

山楂叶化学成分的 HPLC-DAD/ESI-MS 分析

许红蕾,周婷婷,范国荣(第二军医大学药学院,上海 200433)

摘要 目的:通过液相色谱-二极管阵列光谱检测/电喷雾离子化质谱(HPLC-DAD/ESI-MS)联用技术定性分析山楂叶中的主要化学成分。方法:以60%乙醇回流提取山楂叶原药材,再经D101大孔吸附树脂纯化。高效液相色谱条件:使用YMC ODS-C₁₈(250 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm)色谱柱进行分析,以乙腈-0.1%甲酸溶液(15:85 v/v)为流动相,流速为0.6 mL/min,检测波长为254 nm。ESI质谱条件:负离子扫描模式,喷射电压3500 V,毛细管电压-20 V,干燥气(N₂)压力21 psi,扫描范围300-800 amu,雾化温度300 ℃。结果:通过液-质联用技术以及紫外扫描,鉴定出山楂叶中11个主要化学成分。结论:通过HPLC-DAD/ESI-MS联用技术,为鉴定山楂叶中的化学成分建立起了一种快速、高效的分析方法。

关键词 山楂叶;液相色谱-二极管阵列光谱检测/电喷雾离子化质谱联用;化学成分

中图分类号:R927 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)01-0040-03

Analysis on chemical constituents of hawthorn leaves by HPLC-DAD/ESI-MS

XU Hong-lei, ZHOU Ting-ting, FAN Guo-rong (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the chemical constituents of hawthorn leaves by high-performance liquid chromatography (HPLC)-diode array detector/electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-DAD/ESI-MS). **Methods:** Dried hawthorn leaves were extracted under reflux with 60% ethanol and purified by D101 macroporous resin again. The chromatographic separation was performed on a YMC ODS-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm) with a mobile phase composed of acetonitrile-0.1% formic acid (15:85 v/v), eluted at a flow rate of 0.6 mL/min, and UV detection was set at 254 nm. The negative ionization mode with needle voltage 3500 V, capillary voltage -20V, gas(N₂) press 21 psi and temperature of the capillary 300 ℃ was selected. Relative molecular mass data acquisition was performed from m/z 300 to 800 in full MS scan mode. **Results:** Eleven of the major chemical constituents of hawthorn leaves were characterized based on their retention behavior obtained on-line by their UV spectra and the HPLC-DAD/ESI-MS. **Conclusion:** A rapid and efficient method for studying the chemical constituents of hawthorn leaves by HPLC-DAD/ESI-MS was established.

KEY WORDS hawthorn leaves; HPLC-DAD/ESI-MS; chemical constituents

山楂叶为蔷薇科山楂属植物山楂(*Rosaceae crataegus* L.)的干燥叶,我国约有17种^[1]。其多产于我国北方,野生资源非常丰富,是一种常用天然药用植物。山楂叶主要含有黄酮类化合物、有机酸类化合物及一些微量元素。其中黄酮类化合物具有调血脂、防止动脉硬化、增加冠脉流量、抗心肌缺氧及心律失常等活性以及抗炎、镇痛作用^[2,3]。根据文献报道,已经从山楂叶中分离出牡荆素、槲皮素、山萘酚、芦丁、金丝桃苷、熊果酸、胡萝卜苷及二十九烷醇等成分^[4,5]。

通过高效液相色谱法(HPLC)对山楂叶中的一种或多种黄酮进行分析,可以确定其中主要组分并测定其含量。但该法对化合物的定性能力很有限,

必须在有标准对照品的情况下才能进行保留时间的比对定性和定量分析。据此所建立的山楂叶质量控制方法大多只针对牡荆素等少数黄酮,不够全面。

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被分析样品进行分离。再以质谱为检测器在线提供化合物的分子量信息,特别是电喷雾SII软电离质谱技术的出现,为研究热不稳定和极性较大的化合物提供了简捷快速的分析方法,而多级串联质谱技术还可以提供被分析成分的结构信息。有些微量、痕量成分和无紫外吸收的化合物在用HPLC分析时很可能被忽略,而MS具有高度的灵敏性,可检测到皮克级物质,因此很容易发现这些化合物的存在。目前,HPLC-ESI-MS技术已被广泛用于植物有效成分的分离及结构鉴定中。

本研究采用HPLC-DAD/ESI-MS联用技术对山

作者简介:许红蕾(1980-),女,硕士研究生。Tel: (021) 25070388。

通讯作者:范国荣。Tel: (021) 25070388, E-mail: Guofan@yahoo.com.cn

楂叶中的主要化学成分进行鉴定,该法操作简便、快速、灵敏度高、专属性强,为全面控制山楂叶药材的质量提供了依据,对阐明其药效物质基础、质量控制、开发现代中药新药和充分利用我国的药材资源等具有重要意义。

1 仪器与试剂

Varian ProStar 高效液相色谱仪 质谱联用仪 (Varian, Corporation, USA), 配备 ProStar 210 泵、ProStar 410 自动进样器、ProStar 330 二极管阵列光谱检测器、Varian 1200L 三重四极杆电喷雾质谱检测器和 Varian 1200 L 色谱 质谱工作站。

乙腈、甲醇为色谱纯 (德国默克公司), 水为超纯水并经微孔滤膜过滤。其余所用试剂均为分析纯 (中国医药集团上海化学试剂公司)。

2 实验

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 YMC ODS-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm i d ; 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 : 0.1% 甲酸水溶液 (15 : 85, V/V); 流速 0.6 mL/min; 柱温 25 ; 检测波长 254 nm; 进样量 20 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源, 负离子扫描模式, 扫描范围 300 ~ 800 amu, 喷针电压 3 500 V, 毛细管电压 -20V, 干燥气 (N₂) 压力 21 psi, 雾化温度 300 。

2.2 样品制备 称取药材粗粉 500 g, 用 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 将滤液减压浓缩至无醇味, 得山楂叶粗提液 700 mL, 将制得的山楂叶粗提液加适量水混悬后, 过 D101 大孔吸附树脂柱, 先分别用水和 10% 浓度的乙醇溶液充分洗脱, 弃去洗脱液, 再用 20% 和 30% 浓度的乙醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩并干燥, 即得山楂叶提取物样品粉末。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取山楂叶提取物粉末 100 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 超声 20 min, 离心 (8 000 r/min, 离心 10 min), 精密量取离心处理后的上清液 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。

3 结果

3.1 色谱行为 供试品的色谱行为如图 1 所示, 在流动相为乙腈 : 0.1% 甲酸水溶液 (15 : 85, V/V)、流速 0.6 mL/min 的条件下, 不仅能使各色谱峰得到较好的分离, 而且不存在峰拖尾现象, 可见此色谱条件对山楂叶中的主要化学成分具有较好

的分离效果。

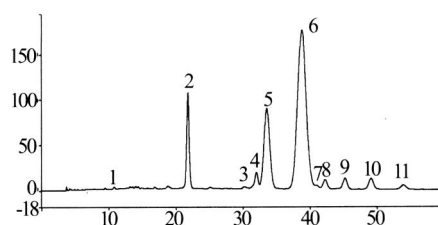


图 1 山楂叶大孔吸附树脂纯化物
高效液相色谱图 (λ = 254 nm)

1. 熊果酸 Ursolic acid; 2. 芦丁-4''-O-鼠李糖苷; 3. Rutin-4''-O-rhamnoside; 4. 去乙酰山楂萜 Deacetyl-cratenacin; 5. 巢菜素-Vicenin-; 6. 牡荆素-4-O-葡萄糖苷 Vitexin-4-O-glucoside; 7. 牡荆素-2-O-鼠李糖苷 Vitexin-2-O-rhamnoside; 8. 牡荆素 Vitexin; 9. 斛皮素-3-鼠李糖-半乳糖苷 Quercetin-3-rhamnosyl-galactose; 10. 芦丁 Rutin; 11. 金丝桃苷 Hyperoside; 12. 牡荆素-4-O-乙酰-2-鼠李糖苷 Vitexin-4''-acetyl-2-O-rhamnoside

3.2 质谱行为 根据供试品的总离子流图 (图 2)、准相对分子质量、及有关文献报道的质谱资料^[6-13], 鉴定出山楂叶中 11 种化合物的可能结构, 其中芦丁-4''-O-鼠李糖苷、牡荆素-4-O-葡萄糖苷和牡荆素-2-O-鼠李糖苷为山楂叶中主要的三种黄酮类化合物。经过高效液相色谱分离纯化后, 通过 ¹H NMR、¹³C NMR 结构解析并与文献数据比对, 进行了结构确证^[14, 15], 鉴定出的可能化合物的名称、紫外最大吸收、准分子离子峰见表 1。

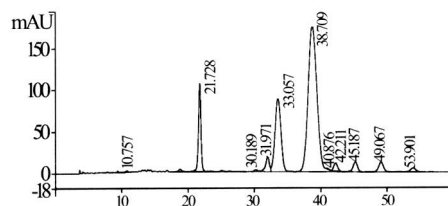


图 2 山楂叶大孔吸附树脂纯化物负离子流图

4 讨论

乙酸的电离常数比甲酸要小, 使用乙酸, 会影响实验效果; 而使用甲酸, 酸度调节的范围较大, 用量比较小, 对分析物在质谱上的响应不会造成太大影响。经过实验比较分析, 最终选择了 0.1% 的甲酸溶液为水相, 分离效果良好。对于检测波长的选择, 经过 DAD 在线全波长扫描, 山楂叶中各黄酮类化学成分在 254 nm 附近均有较大的吸收。

结果表明, 运用 HPLC-DAD/ESI-MS 技术, 能够有效、快速地对山楂叶中的化学成分进行分析测定, 为山楂叶的质量控制以及指纹图谱的建立提供了可靠的依据。

表 1 山楂叶中的主要化学成分

峰号 (peak No.)	t _R /min	[M-H] ⁻ m/z	max/nm	鉴定 (identify)
1	10.8	451.1	225	熊果酸 (Ursolic acid)
2	21.7	755.3	260 350	芦丁-4 "O-鼠李糖苷 (rutin-4 "O-rhamnoside)
3	30.2	611.1	225	去乙酰山楂纳新 (Deacetylcratenacin)
4	31.9	609.2	250 350	巢菜素- (Vicenin-)
5	33.5	593.4	260 330	牡荆素 [4 "O-葡萄糖苷 (vitexin-4 "O-glucoside)
6	38.7	577.3	260 330	牡荆素-2 "O-鼠李糖苷 (vitexin-2 "O-rhamnoside)
7	40.9	431.2	240	牡荆素 (Vitexin)
8	42.2	628.1	254	槲皮素-3-鼠李糖-半乳糖苷 (Quercetin-3-rhamnosyl-galactose)
9	45.2	609.2	254 350	芦丁 (Rutin)
10	49.1	463.4	254 350	金丝桃苷 (Hyperoside)
11	53.9	623.1	254 350	牡荆素-4 "O-乙酰-2 "O-鼠李糖苷 (vitexin-4 "O-acetyl-2 "O-rhamnosyl)

参考文献:

- [1] 郭永学,李楠,仇燕峡,等.大孔吸附树脂纯化山楂叶总黄酮工艺研究[J].中成药,2006,28(1):23.
- [2] 龚青,张叶萍,祝明.RP-HPLC法测定山楂叶中牡荆素鼠李糖苷及牡荆素葡萄糖苷的含量[J].中草药,2005,36(3):23.
- [3] 权迎春,关丽萍.山楂叶提取物的抗炎与镇痛作用研究[J].时珍国医国药,2006,17(4):566.
- [4] 张培成,徐缓绪.山楂叶化学成分研究[J].药学报,2001,36(10):754.
- [5] 斯建勇,陈迪华.云南山楂叶化学成分的研究[J].中国中药杂志,1998,23(7):422.
- [6] 王威,周增辉,崔妍,等.山楂叶黄酮物质提取方法的研究及结构分析[J].中国食品添加剂,2006,4(9):7.
- [7] 张培成,徐缓绪.山楂叶化学成分研究[J].药学报,2001,36(10):754.
- [8] 任凤莲,吴梅林,谷芳芳.高效液相色谱法测定山楂叶中熊果酸含量的研究[J].天然产物研究与开发,2007,19:303.
- [9] 刘荣华,余伯阳.山楂叶 HPLC 指纹图谱研究[J].中成药,2007,29(1):7.
- [10] 江爱龙,刘荣华,邵峰,等. LC-MS法测定山楂叶中多元酚类成分的含量[J].武警医学院学报,2007,16(5):533.
- [11] Cuyekens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16: 2341.
- [12] Beck MA, Häberlein H. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica* [J]. Phytochemistry, 1999, 50: 329.
- [13] Abebe E, Bemd K, Tsige G. Quantitative determination of the group of flavonoids and saponins from the extracts of the seeds of *Glinus lotoides* and tablet formulation thereof by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2005, 1083: 32.
- [14] Rosa T, Rodolfo M, Eduardo N. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography[J]. Food Chemistry, 2008, 106: 767.
- [15] Rayyan S, Fossen T, Solheim NH. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug *Crataegi folium cum flore* (hawthorn) [J]. Phytochem Anal, 2005, 16: 334.

收稿日期:2008-04-09

(上接第 10 页)

- [48] Wickham TJ. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease[J]. NatMed, 2003, 9(1): 135.
- [49] Wang Z, Zhu T, Qiao CP. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(3): 321.
- [50] Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(1): 3.
- [51] Nettelbeck DM. Virotherapeutics: conditionally replicative adenoviruses for viral oncolysis [J]. Anticancer Drugs, 2003, 14(8): 577.
- [52] Anderson W F, Blaese R M, Culver K, et al. The ADA human gene therapy clinical protocol: points to consider response with clinical protocol[J]. Hum Gene Ther, 1990, 1: 33.
- [53] Blaese R M, Culver K W, Miller A D, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years[J]. Science, 1995, 270(5235): 475.
- [54] Raper SE, Yudkoff M, Chimule N, et al. A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(1): 163.
- [55] Raper SE, Chimule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in an ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer[J]. Mol Genet Metab, 2003, 80(1-2): 148.
- [56] Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease[J]. Science, 2000, 288(5466): 669.
- [57] Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency[J]. N Engl J Med, 2003, 348(3): 255.

收稿日期:2009-01-25