

## 竹茹中苜蓿素对照品的高效液相半制备色谱制备研究

龚金炎<sup>1,2</sup>, 毛建卫<sup>1</sup>, 黄伟素<sup>3</sup>, 黄俊<sup>1</sup>, 张英<sup>2</sup>

1. 浙江科技学院 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 浙江 杭州 310023

2. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029

3. 浙江经贸职业技术学院 应用工程系, 浙江 杭州 310018

**摘要:** 目的 建立高效液相半制备色谱制备竹茹中苜蓿素对照品的方法。方法 竹茹用 50%乙醇提取, 浓缩成浸膏, 随后上聚酰胺柱色谱, 采用 70%乙醇柱色谱洗脱物进行 HPLC 分离制备。半制备色谱条件: 色谱柱为 Luna C<sub>18</sub> ODS(250 mm×10 mm, 10 μm), 流动相为乙腈-1%甲酸水溶液 (35:65); 体积流量 4 mL/min; 进样量 1 mL; 检测波长 345 nm。结果 该法所得化合物用 HPLC 归一化法定量, 质量分数大于 98%, 根据波谱学数据鉴定化合物为苜蓿素。结论 建立的方法简便, 所得苜蓿素纯度高, 可作为分析方法的对照品。

**关键词:** 竹茹; 苜蓿素; 对照品; 半制备高效液相色谱; 归一化法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0919-03

## Study on preparation of tricin reference substance by semi-preparative HPLC in *Bambusae Caulis in Taenias*

GONG Jin-yan<sup>1,2</sup>, MAO Jian-wei<sup>1</sup>, HUANG Wei-su<sup>3</sup>, HUANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>

1. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical & Bio Processing Technology of Farm Produces, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China

2. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

3. Department of Applied Engineering, Zhejiang Economic & Trade Polytechnic, Hangzhou 310018, China

**Key words:** *Bambusae Caulis in Taenias*; tricin; reference substance; semi-preparative HPLC; normalization method

竹茹 *Bambusae Caulis in Taenias* 作为药食两用的药材, 在《中药辞海》中记载为禾本科刚竹属、籼竹属和牡竹属中一些竹种的茎秆所刮下的外皮层或其次一层, 具有清热化痰、除烦止呕等功效, 常用于治疗热痰引起的痰热咳嗽、痰火挟痰、烦热呕吐等病症, 在《神农本草经》中列为中品, 《药品化义》曰: “竹茹轻可去实, 凉能去热, 苦能降下, 专清痰, 为宁神开郁佳品”<sup>[1]</sup>, 是临床不可缺少的常用药, 收载于《中国药典》2010年版<sup>[2]</sup>。

苜蓿素 (tricin), 又称麦黄酮、小麦黄素, 化学名称为 5, 7, 4'-三羟基-3', 5'-二甲氧基黄酮。苜蓿素在苜蓿<sup>[3]</sup>、大麦<sup>[4]</sup>、竹叶<sup>[5]</sup>、地胆草<sup>[6]</sup>、软荚藜<sup>[7]</sup>、野菊花<sup>[8]</sup>等植物中多有检出。Hudson 等<sup>[9]</sup>的研究表明苜蓿素能有效抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-468

和人结肠癌细胞 SW480 的生长。Cai 等<sup>[10]</sup>进一步研究了苜蓿素对 MDA-MB-468 细胞株的体外生长抑制及其细胞周期抑制作用。然而, 除了癌症防护之外, 已知关于苜蓿素药理活性研究的报道不多, 部分原因在于获得苜蓿素单体较困难。目前, 苜蓿素单体主要来源于化学合成, 从天然植物中分离制备较大的苜蓿素的相关报道很少, 市场上更无苜蓿素对照品出售。本实验采用常规色谱和高效半制备液相色谱结合的方法制备苜蓿素对照品。该法简便易行, 所制备的对照品质量分数可达 98% 以上。

### 1 仪器与材料

Waters DeltaPrep 600 制备型高效液相色谱系统 (美国 Waters 公司), 包括制备型液相控制器、2996 PDA 检测器、馏分收集器; 2695 分析型高效液相

收稿日期: 2011-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972486); 国家“十二五”科技支撑项目 (2011BAD23B02); 浙江省重大科技攻关项目 (2007C12085, 2008C12036, 2008C02005-5, 2008C14067); 浙江省重点科技创新团队项目 (2011R09028-12); 浙江科技学院科研启动基金资助项目

作者简介: 龚金炎 (1982—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为天然产物与功能性食品的研究与开发。E-mail: gongjinyan1982@163.com

色谱仪, 美国 Waters 2695, 配制 PDA 2996 检测器; Luna C<sub>18</sub> 半制备柱 (250 mm×10 mm, 10 μm)、Luna C<sub>18</sub> 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 美国 Phenomenex 公司; APEXIII 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪, 美国 Bruker Daltonics 公司; Avance DMX-500 (500 MHz) 核磁共振仪, 德国 Bruker Biopsin 公司。聚酰胺树脂 (40~60 目), 上海医药 (集团) 总公司, 色谱纯乙腈、甲醇 (天津四友生物医学技术有限公司), 二次重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 原料处理

竹茹 5.5 kg, 粉碎至 10~20 目, 采用 50%乙醇热回流提取 1.5 h, 提取两次, 合并提取液, 减压浓缩成膏状, 得膏状物 145 g, 取 50 g 上 40~60 目已处理完毕的聚酰胺树脂, 依次采用 3 倍柱体积 10%、30%、50%、70%、95%乙醇洗脱, 分别收集样品、浓缩和冻干, 经高效液相色谱检测发现 70%乙醇洗脱物最适合制备苜蓿素对照品。

### 2.2 色谱条件

**2.2.1 分析色谱条件**<sup>[11]</sup> 色谱柱为 Luna C<sub>18</sub> ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-1% 乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱条件: 0~15 min, 15% A; 15~25 min, 15%~40% A; 25~34 min, 40% A; 34~40 min, 40%~15% A; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 40 °C; 检测波长 345 nm。

**2.2.2 半制备色谱条件** 色谱柱为 Luna C<sub>18</sub> ODS (250 mm×10 mm, 10 μm), 流动相为乙腈-1%甲酸水溶液 (35:65); 体积流量 4 mL/min; 进样量 1 mL; 检测波长 345 nm。

### 2.3 苜蓿素对照品的制备

将 70%乙醇洗脱物溶解于甲醇中, 制成 10 mg/mL 的样品, 经滤膜 (0.45 μm) 滤过后备用, 半制备型 HPLC 分离制备, 收集保留时间为 18.5~19.5 min 的组分 (图 1), 将其减压浓缩干燥 (60 °C 以下), 最后冷冻干燥得到淡黄色粉末 170 mg, 经峰面积归一法计算, 制备所得的对照品质量分数为 98.1%, 竹茹中含苜蓿素 69.60 μg/g, 得率约为 44.10%, 苜蓿素对照品的 HPLC 图谱见图 2。

### 2.4 结构鉴定

淡黄色粉末, mp 287~289 °C; ESI-MS *m/z*: 329 [M-H]<sup>-</sup> (分子式 C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>O<sub>7</sub>, 相对分子质量 329.066 1), <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.33 (2H, s, H-2',

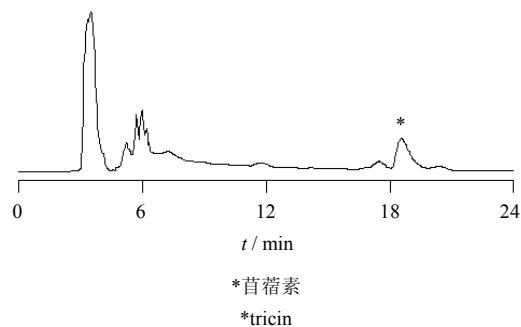


图 1 苜蓿素对照品的制备 HPLC 图谱

Fig. 1 Preparative HPLC chromatogram of triclin reference substance

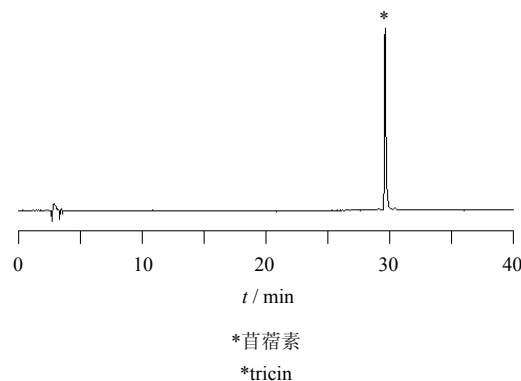


图 2 苜蓿素对照品的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of triclin reference substance

6'), 6.99 (1H, s, H-3), 6.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 3.89 (6H, s, 2×-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 182.3 (C-4), 164.7 (C-2), 164.2 (C-7), 161.9 (C-9), 157.8 (C-5), 148.7 (C-3', 5'), 140.4 (C-4'), 120.9 (C-1'), 104.9 (C-2', 6'), 104.3 (C-10), 104.1 (C-3), 99.3 (C-6), 94.7 (C-8), 56.9 (2×-OCH<sub>3</sub>). 以上数据与文献报道的苜蓿素基本一致<sup>[12-14]</sup>, 可以判定所得化合物为苜蓿素。

## 3 讨论

在进行高效液相半制备色谱制备前, 先将提取物通过聚酰胺柱色谱预处理, 在采用 10%、30%、50%乙醇洗脱以后, 去除了提取物中大量的杂质和一些极性较大的黄酮和酚酸类化合物, 使极性较低的苜蓿素得到了进一步的富集。分析色谱发现苜蓿素在 30 min 左右出峰, 乙腈体积分数在 40%, 为了尽量减少目标峰与前后杂质峰重叠的可能性, 并兼顾单次实验时间和试剂使用量, 因此采用了 35%乙腈等度洗脱, 既能达到目标峰与杂质峰的极限分离, 又能尽可能地节约时间和试剂。

选用甲醇-水系统, 苜蓿素保留时间过长, 且分

离效果不佳; 选用乙腈-水系统, 有主峰与杂质峰重叠现象出现, 并伴有拖尾现象发生, 因此选用乙腈-酸水系统。前期实验发现, 使用乙酸时, 苜蓿素有较好的分离效果, 甲酸稍差, 因此在分析测试时采用乙腈-1%乙酸水溶液作为流动相; 但乙酸沸点较高, 不易蒸发, 会引起产品纯度降低, 因此在制备过程中选用乙腈-1%甲酸水溶液作为流动相, 甲酸沸点与水相近, 易与水一起蒸出, 不会引起产品纯度降低。

单纯的柱色谱分离得到的粗品含有多种微量杂质, 纯度达不到对照品的要求。而通过其他方法纯化比较繁琐, 通过高效液相半制备色谱多个紫外波长的检测, 方法操作方便, 可使苜蓿素峰和杂质峰分开, 进而使得对照品质量分数达到98%以上。

张锐等<sup>[15]</sup>结合硅胶柱色谱和制备HPLC法对竹根醋酸乙酯部位进行分离纯化, 得到了质量分数大于98%苜蓿素对照品, 方法相对简便, 制备成本较低, 唯一的不足就是硅胶柱色谱洗脱时, 需要使用较大的有机洗脱试剂。而本实验建立的制备苜蓿素对照品的方法, 采用聚酰胺树脂吸附解析, 不同体积分数的乙醇作为洗脱试剂, 不仅操作方便, 重现性好, 而且制备的产品纯度高, 可用于分析用的对照品, 而且避免了有机试剂的大量使用。

#### 参考文献

- [1] 中药辞海组. 中药辞海 (第1卷) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 王淑惠, 李兰芳, 张勤增, 等. 不同生长期紫花苜蓿中苜蓿素的测定 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 311-312.
- [4] 凌俊红, 王楠, 任玉珍, 等. HPLC法测定大麦芽中麦黄酮 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1632-1634.

- [5] 周惠燕, 李士敏. 竹叶中麦黄酮的分离鉴定及含量测定 [J]. 中药材, 2006, 29(12): 1301-1302.
- [6] 郭峰, 梁侨丽, 闵知大. 地胆草中黄酮成分的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(4): 303-304.
- [7] 赵排风. HPLC法同时测定软荚藜中2种黄酮类化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1873-1876.
- [8] 王锦越, 陈东, 梁丽娟, 等. 野菊花的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 718-721.
- [9] Hudson E A, Dinh P A, Kokubun T, *et al.* Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, 9(11): 1163-1170.
- [10] Cai H, Hudson E A, Mann P, *et al.* Growth-inhibitory and cell cycle-arresting properties of the rice bran constituent triclin in human-derived breast cancer cells *in vitro* and in nude mice *in vivo* [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(7): 1364-1371.
- [11] 龚金炎, 吴晓琴, 夏道宗, 等. RP-HPLC法测定竹叶提取物中黄酮类和酚酸类成分 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 63-65.
- [12] Nakajima Y, Yun Y S, Kunugi A. Six new flavonolignans from *Sasa veitchii* (Carr.) Rehder [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(40): 8011-8015.
- [13] Chung I M, Hahn S J, Ahmad A. Confirmation of potential herbicidal agents in hulls of rice, *Oryza sativa* [J]. *J Chem Ecol*, 2005, 31(6): 1339-1352.
- [14] Jiao J J, Zhang Y, Liu C M, *et al.* Separation and purification of triclin from an antioxidant product derived from bamboo leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(25): 10086-10092.
- [15] 张锐, 刘建群, 刘丽艳, 等. 制备高效液相色谱从竹根中制备苜蓿素的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1985-1987.