

三叶虫茶中白杨素苷的鉴定及定量分析

许光明^{1*}, 彭新君¹, 肖美凤¹, 文礼章²

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的: 鉴定和测定三叶虫茶中的白杨素苷。方法: 经丙酮提取、聚酰胺柱色谱分离、重结晶纯化, 利用化学鉴别、UV-IR、LC-ESI/MS/MS 对白杨素苷进行鉴定; HPLC 定量测定, Gemini C₁₈ 柱, 流动相: 乙腈-水 (30: 70), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C, 检测波长: 270 nm。结果: 从三叶虫茶中提取分离得白杨素-7- σ -葡萄糖苷晶体, HPLC 归一化法测得其纯度达 99.2%; 在 (2~ 20) $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 范围内, 线性回归方程为: $Y = 7.739 \times 10^4 X - 6.0 \times 10^3$ ($r = 0.9993$), 三批三叶虫茶中白杨素苷的平均含量为 2.77%, 平均回收率为 97.3%, RSD 为 1.3% ($n = 5$)。结论: 首次从三叶虫茶中分离纯化得到白杨素-7-葡萄糖苷, 且用 HPLC 法测定了其含量, 测定结果准确、重现性好。

[关键词] 三叶虫茶; 白杨素-7- σ -葡萄糖苷; 紫外分光光度法; 红外吸收光谱法; 液-质联用法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)07-0012-03

Identifier and Determination of Chrysin in *San-Ye -Chongcha*

XU Guang-ming^{1*}, PENG Xin-jun¹, XIAO Meifeng¹, WEN Li-zhang²

(1. Faculty of Pharmaceutics, Hunan Univ. of TCM, Changsha Hunnan 410208, China;

2. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128, China)

[Abstract] **Objective:** To identify and quantitatively determine chrysin-7- σ -glucoside in Sanyechongcha. **Method:** The compounds were extracted with acetone and purified with polyamide column and recrystallization. The chemical structure was identified by chemical method, UV, IR and ESI/LC-MS/MS. The quantitative analysis was performed on a Gemini C₁₈ column with acetonitrile-water (30: 70) as the mobile phase at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 270 nm. **Result:** The main ingredient with a purity of 99.2% was identified as chrysin-7- σ -glucoside. The linear equation was $Y = 7.739 \times 10^4 X - 6.0 \times 10^3$ in the range of 2~ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9993$). The content of chrysin-7- σ -glucoside in *San-ye-Chong-cha* was 2.77% and average recovery was 97.3%. **Conclusion:** Chrysin-7- σ -glucoside in *Sanyechongcha* was first isolated and quantitatively determined by HPLC, which was a simple, reliable and accurate method.

[Key words] *Sanyechongcha*; chrysin-7- σ -glucoside; UV; IR; LC-ESI/MS/MS; HPLC

用三叶海棠叶饲喂米缢螟幼虫, 取其排泄物作药用或茶用, 称为三叶海棠虫酿茶(简称三叶虫茶)。近年来的研究表明三叶虫茶具治疗溃疡性结肠炎^[1]、降血压^[2]、促进保加利亚乳杆菌抑制肠道金黄

色葡萄球菌等作用^[3]。本文报道其主要成分白杨素苷的鉴定及含量测定。

1 仪器样品与试剂

1.1 仪器 LCQ advantage MAX 质谱仪(Finnigan 公司, 美国), 岛津 10AT 高效液相色谱仪、N3000 色谱工作站(岛津公司, 日本), UV-2450 紫外可见分光光度仪(岛津公司, 日本), WQF-200 傅利叶红外分光仪(北京瑞利分析仪器公司), HH 数显恒温水浴锅(金

[收稿日期] 2008-04-10

[通讯作者] 许光明, Tel: 07318458232; Fax: (0731) 8458227; E-mail: xugm100@ yahoo. com. cn

坛市金城国胜实验仪器厂), RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), AB265-S 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司), SK3300H 超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 样品与试剂 三叶虫茶(由湖南农业大学文礼章博士提供并鉴定,批号:200709,200801,200803),聚酰胺(60-100 目,浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),硅胶 G(青岛海洋化工厂),白杨素标准品(购于湖南省药检所),乙腈为色谱纯;水为重蒸水(自制);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白杨素苷及苷元(白杨素)的提取、分离与纯化

取三叶虫茶 1 kg,加 12 倍量的丙酮超声提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,回收丙酮,其提取物混合聚酰胺后,干法上聚酰胺柱(50 × 3 cm),依次用水 10%、20%、30%、40%、50%、70%、95% 的乙醇洗脱,以 TLC 跟踪检测,合并相同的馏分,浓缩部分溶剂,析出结晶,结晶进一步以丙酮进行重结晶,得针状浅黄色结晶,即为白杨素苷。取该结晶适量用 6% H₂SO₄加热水解,析晶,丙酮重结晶即得白杨素。

2.2 白杨素苷的鉴定 白杨素苷样品的醇溶液加三氯化铁试剂,反应呈蓝紫色;Molish 反应呈阳性。

在硅胶 G 薄层色谱上,以氯仿-甲醇(5:1)为展开剂,用 10% 硫酸乙醇液显色,白杨素苷及白杨素的 R_f 值分别为 0.30 和 0.71。同时白杨素苷甲醇溶液的紫外光谱与加乙酸钠饱和后的甲醇液的紫外光谱相近,无明显的红移,白杨素在 267 nm 和 313 nm 处分别红移 8 nm 和 43 nm,说明白杨素 A 环的 7-OH 成葡萄糖苷。

UV: 白杨素苷 $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 267 和 313 nm,白杨素 $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 267 和 316 nm。

IR: ν_{\max}^{KBr} 3 348, 1 655, 1 617, 1 510, 1 068, 854, 768, 686 cm⁻¹。

LC-ESI/MS/MS: 供试品和对照品溶液:三叶虫茶的丙酮提取液(相当于含生药 15 mg·mL⁻¹);白杨素苷供试品及白杨素对照品的丙酮液(10 μg·mL⁻¹白杨素苷,8 μg·mL⁻¹白杨素)。色谱条件:色谱柱: SinoChrom ODS-BT 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相: A: 1% 的冰乙酸水溶液, B: 乙腈,线性梯度洗脱程序: 0 min, 20% B; 16 min, 23% B; 35 min, 27% B; 45 min, 40% B; 60 min, 85% B; 65 min, 100% B; 流速: 1.0 mL·min⁻¹;柱温: 40 °C;进样体积: 20 μL(进

样环)。质谱条件:电喷雾离子化离子源(ESI);一级质谱用负离子采集模式[ESI(-)MS],二级质谱为正离子采集模式[ESI(+)MS²];m/z 范围:180~600 amu,喷雾毛细管电压:3.5 kV,毛细管电压:30 V,萃取电压 5.0 V,加热毛细管温度:300 °C,脱溶剂气:300 L·h⁻¹,锥孔反吹气:50 L·h⁻¹,鞘气:20 arb,辅助气:40 arb。测定结果:丙酮提取液的总离子色谱图(TIC)(图 1)和白杨素苷供试品一级和二级质谱图及白杨素对照品的二级质谱图(图 2)。结果分析:①三叶虫茶的丙酮提取液中白杨素苷的保留时间 t_R 为 34.36 min。②白杨素(M⁺) 分子量为 254,白杨素苷(M⁺) 分子量为 416。m/z 153.1 为白杨素分子经过 RDA 重排产生碎片离子。

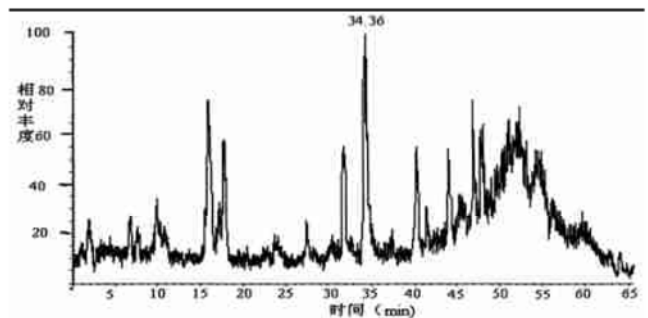


图 1 丙酮提取液的总离子色谱图(TIC)

2.3 三叶虫茶中白杨素苷的含量测定

2.3.1 供试品溶液和对照品溶液的制备 供试品溶液的制备:取过 40 目筛的三叶虫茶粉末约 0.1 g,精密称定,置 100 mL 的具塞锥形瓶中,加 80% 丙酮 20 mL,称定重量,置于 65 °C 的恒温水浴锅中加热回流 1 h,冷却,再称定重量,用 80% 丙酮补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取 1 mL,用流动相(30% 乙腈)定容于 10 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

对照品溶液的制备:精密称取白杨素苷 10 mg,加甲醇制成每 1 mL 含 20.0 μg 的溶液,即得。

2.3.2 色谱条件及系统适用性试验 Gemini C₁₈ 110A 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(30:70);检测波长:270 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹,柱温:40 °C,进样量:20 μL(进样环)。在选定的色谱条件下,白杨素苷和样品中的其它组分可基本分离,与其相邻色谱峰的分度大于 1.5,按白杨素苷峰计算,理论塔板数不低于 3 700,拖尾因子为 1.07。供试品和对照品的 HPLC 谱图见图 3。

用以上条件按峰面积归一化法测得自制的白杨素苷对照品的纯度为 99.4%。

2.3.3 标准曲线的测定 分别精密量取 20.0 μg·

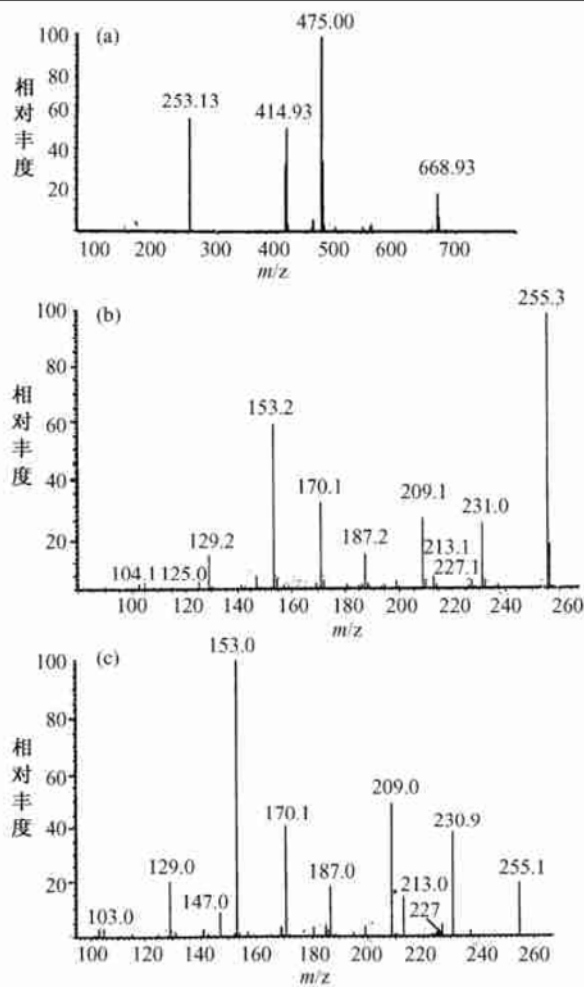


图 2 供试品白杨素苷的 ESI(-)MS(a), ESI(+)MS²(b); 对照品白杨素 ESI(+)MS²(c)(母离子均为 m/z: 255)

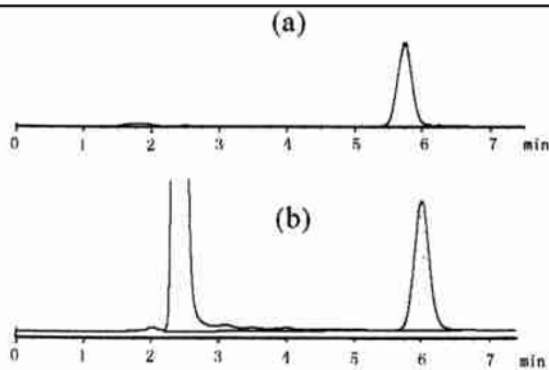


图 3 白杨素苷对照品(a)与供试品(b)HPLC 图

mL^{-1} 的白杨素苷对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 进样 20 μL , 按上述色谱条件测定。以峰面积的积分值(Y)为纵坐标, 白杨素苷的浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 回归直线方程为: $Y = 7.739 \times 10^4 X - 6.0 \times 10^3$ ($r = 0.9993$), 结果表明白杨素苷浓度在(2~ 20) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 精密移取 16.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 20 μL , 重复进样 6 次, 测得白杨素苷的平均峰面积积分值为 1.25×10^6 , RSD 为 0.68%。

2.2.5 稳定性试验 取供试品溶液 20 μL , 每 2 h 进样 1 次, 重复进样 6 次。测得白杨素苷峰面积积分值的 RSD 为 1.8%, 表明样品在 12 h 内测定基本稳定。

2.3.6 重复性试验 精密称取过 40 目筛的三叶虫茶粉末 0.1 g 共 5 份, 制备供试品溶液并测定, 三叶虫茶中白杨素苷含量为 2.40%、2.39%、2.50%、2.45%、2.44%, 计算 RSD 为 1.8%, 结果表明方法的重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取过 40 目筛含量已知的三叶虫茶粉末约 0.1 g 共 5 份, 分别精密加入 0.125 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白杨素苷对照品 80% 丙酮溶液 20 mL, 制备供试品溶液并测定, 计算回收率, 见表 1。

表 1 白杨素苷加样回收试验结果

样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2.50	2.50	4.94	97.6		
2.45	2.50	4.90	98.0		
2.46	2.50	4.85	95.6	97.3	1.3
2.38	2.50	4.85	98.8		
2.40	2.50	4.81	96.4		

2.2.8 样品含量测定 取 3 批三叶虫茶粉, 过 40 目筛后, 精密称取 0.1 g 3 份, 按上述方法测得含量分别为 2.45%、2.81%、3.06%, 平均 2.77%。

3 讨论

本文首次开展了传统“虫茶”——三叶虫茶的有效成分研究, 分离制备了其中的白杨素苷。用理化、波谱手段对其进行了鉴定, 并用 HPLC 测定了其含量, 为三叶虫茶的药效成分研究, 进一步开发利用奠定了基础。

对三叶虫茶制备白杨素苷进行了提取溶剂优化, 表明以 80% 丙酮提取较好, 得到的白杨素苷含量高, 杂质较小。在含量测定中, 对 HPLC 的流动相进行了考察, 结果表明以乙腈-水(30: 70) 流动相, 测量结果准确、重复性好。

[参考文献]

- 伍菊英. 三叶虫茶治疗溃疡性结肠炎 31 例疗效观察[J]. 湖南中医学院学报, 1997, 17(3): 27-28.
- 陈晓阳, 文礼章, 李 晟, 等. 三叶虫茶对肾性高血压大鼠神经免疫调节作用的实验研究[J]. 湖南中医学院学报, 2006, 26(2): 4-6.
- 文礼章, 谭周进, 沈佐锐. 几种民间药用虫茶浸提液对微生物的影响研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 38-42.