

地榆提取物中不同类型鞣质的测定

程悦¹, 陈嘉升¹, 陈建萍^{2*}, 王冬梅^{1*}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 香港大学中医药学院, 香港)

摘要:目的 建立可水解鞣质和缩合鞣质测定方法, 并对地榆水提物及不同极性溶剂萃取物中可水解鞣质和缩合鞣质进行测定。方法 采用酸解后 HPLC 分析法测定可水解鞣质; 采用香草醛硫酸法测定缩合鞣质。结果 地榆水提物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水层留余物的可水解鞣质质量分数分别为 (81.83 ± 2.59) mg/g、 (206.80 ± 2.43) mg/g、 (163.56 ± 5.69) mg/g、 (47.62 ± 1.13) mg/g; 缩合鞣质质量分数分别为 (181.72 ± 1.41) mg/g、 (594.52 ± 16.76) mg/g、 (476.27 ± 13.33) mg/g、 (14.41 ± 0.29) mg/g。结论 酸解后 HPLC 分析法和香草醛硫酸法简便、快速、精密度、稳定性、重现性、专属性好, 适合作为不同类型鞣质的测定方法; 地榆乙酸乙酯萃取物的可水解鞣质及缩合鞣质最高。

关键词:地榆; 可水解鞣质; 缩合鞣质; 高效液相色谱; 香草醛硫酸法

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-528(2011)05-0852-06

Determination of tannins content in *Sanguisorba officinalis* L. extracts

CHENG Yue¹, CHEN Jia-sheng¹, CHEN Jian-ping^{2*}, WANG Dong-mei^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Chinese Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the quantitative assay of hydrolysable tannins and condensed tannins, and in the aqueous extract of *Sanguisorba officinalis* L and its different solvents partitioned extracts. **METHODS** The HPLC was used for the determination of hydrolysable tannins content. The Vanillin-H₂SO₄ method was employed for the determination of condensed tannins content. **RESULTS** The hydrolysable tannins content in the aqueous extract, ethyl acetate partitioned extract, *n*-butanol partitioned extract and water residue were (81.83 ± 2.59) mg/g, (206.80 ± 2.43) mg/g, (163.56 ± 5.69) mg/g, (47.62 ± 1.13) mg/g, respectively; The condensed tannins content was (181.72 ± 1.41) mg/g, (594.52 ± 16.76) mg/g, (476.27 ± 13.33) mg/g, (14.41 ± 0.29) mg/g, respectively. **CONCLUSION** HPLC analysis in acid hydrolysis and Vanillin-H₂SO₄ method are simple, rapid, accurate, stable, reproducible, selective, and suitable for determination of tannins. Of all these extracts, the tannins content in ethyl acetate extract layer is the highest.

KEY WORDS: *Sanguisorba officinalis* L.; hydrolysable tannin; condensed tannin; HPLC; Vanillin-H₂SO₄ method

地榆为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *Sanguisorba officinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li 的干燥根, 主产于东北、内蒙古、山西、陕西、河南、广西等地。地榆味苦、酸、涩, 微寒, 归肝、大肠经, 用于治疗便血、痔血、血痢、崩漏、水火烫伤、痈肿疮毒等症^[1]。鞣质类和三萜类化合物是地榆的主要化学成分, 鞣质是其发挥收敛止血作用

的物质基础^[2]。

鞣质(Tannins)又称单宁, 是存在于植物体内的一类结构较复杂的多酚类化合物。K Frendenberg 于 1920 年按照鞣质的化学结构特征将其分为可水解鞣质(hydrolysable tannin)和缩合鞣质(condensed tannin)两大类^[3]。可水解鞣质, 即没食子酸酯类多酚, 是多元醇与没食子酸或与没食子酸有生源关系

收稿日期: 2010-09-25

作者简介: 程悦(1987—), 女, 硕士生, 研究方向: 中草药药效物质基础研究。Tel: (020)39943043, E-mail: chengyue888@163.com

* 通信作者: 王冬梅, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 天然药物化学与中草药质量标准化。Tel: (020)39943042, E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn 陈建萍, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 中药药理学(心脑血管药理学、肿瘤药理学)。Tel: (00852)95147068, E-mail: jjpichen@yahoo.com

的酚酸所形成的酯,其分子内具有酯键或苷键,在稀酸、稀碱或酶的作用下易水解,产生多元醇和小分子类酚酸,根据其水解产物的不同,分为没食子鞣质(gallotannin)和鞣花鞣质(ellagitannin)两大类。缩合鞣质,即聚黄烷醇类多酚,是由儿茶素或没食子酸儿茶素等黄烷-3-醇类化合物以碳-碳键聚合而形成的化合物,不被酸所水解,通常三聚体以上才具有鞣质的性质^[4]。

地榆中的鞣质类成分量很高,约为17%,从1982年开始,Nonaka、Tanaka等^[5-9]先后从地榆中分离出没食子酸、鞣花酸、地榆素H-1、地榆素H-2、地榆素H-3、地榆素H-6、地榆素H-11、(±)-儿茶素、(±)-没食子酸儿茶素、原花青素B-3、原花青素C-2、3-O-没食子酰原花青素B-3、4,6-O-双没食子酰甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷、6-O-双没食子酰甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷I、6-O-双没食子酰甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷II、2,3,4,6-O-四没食子酰甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷、2,3,6-O-三没食子酰-β-D-吡喃葡萄糖苷和3,4,6-O-三没食子酰-β-D-吡喃葡萄糖苷、1,2,3-O-三没食子酰-β-D-葡萄糖、1,2,3,6-O-四没食子酰-β-D-葡萄糖、2,3,4,6-O-四没食子酰-β-D-葡萄糖、1,2,3,4,6-O-五没食子酰-β-D-葡萄糖等化合物,夏红旻、秦国伟等^[10-11]分离出3,3',4'-三甲氧基鞣花酸和3-O-甲基没食子酸甲酯。

可水解鞣质和缩合鞣质由于基本组成的不同,药理作用和疗效显著不同,即使同类型的鞣质,结构上的微小差异也可导致活性的巨大差异,为了富集地榆中不同类型的鞣质类成分进行进一步的药效物质基础以及药理活性研究,本实验以可水解鞣质和缩合鞣质作为研究对象,分别测定地榆水提物和各萃取部位的鞣质,采用酸解后HPLC分析的方法测定可水解鞣质,用香草醛硫酸法测定缩合鞣质。

1 材料与仪器

1.1 供试材料

地榆干燥药材,产地广西,购自香港大学中医药学院临床教研中心大药房,经中山大学药学院生药学与天然药化实验室杨得坡教授鉴定为蔷薇科地榆属植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 的干燥根。

1.2 试剂与仪器

TU-1810紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),HPLC色谱仪:岛津LC-20AB泵、岛津SIL-20A自动进样器、岛津SPD-M20A二极管阵列检测器(日本岛津公司),Ultimate AQ-C18色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm,美国Welch公司),

Millipore超纯水系统。

鞣花酸、没食子酸、儿茶素(美国Sigma公司),色谱纯乙腈(美国Sigma公司),石油醚(沸程60~90℃)、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、硫酸、香草醛为国产分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 地榆水提物及各个萃取部位的制备

干燥地榆药材2.5 kg,粉碎,冷水浸泡过夜后,加入10倍水(V:M)、加热至沸后煎煮1 h,抽滤,滤渣重复煎煮提取1次,抽滤,合并两次提取液,得地榆水提液。

将水提液浓缩至小体积后,除小部分浓缩得水提物约120 g,其余依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇对地榆水提液进行萃取,萃取液减压浓缩至干,得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物及水层留余物,得率如表1所示。因石油醚萃取物的得量很少,且不含鞣质类成分,故不对其进行鞣质的测定。

表1 地榆各萃取部位得率

Tab. 1 The contents of different extracts from *Sanguisorba officinalis* L.

	石油醚 萃取物	乙酸乙酯 萃取物	正丁醇 萃取物	水层 留余物
收量/g	0.30	13.00	180.98	236.71
收率/%	0.07	3.02	41.99	54.92

2.2 地榆水提物及各萃取部位中可水解鞣质的测定

可水解鞣质分子内的酯键或苷键在酸热作用下易水解,产生没食子酸和鞣花酸,因此,本实验采用酸解后HPLC分析的方法^[12],通过测定水解后没食子酸和鞣花酸,来间接反映可水解鞣质的总量。

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取鞣花酸5.22 mg,置于25 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤后,为鞣花酸对照品贮备液(208.8 μg/mL);精密称取没食子酸对照品5.00 mg,置于25 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤后,为没食子酸对照品贮备液(200 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取地榆水提物5 mg、乙酸乙酯萃取物2 mg、正丁醇萃取物3 mg、水层留余物5 mg,置于5 mL棕色小瓶,加入0.5 mL 2.0 mol/L盐酸溶液,密封,95℃下酸解8 h。结束酸解后,冷却至室温,加入甲醇超声30 min,转移至5 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm微孔

滤膜过滤,为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件的选择 以乙腈和0.2%甲酸-水为流动相,乙腈0 min(5%)-10 min(15%)-25 min(25%)-35 min(30%)-45 min(90%);体积流量1 mL/min;进样量20 μ L;检测波长254 nm。在该色谱条件下,没食子酸和鞣花酸的保留时间分别为8.81 min和27.35 min,没食子酸和鞣花酸与样品中其他组分分离良好,理论塔板数均大于5 000,结果见图1。

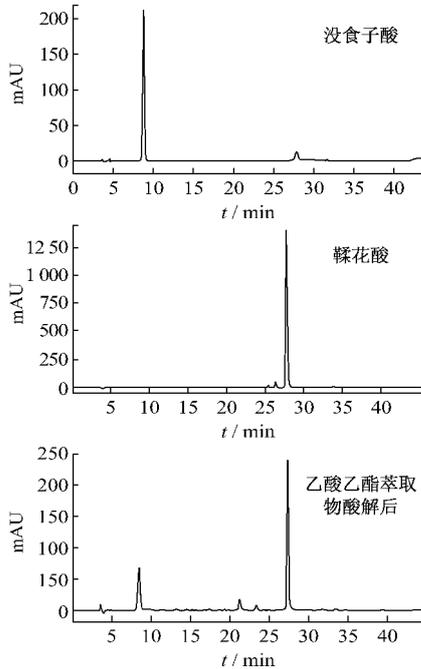


图1 没食子酸、鞣花酸对照品及乙酸乙酯萃取物酸解后 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of gallic acid, ellagic acid and hydrolyzated ethyl acetate extract

2.2.4 可水解鞣质测定的方法学考察

2.2.4.1 标准曲线和线性范围 精密吸取0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3 mL 鞣花酸对照品贮备液于5 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制浓度为5.22、10.44、20.88、41.76、62.64、83.52、125.28 μ g/mL的鞣花酸对照品系列溶液;精密吸取0.125、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2 mL 没食子酸贮备液于5 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制浓度为5、10、20、30、40、50、60、80 μ g/mL的没食子酸对照品系列溶液。按2.2.3项下色谱条件进行分析,分别以对照品没食子酸、鞣花酸的浓度 X (μ g/mL)为横坐标,峰面积值 Y 为纵坐标进行回归分析。

结果显示,鞣花酸浓度在5.22~125.28 μ g/mL

范围内线性良好,回归方程为: $Y = 167\ 410X - 463\ 853$ $r^2 = 0.998\ 8$;没食子酸浓度在5.00~80.00 μ g/mL范围内线性良好,回归方程为: $Y = 21\ 461X + 23\ 487$ $r^2 = 0.999\ 7$ 。

2.2.4.2 精密密度试验 在2.2.3项下色谱条件,分别将鞣花酸和没食子酸对照品溶液重复进样6次,测得鞣花酸和没食子酸峰面积的RSD分别为0.13%和0.04%,表明仪器精密密度良好。

2.2.4.3 重复性试验 称取地榆乙酸乙酯萃取物2 mg共6份,按2.2.2项下制备供试液样品,按2.2.3项下色谱条件进行分析,测得鞣花酸和没食子酸质量分数均值分别为57.63 mg/g和149.33 mg/g,RSD分别为0.71%和0.98%,表明该方法重复性良好。

2.2.4.4 稳定性试验 称取地榆乙酸乙酯萃取物2 mg,按2.2.2项下制备供试液样品,配制后分别于第0、1、2、4、8、16、24 h进样7次,按2.2.3项下色谱条件进行分析,测得供试品中的鞣花酸和没食子酸峰面积的RSD分别为0.31%和0.20%,表明样品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.4.5 加样回收率试验 精密称取已知量的地榆乙酸乙酯萃取物9份,每份约1.2 mg,分别加入不同量的鞣花酸和没食子酸对照品溶液,制备3个不同浓度的样品,每个浓度平行3份,按2.2.2项下制备供试液样品9份,按2.2.3项下色谱条件进行分析,结果如表2所示,鞣花酸与没食子酸加样回收率分别为100.36%和102.77%,RSD值分别为1.45%和1.20%,表明该方法的准确度良好。

2.2.5 地榆水提物及各萃取部位中可水解鞣质的测定 分别称取地榆水提物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水层留余物各3份,按照按2.2.2项下制备供试液样品,按2.2.3项下色谱条件进行分析,测定供试品中没食子酸和鞣花酸的量,结果如表3所示。

2.3 地榆水提物及各萃取部位中缩合鞣质的测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取儿茶素对照品52.59 mg置于50 mL量瓶中,用甲醇溶剂并稀释至刻度,摇匀,为对照品贮备液(1.051 8 mg/mL)。

2.3.2 供试品溶液的制备 称取地榆水提物5 mg、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物样品各2 mg,水层留余物50 mg,置于5 mL量瓶中,加入甲醇,超声溶解后,用甲醇稀释至刻度,摇匀,为供试品溶液。

2.3.3 缩合鞣质测定方法 采用香草醛硫酸法^[13],取供试品溶液0.5 mL,加入包有锡箔的试管

表 2

加样回收率试验 (n=9)

Tab. 2

Results of recovery test (n=9)

		取样量	样品中原有量	加入量	测得量	回收率	均值	RSD
		/mg	/μg	/μg	/μg	%	%	%
鞣花酸	高 (120%)	1.16	66.84	80.21	147.70	100.81	100.36	1.45
		1.20	69.15	82.98	154.13	102.41		
		1.17	67.42	80.90	146.84	98.16		
	中 (100%)	1.20	69.15	69.15	138.95	100.95		
		1.21	69.73	69.73	138.70	98.93		
		1.22	70.30	70.30	140.14	99.34		
	低 (80%)	1.18	68.00	54.40	123.63	102.27		
		1.17	67.42	53.94	121.73	100.70		
		1.15	66.27	53.01	119.12	99.69		
没食子酸	高 (120%)	1.16	172.99	207.58	388.22	103.69	102.77	1.20
		1.20	178.95	214.74	394.20	100.23		
		1.17	174.48	209.37	386.11	101.08		
	中 (100%)	1.20	178.95	178.95	364.15	103.49		
		1.21	180.44	180.44	366.92	103.34		
		1.22	181.93	181.93	370.37	103.57		
	低 (80%)	1.18	175.97	140.78	320.11	102.39		
		1.17	174.48	139.58	319.72	104.05		
		1.15	171.50	137.20	311.67	102.17		

表 3 地榆水提取物及各萃取部位的可水解鞣质测定

Tab. 3 Contents of hydrolysable tannins in the aqueous extract of *Sanguisorba officinalis* L and its different solvents partitioned extracts

	酸解后没食子酸/(mg/g)	酸解后鞣花酸/(mg/g)	可水解鞣质/(mg/g)
水提取物	20.82 ± 1.48	59.78 ± 1.11	81.83 ± 2.59
乙酸乙酯萃取物	149.18 ± 1.84	57.62 ± 0.59	206.80 ± 2.43
正丁醇萃取物	102.74 ± 3.64	60.82 ± 2.05	163.56 ± 5.69
水层留余物	5.42 ± 0.03	42.20 ± 1.10	47.62 ± 1.13

中,分别加入 2.5 mL 3% 香草醛甲醇溶液和 2.5 mL 30% 浓硫酸甲醇溶液,摇匀,避光显色 20 min 后,在 500 nm 处测定吸光度 A_{500} 。

2.3.4 缩合鞣质测定的方法学考察

2.3.4.1 标准曲线和线性范围 精密量取儿茶素对照品贮备液 0.5、1、2、3、4、5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,分别加入甲醇稀释定容至刻度,摇匀,备用。分别取上述各浓度对照品溶液 0.5 mL,按 2.3.3 项下测定,以对照品溶液的浓度 (X , mg/mL) 为横坐标,对照品吸光度值 A_{500} (Y) 为纵坐标,进行回归分析。结果显示,儿茶素对照品浓度在 0.054 1 ~ 0.525 9 mg/mL 范围内线性良好,回归方程为 $Y = 2.252 3X - 0.107 7$, $r^2 = 0.999 1$ 。

2.3.4.2 精密度试验 取对照品溶液 0.5 mL,按 2.3.3 项下测定,连续测定 6 次 A_{500} ,RSD 为 0.20%,表明仪器精密度良好。

2.3.4.3 重复性试验 精密称取 1 mg 地榆乙酸乙

酯萃取物 6 份,按 2.3.2 项下制备供试液,按 2.3.3 项下测定 A_{500} ,计算缩合鞣质均值为 593.55 mg, RSD 为 1.70%,表明该方法重复性良好。

2.3.4.4 稳定性试验 精密称取地榆乙酸乙酯萃取物 1 mg,按 2.3.2 项下制备供试液,同一供试品溶液分别于第 0、1、2、4、8、24 h 按 2.3.3 项下测定 A_{500} ,共测定 6 次,RSD 为 1.32%,表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4.5 加样回收率试验 称取 1 mg 已知质量分数的地榆乙酸乙酯萃取物 9 份,分别加入不同质量分数的儿茶素对照品溶液,制备 3 个不同浓度的样品,每个浓度平行 3 份,按 2.3.2 项下制备供试液样品 9 份,按 2.3.3 项下测定 A_{500} ,结果如表 4 所示,儿茶素的加样回收率为 99.37%,RSD 值为 1.06%,表明该方法的准确度良好。

2.3.5 地榆水提取物及各萃取部位中缩合鞣质的测定 分别称取地榆水提取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水层留余物各 3 份,按照按 2.3.2 项下制备供试液样品,按 2.2.3 项下测定 A_{500} ,结果如表 5 所示。

3 讨论

3.1 地榆水提取物及各个萃取部位鞣质量的差异

由以上结果可知,所含可水解鞣质和缩合鞣质量高低顺序均为:乙酸乙酯萃取物 > 正丁醇萃取物 > 水提取物 > 水层留余物。可水解鞣质和缩合鞣质在乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物中量较高,这说明

表4

加样回收率试验 (n=9)

Tab. 4

Results of recovery test (n=9)

	取样量/mg	样品中原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	均值/%	RSD/%
高 (120%)	1.26	0.75	0.90	1.64	99.01	101.08	1.06
	1.36	0.81	0.97	1.79	101.63		
	1.37	0.81	0.98	1.82	102.55		
中 (100%)	1.16	0.69	0.69	1.38	100.94		
	1.16	0.69	0.69	1.39	101.59		
	1.19	0.71	0.71	1.42	100.90		
低 (80%)	1.21	0.72	0.57	1.31	102.29		
	1.20	0.71	0.57	1.29	101.07		
	1.13	0.67	0.54	1.21	99.78		

表5 地榆水提取物及各萃取部位的缩合鞣质测定

Tab. 5 Content of condensed tannins in the aqueous extract of *Sanguisorba officinalis* L and its different solvents partitioned extracts

样品	缩合鞣质/(mg/g)
水提取物	181.72 ± 1.41
乙酸乙酯萃取物	594.52 ± 16.76
正丁醇萃取物	476.27 ± 13.33
水层留余物	14.41 ± 0.29

乙酸乙酯和正丁醇萃取均可使两种类型鞣质类成分得到富集,尤其是没食子鞣质和缩合鞣质的富集效果显著,乙酸乙酯萃取物中没食子鞣质和缩合鞣质的量分别是水提取物中量的7.1倍和3.2倍,正丁醇萃取物中没食子鞣质和缩合鞣质的量分别是水提取物中量的4.9倍和2.6倍。

3.2 地榆不同鞣质测定方法的优缺点

可水解鞣质的测定,采用酸解后 HPLC 分析的方法,其原理是在酸热作用下,多酚分子内的酯键或苷键易水解,产生没食子酸和鞣花酸,用 HPLC 法可以准确测定多酚水解后生成的酚酸,其优点在于准确度高,灵敏度好,不受其他物质的干扰。

缩合鞣质的测定采用香草醛硫酸法,其原理在于酸性条件下黄烷醇类多酚组成单元儿茶素的 A 环上的羟基能与香草醛发生缩合反应,在一定浓度范围内,该显色物质在一定的吸收波长处的吸光度与缩合鞣质的浓度成正比,其优点在于其线性最好,而且测量值最接近于标准品的真实值^[14],经过显色反应条件优化试验,最终确定香草醛甲醇溶液浓度为3%,浓硫酸甲醇溶液浓度为30%,避光显色20 min 为反应条件。

2010 版中国药典中的鞣质的测定方法^[15],其原理是多酚结构中的酚羟基能够还原钨钼酸生成蓝色化学物质,根据此原理分别测定总酚与不被吸附的多酚量,鞣质量即为总酚与不被吸附多酚的量之

差,此法比较稳定,重现性好,因而成为测定与蛋白结合鞣质量的经典方法,但此方法并不能区分可水解鞣质和缩合鞣质。

本试验采用的酸解后 HPLC 分析和香草醛硫酸法分别测定两种不同类型鞣质的量,方法简便、快速、精密度、稳定性、重现性、专属性好,适合作为中药或天然药物中不同类型鞣质的测定方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:117.
- [2] 于蓓蓓,钟方晓,董学. 地榆化学成分研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(13):103-105.
- [3] Haslam E. Plant Polyphenols: vegetable tannins revisited [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- [4] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [5] Nanaka G, Tanaka T, Nishioka I. Tannins and related compounds. Part 3. A new phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone, and three new ellagitannin, sanguinins H-1, H-2 and H-3, from *Sanguisorba officinalis* [J]. *J Chem Soc Pekin Trans 1*, 1982, (4): 1067-1073.
- [6] Nonaka G, Tanaka T, Nita M, et al. A dimeric hydrolysable tannin, sanguinin H-6 from *Sanguisorba officinalis* L [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(6): 2255-2257.
- [7] Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds. X X VIII: Revision of the structures of sanguinins H-6, H-2 and H-3, and isolation and characterization of sanguinin H-11, a novel tetrameric hydrolysable tannin, and seven related tannins, from *Sanguisorba officinalis* [J]. *J Chem Res*, 1985, (S): 176-177.
- [8] Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. 7-O-galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(11): 2575.
- [9] Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds. X VI. Isolation and characterization of six methyl glucoside gallates and a gallic acid glucoside gallate from *Sanguisorba officinalis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(1): 117.
- [10] 夏红旻,孙立立,孙敬勇,等. 地榆炭化学成分的研究[J].

- 食品与药品, 2010, 12(1): 42-43.
- [11] 秦国伟, 陈梅玉, 徐任生. 等. 地榆化学成分的研究[J]. 中草药, 1991, 22(11): 483.
- [12] 刘海英. 地榆多酚的组分分析及功能研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009: 16.
- [13] 孙 芸, 谷文英. 硫酸-香草醛法测定葡萄籽原花青素含量[J]. 生产与科研经验, 2003, 29(9): 43-46.
- [14] Sun B S, Ricardo-da-Silva J M, Sprqnger I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(10): 4267-4274.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 62.

番石榴叶内生真菌 *Pestalotiopsis zonata* 次级代谢产物的研究

王艳颖, 罗都强*, 师宝忠, 杨小龙

(河北大学生命科学学院 药物化学与分子诊断教育部省部共建重点实验室, 河北 保定 071002)

摘要:目的 研究番石榴叶内生真菌 *Pestalotiopsis zonata* 的次级代谢产物。方法 应用正、反相硅胶柱色谱以及制备型薄层色谱(P TLC)和 Sephadex LH-20 等多种方法分离纯化, 运用 NMR 和 MS 等波谱解析化合物的结构。结果 共分离鉴定了 12 个已知化合物, 它们分别为乌苏酸 I、齐墩果酸 II、3-乙酰氧基齐墩果酸 III、7-甲氧基-6-甲基-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基氧代)异苯并呋喃-1(3H)-酮 IV、对羟基苯乙酸 V、酪醇 VI、2-羟基-3-苯基丙酸甲酯 VII、菜油甾醇 VIII、琥珀酸 IX、 β -谷甾醇 X、过氧麦角甾醇 XI、D-阿洛醇 XII。结论 所有化合物均尚未见从该内生真菌中分离得到的相关文献报道。

关键词: 番石榴; 环带拟盘多毛孢; 内生真菌; 次级代谢产物

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)05-0857-03

番石榴 *Psidium guajava* L 为桃金娘科 Myrtaceae 番石榴属 *Psidium* 植物, 为常绿灌木或小乔木, 又名番桔、鸡屎果和番桃等。番石榴原产于南美洲热带地区, 现广泛分布于热带及亚热带地区, 在我国广东、广西、福建、海南、台湾等省区均有野生及人工栽培^[1]。番石榴叶具有明显的降血糖、抗病毒及抗菌等活性, 其中含有多种化学成分, 迄今从中已分离并获得的有三萜类、黄酮类、鞣质类、倍半萜类等成分^[2]。近年来, 植物内生真菌的研究已成为一大热点, 很多研究者已从植物的内生真菌中分离得到与宿主相同或相似的生理活性成分。*Pestalotiopsis zonata* 为拟盘多毛属 *Pestalotiopsis* 真菌, 本实验首次对寄生在番石榴叶中的 *P. zonata* 的次级代谢产物进行了化学成分的研究, 以期对其药用活性成分开发提供基础资料, 从中分离鉴定了 12 个已知化合物, 所有化合物均尚未见从该内生真菌中分离得到的相关文献报道。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE III-600 核磁共振谱仪; EI, ESI 和 FAB-MS; APEIII FT-MS 质谱仪; Waters600-2489

高效液相色谱仪; 柱色谱硅胶和制备薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工产品; 反相硅胶(O DS-A); Sephadex LH-20。

该菌株由浙江大学农业与生物技术学院张敬泽教授提供(2004年5月采自海南兴隆 *P. zonata* 分离自番石榴叶部)。

2 发酵培养

培养基: 葡萄糖 20 g, 去皮土豆 200 g, MgSO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 3 g, VB₁ 10 mg, 加水搅拌混合至 1 000 mL。透明三角瓶(大小: 500 mL, 培养基体积: 300 mL)共接种 30 L。柠檬酸 0.1 g/mL, 调 pH 值 6.0 ~ 6.5 温度: 21 ~ 23 °C, 转速: 150 r/min, 于摇床上培养发酵 2 周。

3 提取分离

发酵液 30 L 浓缩至 4 L 左右, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液减压回收乙酸乙酯, 获得粗提物 17.48 g, 上硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱), 得到若干不同极性组分, 对其进一步分离纯化, 具体方法有正、反相硅胶柱色谱, Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 = 1 : 1 与纯甲醇两类), HPLC, 重结

收稿日期: 2010-10-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071701)

作者简介: 王艳颖(1987-), 女, 硕士生, 从事天然产物研究。Tel: 13630853699, E-mail: wangyanying2002727@126.com

* 通信作者: 罗都强, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物化学研究。Tel: (0312) 5079364, E-mail: duqiangluo@163.com