

甜茶素对照品制备方法的研究*

Preparation Method of Reference Substance of Rubusoside from *Rubus suavissimus* S. Lee

冯 军¹, 黄 艳¹, 刘布鸣^{1**}, 莫建光²

FENG Jun¹, HUANG Yan¹, LIU Bu-ming¹, MO Jian-guang²

(1. 广西中医药研究院, 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022; 2. 广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(1. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:【目的】建立从甜茶叶中制备甜茶素对照品的方法, 获得符合要求的甜茶素对照品。【方法】利用大孔树脂吸附、重结晶和液相色谱法对甜茶叶的水提取物——甜茶素进行分离、纯化结晶, 然后采用薄层色谱法和高效液相色谱法对甜茶素进行纯度检查, 并通过 UV, IR, MS, NMR 等对其进行结构鉴定。【结果】从甜茶叶水提取物中分离、纯化结晶出甜茶素对照品, 质量分数 $W > 99.0\%$ 。【结论】建立的制备方法简单可行, 所得到的甜茶素对照品符合中药化学对照品的相关要求, 可作为甜茶叶及其相关制剂的质量控制用化学对照品。

关键词: 甜茶叶 甜茶素 对照品 制备

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2015)02-0156-04

Abstract: 【Objective】A method for separating reference substance of Rubusoside from leave of *Rubus suavissimus* S. Lee was established in order to get the qualified reference substance of Rubusoside. 【Methods】Water-extract of the leave of *Rubus suavissimus* S. Lee was isolated and purified by preparative liquid chromatography combining with macroporous resin adsorption and recrystallization. The purity of Rubusoside was checked by TLC and HPLC, and its structure was identified by UV, IR, MS, NMR. 【Results】Rubusoside was completely separated from the leave of *Rubus suavissimus* S. Lee, and the purity of the reference substance was no less than 99.0%. 【Conclusion】The method is simple and convenient, by which the compound prepared is accorded with the relative demands of chemical reference substance in Chinese materia medica, and can be used as a reference substance for the quality control and the research of herbal medicine.

Key words: *Rubus suavissimus* S. Lee, Rubusoside, reference substance, preparation
DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20150408.001

0 引言

【研究意义】中药及其制剂的质量控制、药效、药理及生产工艺等多方面的研究均需要使用相应的化学对照品。甜茶叶系蔷薇科悬钩子属植物广西甜茶 (*Rubus suavissimus* S. Lee) 的干燥叶, 俗称“甜茶”, 主要分布在我国南方丘陵地区, 主产广西, 有清热、润

收稿日期: 2014-11-18

修回日期: 2015-03-05

作者简介: 冯 军(1984-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事中药、天然药化学成分与质量标准研究。

* 广西中药质量标准研究重点实验室开放课题项目(桂中重开201103)和南宁市生物制药产业大型科学仪器与设备共享与服务平台建设项目(20121052-3)资助。

** 通讯作者: 刘布鸣(1956-), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药、天然药化学成分与质量标准研究, E-mail: liubuming@aliyun.com。

肺利咽、祛痰止咳的功能^[1]。甜茶素是甜茶叶的主要有效成分,可作为甜茶叶及其制剂的主要质量控制指标性成分;对其进行制备研究,获得高纯度的化学对照品,为测定甜茶叶及其制剂中甜茶素的含量、研究甜茶素的活性及其在生物体内的药动学过程提供方便,也为工业上制备高纯度甜茶素提供有利参考。【前人研究进展】广西民间使用甜茶叶作为代茶饮料已有悠久历史,甜茶叶的化学成分研究已有相关文献报道^[2~6],而目前对于甜茶素的研究主要集中在分离提取^[7~13]、含量测定^[14,15]、药理作用^[16~19]等方面。【本研究切入点】鲜有甜茶素对照品制备方法及质量控制研究的报道。【拟解决的关键问题】利用大孔树脂吸附、重结晶和液相色谱法等方法提取得到高纯度的甜茶素,为甜茶叶及其制剂的质量控制研究提供化学对照品。

1 材料与方法

1.1 材料

德国 BRUKER TENSOR 27FTIR 红外光谱仪,日本岛津 UV-2550 型紫外光谱仪,德国 BRUKER Drx 500 核磁共振波谱仪,美国 Agilent G6230 TOF MS 质谱仪,日本岛津 LC-10A 液相色谱仪,美国 Waters 1525-2998 液相色谱仪,美国 Waters 2545 高压制备液相色谱仪,威玛龙 UC-3282 型高压制备液相色谱仪,ADS-7 大孔树脂(郑州勤实科技有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯;水为重蒸馏水;其它溶媒为分析纯。广西甜茶(*Rubus suavissimus* S. Lee)的干燥叶,采自广西金秀,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为蔷薇科悬钩子属植物叶。

1.2 方法

1.2.1 粗品的提取分离

甜茶叶 2 kg,水煎煮提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,浓缩至每 1 mL 相当于 0.3 g 甜茶叶,于室温条件下自然冷却;然后在其中加入 3 倍体积的乙醇,搅拌,静置 24 h,回收乙醇,得每 1 mL 相当于 0.5 g 甜茶叶的浓缩液。将浓缩液经 ADS-7 大孔树脂吸附,用乙醇-水系统洗脱,收集乙醇-水(60:40)的洗脱液,合并浓缩,经甲醇重结晶,得到甜茶素粗结晶。

1.2.2 对照品的制备

将粗结晶用纯水溶解,注入制备液相色谱仪,色谱条件:色谱柱为 Kromasil C-18 柱(250 mm×10 mm,10 μm),流动相为甲醇-水(70:30),检测波长为 205 nm,流速为 5 mL/min,柱温为室温,进样量为 1 mL,按保留时间收集甜茶素组分,并对所收集的同一组分进行高效液相色谱检测。检测的色谱条件为

色谱柱:C-18 柱;流动相:乙腈-水(30:70);检测波长:205 nm;流速:1 mL/min;柱温:室温。合并保留时间相同而且纯度大于 98%的组分,回收溶剂,得到纯度大于 98%的甜茶素对照品。

1.2.3 对照品的纯度检查

1.2.3.1 薄层色谱法

取制备得到的甜茶素对照品适量,用甲醇制成 3 mg/mL 的溶液,在同一硅胶 G 板上,按不同的点样量梯度点样,点样量分别为 20 μg,40 μg,60 μg,80 μg,100 μg。用 3 个不同系统的展开剂:系统(1)乙酸乙酯-丙酮-乙酸-水(体积比为 8:3:1:1);系统(2)氯仿-甲醇-水(体积比为 20:6:0.5);系统(3)乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 16:3:0.5);置展开缸分别展开,展距 15 cm。喷以碘溶液定位,晾干,置白光下检视。

1.2.3.2 高效液相色谱法

精密称取于 105℃干燥至恒重的对照品适量,加流动相制成每 1 mL 含 3 mg 对照品的溶液,色谱条件:Wondasil C-18 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(30:70);检测波长为 205 nm;流速为 1 mL/min;进样量为 10 μL;柱温为室温。然后改变流动相和波长,分别用甲醇-水(65:35)、检测波长 205 nm 和乙腈-水(30:70)、检测波长 210 nm 进行进一步检测。

1.2.4 对照品的结构鉴定

1.2.4.1 紫外分光光度法

取制备得到的甜茶素对照品适量,加水制成约 5 μg/mL 的溶液,以水为空白溶液,在 200~400 nm 范围进行扫描,获得甜茶素 UV λ^{H₂O}_{max} nm 数据。

1.2.4.2 红外光谱法

取制备得到的甜茶素对照品适量,与溴化钾混匀并压片,在 4000~400 cm⁻¹ 范围扫描,获得甜茶素 IRν_{KBr}max cm⁻¹ 数据。

1.2.4.3 质谱法

取制备得到的甜茶素对照品适量,甲醇溶解,注入质谱仪,测定甜茶素的 MS(ESI)_{m/z} 数据。

1.2.4.4 核磁共振法

取制备得到的甜茶素对照品适量,以氘代甲醇为溶剂,TMS 为内标,分别测定甜茶素的¹H NMR 数据和¹³C NMR 数据。

2 结果与分析

2.1 对照品的纯度检查结果

2.1.1 薄层色谱法检查结果

在薄层色谱硅胶板中,可见单一的斑点:3 种不

同展开剂系统,5个不同浓度的梯度点样,均为单一斑点(图1),未见杂质斑点。

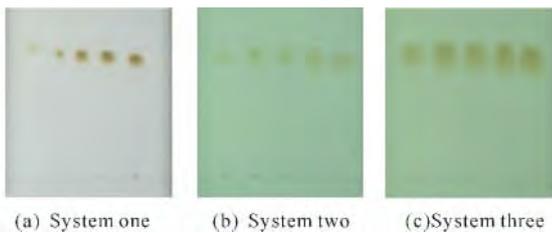


图1 甜茶素薄层色谱图

Fig.1 The TLC of Rubusoside

2.1.2 高效液相色谱法纯度检查结果

在上述1.2.3.2色谱条件下,得到甜茶素对照品的HPLC图(图2),经二级管阵列检测器DAD进行峰纯度检查,结果显示为单一纯峰,5点紫外光谱图完全重合(图3),用面积归一化法计算甜茶素含量为99.0%。进一步检测(改变流动相和波长)发现,对照品均为一个主峰,改变流动相分析未见有异常峰。

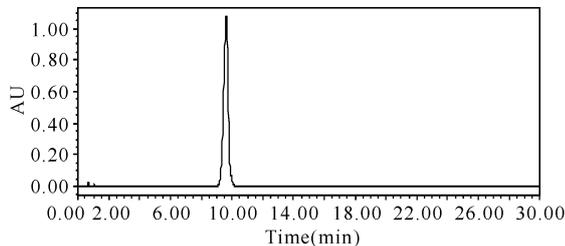


图2 甜茶素的HPLC图

Fig.2 The HPLC graph of Rubusoside

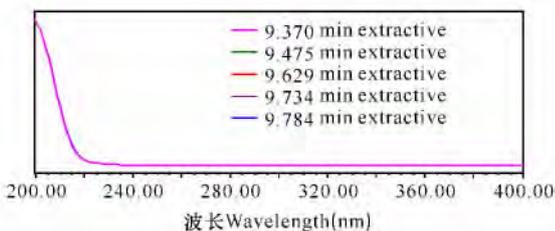


图3 甜茶素5点紫外光谱图

Fig.3 The five points of Rubusoside in UV spectrum

2.2 对照品的结构鉴定

制备得到的对照品为白色粉末,溶于水、甲醇、乙醇等极性溶剂,mp 176~178°C。UV λ^{H_2O} max nm: 末端吸收。IR ν_{KBr} max cm^{-1} : 3387(-OH), 2931(-CH₂-), 1723(-O-C=O), 1638(-C=C), 1460(-CH₃), 1076(C-O), 887(C=C-H)。MS(ESI) m/z: 665[M+Na]⁺, 162, 134(100), 133, 117。¹H-NMR(MeOD, 600 MHz, TMS) δ ppm: 1.23(3H, s, H-18), 1.30(3H, s, H-20), 4.98(1H, brs, H-17a), 5.51(1H, brs, H-17b), 6.11(1H, d, J=8.4, Glc-H1'), 5.10(1H, d, J=7.7, Glc-H1'')。 ¹³C-NMR(MeOD, 150 MHz, TMS) δ ppm: 40.8(C-1), 19.5(C-2), 38.4(C-3), 44.1(C-4), 57.4

(C-5), 22.2(C-6), 41.7(C-7), 42.5(C-8), 54.0(C-9), 39.9(C-10), 20.7(C-11), 37.3(C-12), 86.0(C-13), 44.6(C-14), 47.8(C-15), 154.6(C-16), 104.5(C-17), 28.4(C-18), 177.0(C-19), 15.7(C-20), 99.8(C-1'), 75.5(C-2'), 78.9(C-3'), 72.4(C-4'), 78.1(C-5'), 63.1(C-6'), 95.9(C-1''), 74.1(C-2''), 79.1(C-3''), 71.2(C-4''), 79.4(C-5''), 62.2(C-6'')。以上数据与文献[12,13]报道的甜茶素基本一致,因此确定该化合物为甜茶素(Rubusoside)。结构见图4。

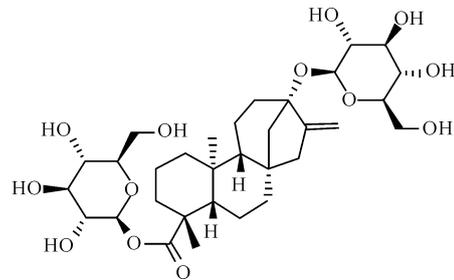


图4 甜茶素的结构式

Fig.4 The structure of Rubusoside

3 结论

本实验通过化学分离与制备液相色谱法制备得到的甜茶素,经薄层色谱法检查,在3种不同展开剂系统,5个不同浓度的梯度点样下,均为单一斑点;用高效液相色谱法进行纯度检查,在3个不同流动相系统和检测波长下均为单一峰,面积归一化法计算甜茶素含量>99%;通过UV,IR,MS,NMR等方法对制备得到的甜茶素对照品进行结构确定,结果均与已知数据一致,确定为甜茶素。本实验提取分离、纯化结晶得到的甜茶素对照品,符合中药化学对照品的相关要求,可作为广西甜茶及其相关制剂质量控制用的化学对照品。

参考文献:

- [1] 韦家福,黄燮才.广西甜茶原植物的鉴定[J].中药材,1996,19(1):16-17.
Wei J F, Huang X C. The identification of *Rubus suavissimus* S. Lee[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1996, 19(1): 16-17.
- [2] Sugimoto N, Sato K, Liu H M, et al. Analysis of Rubusoside and related compounds in tenryocho extract sweetener[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2002, 43(4): 250-253.
- [3] Ohtani K, Aikawa Y, Ishikawa H, et al. Further study on the 1,4- α -trans glucosylation of Rubusoside, a sweet steviol-bisglucoside from *Rubus suavissimus* [J]. Agric

- Biol Chem, 1999, 55(2): 449-453.
- [4] Chou W H, Oinaka T, Kanarnaru F, et al. Diterpene glycosides from leaves of Chinese *Rubus chingii* and fruits of *R. suavissimus*, and identification of the source plant of the Chinese folk medicine "fu-pen-zi"[J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(7): 3021-3024.
- [5] 王剑霞, 吕华冲. 广西甜茶化学成分的研究[J]. 中药材, 2007, 30(7): 800-802.
Wang J X, Lv H C. Studies on the chemical constituents of *Rubus suavissimus* S. Lee[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007, 30(7): 800-802.
- [6] 杜晋伟, 杨敬芝, 张东明. 甜茶叶的化学成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(3): 346-348.
Du J W, Yang J Z, Zhang D M. Studies on the chemical constituents of *Rubus suavissimus* S. Lee[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(3): 346-348.
- [7] 何伟平, 张耀奇. 甜茶素的研制[J]. 广西轻工业, 1998(1): 23-26.
He W P, Zhang Y Q. The preparation of Rubusoside[J]. Guangxi Journal of Light Industry, 1998(1): 23-26.
- [8] 史作清, 施荣富, 冯君谦. 一步法提取甜菊糖甙——ADS-7 吸附树脂的应用研究[J]. 中国食品添加剂, 1995, 2: 18-20.
Shi Z Q, Shi R F, Feng J Q. Extraction and separation of stevioside by one step method—study on the application of ADS-7 adsorbent[J]. China Food Additives, 1995, 2: 18-20.
- [9] 周如金, 黄敏, 张玲, 等. 大孔吸附树脂提取甜茶苷的研究[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(5): 35-39.
Zhou R J, Huang M, Zhang L, et al. Study on extraction of Rubusoside from *Rubus suavissimus* S. Lee by macroporous resins adsorption[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2008, 28(5): 35-39.
- [10] 司佳, 吴正奇, 万端极, 等. 从甜茶叶中制备甜茶素的工艺研究[J]. 食品科技, 2013, 38(4): 262-265.
Si J, Wu Z Q, Wan D J, et al. Preparation on Rubusoside from sweet tea[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(4): 262-265.
- [11] 李祝, 陈蓉, 李猷, 等. 广西甜茶中甜茶素的提取工艺研究[J]. 食品工业, 2013, 34(2): 93-95.
Li Z, Chen R, Li Y, et al. Research on extraction technology of sweet tea glucoside from Guangxi sweet tea [J]. Food Industry, 2013, 34(2): 93-95.
- [12] 陈全斌, 张巧云, 义祥辉. 高纯度甜茶甙的制备[J]. 林业科技, 2006, 31(4): 55-56.
Chen Q B, Zhang Q Y, Yi X H. Purification of Rubusoside in *Rubus suavissimus* [J]. Forestry Science & Technology, 2006, 31(4): 55-56.
- [13] 张健, 桂新, 章苏宁, 等. 甜茶叶中甜茶苷的 UPLC-MS/MS 分析[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2692-2696.
Zhang J, Gui X, Zhang S N, et al. Determination of Rubusoside from *Rubus Suavissimus* S. Lee leaves by UPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2011, 28(5): 2692-2696.
- [14] 卢昕, 张新申, 刘承伟. 反相高效液相色谱法测定广西甜茶中的甜茶素[J]. 色谱, 2003, 21(3): 260-262.
Lu X, Zhang X S, Liu C W. Determination of Rubusoside in *Rubus suavissimus* S. Lee by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(3): 260-262.
- [15] 樊兰兰, 韦玮, 何丽丽, 等. 广西甜茶制剂中甜茶素含量的 RSLC-DAD 测定[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 129-131.
Fan L L, Wei W, He L L, et al. Quantification of Rubusoside in preparations of *Rubus Suavissimus* by RSLC-DAD[J]. Lishizhen Medicine And Materia Medica Research, 2012, 23(1): 129-131.
- [16] 梁坚, 赵鹏, 李彬, 等. 甜茶的急性和长期毒性研究[J]. 广西医学, 2003, 25(12): 2394-2397.
Liang J, Zhao P, Li B, et al. Acute and chronic toxicity of *Rubus suavissimus* [J]. Guangxi Medical Journal, 2003, 25(12): 2394-2397.
- [17] 钟正贤, 周桂芬, 陈学芬, 等. 广西甜茶提取物药理研究[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(10): 867-868.
Zhong Z X, Zhou G F, Chen X F, et al. Pharmacological studies on the extract of *Rubus suavissimus* from Guangxi[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2000, 11(10): 867-868.
- [18] Nakatani K, Atsumi M, Arakawa T, et al. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a thai medicinal plant[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(9): 1137-1141.
- [19] 王慧, 王建壮, 王剑霞, 等. 广西甜茶二萜成分抗过敏作用研究[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(1): 60-62.
Wang H, Wang J Z, Wang J X, et al. Anti-allergic effect of Guangxi sweet tea diterpenoids [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2014, 30(1): 60-62.

(责任编辑:米慧芝)