

大花红景天中大花红天素标准品的制备和鉴定研究

吴少雄¹, 郭亚东¹, 郭祀远², 李琳², 殷建忠¹

(1.昆明医学院食品与营养研究所, 云南 昆明 650031)(2.华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 结合大孔树脂富集、柱色谱分离纯化法, 研究了从大花红景天醇提取物中制备大花红天素标准品的方法。标准品通过波谱学方法进行了结构鉴定, 用归一化法定量, 质量分数大于99%。所得大花红天素可作为大花红景天原料及其产品定性、定量分析使用的标准品。

关键词: 大花红景天; 大花红天素; 标准品; 制备

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0596-03

Preparation and Identification of Crenulatin Reference Substances from the Roots of *Rhodiola Crenulata*. H

WU Shao-xiong¹, GUO Ya-dong¹, GUO Si-yuan², LI Lin², YIN Jian-zhong¹

(1. Research Institute of Nutrition and Food science, Kuming Medical College, Kuming 650031, China)

(2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A method for preparation of crenulatin reference substance was developed in this paper. Crenulatin was extracted from the roots of *Rhodiola Crenulata*. H by alcohol, isolated by macroporous resin, purified by column chromatography, and structurally analyzed by spectroscopy. GC-MS analysis showed that the contents of crenulatin were higher than 99%. The achieved crenulatin could be used as reference substances for the qualitative and quantitative analysis of the raw materials and products of *Rhodiola Crenulata*. H.

Key words: *Rhodiola Crenulata*. H; crenulatin; reference substance; preparation

大花红天素 (crenulatin) 属异戊烯 (半萜 hemiterpenes) 苷类的结构类型, 自然界极少存在此类结构的化合物^[1], 结构式如图 1 所示。大花红天素主要存在于大花红景天中, 专属性较好, 可将其作为大花红景天的质量控制指标之一^[2]。鉴于市场上没有该化合物标准品的供应, 限制了对大花红景天进一步的开发与利用。本实验采用大孔树脂富集、硅胶柱色谱初分离、再经 Sephadex LH-20 色谱柱分离纯化的方法, 对大花红景天醇提取物制备大花红天素标准品进行了研究和鉴定, 并根据《中药新药质量标准用对照品研究的技术要求》^[3]进行质量考察; 制备了纯度大于 99% 的大花红天素标准品, 为大花红景天保健食品原料的分析提供标准物质。

1 材料与仪器

大花红景天 (*Rhodiola Crenulara* H) 购于云南英茂实验室, 柱层分析用硅胶 (200~300 目), 薄层色谱

收稿日期: 2008-01-22

作者简介: 吴少雄(1965-), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品化学与营养研究

层析用硅胶预制板均为青岛海洋化工厂产品。AB-8 大孔树脂为南开大学化工厂出品。Sephadex LH-20 凝胶为 Pharmacia 公司产品。NMR: Bruker DRX-500 超导核磁共振仪, 以 TMS 为内标; MS: Finnigan Trace DSQ 四极杆质谱仪; IR: Bruker Tensor 27 FT-IR 红外光谱仪 (溴化钾压片); Agilent 6890N GC/5793N MS 气相色谱/质谱联用仪; HP-5MS 石英熔融毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)。旋转薄膜蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; 显色剂: 10%浓硫酸乙醇溶液; 其他所用试剂均为分析纯。

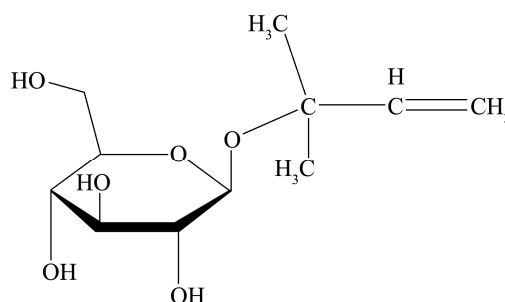


图 1 大花红景天素结构式

Fig.1 Structural formula of crenulatin

2 方法与结果

2.1 大花红天素制备

取大花红景天干燥药材 1.5 kg, 粉碎, 过 40 目筛, 用 5 倍体积 75% 的乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 减压浓缩得浸膏 296 g。用适量的水溶解浸膏, 过已处理好的 AB-8 大孔吸附树脂, 依次用水和 95% 乙醇洗脱, 收集醇洗脱液, 回收乙醇, 醇洗浸膏加少量硅胶 (200~300 目) 拌匀, 挥干后加入硅胶柱中 (氯仿湿法装柱) 以氯仿-甲醇 (V/V=20:1~1:1) 为洗脱剂进行柱层析, 按每流份 50 mL 收集, 将各流份点于硅胶 G 薄层板上, 以 CHCl_3 -MeOH (V/V=4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液于电热板上加热至斑点显色, 根据薄层色谱检查, 合并相同的斑点部分, 浓缩, 再经 Sephadex LH-20 色谱柱分离, 重结晶即得。

2.2 结构鉴定

白色结晶, 易溶于水和甲醇。IR_{vmax} cm^{-1} : 3407 (ν_{OH}), 3090 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1639 ($\nu_{\text{C=C}}$). FAB⁻-MS: m/z: 247 [(M-H)⁺]. EI-MS: m/z: 69, 70. ¹H NMR (CD_3OD) δ : 1.32(3H,s,H-4), 1.36(3H,s,H-5), 3.13-4.56(7H,m, 糖上 H), 5.08(1H,d,J=10.9Hz,H-1_a), 5.18(1H,dd,J=0.8,17.7Hz H-1_b), 6.00(1H,t, J=10.9,17.7Hz,H-2)。¹³C NMR (CD_3OD) δ : 145.4(C-2), 114.3(C-1), 99.5(C-1'), 79.3(C-3), 78.2(C-5'), 77.6(C-3'), 75.1(C-2'), 71.7(C-4'), 62.8(C-6'), 27.8, 26.6(C-4,5)。根据以上图谱特征分析结合文献^[3]报道, 鉴定该化合物结构为大花红天素 (crenulatin)。

2.3 标准品的纯度检测

2.3.1 薄层色谱鉴别法分析^[4]

精密称取大花红天素适量, 加甲醇溶液, 制成 10 mg/ml 的供试品溶液, 精密吸取供试品溶液适量, 点于硅胶 G 薄层层析预制板上, 分别用石油醚-丙酮 (V/V=4:1)、氯仿-甲醇 (V/V=4:1) 和采用乙酸乙酯-甲醇 (V/V=9:1) 等三种不同的试剂系统作为展开剂展开, 取出、晾干、喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 于电热板加热斑点显色, 日光下观察。采用石油醚-丙酮为展开剂展开, 标准品不同体积 (2 μL 、4 μL 、6 μL 、8 μL 、10 μL) 的薄层层析结果见图 2(I), R_f 为 0.575; 标准品不同体积 (2 μL 、4 μL 、6 μL 、8 μL 、10 μL) 采用氯仿-甲醇为展开剂展开, 薄层层析结果如图 2(II), R_f 为 0.607; 以乙酸乙酯-甲醇为展开剂展开, 对照品不同体积 (2 μL 、4 μL 、6 μL 、8 μL 、10 μL) 的薄层层析结果见图 2(III), R_f 为 0.575。

如图 2, 大花红天素标准品用三种不同的溶剂系统为展开剂展开, 经硫酸乙醇在加热条件下显色后, 均呈单一斑点, 符合定性用对照品的要求。

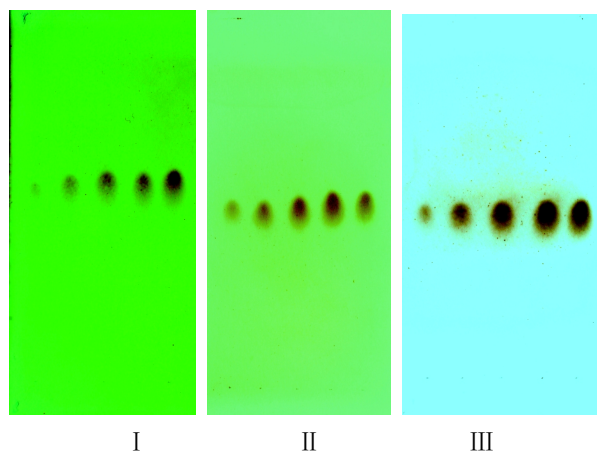


图 2 薄层层析结果

Fig.2 Thin layer chromatography of Crenulatin

2.3.2 GC-MS 检测

采用 Agilent 6890N GC/5793N MS 气相色谱/质谱联用仪对大花红天素的纯度进行检测^[5]。

GC-MS 条件: 毛细管柱: HP-5MS 石英熔融毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 进样口温度 240 $^{\circ}\text{C}$, 载气为氦气, 流速 1.0 ml/min, GC-MS 接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。升温程序 50 $^{\circ}\text{C}$ (保持 1 min) \rightarrow 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 160 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 190 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 220 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 270 $^{\circ}\text{C}$ (保持 3 min), 离子源为 EI 源, 电子能量 70 eV, 扫描范围 35~455 amu。用峰面积归一法计算大花红天素的纯度, 结果为 99.53%。总离子流色谱图见图 3。表明大花红天素符合化学对照品定性和定量用的纯度要求。

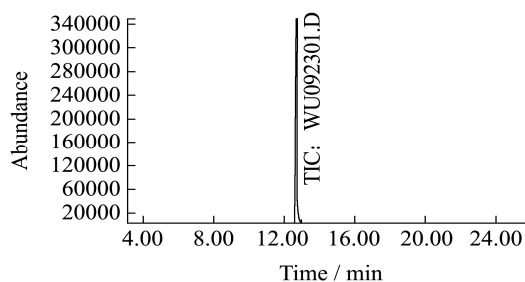


图 3 大花红天素总离子流图

Fig.3 Total ion current of crenulatin

3 结论

大花红天素主要存在于大花红景天中, 专属性好, 是大花红景天的质量控制指标之一。市场上尚无

(下转第 592 页)

