

## 木蝴蝶中黄酮类化合物的 HPLC-ESI-MS 分析

缪建荣<sup>1,2</sup>, 杨红美<sup>2,3</sup>, 曾建国<sup>2</sup>, 陈波<sup>3</sup>, 严付华<sup>2,3</sup>

(1. 湖南省药品检验所, 湖南长沙 410001; 2. 湖南九汇现代中药有限公司, 湖南长沙 410331;  
3. 湖南师范大学化学研究所, 湖南长沙 410081)

**摘要:**目的 建立木蝴蝶中黄酮类化合物的 HPLC-ESI-MS 分析方法, 鉴定木蝴蝶中的黄酮类化合物。方法 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.5% 甲酸水溶液(A)、乙腈(B), 梯度洗脱; 紫外检测波长范围: 195~400 nm; 采用正离子检测模式。结果 木蝴蝶中的 6 个黄酮类化合物获得了良好的分离与检测。通过与对照品的保留时间、正离子质谱比较鉴定和测定黄芩苷和白杨素的量, 同时根据正离子质谱数据和文献数据分析推断了 4 个黄酮化合物。结论 本方法准确快速, 适合木蝴蝶中黄酮类化合物的鉴定, 可用于木蝴蝶原药材的质量控制。

**关键词:** 木蝴蝶; HPLC-ESI-MS; 黄酮

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0505-04

Analysis of flavonoids in seeds of *Oroxylum indicum* by HPLC-ESI-MSMIAO Jian-rong<sup>1,2</sup>, YANG Hong-mei<sup>2,3</sup>, ZENG Jian-guo<sup>2</sup>, CHEN Bo<sup>3</sup>, YAN Fu-hua<sup>2,3</sup>

(1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 2. Hunan Jiuhui Modern Chinese Materia Medica Co., Ltd., Changsha 410331, China; 3. Institute of Chemistry, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract: Objective** To establish an HPLC-ESI-MS method for simultaneous analysis and determination of flavone in the seeds of *Oroxylum indicum*. **Methods** The separation was performed by Hypersil C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile (B) 0.5%. The flow rate was 1.0 mL/min and detection wavelength was at 195–400 nm. The samples were analyzed in positive mode. **Results** Six flavones in the seeds of *O. indicum* could be separated in one run. Baicalin, chrysin-7-glucuronide, oxoxylin A, and baicalin-7-O-glucoside had been tentatively identified by ESI-MS and reference data. **Conclusion** Besides quantification of the components, this new method surpasses previously published ones in product quality control with accurate and rapid advantage, and provides the HPLC chromatographic fingerprints of biological active components in the seeds of *O. indicum*.

**Key words:** *Oroxylum indicum* (L.) Vent.; HPLC-ESI-MS; flavone

木蝴蝶为紫葳科植物木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent. 的干燥成熟种子。秋、冬二季采收成熟果实, 曝晒至果实开裂, 取出种子, 晒干。具有清肺利咽、疏肝和胃的功效用于肺热咳嗽、鼻塞、暗哑、肝胃气痛<sup>[1]</sup>。具有药理活性化学成分脂肪油、黄芩苷元-7-葡萄糖苷、黄芩苷、黄芩苷元、千层纸素 A、木蝴蝶苷 B、白杨素、白杨素-7-葡萄糖醛酸苷等黄酮类化合物<sup>[2]</sup>。目前关于木蝴蝶中黄酮类化合物的分析报道很少, 主要以紫外分光光度法检测和 HPLC-UV 检测为主, HPLC-UV 基本上是单个成分的量的测定<sup>[3]</sup>。

液质联用技术(HPLC-MS)是目前广泛应用的

分析方法之一。它利用液相色谱的高效分离能力对分析物进行分离, 再以质谱为检测器在线提供化合物的相对分子质量信息。HPLC-UV-MS 能充分发挥色谱的分离能力, 并具有质谱的高分辨特性, 可得到保留时间、紫外响应、荷质比响应这样的三维信息, 很适合于分析检测中草药这样的多组分复杂体系。本实验首次采用 HPLC-ESI-MS 测定木蝴蝶中的黄芩苷和白杨素的量, 同时根据 MS 数据、保留时间、紫外响应和文献资料的比较, 鉴定了 4 个黄酮化合物: 黄芩素、白杨素-7-O-葡萄糖苷酸、黄芩苷元-7-葡萄糖苷、千层纸素 A。此方法可应用于木蝴蝶原药材和提取物的质量控制以及复方中的黄酮类化合

收稿日期: 2005-11-04

作者简介: 缪建荣(1964-), 男, 江苏张家港人, 副主任药师, 研究方向为植物提取物及质量控制。

Tel: (0731) 3280779 E-mail: jr\_miao@yahoo.com.cn

物的研究。

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂: Waters 2695 分离单元, Waters 996 PDA 检测器, Waters ZQ 2000 质谱检测器 (Waters, 美国), 色谱纯乙腈 (湖南化工研究院精细化工研究所), 甲酸 (上海三浦化工有限公司), 重蒸馏水 (自制), 木蝴蝶药材 (云南, 由湖南师范大学张建中教授鉴定), 质量分数大于 99% 的黄芩苷和白杨素对照品购自 Sigma 公司。

1.2 液相色谱-质谱条件: 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: A: 0.5% 甲酸水溶液, B: 乙腈, 进行梯度洗脱, 梯度条件为前 3 min 内 A 为 80% 呈线性变到 20%, 后 19 min 内 A 由 80% 呈线性变到 20% 进样前, 柱子用初始流动相平衡 10 min, 分析完一个样以后, 用 100% 乙腈冲洗色谱柱; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 195~400 nm; 柱温: 30 °C; 进样体积为 10 μL。

质谱条件: 用电喷雾离子化正离子采集模式 (ESI+),  $m/z$  范围: 150~550 amu, 毛细管电压: 3.5 kV, 锥孔电压: 20 V, 萃取电压: 5.0 V, 源温度: 120 °C, 脱溶剂温度: 250 °C, 脱溶剂气: 300 L/h, 锥孔反吹气: 50 L/h。

1.3 校正曲线的绘制: 取白杨素与黄芩苷对照品各 10 mg 于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 得 0.200 mg/mL 标准储备液, 取该混合溶液逐渐稀释得到最终质量浓度分别为 0.2、0.4、2.5、5、10、20 μg/mL 标准系列溶液。每个浓度的样品分析 3 次, 所得峰面积的平均值对浓度做曲线, 得到黄芩苷和白杨素的校正曲线。

1.4 样品处理: 将木蝴蝶药材粉碎, 称取 1 g, 用 20 mL 甲醇超声提取 5 min, 离心后取出上清液, 残渣再用 20 mL 甲醇提取一次, 合并提取液, 再用甲醇将提取液定容于 50 mL 量瓶, 过 0.45 μm 膜, 滤液直接进色谱系统分析, 进样量为 10 μL。

## 2 结果与讨论

2.1 流动相的选择: 在建立分析方法的过程中以乙腈、水为流动相, 用等度淋洗无法同时分离上述 6 种物质, 而按梯度淋洗方法可以达到基线分离但峰形较差。因此往流动相中加 1%、0.5%、0.1% 的甲酸改善峰形, 结果发现 0.5% 甲酸的效果最佳。流动相中加入 0.1% 磷酸也可以达到相同的效果, 但是磷酸为非挥发性酸, 污染质谱检测器的离子源, 因此流动相中的添加剂为甲酸。

2.2 质谱条件的优化: 为了使各个物质都能够达到

最佳的质谱响应, 优化的质谱条件包括脱溶剂气温度、源温度、毛细管电压、锥孔电压、脱溶剂气流速。实验证明: 脱溶剂气温度、源温度、脱溶剂气流速对化合物的响应的影响比较小。锥孔电压是主要的影响因素。随着锥孔电压升高, 总离子流响应增强, 分子离子峰的强度降低, 当电压达到 20 V 时, 准分子离子峰强度最强。所以在选择离子模式中, 锥孔电压设为 20 V。

2.3 HPLC-UV-MS 分析木蝴蝶原药材: 在本实验的色谱条件下, 木蝴蝶中的 6 个成分获得了基线分离。在总离子流色谱图中可以观察到 6 个标记峰如图 1, 峰 1 的特征离子为 433、271; 峰 2 的特征离子为 447、271; 峰 3 的特征离子为 431、255; 峰 4 的特征离子 271; 峰 5 的特征离子 255; 峰 6 特征离子 285。图 2 是 6 个标记峰的质谱图。通过比较对照品和样品的保留时间和质谱数据, 峰 2、5 分别鉴定为黄芩苷、白杨素。其中峰 2 的特征离子 447 为分子离子峰  $[M+H]^+$ , 特征离子 271 为  $[M-Glucoside+H]$ 。根据质谱数据、高效液相色谱中各个物质的出峰顺序和文献数据一致<sup>[4-8]</sup>, 峰 1、3、4、6 分别尝试性的鉴定为黄芩素-7-O-葡萄糖苷、白杨素-7-O-葡萄糖苷、黄芩素、千层纸素 A。其中峰 1 的特征离子 433 为分子离子峰  $[M+H]^+$ , 特征离子 271 为  $[M-Glucoside+H]$ ; 峰 3 的特征离子 431 为分子

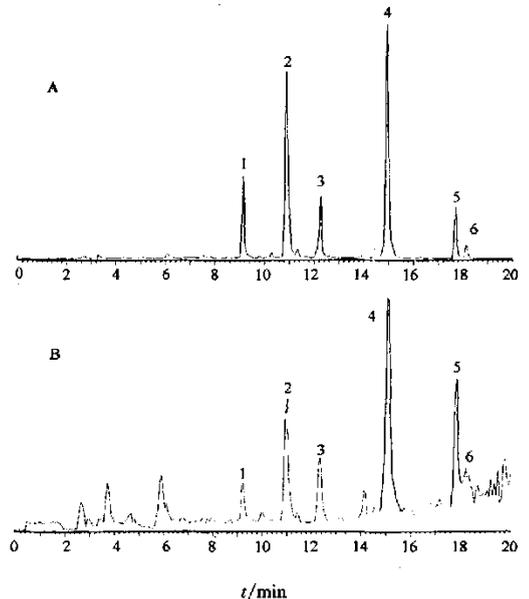


图 1 木蝴蝶原药材的 HPLC-UV 色谱图 (A) 和 HPLC-ESI-MS 色谱图 (B)

Fig. 1 HPLC-UV (A) and HPLC-ESI-MS (B) Chromatogram of Semen Oroxyli

离子峰  $[M+H]^+$ , 特征离子 271 为  $[M-Glucuroside+H]$ 。这些化合物的鉴定见表 1。

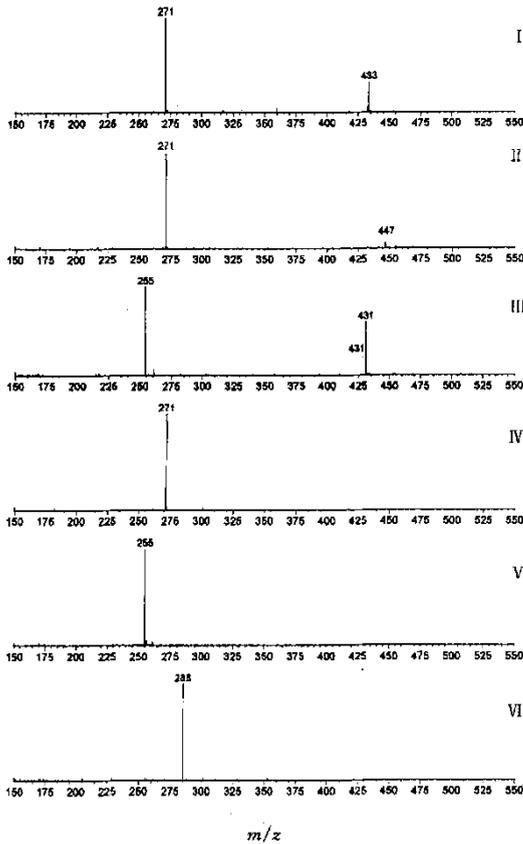


图 2 化合物 I ~ VI 的质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of compounds 1 - VI

表 1 各个活性成分保留时间、分子离子峰和  $\lambda_{max}$   
Table 1 Retention time, molion peak, and  $\lambda_{max}$   
of every active constituents

峰名	$t_R$ / min	特征离子		$\lambda_{max}/nm$	化合物名称
		$[M+H]^+$	$[M-Glu+H]^+$		
I	8.14	433	271	277, 316	黄芩素-7-葡萄糖苷
I	11.13	447	271	277, 316	黄芩苷
II	11.99	431	255	268	白杨素-7-葡萄糖苷
IV	12.35	271	-	276, 323	黄芩素
V	12.50	255	-	268, 313	白杨素
VI	12.93	285	-	272, 321	千层纸素 A

图 3 是选择离子分别为  $m/z$  433、447、431、271、255 和 285 的提取色谱图与全扫描离子色谱图的比较图。从信噪比值很明显可以看出, 采用选择离子模式比采用全扫描离子模式具有更高的灵敏度。

#### 2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系: 按照 1.3 项黄芩苷和白杨素校正曲线, 得到黄芩苷和白杨素的线性方程分别为:  $Y = 42\ 588\ 180.35 X - 26\ 920.21, r = 0.999\ 9$ ;  $Y = 26\ 369\ 708 X - 46\ 971.25, r = 0.999\ 5$ 。将标准溶液

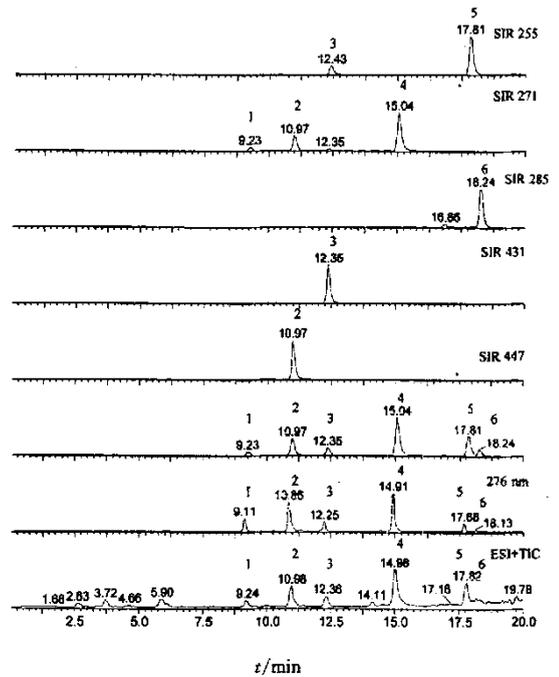


图 3 木蝴蝶原药材的 HPLC-ESI-MS-TIC 和 HPLC-MS-SIR 色谱图

Fig. 3 HPLC-ESI-MS-TIC and HPLC-MS-SIR Chromatogram of Semen Oroxyli

逐渐稀释, 以信噪比(S/N)为 3 时进样量作为检出限, 得紫外检测限 0.80 ng 和 0.6 ng。

2.4.2 回收率的考察: 取已知量的木蝴蝶原药材, 1 mg/g 的量作标准加入回收实验。每个样品平行处理 5 份, 按照样品测定的方法进行分析测定, 求算平均回收率, 求得黄芩苷和白杨素的平均回收率分别为 97.5%、96.5%, RSD 分别为 1.3%、1.3% ( $n=5$ )。

2.5 样品的测定: 按照 1.2 项条件, 测定木蝴蝶中黄芩苷和白杨素, 结果分别为 15.836 和 0.46 mg/g (RSD=1.5%,  $n=5$ ), 所得的样品谱图见图 1。

#### References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Jiangsu New Medical Collee. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Vol 2. Shanghai: People's Publishing House, 1977.
- [3] Shi J L, Zhang C Y, Li Qi. Determination of Baicalin in Semen Oroxyli by HPLC [J]. Chin Pharm Aff (中国药事), 2005, 19(5): 292-293.
- [4] Chen L J, David E G, Jonathan J. Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of Oroxyllum indicum by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2003, 988: 95-105.
- [5] Chen L J, Song H, Lan X Q, et al. Comparison of high-speed counter-current chromatography instruments for the separation of the extracts of the seeds of Oroxyllum indicum [J]. J Chromatogr A, 2005(1063): 241-245.
- [6] Zhang L, Lin G, Zuo Z. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of

baicalein and baicalein 7-glucuronide in rat plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004(36): 637-641.

- [7] Horvath C R, Martos P A, Saxena P K. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with

diode array and mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005(1062): 199-207.

- [8] Li H B, Chen F. Isolation and purification of baicalein, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005(1074): 107-110.

## 许树中的萜类化合物

南海函, 吴 军, 尹 浩, 张 德\*

(中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301)

许树 *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn., 为马鞭草科大青属植物, 生于滨海滩头、路边, 分布于热带亚洲、澳洲及太平洋群岛。在我国台湾、海南、广东和广西等地的红树林中以伴生植物的形式生长<sup>[1,2]</sup>。许树叶子的成分可以作为抗菌剂和退热药, 具有抗微生物活性和兴奋心血管的作用<sup>[3]</sup>, 促进大鼠子宫收缩并有抑制肠胃运动的功能<sup>[4]</sup>。外用治皮肤湿疹、跌打肿痛、外伤出血等。为进一步研究其成分, 对许树进行了提取分离。在以前工作的基础上<sup>[5]</sup>, 又从中分离到 5 个三萜和 1 个二萜化合物。经过理化性质分析和波谱数据解析分别鉴定为羽扇豆醇 (lupeol, I)、magnificol (II)、粘霉烯酮 (III)、粘霉烯醇 (glutinol, IV)、3-乙酰齐墩果醛 (3-O-acetyloleanolic aldehyde, V) 和钩大青酮 (uncinatone, VI)。I ~ V 为三萜类化合物, VI 为二萜化合物, 这 6 个化合物都是首次从许树中分离得到。

### 1 仪器和材料

<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 谱用 Burker AVANCE 500 MHz 型核磁共振谱仪测定, EI-MS 用岛津 QP-5050A 及 QP-2010 型气相色谱-质谱联用仪测定。柱色谱用硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工厂生产, TLC 硅胶预制板由烟台市化学工业研究所生产。溶剂均为分析纯, 由天津百世化工有限公司工厂生产。许树植物 2001 年采自海南省三亚市, 由本所张德研究员鉴定。

### 2 提取和分离

许树地上部分干质量 4.5 kg, 粉碎, 分别用 95% 和 50% 工业乙醇回流提取 3 次, 浓缩得粗提物 238 g 和 208 g。将 50% 乙醇提取物用水混悬后依次用石油醚、醋酸乙酯各萃取 3 次, 回收溶剂后得石油

醚萃取物 30 g。将石油醚萃取物经硅胶柱色谱以石油醚-醋酸乙酯 (20:1~2:1) 系统进行梯度洗脱并重结晶得到 5 个三萜和 1 个二萜化合物。

### 3 结构鉴定

化合物 I: 无色针状结晶 (石油醚-醋酸乙酯), 分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O, EI-MS、<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 光谱数据与文献一致<sup>[6]</sup>, 鉴定为羽扇豆醇。

化合物 II: 无色针状结晶 (石油醚-醋酸乙酯), 分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, EI-MS  $m/z$ : 424 [M]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.76, 0.79, 0.83, 0.94, 0.96, 1.03, 1.68 (各 3H, s, 7CH<sub>3</sub>), 4.56 (1H, s), 4.68 (1H, d,  $J=2$  Hz), 5.12 (1H, t,  $J=3.6$  Hz)。<sup>13</sup>C-NMR δ: 38.83 (C-1), 27.52 (C-2), 79.09 (C-3), 38.94 (C-4), 55.44 (C-5), 18.41 (C-6), 34.42 (C-7), 40.96 (C-8), 50.58 (C-9), 37.29 (C-10), 21.04 (C-11), 121.83 (C-12), 145.25 (C-13), 42.94 (C-14), 27.56 (C-15), 35.68 (C-16), 43.07 (C-17), 48.45 (C-18), 48.06 (C-19), 150.98 (C-20), 29.97 (C-21), 40.08 (C-22), 28.05 (C-23), 15.39 (C-24), 16.15 (C-25), 16.06 (C-26), 14.62 (C-27), 18.06 (C-28), 109.34 (C-29), 19.37 (C-30)。MS 和 <sup>1</sup>H-NMR 与文献一致<sup>[7]</sup>, 结合 <sup>13</sup>C-NMR、DEPT、HSQC 和 HMBC 确定化合物 I 为 magnificol。

化合物 III: 无色针状结晶 (石油醚-醋酸乙酯), 分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, EI-MS  $m/z$ : 424 [M]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.82, 0.96, 0.99, 1.03, 1.09, 1.16, 1.22, 1.24 (各 3H, s, 8CH<sub>3</sub>), 5.7 (1H, brs)。<sup>13</sup>C-NMR δ: 21.59 (C-1), 38.13 (C-2), 215.25 (C-3), 50.03 (C-4), 142.58 (C-5), 121.43 (C-6), 23.70