

· 化学与分析 ·

流苏金石斛中牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷的 分离鉴定及含量测定

费娇冬^{1,2}, 陈林², 丁刚², 张宏武², 李榕涛³, 喻长远^{1*}, 邹忠梅^{2*}

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029;

2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

3. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南万宁 571533)

[摘要] 目的: 分离制备流苏金石斛药材指标性成分, 并建立测定流苏金石斛中该成分含量的高效液相色谱法。方法: 采用 Shiseido(Pak-C₁₈) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (20:80) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 340 nm, 柱温 25 °C。结果: 从流苏金石斛中分离制备其指标性成分牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷; 该成分在 0.016 ~ 1.6 μg 线性关系良好 ($r=0.9998$), 平均加样回收率为 99.66% (RSD 1.05%)。结论: 方法快速简便, 可靠, 重复性好, 为流苏金石斛药材的质量控制提供依据。

[关键词] 流苏金石斛; 兰科; 金石斛属; 牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0064-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121029.1643.007.html>

[网络出版时间] 2012-10-29 16:43

Isolation, Identification and Quantitative Analysis of Vitexin 2''-O-β-D-glucopyranoside in the Whole Herb of *Flickingeria fimbriata*

FEI Jiao-dong^{1,2}, CHEN Lin², DING Gang², ZHANG Hong-wu²,
LI Rong-tao³, YU Chang-yuan^{1*}, ZOU Zhong-mei^{2*}

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union

Medical College, Beijing 100193, China; 3. Hainan Branch Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy
of Medical Science & Peking Union Medical College, Wanning 571533, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare chemical marker and establish HPLC method for determining this marker in the whole herb of *Flickingeria fimbriata*. **Method:** A Pak-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted with a mobile phase of acetonitrile-water (20:80) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was set at 25 °C. The detection wavelength was 340 nm. **Result:** Vitexin 2''-O-β-D-glucopyranoside was firstly isolated as a chemical marker from *F. fimbriata*. This marker showed a good linear relationship in the range of 0.016-1.6 μg ($r=0.9998$) and the average recovery was 99.66% (RSD 1.05%). **Conclusion:** The

[收稿日期] 20120202(008)

[基金项目] 国家“重大新药创制”项目 (2011ZX09301002-001)

[第一作者] 费娇冬, 硕士, 从事天然产物化学及质量标准研究, Tel: 15210834579, E-mail: shuihan_1224@163.com

[通讯作者] * 喻长远, 教授, 从事中药及天然产物研究, Tel: 010-64448589, E-mail: yucy@mail.buct.edu.cn;

* 邹忠梅, 研究员, 从事天然药物化学研究, Tel: 010-57833290, E-mail: zmozou@implad.ac.cn

method is quick, simple, reliable, and reproducible, which can be used for quality control of *F. fimbriata*.

[Key words] *Flickingeria fimbriata*; *Orchidaceae*; *Flickingeria*; vitexin 2''-O-β-D-glucopyranoside; HPLC

流苏金石斛 *Flickingeria fimbriata* (Bl.) Hawkes 为兰科金石斛属植物,主要分布在我国海南、广西西南部、云南东南部等地,具有益胃生津、滋阴清热之功效,用于阴伤津亏、口干烦渴、食少干呕、病后虚热、目暗不明等^[1]。研究表明,流苏金石斛水和乙醇提取物能提高正常大鼠肝细胞中过氧化酶和应激状态下大鼠肝细胞中催化酶的含量^[2-3],改善应激状态下大鼠肝细胞的过氧化损伤^[4],其主要含有萜类、二萜、芳香族、甾族和脂肪族等成分^[5],但尚未见有关其质量评价的方法。本文对流苏金石斛中指标性成分牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷进行了分离鉴定,应用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法建立了流苏金石斛中该指标性成分含量的测定方法^[6-7],为科学评价流苏金石斛药材质量提供参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(996-PDA 二极管阵列检测器,600 泵,柱温箱,Empower 工作站,美国 Waters 公司),AT201 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。试验使用乙腈为色谱纯(Burdick & Jackson),水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。流苏金石斛样品 2008 年 6-10 月分别采自海南昌江霸王岭、黎母山(琼中县)、儋州市宝岛新村,由中国医学科学院药用植物研究所海南分所助理研究员李榕涛鉴定为兰科金石斛属植物 *Flickingeria fimbriata* (Bl.) Hawkes 的全草。标本存放于中国医学科学院药用植物研究所天然药物化学中心(FF2008-1,FF2008-2,FF2008-3)

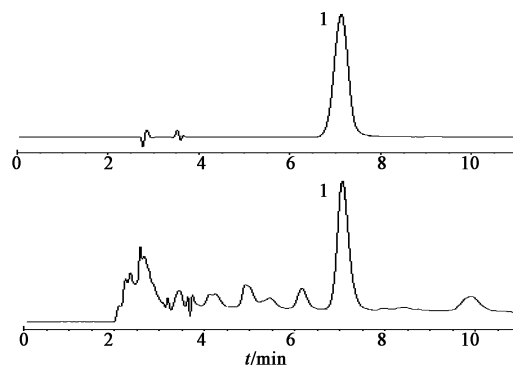
2 方法与结果

2.1 提取、分离和结构鉴定 干燥的流苏金石斛全草 3.68 kg,用 95% 和 70% 乙醇回流提取各 1 次,每次 1 h,过滤合并滤液,减压浓缩,浸膏加适量水混悬后,依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,正丁醇萃取液浓缩,得到正丁醇提取物 50 g。取正丁醇提取物 45 g,经硅胶(200~300 目)柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇系统梯度(50:1~4:1)洗脱,再经甲醇重结晶得到化合物 1(1.0 g)。

化合物 1 黄色粉末,mp 212~214 °C,溶于甲醇/水(1:1)。ESI-MS m/z 593 [M-H]⁻。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 13.14 (1H, s, 5-OH), 7.99 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, $J = 8.4$

Hz, H-3', 5'), 6.73 (1H, s, H-3), 6.22 (1H, s, H-6), 4.79 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, glc-1''-H), 3.91 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, glc-1'''-H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 181.96 (C-4), 163.72 (C-2), 162.59 (C-7), 161.03 (C-4'), 160.55 (C-5), 156.17 (C-9), 128.83 (C-2', C-6'), 121.69 (C-1'), 115.80 (C-3', 5'), 105.09 (C-1'''), 103.81 (C-8, 10), 102.61 (C-3), 98.13 (C-6), 81.73 (C-5''), 81.14 (C-2''), 78.39 (C-3''), 76.35 (C-3'''), 79.54 (C-5'''), 74.32 (C-2'''), 71.47 (C-1''), 70.17 (C-4''), 69.46 (C-4'''), 60.93 (C-6''), 60.38 (C-6''')。以上数据与文献报道的牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷(vitexin 2''-O-β-D-glucopyranoside)一致^[8],为首次从流苏金石斛中分离得到,经 HPLC 归一化法测定其纯度 >98%。

2.2 色谱条件 色谱柱 Shiseido (Pak-C₁₈) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(20:80),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 340 nm,柱温 25 °C,进样量对照品溶液 5 μL,供试品溶液 20 μL。在上述条件下,牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷达到基线分离,见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷

图 1 流苏金石斛 HPLC

2.3 对照品溶液及供试品溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷对照品约 1.0 mg,置于 2 mL 量瓶中,加甲醇-水(1:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液 取流苏金石斛粉末(过 40 目筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,用 50 mL 甲醇超声提取 2 次,每次 0.5 h,合并滤液,蒸干,残渣置于 5 mL 量瓶中,加甲醇-水(1:1)溶解并稀释至刻

度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取 2.3.1 项下配制的对照品溶液,依次稀释成 3.2,6.4,32,64,320 mg·L⁻¹,按 2.2 项色谱条件进样,记录峰面积。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得到回归方程 $Y = 33\ 102X - 307.9$ ($r = 0.999\ 8$),表明牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷在 0.016 ~ 1.6 μg 呈良好的线性。

2.4.2 精密密度试验 精密吸取同一对照品溶液,连续进样 6 次,牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷峰面积的 RSD 1.21%,表明仪器精密密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批流苏金石斛粉末(S3),按 2.3.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,进样测定,结果牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷的平均质量分数为 0.25 mg·g⁻¹,RSD 1.76%,表明此法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,在 0,4,8,12,16,20,24 h 分别进样测定,牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷峰面积的 RSD 1.48%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的流苏金石斛药材粉末(S3)6 份,每份约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入一定量的牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷对照品,按照 2.3.2 项下方法制备并分别进样测定,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷加样回收率(n=6)

称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.004 3	0.251	0.25	0.500	99.74		
1.001 7	0.250	0.25	0.496	98.24		
1.003 6	0.251	0.25	0.498	98.79	99.66	1.06
1.002 4	0.251	0.25	0.498	98.87		
1.005 9	0.251	0.25	0.505	101.60		
1.003 5	0.251	0.25	0.503	100.72		

2.4.6 样品含量测定 取 3 批海南产流苏金石斛药材,按照 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样测定,结果见表 2。

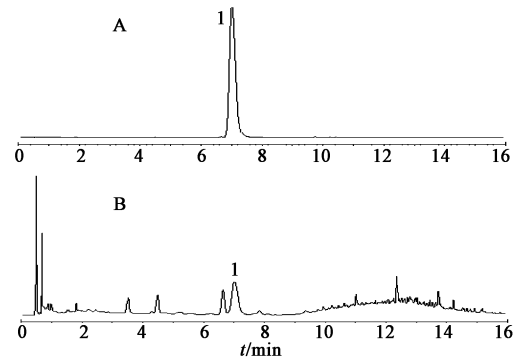
3 讨论

3.1 指标性成分选择 为了选择流苏金石斛中的主要成分作为指标性成分,建立其质量评价方法。本实验通过薄层层析及高效液相色谱对流苏金石斛甲醇提取物进行了分析,发现其主要成分位于正丁

表 2 3 批流苏金石斛中牡荆素
2''-O-β-D-葡萄糖苷含量测定(n=3)

编号	来源	批号	对照品 /mg·g ⁻¹
S1	海南昌江霸王岭	FF2008-1	0.34
S2	海南黎母山(琼中县)	FF2008-2	0.17
S3	海南儋州市宝岛新村	FF2008-3	0.25

醇萃取物中,经跟踪分离鉴定,确定为牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷。进一步应用超高效液相色谱检查(图 2),发现该成分确为流苏金石斛药材中的主要成分之一,可作为控制其质量的指标性成分。



A. 对照品; B. 样品; 1. 牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷

图 2 流苏金石斛 UPLC

3.2 检测波长的选择 取牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液 5 μL,在 200 ~ 400 nm 扫描其吸收光谱,结果表明在 340 nm 处有最大吸收,因此选择 340 nm 为测定波长。

3.3 供试品制备方法的建立 比较了 50% 乙醇、95% 乙醇、水、甲醇等溶剂的提取效率,同时对提取方式(超声和回流)进行了考察,结果表明,甲醇超声提取得到的牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷含量最高,故选择甲醇超声提取制备供试品溶液。

本实验采用高效液相色谱法,建立了流苏金石斛药材中指标性成分牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷含量测定方法,为科学评价其质量提供了依据。测定结果表明,海南产流苏金石斛药材中牡荆素 2''-O-β-D-葡萄糖苷含量在 0.17 ~ 0.34 mg·g⁻¹,质量比较一致。

[参考文献]

[1] 广东省中药材标准. 第 1 册[S]. 2004: 87.
[2] Chakrabarty M, Datta G K, Ghosh S. Induction of antioxidative enzyme by the ayurvedic herb *Desmotrichum fimbriatum* Bl. in mice[J]. Indian J Exp Biol, 2001, 39 (5): 485.

炮制对莱菔子中脂肪油的含量影响及 GC-MS 分析

孙忠迪, 王群, 李书云, 吕文海*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 探讨炮制对莱菔子及水煎液中脂肪油含量及组分的影响。方法: 用质量法测定供试品及水煎液中脂肪油含量, 脂肪油经甲酯化用气质联用技术对脂肪酸分析其组分。结果: 莱菔子生炒品脂肪油含量相近, 水煎液中炒品含量高于生品。生、炒品脂肪油中均检出了芥酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、11-二十碳烯酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山萘酸。结论: 炒制有利于莱菔子中脂肪油在水煎液中的溶出, 对其组分和含量没有影响。

[关键词] 莱菔子; 生炒品; 脂肪酸; 气相色谱质谱联用

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)01-0067-03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121029.1633.004.html>

[网络出版时间] 2012-10-29 16:33

The Effect and Analysis by GC-MS of Fatty Acid Content In Roasted Semen Raphani

SUN Zhong-di, WANG Qun, LI Shu-yun, LV Wen-hai*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of processing on the content and components on the fatty acid in Semen Raphani and decocting. **Method:** The content of the fatty acid in the product and decocting was determined by gravimetric method. The oil from Semen Raphani was esterified with carbinol and analyzed by GC-MS. **Result:** The major fatty acids in Semen Raphani were 13- (Z) -docosenoic acid, 9- (Z) -octadecenoic acid, 9, 12- (Z, Z) -octadecadienoic acid, 9, 12, 15- (Z, Z, Z) -octadecatrienoic acid, 11-eicosenoic acid, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, eicosanoic acid and behenic acid. **Conclusion:** The constituents and relative content on the fatty acid in crude Semen Raphani were very close to the fatty acid in roasted Semen Raphani. The processing of Semen Raphani facilitate the quantity of fatty acid, and had no effect on the constituents and relative content on the fatty acid.

[Key words] Semen Raphani; the crude and roasted products; fatty acids; GC-MS

[收稿日期] 20120407(008)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173554)

[第一作者] 孙忠迪, 硕士, E-mail: sunzhongdi8296@126.com

[通讯作者] * 吕文海, 教授, 从事饮片炮制理论与制备规范化研究, E-mail: luwenhaitcm@163.com

- [3] 王君明, 崔瑛, 王峥涛, 等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 265.
- [4] 王君明, 崔瑛, 申玲玲, 等. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 247.
- [5] 陈业高, 王红艳. 金石斛属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(8): 725.
- [6] 罗文汇, 谭志灿, 李养学, 等. HPLC 测定布渣叶中牡荆苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 110.
- [7] 张可峰, 陈旭. 金花茶叶中 3 种黄酮苷元的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 60.
- [8] 徐方方, 范春林, 王磊, et al. 枳椇子的化学成分[J]. 暨南大学学报, 自然科学版, 2011, 32(3): 304.

[责任编辑 顾雪竹]