

金花茶中黄酮类活性成分的 GC-MS 分析

梁香¹, 程金生^{1,2}, 陈信炎¹, 吴凌凤^{1*}

(1. 嘉应学院医学院, 广东梅州 514031; 2. 韶关学院, 广东韶关 512000)

[摘要] **目的:**建立石墨烯-搅拌棒吸附萃取(SBSE)结合气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析金花茶中黄酮类活性成分并对总黄酮的相对含量进行测定。**方法:**自制稻草源活性炭制备石墨烯聚合物,实验中影响SBSE的因素(萃取涂层选择、萃取温度和时间等)进行了优化,用GC-MS鉴定金花茶中黄酮类活性成分,在所得优化条件下采用峰面积归一化法对金花茶中总黄酮相对含量进行测定。**结果:**样品中黄酮类活性成分经鉴定有儿茶素,表没食子儿茶素(EGC),儿茶酚(C),槲皮素-7-O-葡萄糖苷,芦丁,异槲皮苷,花青素,槲皮素,山柰酚,儿茶素没食子酸酯(CG),儿茶素没食子酸酯(CG)等,经检测金花茶中总黄酮相对含量(主要为槲皮素和山柰酚)达到3.0%。同一样品经6次测定,以金花茶总黄酮的总峰面积值为考察指标,其RSD 1.0%。**结论:**建立的SBSE-GC-MS方法分离鉴定出24个成分,测定金花茶总黄酮相对含量重复性较好,适于金花茶黄酮类成分的分析检测,为金花茶黄酮类活性成分的进一步研究提供了理论参考。

[关键词] 石墨烯-搅拌棒吸附萃取; 气相色谱质谱联用; 金花茶; 黄酮类

[中图分类号] R284.1;R282;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0084-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181309

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1057.017.html>

[网络出版时间] 2018-04-12 16:21

Application of GC-MS Technique to Analyze Active Ingredients of Flavonoids in *Camellia chrysantha* Flos

LIANG Xiang¹, CHENG Jin-sheng^{1,2}, CHEN Xin-yan¹, WU Ling-feng^{1*}

(1. Medical College of Jiaying University, Meizhou 514031, China;

2. Shaoguan University, Shaoguan 512000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a analytical method combining graphene-stir bar sorptive extraction (SBSE) and chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the active components of flavonoids in *Camellia chrysantha* flos and the relative content of total flavonoids. **Method:** Activated carbon from rice straw was made to prepare the graphene polymer, and the factors affecting SBSE (such as selection of extraction coatings, extraction temperature and time) were optimized. Then GC-MS was used to identify the active components of flavonoids in *C. chrysantha* flos and determine the relative content of total flavonoids by using peak area normalization method under the optimized conditions. **Result:** Flavonoids in *C. chrysantha* flos were identified as catechin, epigallocatechin (EGC), catechol (C), quercetin-7-O-glucoside, rutin, isoquercitrin, quercetin, kaempferol, anthocyanins, epigallocatechin gallate (CG), and epigallocatechin gallate (CG) etc. The relative content of total flavonoids (mainly including quercetin and kaempferol) reached 3.0%. After 6 tests of the same sample, the total peak area of the total flavonoids in *C. chrysantha* flos was used as the evaluation index, with a relative standard deviation (RSD) of 1.0%. **Conclusion:** The method separated and identified 24 components by SBSE-GC-MS,

[收稿日期] 20171105(007)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2013010012676);广东省医学科学基金项目(A2014825)

[第一作者] 梁香, 硕士, 讲师, 从事药物分析和分析化学研究, E-mail: 50929804@qq.com

[通信作者] * 吴凌凤, 硕士, 讲师, 从事药物分析和分析化学研究, E-mail: wwl0314@163.com

and the results indicated good reproducibility and appropriateness of the method to test the flavonoids in *C. chrysantha flos*, providing theoretical reference for further studies on flavonoids in *C. chrysantha flos*.

[Key words] graphene-SBSE; GC-MS; *Camellia chrysantha flos*; flavonoids

金花茶是山茶科山茶属的常绿灌木或小乔木,药理实验研究表明,金花茶植物具有抑制肿瘤细胞生长、降血压、降血脂、降低胆固醇和防止动脉粥样硬化等作用^[1-5]。金花茶含有多种化学成分,其中包括黄酮类(其苷元为槲皮素和山柰酚),茶多酚,茶多糖,皂苷类以及多种对人体有重要保健作用的微量元素和维生素等^[6-7]。

搅拌棒吸附萃取(Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE)是 1990 年代末发展起来的一种新型的样品前处理技术,具有灵敏度高、重复性好、不使用有机溶剂等优点。目前,国外已将 SBSE 与气相色谱、液相色谱和色谱-质谱等在线联用,并成功地应用于环境检测^[8]、食品分析以及生物样品等领域中的挥发性、半挥发性溶质的检测。石墨烯作为一种新型碳纳米材料,由于其具有大的比表面积、良好的热稳定性和化学稳定性、较强的疏水性、易于进行化学修饰等优点,在材料、催化、吸附分离等诸多领域得到了广泛的应用。石墨烯在搅拌棒吸附萃取等样品前处理领域有了新的应用。

目前对金花茶总黄酮成分测定主要是 TLC, HPLC, IR, NMR 和 UV 等分析手段^[9-11], 本实验旨在建立一种新型的检测技术,基于石墨烯的 SBSE, 结合 GC-MS 分析金花茶中黄酮类活性成分并对其相对含量进行测定的方法。

1 材料

试验样品由广东盛世通生物有限公司提供,经程金生副教授鉴定是山茶科金花茶 *Camellia chrysantha* 的干燥花。稻草,丙酮,氯化锌,盐酸,浓硫酸,高锰酸钾,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),聚乙二醇 6000,甲醇和丙酮等(分析纯,南京化学试剂股份有限公司)。

索氏提取器(上海洪纪仪器设备公司),旋转蒸发仪(上海锦屏仪器仪表有限公司),电热鼓风烘箱, KQ-500DB 超声仪(昆山市超声仪器公司),微波炉(格兰仕); Gerstel Twister 型吸附搅拌棒, Gerstel TDS-2 型热脱附装置(德国德祥科技有限公司); 2010plus 系列气相色谱法-质谱联用仪(日本岛津公司), CDS5200 型裂解器(美国 Agilent 公司)。

2 方法与结果

2.1 SBSE 萃取条件 萃取温度 75 °C, 萃取时间

20 min, 搅拌速度 1 200 r·min⁻¹。将萃取有黄酮成分的 SBSE 搅拌棒放入到样品套管中, 最后将样品套管放到 Agilent CDS5200 裂解器中进行热解吸。

2.2 气相色谱条件 载气为高纯氦气, 恒压模式, 进样口温度 290 °C, 进样模式为不分流进样, 进样量 1 μL, 柱温程序(初始温度 70 °C, 保持 2 min, 以 15 °C·min⁻¹ 升至 190 °C, 保持 1 min, 以 10 °C·min⁻¹ 升至 260 °C, 以 5 °C·min⁻¹ 升至 285 °C, 保持 10 min)。

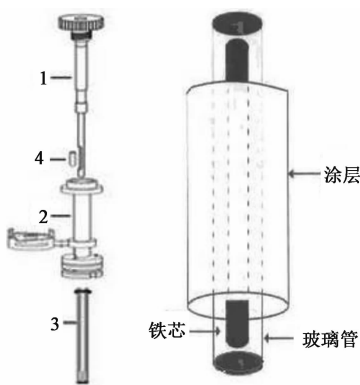
2.3 质谱条件 离子源温度 220 °C, 接口温度 280 °C, 检测电压 1.02 kV, 溶剂切除时间 4.5 min, 选择离子模式。

2.4 金花茶浓缩液的制备 采摘春季新鲜的金花原叶, 符合 2015 年版《中国药典》要求, 无霉变、无异味、无杂质。洗净, 烘干, 粉碎, 将粉碎后的金花原叶 15 kg; 加入丙酮 55 L, 利用索氏提取器提取 4 h, 得提取液 A; 提取后残渣加入丙酮 40 L, 在 50 °C 条件下超声 2 h, 得提取液 B, 合并提取液 A 和 B, 利用旋转蒸发仪旋转蒸发除去丙酮, 得到有机相的金花茶浓缩液。

2.5 用稻草等可再生资源碳化制备活性炭 称取优选洗净后干燥的稻草 10 g, 切段粉碎, 过 30 目筛, 放入瓷坩锅中, 加入 0.05 mol·L⁻¹ 氯化锌溶液 10 mL 作为活化剂, 搅拌混匀, 将混匀的料液在室温下浸渍 12 h。随后将其置于马弗炉中, 从室温升至 900 °C (升温速率为 10 °C·min⁻¹), 保温一定时间后将活化好的试样从马弗炉中取出, 立即将试样倒入到一定浓度的盐酸水溶液中, 再将试样用水洗涤至 pH 为 7。再将洗涤好的试样放入电热鼓风烘箱中, 110 °C 烘干 4 h, 在干燥器中静置冷却。最后将试样粉碎过 300 目筛, 即得到稻草源活性炭粗品。上述粗品采用 Cellu. sep 透析袋(规格 6 000 ~ 8 000 Da), 在 pH 为 7.38 的去离子水中透析约 1 周, 真空干燥后即得活性炭纯样。

2.6 石墨烯氧化物及石墨烯-聚合物的制备 稻草源活性炭(1.5 g, 300 目)加入 H₂SO₄ 12 mL, K₂S₂O₈ 2.5 g 及 K₂O₅ 2.5 g 的混合物中, 加热上述混合液至 80 °C 保持该温度, 磁力搅拌 5 h。冷却至室温, 将混合物倾入到 500 mL 去离子水中, 静置过夜。第 2 日将上述静置物经 0.2 μm 滤膜过滤, 洗涤晾干, 得预氧化石墨。将该预氧化的石墨加入至 0 °C 的

浓 H_2SO_4 (120 mL) 中, 随后, 缓慢加入 $KMnO_4$ 15 g, 并控制反应温度在 $20\text{ }^\circ\text{C}$, 搅拌均匀。控制反应体系在 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 继续搅拌 4 h 后, 加入去离子水 1 L, 搅拌 0.5 h 后, 逐滴滴入 30% H_2O_2 20 mL, 反应体系迅速由棕色转变为棕黄色。过滤该棕黄混合物, 用 1:10 HCl (1 L) 洗涤以除去金属离子, 随后再用去离子水 1 L 反复洗涤, 得棕色固体, 晾干后, 将上述棕色固体制成水分散液 (0.5%), 连续透析一周, 最后过滤, 洗涤, 重新分散超声 1 h, 过滤, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥 24 h, 即可制备得到二维石墨烯氧化物 (GO) 纳米片。将二维石墨烯氧化物纳米片 (1 g) 分散于 100 mL 水中, 超声 30 min 后加入水合肼 2 mL, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 回流 24 h, 过滤, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥 24 h, 得二维石墨烯纳米片。准确量取乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA) 85.0 mg, 聚乙二醇 6000 (PEG) 60.0 mg, 二甲基甲酰胺 (DMF) 270.0 μL , 偶氮二异丁腈 (AIBN) 1.0 mg, 超声涡旋至澄清的溶液。将石墨烯加入上述溶液, 使其质量浓度为 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后在循环水中超声 30 min 即得到分散均匀的溶液, 取上述预聚液 150.0 μL 灌入 0.6 mL 离心管中, 插入内插管, 排出溶液中的气泡。将其上端依次用封口胶与聚四氟乙烯生料带封口后, 置于微波炉中进行反应, 微波反应结束后用医用镊子小心将键合有涂层的搅拌棒取出, 依次用甲醇-水 (1:1) 和丙酮在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床上清洗涂层, 涂层清洗完毕后保存于三次水中备用^[12]。见图 1, 2。

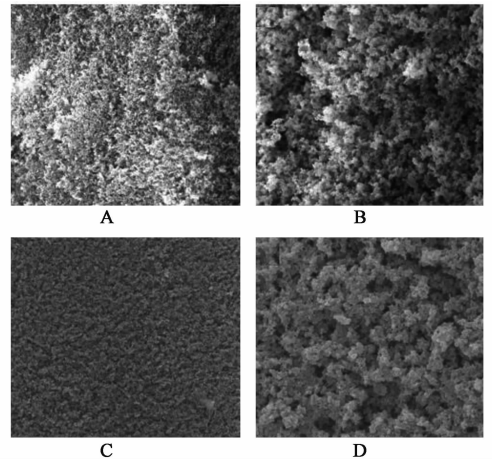


1. TSP (热分离进样杆); 2. 热分离适配器; 3. 进样口衬管; 4. 萃取搅拌棒

图 1 进样口剖面及搅拌棒示意

Fig. 1 Sketch of inlet section and stirring bar

2.7 分析检测 随后将上述搅拌棒浸入制备的金花茶叶浓缩液 1 mL 中, 磁力搅拌 10 min, GC-MS 分析不同组分保留时间和质谱碎片, 得到金花茶中总黄酮类物质含量信息。



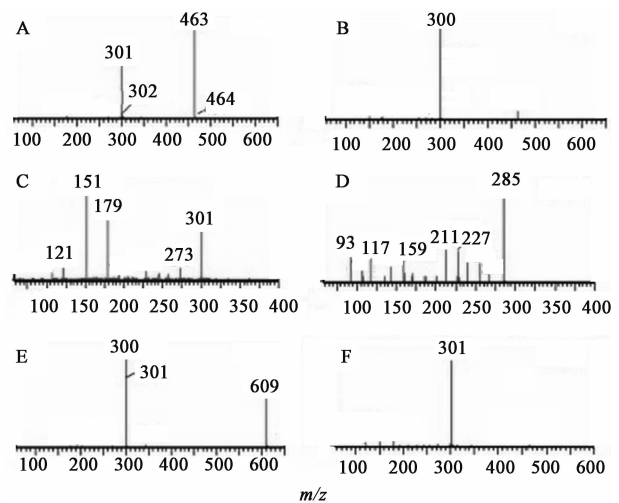
A, B. 形成涂层后; C, D. 涂层前; A, C. 放大 500 倍; B, D. 放大 2 500 倍

图 2 代表性石墨烯-聚合物 (石墨烯-聚乙二醇二甲基丙烯酸酯) 涂层示意

Fig. 2 Schematic diagram of representative graphene polymer (graphene glycol two methacrylate) coating

2.8 方法学考察 按 2.7 项下条件进行分析, 重复 6 次, 以金花茶黄酮成分的总峰面积为考察指标, 计算其 RSD 1.0%, 表明重复性较好。

2.9 样品分析 按照上述实验方法对金花茶黄酮类成分进行测定, 得到样品色谱图, 见图 3。表 1 中采用峰面积归一化法计算各组分百分比含量 (各组分峰面积/总峰面积)。从表中可以看出, 样品含有经检测金花茶中总黄酮含量 (主要为槲皮素和山柰酚) 达到 3.0%。



A. 槲皮素-7-O-葡萄糖苷; B. 异槲皮苷; C. 槲皮素; D. 山柰酚; E. 芦丁; F. 槲皮素-4'-O-葡萄糖苷

图 3 应用 SBSE-GC-MS 得到的部分金花茶中黄酮类活性成分质谱
Fig. 3 Flavonoids in *Camellia chrysantha flos* with application of SBSE-GC-MS

表 1 金花茶黄酮类成分 SBSE-GC-MS 分析检测

Table 1 Analysis of results in detection of *Camellia chrysantha* flavonoids SBSE-GC-MS

| No. | 保留时间 /min | 化合物名称 | 相对质量分数/% |
|-----|-----------|--------------------|----------|
| 1 | 3.59 | 2-甲氧基-5-氨基苯酚 | 0.33 |
| 2 | 5.03 | 儿茶素 | 1.68 |
| 3 | 6.59 | 邻苯二甲酸二甲酯 | 0.51 |
| 4 | 6.77 | 2,6-二叔丁基对甲苯酚 | 1.54 |
| 5 | 8.95 | 表没食子儿茶素(EGC) | 0.79 |
| 6 | 9.98 | 儿茶酚(C) | 1.52 |
| 7 | 10.18 | 6,10,14-三甲基-2-十五烷酮 | 2.37 |
| 8 | 10.55 | 槲皮素-7-O-葡萄糖苷 | 0.71 |
| 9 | 10.71 | 芦丁 | 0.12 |
| 10 | 11.60 | 异槲皮苷 | 0.28 |
| 11 | 13.55 | 花青素 | 0.82 |
| 12 | 14.16 | 绿原酸 | 0.45 |
| 13 | 14.20 | 槲皮素-4'-O-葡萄糖苷 | 0.09 |
| 14 | 14.55 | 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) | 0.42 |
| 15 | 15.12 | 表儿茶酸(EC) | 0.35 |
| 16 | 15.58 | 没食子儿茶素没食子酸酯(GCG) | 0.49 |
| 17 | 17.45 | 十一烯基丁二酸酐 | 1.23 |
| 18 | 18.27 | 山柰素 | 0.27 |
| 19 | 19.06 | 表儿茶素没食子酸酯(EGC) | 0.59 |
| 20 | 20.00 | 槲皮素 | 1.12 |
| 21 | 20.04 | 儿茶素没食子酸酯(CG) | 0.67 |
| 22 | 20.12 | 2-(氧代十八烷基)乙醇 | 4.52 |
| 23 | 23.20 | 山柰酚 | 0.80 |
| 24 | 29.48 | 棕榈酸乙酯 | 0.48 |

3 讨论

3.1 生物质源石墨烯-聚合物纳米材料合成与表征

通过石墨烯-聚合物复合材料和聚合物涂层材料表面结构的扫描电镜图可以看出,材料由双连续的结构组成,即彼此交联的聚合物骨架和相互连通的穿透孔,骨架和穿透孔之间相互渗透,交织成网络结构。萃取介质表面呈现多孔结构,它不但可以增加样品的萃取容量,而且因与样品之间的接触面积增加,还可以提高样品萃取的效率。通过电镜图的比较可以看到聚合物并且在加了石墨烯后在其骨架表面覆盖有一层石墨烯。涂层材料的比表面积采用 Brunauer-Emmett-Teller(BET)方法进行测定,孔径采用 Barrett-Joyner-Halenda(BJH)法依据圆筒孔等效模型计算。石墨烯-聚合物复合材料的比表面

积, BJH 平均孔径分别为 147, 4.8 nm。说明采用微波法合成石墨烯-聚合物复合材料涂层, 可以将石墨烯很均匀地分布在聚合物的骨架表面, 可以显著增大材料的比表面积, 从而保证了萃取效率的提高。

3.2 SBSE 萃取工艺考察

3.2.1 萃取温度

研究发现, 萃取温度对 SBSE 萃取棒对金花茶黄酮成分吸附量影响较大, 实验选定 6 个温度点(44, 55, 65, 75, 85, 95 °C)进行检测分析(吸附时间 20 min), 以色谱峰总面积作为考察指标。实验结果表明, 当吸附温度为 75 °C 时, 吸附量达到最大峰值, 85 °C 时挥发性成分吸附量已经开始下降。因此本文选择最终吸附温度为 75 °C。

3.2.2 萃取时间

萃取时间是影响样品中各组分从溶液转移至搅拌棒的主要因素之一, 为了衡量萃取吸附时间对金花茶中黄酮成分 SBSE 萃取吸附效果的影响, 保持磁力搅拌子转速 1 200 r·min⁻¹, 在 75 °C 下(采用底部电加热套加热), 以石墨烯-聚合物纳米材料 100 μm 为涂层, 考察萃取时间, 通过比较不同萃取吸附时间下各组分色谱峰峰面积大小来确定最优萃取时间。实验结果表明, 在 70 °C 温度下, 金花茶萃取吸附时间达到 20 min 后, 黄酮成分色谱峰总峰面积已到最大峰值。因此, 选择 20 min 作为金花茶黄酮类成分 SBSE 萃取吸附时间。

3.2.3 萃取涂层选择

分别考察涂有 100 μm 商用 PDMS 膜, 100 μm 石墨烯-聚合物膜萃取棒的萃取能力, 以检出峰个数和色谱峰总面积为衡量指标, 结果显示, 同等条件下, 100 μm 商用 PDMS 膜萃取棒共检出 18 个峰, 峰面积和为 473, 100 μm 石墨烯-聚合物膜 SBSE 萃取棒共检出 24 个峰, 峰面积和为 523。

综上所述, 本实验运用 SBSE 结合 GC-MS 对金花茶中黄酮类活性成分进行测定, 从样品中检测到金花茶中总黄酮含量达到 3.0%, 6 次测定样品的 RSD < 10%, 说明建立的实验方法重复性较好。因此, SBSE 结合 GC-MS 技术可以应用到金花茶的质量监控中, 为金花茶资源的开发利用以及进一步成分研究提供科学基础和参考数据。

[参考文献]

- [1] 韦锦斌, 农彩丽, 苏志恒, 等. 金花茶体外抗肿瘤活性及物质基础的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 169-174.
- [2] 马硕, 蒲志军, 张小玲, 等. 金花茶多酚对 2 型糖尿病

- 大鼠胰腺的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 89-93.
- [3] 段小娴, 唐小岚, 苏建家, 等. 金花茶对二乙基亚硝胺致大鼠肝癌抑制作用研究[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(6): 14-16.
- [4] 黄永林, 陈月圆, 文永新, 等. 不同溶剂提取及初步纯化的金花茶叶提取物降血脂功能实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 776.
- [5] 韦霄, 黄兴贤, 蒋运生, 等. 3种金花茶组植物提取物的抗氧化活性比较[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 639-641.
- [6] 王龙, 孙建设. 类黄酮的化学结构及其生物学功能[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(Z1): 144-147.
- [7] 张鞍灵, 刘国强, 高锦明, 等. 黄酮类化合物生物活性与结构的关系[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(2): 75-79.
- [8] Richardson S D, Ternes T A. Water analysis: emerging contaminants and current issues [J]. Anal Chem, 2005, 77(12): 3807-3838.
- [9] 陈全斌, 湛志华, 义祥辉, 等. 金花茶抗氧化活性成分提取及其含量测定[J]. 广西热带农业, 2005(3): 1-2.
- [10] 韦霄, 黄兴贤, 蒋运生, 等. 3种金花茶组植物提取物的抗氧化活性比较[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 639-641.
- [11] 黄永林, 文永新, 刘金磊, 等. 5种金花茶中总黄酮含量的测定[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(1): 38-39.
- [12] 程金生, 万维宏, 朱文娟, 等. 石墨烯-顶空搅拌棒联用技术检测金花茶中挥发油类成分[J]. 现代化工, 2015, 35(7): 173-177.

[责任编辑 顾雪竹]