : 人民卫生出版社) , 2001 : 2 354

[2] Cai G X , Tan G B , Zhou S , et al. Records of Hunan medicines. Changsha : Hunan Science & Technology Press (蔡光先 , 谭光波 , 周慎 , 等. 湖南药物志. 长沙 : 湖南科学技术出版社) , 2004 : 5 105

[3] Lou Z C , Qin B. Species systematization and quality evaluation of commonly useful Chinese traditional drugs. Beijing : Peking University Medical Press (楼之岑 , 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究. 北京 : 北京大学医学出版社) , 2003 : 959

[4] Yaji R , Doi M. Biosci Biotech Biochem , 1999 , 63(5) : 932

[5] Pettit G R , Hogan F , Xu J P , et al. J Nat Prod , 2008 , 71 (3) : 438

[6] Li Y , Li X F , Kim S K , et al. Chem Pharm Bull , 2004 , 52 (3) : 375

[7] Li M H , Ding G , Shen M , et al. Chinese Journal of Natural Medicine (李明慧 , 丁岗 , 沈明 , 等. 中国天然药物) , 2006 , 4(2) : 104

[8] Luo M , Fu Y J , Zu Y G , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (罗猛 , 付玉杰 , 祖元刚 , 等. 分析化学) , 2005 , 33(1) : 87

[9] Zeng J H , Peng Z S , Mao Z C , et al. Journal of Chinese Medicinal Materials (曾建红 , 彭正松 , 毛子成 , 等. 中药材) , 2003 , 26(5) : 361