

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610130879.7

[51] Int. Cl.

C07H 17/04 (2006.01)

C07H 1/08 (2006.01)

A61K 36/40 (2006.01)

A61K 131/00 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 1999536A

[22] 申请日 2006.12.29

[21] 申请号 200610130879.7

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街5625号

[72] 发明人 刘志强 周莉莉 宋凤瑞 王淑敏

刘春明 吴国光 刘淑莹

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司

代理人 马守忠

权利要求书3页 说明书8页

[54] 发明名称

一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物同时提取及检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物同时提取及测定方法。采用本法可简便可靠地对山茱萸中六种环烯醚萜苷类化合物完全提取并定量检测，各种方法学指标均能可靠地满足检测山茱萸中环烯醚萜苷类物质的需要。本发明与现有山茱萸提取测定方法相比，具有以下优点及突出性效果：(1)提取方法简便，效率高，成本低廉；(2)检测方法快捷、有效，同时得到山茱萸各环烯醚萜苷类化合物的含量。(3)药材检测结果准确、有效、可靠。

1、一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物的同时提取方法，其特征在于，步骤和条件如下：

(1) 将山茱萸药材净制，即除去杂质和残留果核、果梗，得到净山茱萸；

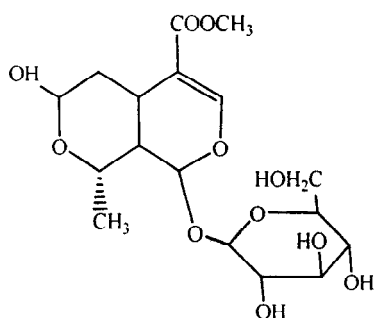
(2) 将净山茱萸加入体积百分比浓度为 20 %~90 %乙醇，8~30 倍量浸泡后，回流提取 2~4 次，以微沸为度，每次回流时间为 0.5 ~1 小时，过滤；

(3) 合并滤液，用旋转蒸发仪减压浓缩至无醇味，得浓缩液；

(4) 将浓缩液加乙醇调至使含乙醇量体积百分比浓度为 50 %~90，冷藏静置 12~48 小时；

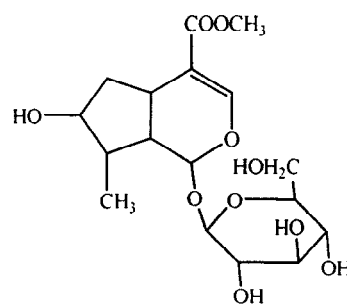
(5) 将静置后溶液过滤，滤液用旋转蒸发仪减压回收乙醇至无醇味，得到山茱萸环烯醚萜苷类提取物；

所述的山茱萸环烯醚萜苷类提取物为六种山茱萸环烯醚萜苷类化合物，其分子量和分子结构式如下所示：



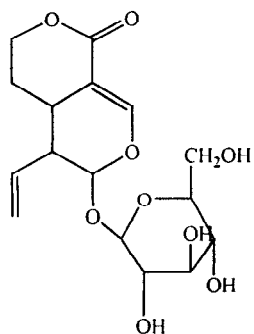
莫诺昔 (Morroniside)

MW=406



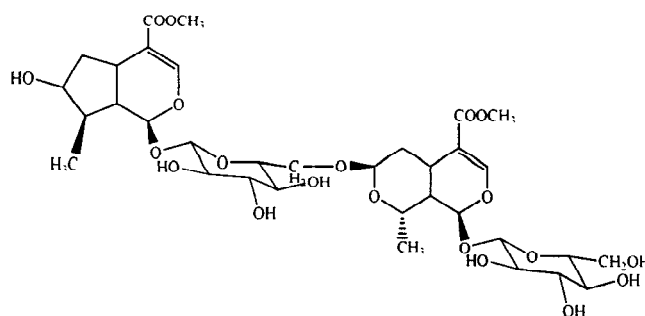
马钱昔 (Loganin)

MW=390



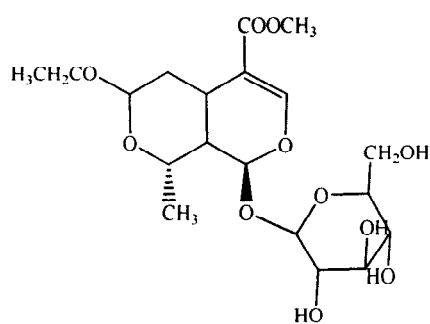
獐芽菜苷 (Sweroside)

MW=358



山茱萸新苷 II (Cornuside II)

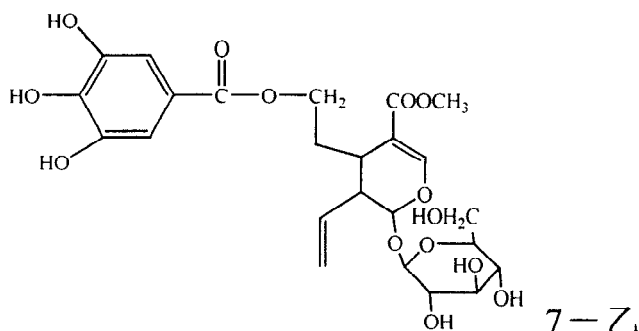
MW=778



氧基莫诺苷

(7-O-ethylmorroneiside)

MW=434



山茱萸新苷 I

(Cornuside I)

MW=542

2、如权利要求 1 所述的一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物的同时提取方法所提取的六种山茱萸环烯醚萜苷类化合物的检测方法，其特征在于，步骤和条件如下：

(1)液相分离：

流动相：由 A 和 B 组成，其中 A 为：乙腈或甲醇 B 指超纯水，流速：  
0.5~1.2 ml / min ；

色谱柱：采用硅胶键合相填料液相色谱柱为：C18 柱、C8 柱；柱温：  
20~35℃ ；

检测波长：240nm；

洗脱方法：采用梯度洗脱方法，流动相的组成以体积百分比计为 A：60 %~10 %、B：40 %~90 %；洗脱梯度根据不同的键合色谱柱进行设计和调整，对于 C18 键合色谱柱，当 A 为乙腈、B 为水时，洗脱方法如下：

梯度（以体积百分比计算）： 0~2.0 min, A: 10 %、B: 90 %；

2.0~10.0 min, A: 10~15 %、B: 90~85 %；

10.0~40.0 min, A: 15~30 %、B: 85~70 %；

40.0~45.0 min, A: 30~40 %、B: 70~60 %.

## (2) 质谱检测：

质谱条件为：采用电喷雾离子源、负离子模式，离子喷射电压 4~5KV；毛细管温度 180~300℃；毛细管电压-25V；鞘气 (N<sub>2</sub>) 流速 35 个单位；扫描范围 m/z 50~1000. 按分子量和质谱行为来确认各环烯醚萜苷类化合物。

## 一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物同时提取及检测方法

### 技术领域

本发明涉及一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物同时提取及检测方法，属于中药技术领域。

### 技术背景

山茱萸(*Cornus officinalis Sieb. et Zucc.*)，别名蜀枣、鼠矢、鸡足、山萸肉、实枣儿、枣皮和萸肉等，我国浙江、河南、山东、安徽、江苏、山西、陕西、四川等地均有分布和栽培。山茱萸其味酸、涩，性微温，归肝肾经，有补益肝肾、涩精固脱的功效。主治眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精、遗尿尿频、崩漏带下、大汗虚脱、内热消渴。具有补益肝肾、涩精固脱的作用，是中医临床常用的名贵传统药材之一。

我国自古就有山茱萸应用于糖尿病(中医称为“消渴症”)治疗的记载。国内外学者对其成分进行了研究，现代药理学研究表明，山茱萸环烯醚萜苷类物质是降糖的主要活性部位。许惠琴等(南京中医药大学学报, Vol. 19(6), 2003, P342~344)研究了山茱萸环烯醚萜总苷对实验性糖尿病肾病变的保护作用；皮文霞等(中药新药与临床药理, Vol. 14(1), 2003, P23~24)报道了山茱萸环烯醚萜总苷对糖尿病血管并发症模型大鼠血清SOD的影响。

有报道认为，已知山茱萸中环烯醚萜苷类化合物有10个，含量最高的是马钱苷(loganin)、莫诺苷(morronein)，另含獐牙菜苷(sweroside)、

7-甲基莫诺苷(疑为提取过程中的次生产物)、7-乙氧基莫诺苷(可能是由于乙醇的提取,也可能因酒的炮制产生的次生物)。脱水莫诺苷元、7-脱氢马钱苷(7-dehydrologanin)、山茱萸苷(cornin,即马鞭草苷 verbenalin)、山茱萸新苷 I, II (cornuside I, II) (潘杨等,南京中医药大学学报: Vol. 14 (1), 1998, P61)。1973年由 Tohru Endo 等从山茱萸中首次分离得到环烯醚萜苷类单体化合物-莫诺苷(日本《药学杂志》 Vol. 93, P30~32)。文中的方法为甲醇提取后上活性炭柱,经过硅胶柱层析,氯仿-甲醇梯度洗脱,得到莫诺苷。1992年陈玉武等也从制萸肉中分离得到了莫诺苷(中日友好医院学报, Vol. 6, P231~234)。文中的方法为水提取后上大孔吸附树脂柱,经过硅胶柱层析,得到莫诺苷。中国专利 200410014771.2 公开了山茱萸提取物莫诺苷的制备方法和用途。但是,现有的这些分离步骤繁琐,在提取过程中损失较大,并且只能得到部分环烯醚萜苷类单体物质,不能代表治病的药效物质基础。迄今为止,也尚未见有山茱萸环烯醚萜苷类物质的同时提取和检测方法的报导。

## 发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中预处理操作复杂,不能同时提取和检测多种环烯醚萜苷类化合物的缺陷,提供一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物同时提取和检测方法。

1、本发明的一种山茱萸环烯醚萜苷类提取物同时提取和检测方法,是通过下述步骤获得的:

(1) 将山茱萸药材净制,即除去杂质和残留果核、果梗,得到净山茱萸。

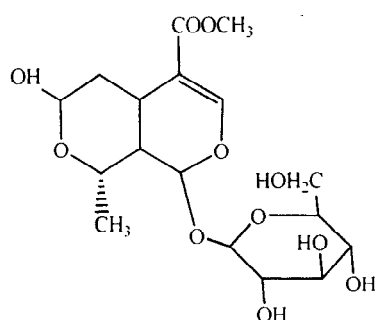
(2) 将净山茱萸加入体积百分比浓度为 20 %~90 %乙醇, 8~30 倍量浸泡后, 回流提取 2~4 次, 以微沸为度, 每次回流时间为 0.5 ~1 小时, 过滤。

(3) 合并滤液, 用旋转蒸发器减压浓缩至无醇味, 得浓缩液。

(4) 将浓缩液加乙醇调至使含乙醇量体积百分比浓度为 50 %~90, 冷藏静置 12~48 小时。

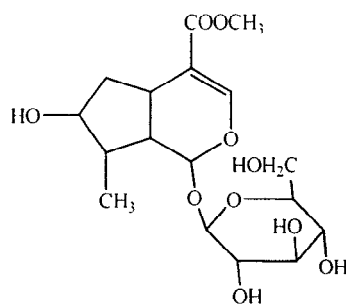
(5) 将静置后溶液过滤, 滤液用旋转蒸发器减压回收乙醇至无醇味, 得到山茱萸环烯醚萜苷类提取物;

所述的山茱萸环烯醚萜苷类提取物为六种山茱萸环烯醚萜苷类化合物, 其分子量和分子结构式如下所示:



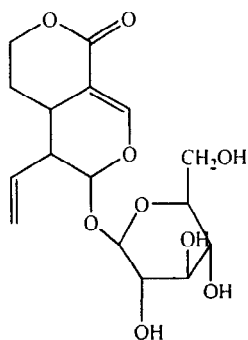
莫诺苷 (Morroniside)

MW=406



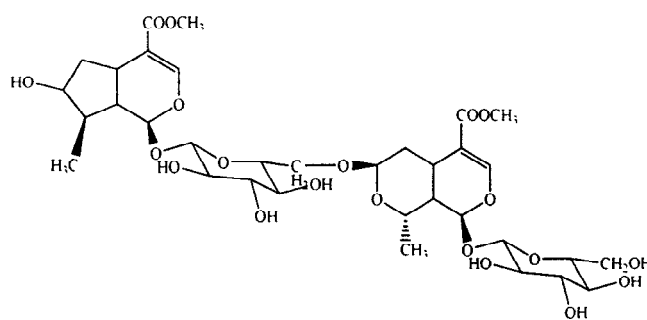
马钱苷 (Loganin)

MW=390



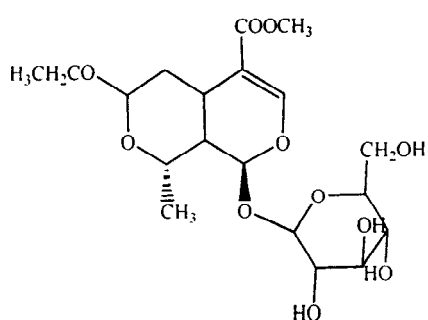
獐芽菜苷 (Sweroside)

MW=358



山茱萸新苷 II (Cornuside II)

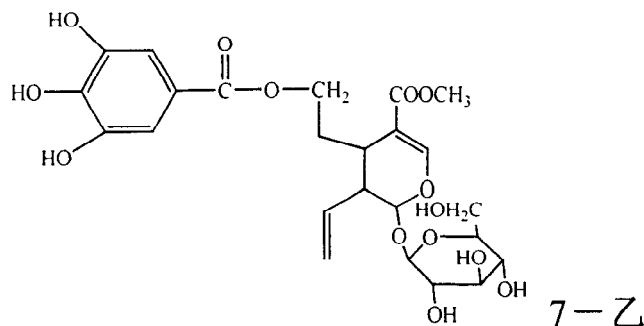
MW=778



氧基莫诺昔

(7-*O*-ethylmorroneiside)

MW=434



山茱萸新昔 I

(Cornuside I)

MW=542

在上述制备方法中，用乙醇提取可以采用煎煮法、浸渍法、渗漉法和超声法提取。也可以用其它有机溶剂提取所获得的提取物。

本发明所说的山茱萸是山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的成熟果肉，包括生品和炮制品。

2、本发明所述的山茱萸环烯醚萜苷类提取物的同时检测方法包括如下两个方面：

(1) 液相分离：

流动相：由 A 和 B 组成，其中 A 为：乙腈或甲醇 B 指超纯水，流速：0.5~1.2 ml / min .

色谱柱：采用硅胶键合相填料液相色谱柱为：C18 柱、C8 柱。柱温：20~35℃ 。

检测波长：240nm.

洗脱方法：采用梯度洗脱方法。流动相的组成以体积百分比计为 A：60 %~10 %、B：40 %~90 %；洗脱梯度根据不同的键合色谱柱进行设计和调整，对于 C18 键合色谱柱，当 A 为乙腈、B 为水时，洗脱方法如下：



梯度（以体积百分比计算）： 0~2.0 min, A: 10 %、B: 90 %；  
2.0~10.0 min, A: 10~15 %、B: 90~85 %；  
10.0~40.0 min, A: 15~30 %、B: 85~70 %；  
40.0~45.0 min, A: 30~40 %、B: 70~60 %.

## (2) 质谱检测：

质谱条件为：采用电喷雾离子源、负离子模式，离子喷射电压 4~5KV；毛细管温度 180~300℃；毛细管电压-25V；鞘气（N<sub>2</sub>）流速 35 个单位；扫描范围 m/z 50~1000. 按分子量和质谱行为来确认各环烯醚萜苷类化合物。

## 3、本发明方法的方法学考察和浓度计算方法：

以标准品马钱苷进行本发明方法的方法学考察，得到本发明方法的检测限为 0.5~10ng/ml (信噪比 $\geq 3$ )；线性范围为 10~2000 ng/ml；相关系数在 0.9990 以上；日内及日间精密度、重现性相对标准偏差 RSD $\leq 5\%$ ；加样回收率在 90~110 %.

按外标法计算得到样品中马钱苷的含量，再按内标法以峰面积或者峰高法计算出样品中其它五种环烯醚萜苷类化合物的含量。

本发明的有益效果如下：

1)、本发明的制备方法可简单直接得到山茱萸环烯醚萜苷类化合物提取物，无需进一步处理。

2) . 本发明对山茱萸提取物的检测灵敏度高、专一性强，操作简便可靠，各种方法学指标均能可靠地满足检测山茱萸中环烯醚萜苷类物质的需要。

## 具体实施方式

### 提取实施例 1

山茱萸生品药材 50g 用 80 %乙醇回流提取，提取 2 次，加醇量为药材重量的 20 倍，提取时间 2 小时。合并提取液，滤过并减压浓缩至 1/10 体积，在浓缩液中加入 95 %乙醇，使含醇量为 80 %，醇析沉淀后冷藏静置 24 小时，滤过，减压回收乙醇，得到山茱萸生品回流提取物。

### 提取实施例 2

山茱萸炮制品药材 50g 用 80 %乙醇回流提取，提取 2 次，加醇量为药材重量的 20 倍，提取时间 2 小时。合并提取液，滤过并减压浓缩，将浓缩液加 4 倍量水沉淀后冷藏静置 24 小时，滤过，减压回收乙醇，得到山茱萸炮制品回流提取物。

### 提取实施例 3

山茱萸炮制品药材 50g 用 80 %乙醇超声提取 2 次，每次 20min，加醇量为药材重量的 20 倍。合并提取液，滤过并减压浓缩至无醇味，在浓缩液中加入 95 %乙醇，使含醇量为 80 %，醇析沉淀后冷藏静置 24 小时，滤过，减压回收乙醇，得到山茱萸炮制品超声提取物。

### 提取实施例 4

山茱萸炮制品药材 100g 粉碎后过 40 目筛，用 40 %乙醇浸渍 36 小时后渗漉提取，流速 4~5 毫升 / 分钟，渗漉量为药材重量的 10 倍。合并提取液，滤过并减压浓缩，将浓缩液加 4 倍量水沉淀后冷藏静置 12 小时，滤过，减压回收乙醇，得到山茱萸炮制品渗漉提取物。

### 提取实施例 5

山茱萸炮制品药材 50g 用 70 %的乙醇煎煮 2 次，加醇量为药材重量

的 10 倍，煎煮微沸后提取各 1h。合并煎煮液，过滤，减压回收乙醇，得山茱萸炮制品煎煮提取物。

## 检测实施例 1

### 1 材料

#### 1.1 仪器

液相色谱—质谱联用仪：Waters 2690 series LC/LCQ trap: ESI 源。

色谱柱：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 柱(MG 5  $\mu$  m,250mm $\times$ 4.6mm(i.d.))。

#### 1.2 药品与试剂

马钱苷标准品购于中国药品生物制品检定所。

甲醇、乙腈为色谱纯，购自 Fisher 公司；水为超纯水（18.2M $\Omega$ ·cm）  
0.45  $\mu$  m 滤膜（美国安捷伦公司）。

### 2 仪器条件

#### 2.1 液相色谱条件

流动相：A：乙腈；B：超纯水；流速：0.6 ml/ min 。

进样量 10  $\mu$  l.

柱温：35 $^{\circ}$ C.

检测波长：240nm.

梯度洗脱（以体积百分比计算）：

0~2.0 min, A: 10 %、B: 90 %；

2.0~10.0 min, A: 10~15 %、B: 90~85 %；

10.0~40.0 min, A: 15~30 %、B: 85~70 %；

40.0~45.0 min, A: 30~40 %、B: 70~60 %.

## 2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源, 负离子模式。喷射电压 4.5kV; 毛细管电压-25V; 毛细管温度 200℃; 鞘气 (N<sub>2</sub>) 流速 35 个单位; 扫描范围  $m/z$  50~1000.

## 2.3 方法学考察

分别测定精密度、稳定性和重现性, 要求相对标准偏差  $RSD \leq 5\%$ , 检测限要求信噪比 (S/N)  $\geq 3$ , 得到本发明方法的检测限为 0.5~10ng/ml; 线性范围为 10~2000 ng/ml; 相关系数在 0.9990 以上; 日内及日间精密度、重现性相对标准偏差  $RSD \leq 5\%$ ; 加样回收率在 90~110%.

## 2.4 检测结果

经确认, 山茱萸中六种环烯醚萜苷类化合物的保留时间分别为: 莫诺苷 ( $m/z$  405) 12.35min; 马钱苷 ( $m/z$  389) 17.06min; 獐芽菜苷 ( $m/z$  357) 17.89min; 山茱萸新苷 II ( $m/z$  777) 28.02min; 7-乙氧基莫诺苷 ( $m/z$  433) 31.25min; 山茱萸新苷 I ( $m/z$  541) 32.7min.