

白花蛇舌草中环烯醚萜苷类化合物的稳定性研究^{*}

□李存满 徐青^{**} 薛兴亚^{**} 章飞芳 梁鑫森^{**}

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

陈德良 (武汉大学中南医院 武汉 430071)

摘要:利用 HPLC 法详细考察了不同介质、不同保存容器、温度及光对白花蛇舌草中环烯醚萜苷类化合物的影响,并且用 LC/MS 对该类化合物变化前后进行了分析。结果发现:白花蛇舌草中环烯醚萜苷类化合物在酸性介质中部分物质不稳定;在纯水介质中置于塑料容器中易发生变化,且溶液颜色变成蓝色;60℃放置时间不宜超过 6 h;但其对光并不敏感。根据质谱信息并结合文献报道,推测了几个变化较大的化合物的结构,峰 6 和 8 分别为鸡矢藤苷甲酯和去乙酰基车叶草苷酸甲酯,峰 1,2,10 和 12 为去乙酰基车叶草苷酸、鸡矢藤苷、车叶草苷酸和车叶草苷,峰 5,7 为鸡矢藤苷甲酯的同分异构体,并推测环烯醚萜苷类物质在酸性介质中 C-4 位取代基为 COOH 的化合物较 C-4 位取代基为 COOCH₃ 的化合物稳定,在变化过程中 COOCH₃ 会水解为 COOH。

关键词:白花蛇舌草 环烯醚萜苷 稳定性 HPLC LC/MS

一、引言

中药白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* (Willd) Roxb.) 为茜草科耳草属植物,全草入药,具有清热解毒、活血化淤、抗菌消炎和抗肿瘤等多种生理活性,临床上被广

泛使用。其化学成分主要包括黄酮类、环烯醚萜苷类、蒽醌类等化合物。环烯醚萜苷类是天然产物中一类重要的化合物,也是白花蛇舌草中主要类化学物质之一^[1]。它具有细胞毒、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性^[2,3]。环烯醚萜类化合物属于臭蚁二醛(iriodial)的半缩醛衍生物,半缩醛结构不稳定,易发生水解或在酸性介质中易发生重排等变化^[4,5]。但目前对环烯醚萜

收稿日期:2007-05-08

修回日期:2007-08-09

^{*} 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213):基于现代理论和技术的复方中药系统研究,负责人:梁鑫森。

^{**} 联系人:徐青,博士,副研究员,主要从事液相色谱分析方法、中药指纹图谱、中药标准组分分离与表征的研究,Tel:0411-83479521,E-mail:xug-ing@dicp.ac.cn;薛兴亚,博士,副研究员,主要研究方向:复杂样品分离制备、复杂样品色谱及联用分析、化学生物信息管理与分析,Tel:0411-84379529,E-mail:xuexy@dicp.ac.cn;梁鑫森,本刊编委,博士,研究员,主要从事组分中药的系统研究,Tel:0411-84379519,Email:liangxm@dicp.ac.cn。

类化合物稳定性的研究很少^[6],而对白花蛇舌草中该类物质稳定性研究尚未见报道。本文利用 HPLC 及 LC/MS 对白花蛇舌草中的环烯醚萜类化合物的稳定性进行了较系统地考察,为该类化合物在新药开发及分离纯化过程中的质量控制提供了有益的借鉴作用。

二、实验部分

1. 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪,包括四元泵、自动进样器、紫外检测器(DAD)和柱温箱;Agilent LC/MS MSD Trap XCT 系列液-质联用仪。

乙腈(色谱纯)购自 Fisher Scientific 公司(英国),甲酸(色谱纯)购自 TEDIA 有限公司(美国),实验用水为 Milli-Q 纯净水。白花蛇舌草药材采自湖南省衡东县,经中国中医科学院中药研究所鉴定为正品白花蛇舌草。AB-8 大孔树脂购自南开大学化工厂。其它试剂均为分析纯。

2. 色谱条件

色谱柱:Supersil ODS3(4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm, Chrom expert company, USA);流动相:A 相为乙腈,B 相为含 0.1% 甲酸的水溶液,起始浓度为 5 % A,保持 5 min,然后以线性梯度方式,20 min 内升至 15 % A,最后在 10 min 内升至 95 % A。流速为 1.0 mL/min,由于环烯醚萜类的特征紫外吸收波长在 230 - 240 nm,故本实验选择检测波长为 238 nm,进样体积为 20 μL,柱温为 30℃。

3. LC/MS 条件

色谱条件同 2.2。MS 条件如下:ESI 离子源;干燥气流速:8.0 L/min;干燥气温度:325℃;雾化气压力:35psi;扫描范围:m/z 100 - 1000;正、负离子模式检测;碰撞诱导解离(CID)。

4. 样品制备

取干燥白花蛇舌草药材粉末 100 kg,用 10 倍量的水回流提取二次,每次 2 h,水提液

减压浓缩,喷雾干燥。取 1.5 kg 干粉再依次用乙酸乙酯、正丁醇分配提取。正丁醇组分过 AB-8 大孔树脂柱,分别用水及不同浓度乙醇洗脱,以 30% 乙醇洗脱并减压浓缩后得到的样品为本研究用分析样品。通过紫外吸收光谱及质谱数据分析并结合文献报道,我们以前的工作已证明该组分峰 1-12 为环烯醚萜类化合物。

三、结果与讨论

1. 环烯醚萜类物质在不同存放容器不同介质中的稳定性

白花蛇舌草上述组分中含有的化合物峰 1-12 为环烯醚萜类化合物(图 1),其中已经制备分离得到峰 6 及 8 的单体化合物,并确认分别为鸡矢藤苷甲酯和去乙酰基车叶草苷酸甲酯(经 UV、MS、NMR 鉴定并与文献对照)。

取该组分约 4 mg 用 5 mL 纯水溶解,室温下分别置于白色透明塑料瓶(样 1)和白色透明玻璃瓶(样 2)中,考察其稳定性。结果发现,置于塑料瓶中的样品溶液 5 天后,溶液即略显蓝色,放置 7 天即明显变蓝并有蓝色沉淀生成(图 2a);而样 2 放置 22 天后未发生明显变化,即样品溶液颜色及化合物 1-12 的含量未观察到明显变化(图 2b)。同样以 0.1% 甲酸水溶液为介质(pH2.6)配制样品溶液,室温下分别置于白色透明塑料瓶(样 3)和白色透明玻璃瓶(样 4)中,放置 13 天后,二者溶液颜色均未发生明显变化,但部分化合物含量发生了变化,结果分别见图 2c, 2d。

从图 2 中看到,样 1 放置 7 天后,峰 3、4 和 12 含量明显减少甚至消失,放置 11 天后,除峰 11 随着放置时间的延长而含量增加外,其它峰含量均明显降低最

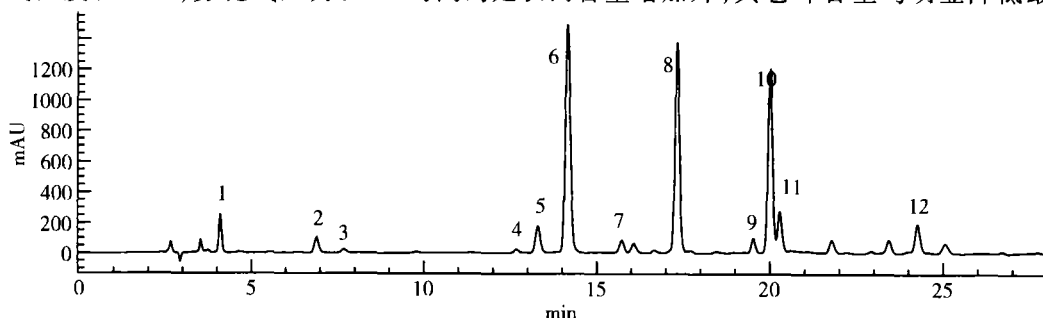


图 1 白花蛇舌草环烯醚萜类组分 HPLC 色谱图

后甚至消失;而样2放置22天未发生明显变化;样3和样4变化趋势基本相同,其中峰1、3和7变化明显。相对来说,

样3各峰的变化较样1小,可能是在酸性介质中抑制了环烯醚萜苷与容器材料的相互作用;样4的变化幅度明显大于样2。故环烯醚萜苷类化合物溶液不宜保存于塑料瓶中,在酸性介质中存放某些物质也会发生较大变化。

2. 光对环烯醚萜苷类物质稳定性的影响

以0.1%甲酸水为介质配制成的样品溶液,分别置于棕色玻璃瓶(样5)和白色玻璃瓶(样6)中。室温放置20天后,溶

液颜色均未发生明显变化(图3)。从图中看到样5和样6中各化合物的变化趋势相似,说明该组分中环烯

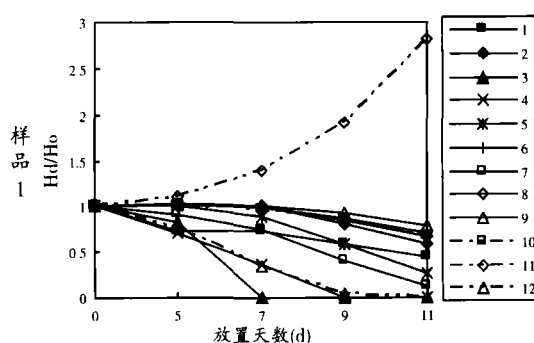


图2a 纯水介质的样品溶液于透明塑料瓶中的变化

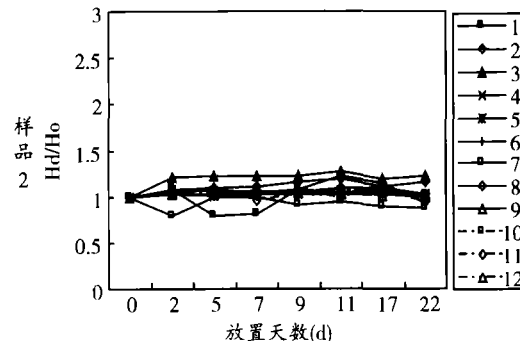


图2b 纯水介质的样品溶液于透明玻璃瓶中的变化

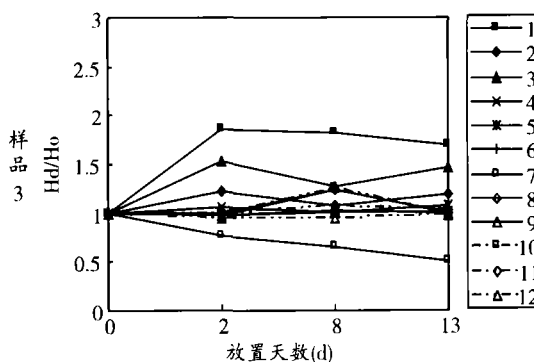


图2c 酸性介质的样品溶液于透明塑料瓶中的变化

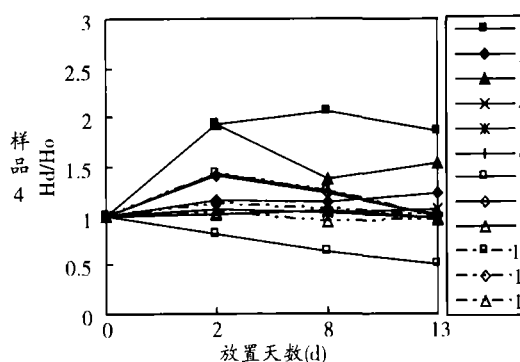


图2d 酸性介质的样品溶液于透明玻璃瓶中的变化

Hd/Ho: 放置后化合物峰高(Hd)与样品配制时峰高(Ho)比值(以下相同)

图2 存放容器和介质对环烯醚萜苷类化合物的影响

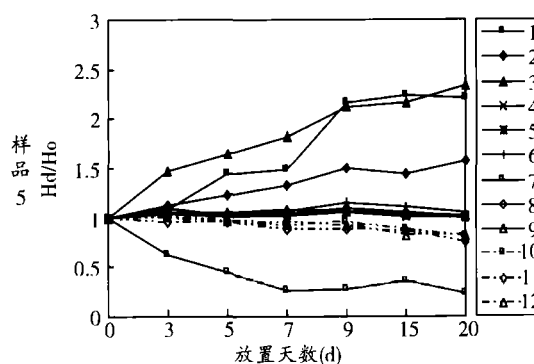


图3a 酸性介质的样品溶液于棕色玻璃瓶中的变化

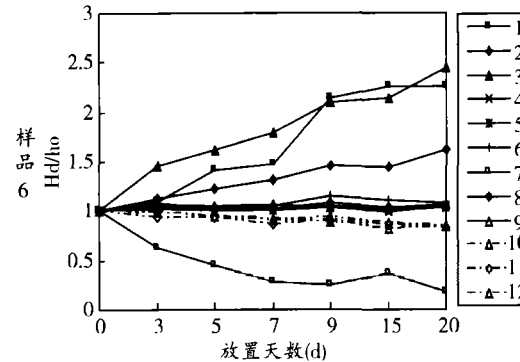


图3b 酸性介质的样品溶液于白色玻璃瓶中的变化

图3 光对环烯醚萜苷类化合物的影响

醚萜苷类物质对光不太敏感,其结构与文献^[6]报道的对光极敏感的环烯醚萜类物质不同。其中几个化合物变化较明显,可能与其在酸性介质中有关。

3. 温度对环烯醚萜苷类物质的影响

将以纯水为介质的样品溶液分别置于白色透明玻璃瓶中于40℃(样7),60℃(样8)保存6、12、13h之后测定;同样将以0.1%甲酸水为介质的样品溶液分别置于白色透明玻璃瓶中于40℃(样9)、60℃(样10)保存6、12、18h之后测定,结果见图4。从结果看,该组分纯水溶液40℃放置18h未发生明显变化,而60℃最长只能放置6h,到12h后其中峰1和7已发生明显变化,18h后这两个峰变化进一步加剧,但其它各峰60℃放置18h未发生明显变化。同样该组分在0.1%甲酸水介质中40℃放置12h未发现明显变化,而在60℃放

置6h后峰7即发生明显变化,12h后峰1、2和3也发生明显变化。

4. LC/MS 对样品溶液变化前后的分析

图5为样1放置不同时间后的HPLC分析谱图,可看到峰1-10及12的相对含量在逐渐变小,而变化最明显的是峰3、4、7及12(如图中所示),放置5天后峰4几乎消失,至11天后峰7、12也基本消失;而峰11和13在逐渐变大,尤其峰13是在变化过程中产生的新化合物。

用LC/MS分别对样1变化前后及样1生成的蓝色沉淀进行分析,质谱总离子流图见图6。从LC/MS分析结果看,样1发生主要变化的峰11和12,其分子量分别为432和414,根据其MS信息并结合文献报道,推测分别为车叶草苷酸同分异构体和车叶草苷。

峰6和8

(鸡矢藤苷甲酯和去乙酰基车叶草苷酸甲酯)的相对含量也发生了变化,有逐渐减小的趋势。新生成的峰13由于MS响应很弱,无法判断相关信息。样1生成的蓝色沉淀没有紫外吸收,从其质谱总离子流图(图6c)可明显看到四个峰,其分子量分别为

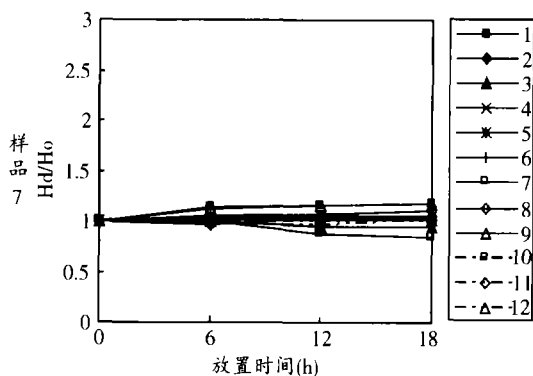


图4a 纯水介质样品溶液40℃放置后的变化

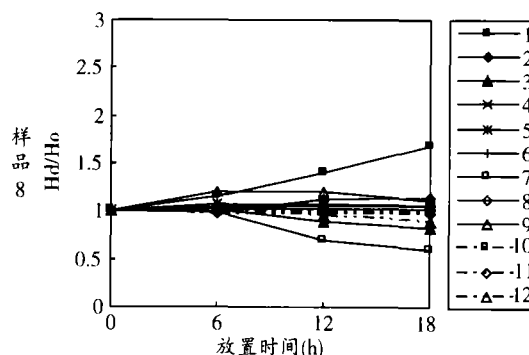


图4b 纯水介质样品溶液60℃放置后的变化

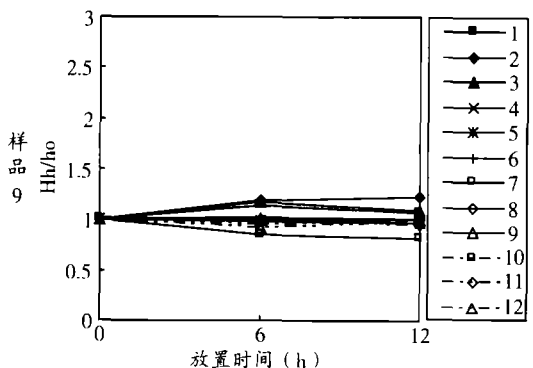


图4c 酸性介质样品溶液40℃放置后的变化

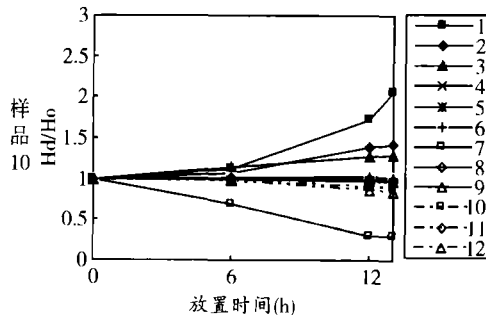


图4d 酸性介质样品溶液60℃放置后的变化

图4 温度对环烯醚萜苷类化合物的影响

M453, 566, 679 和 792, 但具体结构尚不能确定。

在样 3、4、5、6 和 10 中, 变化最明显的是峰 1、2、3 及 7, 其中峰 1、2 和 3 变化大体呈增大趋势, 而峰 7 逐渐减小。根据 MS 数据, 峰 1 和 2 是分子量为 390 的同分异构体, 根据 MS 裂解碎片信息并结合文献报道, 推测其分别为去乙酰基车叶草苷酸和鸡矢藤苷。峰 7 是分子量为 404 的鸡矢藤苷甲酯的同分异构体。由于化合物 1 和 2 分子结构中 C-4 位取代基为 COOH, 而化合物 7 分子结构中 C-4 位取代基为 COOCH₃, 故推测

环烯醚萜类物质在酸性介质中 C-4 位取代基为 COOH 的化合物较 C-4 位取代基为 COOCH₃ 的化合物稳定, 在变化过程中 COOCH₃ 水解为 COOH。

四、结 论

本实验对白花蛇舌草中环烯醚萜苷类化合物的稳定性进行了系统的考察。结果表明: 环烯醚萜苷类化合物在室温纯水介质中存放于玻璃瓶中较稳定; 60℃ 放置时间不宜超过 6h。本实验为该类药物在新药开发及分离纯化过程中的质量控制提供了有益的借鉴作用。

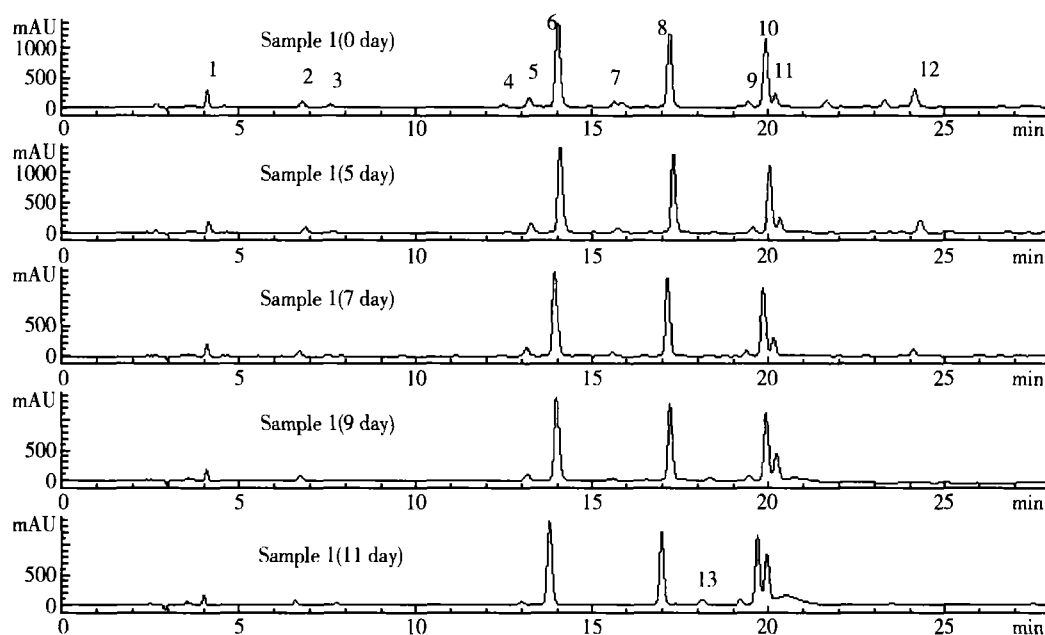


图 5 放置不同时间后样 1 变化的 HPLC 图

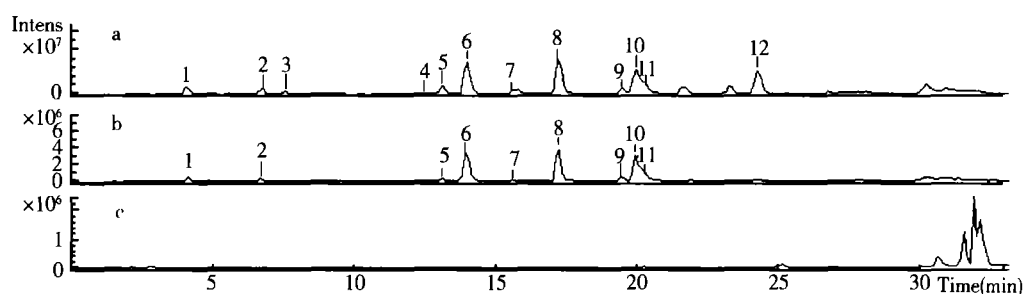


图 6 样 1 质谱总离子流图。a: 0 天; b: 11 天; c: 生成的蓝色沉淀

参考文献

- 1 Xu B J, Sung C K. Chemical constituents and Pharmacological Activities of hedyotis diffusa. Nat. Prod. Sci., 2005, 11(1): 1~9.
- 2 Kim Y, Park E J, Kim J, et al. Neuroprotective Constituents from Hedyotis diffusa. J. Nat. Prod., 2001, 64(1): 75~78.
- 3 Kim D H, Lee H J, Oh Y J, et al. Iridoid glycosides isolated from Oldenlandia diffusa inhibit LDL-oxidation. Arch. Pharm. Res., 2005, 28(10): 1156~1160.
- 4 Yao Xinsheng (姚新生). Natural Medicinal Chemistry (天然药物化学). 2nd Edition. Beijing (北京): People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 1994: 288~289.

(Continued on Page 66)

- 国医国药, 2004, 15(2): 82 ~ 83.
- 17 郭庆梅, 兰亦青. 不同生长期川牛膝根的发育变化. 山东中医药大学学报, 1998, 22(3): 219 ~ 220.
- 18 黄璐琦, 李慧, 陈京荔, 等. 珍稀濒危中药资源保护的相关问题探讨. 世界科学技术—中药现代化(中药资源保护), 2001, 3(6): 46 ~ 49.
- 19 康明, 叶其刚, 黄宏文. 注意植物迁地保护中的遗传风险. 遗传, 2005, 27(1): 160 ~ 166.
- 20 Thro AM, et al. Cassave biotechnology network meets in cartagena to study nutritional and economic values of New world. *Resource Diversity*, 1991, 8(4): 11 ~ 13.
- 21 郭长源. 保护开发中药材资源是中药现代化的重要课题. 中草药, 2002, 33(1): 91 ~ 92.

Strategies for Protecting Rare and Endangered Medicinal Plants in Chongqing

Yi Sirong, Huang Ya, Xiao Bo, Deng Caifu, Xiao Zhong

(Chongqing Research Institute of Medicinal Plantation, Nanchuan, Chongqing 408435)

According to incomplete statistics, there are 244 rare and endangered medicinal plants in Chongqing. Numerous elements, both climate induced and manmade, are attributed to the extinction of some valuable plants. This paper outlines a range of protective strategies for saving the endangered medicinal plants.

Keywords: rare and endangered medicinal plants; protective strategies; Chongqing

(责任编辑: 张述庆, 责任译审: 邹春申)

(Continued from Page 55)

- 5 Bianco A, Massa M, Oguakwa J U, et al. 5 - deoxystansioside, an iridoid glucoside from *Tecoma stans*. *Phytochemistry*, 1981, 20(8): 1871

~ 1872.

- 6 Cogne A L, Queiroz E F, Marston A, et al. On - line identification of unstable iridoids from *Jamesbrittenia fodina* by HPLC - MS and HPLC - NMR. *Phytochemical Analysis*, 2005, 16(6): 429 ~ 439.

Stability of Iridoid Glycosides in *Hedyotis Diffusa*

Li Cunman, Xu Qing, Xue Xingya, Zhang Feifang, Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

Chen Deliang

(ZhongNan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071)

The stability of iridoid glycosides extracts from *Hedyotis diffusa* using HPLC was investigated, in the context of storage container, solvent media, temperature, and light irradiation. Variations of iridoid glycosides samples were also determined using LC/MS. The results indicated that the iridoid glycosides in *Hedyotis diffusa* were more stable in pure water than in and acidic solution and more stable in glass container than in plastic container. However, the iridoids were not found noticeably varied in the context of light irradiation. Iridoid glycosides at an indoor temperature between 40°C and 60°C presented a better stability, than at 60°C for 6 h. Based on the MS data and previous studies, the structures of changed compounds were preliminarily identified, such as peak 1, 2, 6, 8, 10 and 12 (deacetylasperuloside acid, scandoside, scandoside methyl ester, deacetylasperuloside acid methyl ester, asperuloside acid and asperuloside), and peak 5, 7 (isomers of scandoside methyl ester). It was deduced that the iridoid glycosides with a COOH₃ group on C - 4 were more stable, compared with the one with a COOCH₃ group on C - 4. A COOCH₃ group on C - 4 can be translated into a COOH₃ group by hydrolysis in acidic media.

Keywords: *Hedyotis diffusa*; Iridoid glycosides; Stability; HPLC; LC/MS

(责任编辑: 张述庆, 责任译审: 邹春申)