

红凤菜新鲜茎叶中总黄酮提取物的 LC-MS 分析

任冰如, 吕 寒, 陈 剑, 梁呈元, 吴菊兰, 李维林^①

(江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省药用植物研究开发中心 江苏省抗糖尿病药物筛选技术服务中心, 江苏 南京 210014)

LC-MS analysis of total flavonoids extracts from fresh stem and leaf of *Gynura bicolor* REN Bingru, LYU Han, CHEN Jian, LIANG Chengyuan, WU Julan, LI Weilin^① (Jiangsu Center for Research and Development of Medicinal Plants, Jiangsu Provincial Service Center for Anti-diabetic Drugs Screening, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(3): 108-110

Abstract: Four total flavonoids extracts were obtained from fresh stem and leaf of *Gynura bicolor* DC. by method of ethanol extraction-macroporous resin column chromatography-polyamide column chromatography-recrystallization, and their compositions were analyzed by LC-MS technology. The results show that there are six groups of flavonoid absorption peak in total flavonoids extracts of *G. bicolor*, which is identified to be eight components including rutin, quercetin-3-O-rubinobioside, hyperoside, isoquercitrin, kaempferol-3-O-rubinobioside, kaempferol-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-galactoside and astragalgin. This extraction method can effectively extract and purify total flavonoids from fresh stem and leaf of *G. bicolor*, so it can be used for factory production.

关键词: 红凤菜; LC-MS; 总黄酮; 槲皮素; 山柰酚

Key words: *Gynura bicolor* DC.; LC-MS; total flavonoids; quercetin; kaempferol

中图分类号: Q946.83; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2014)03-0108-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.03.15

红凤菜(*Gynura bicolor* DC.)为菊科(Compositae)菊三七属(*Gynura* Cass.)植物,别名血皮菜、观音菜、观音苋、紫背天葵等,主要分布于中国南方各地,全草均可入药^[1];也可作为蔬菜食用,在国内多个地区均有栽培和销售。目前已知红凤菜含有黄酮类、酚性酸类、萜类、甾醇类、脂肪酸类、生物碱类及花青素类等^[2-7]成分。由于黄酮类成分多具有保护心血管、抗肿瘤、抗糖尿病、抗氧化、抗炎和抗病毒等作用^[8],因此对红凤菜中黄酮类成分的研究具有深度开发价值。

作者采用“乙醇提取-大孔树脂柱层析-聚酰胺柱层析-重结晶”方法从红凤菜新鲜茎叶中提取获得不同分离阶段的黄酮类化合物,并采用 LC-MS 技术结合薄层层析对其进行检测分析,考察提取分离过程中黄酮类化合物的富集和纯化状况,以期对红凤菜中黄酮类化合物高效提取纯化工艺的建立提供基础实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试红凤菜取自江苏省·中国科学院植物研究所实验苗圃,于2003年7月引自重庆,凭证标本保存于江苏省·中国科

学院植物研究所标本馆(NAS),凭证标本号为0648614。

使用的乙腈(美国 Fisher 公司)和甲酸(美国 Tedia 公司)均为色谱纯级;采用 Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司)制备超纯水。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液制备 参照陈剑^[5]的方法从红凤菜中分离制得黄酮苷类对照品芦丁(rutin)、异槲皮苷(isoquercitrin)和紫云英苷(astragalgin)以及有机酸类对照品异绿原酸 A(isochlorogenic acid A)和异绿原酸 C(isochlorogenic acid C),上述5个对照品均通过 NMR、MS 和文献比对等进行结构鉴定。分别取各对照品适量,用甲醇配成质量浓度 0.1 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

1.2.2 总黄酮成分的分离及样品溶液的制备 取红凤菜新鲜茎叶 5 kg,用 20 L 体积分数 95% 乙醇室温冷浸提取 7 d,提取液减压浓缩并冷沉去杂。上清液上 NKA 大孔树脂柱,依次用 2 倍体积的水以及体积分数 30%、50%、70% 和 95% 乙醇进行梯度洗脱;以 BAW[V(正丁醇):V(乙酸):V(水)=4:1:5]为展开剂、质量体积分数 1% AlCl₃ 为显色剂对洗脱液进行聚酰胺薄层层析;合并具有黄酮反应的洗脱液,减压浓缩至无醇味。取一部分洗脱液在沸水浴上蒸干,得到样品 I;另一部分洗脱

收稿日期: 2013-09-29

基金项目: 江苏省产学研联合创新基金项目(BY2012213); 江苏省科技基础设施建设计划——科技公共服务平台项目(BM2011117)

作者简介: 任冰如(1964—),女,江苏宜兴人,博士,研究员,主要从事植物资源的研究与开发工作。

^①通信作者 E-mail: lwlcnbg@mail.cnbg.net

液进行聚酰胺柱层析,依次用2倍体积的水以及体积分数30%、50%、70%和95%乙醇梯度洗脱,收集洗脱液,每流份为1/10柱床体积,减压浓缩后室温放置,至黄酮结晶析出后,过滤,将滤液合并后进行干燥,得到样品II,同时得到不同流份的结晶即样品III和样品IV。各样品均取5 mg,分别用体积分数80%甲醇溶解并定容至10 mL,用孔径0.22 μm 微孔滤膜过滤,即为供试样品溶液。

1.2.3 LC-MS检测条件 参照文献[5]、使用Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC-MS超高效液相-精确飞行时间质谱联用仪(美国Agilent公司)进行LC-MS分析。

色谱分析条件:Agilent Zorbax SB-C₁₈色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 1.8 μm , 美国Agilent公司);流速0.5 mL \cdot min⁻¹,柱温25 $^{\circ}\text{C}$,进样量5.0 μL 。流动相A为乙腈、流动相B为体积分数0.1%甲酸溶液,梯度洗脱过程:0~30 min,5%~40% A;30~40 min,40%~100% A;40~45 min,100%~5% A。紫外采集数据范围为200~400 nm,检测波长360 nm。

质谱分析条件:ESI负离子模式,喷雾气压力50 psig,干燥气流速10 L \cdot min⁻¹,干燥气温度350 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压3 500 V;碎裂电压175 V;扫描范围(m/z)50~1 000。

2 结果和分析

2.1 红凤菜总黄酮提取物的组成成分解析

红凤菜新鲜茎叶总黄酮提取物的LC-MS检测结果见表1,表中的化合物名称根据对照品和样品的LC-MS图谱、保留时间(Rt)和负离子模式下一级质谱的分子离子峰[M-H]⁻并结合文献[4-5]中的数据确定。

根据对照品的质谱信息,鉴定出1号峰(Rt 17.64 min, [M-H]⁻ m/z 609)为芦丁,3号峰(Rt 18.60 min, [M-H]⁻ m/z 463)为异槲皮苷,6号峰(Rt 20.35 min, [M-H]⁻ m/z 447)为紫云英苷。因作者采用的LC-MS检测条件与文献[5]完全一致,故参照文献[5]确定样品中其余黄酮苷类成分分别为:3号峰(Rt 18.67 min, [M-H]⁻ m/z 593)为山柰酚-3-O-洋槐苷(kaempferol-3-O-rubinoside),4号峰(Rt 19.31 min, [M-H]⁻ m/z 593)为山柰酚-3-O-芸香苷(kaempferol-3-O-rutinoside),5号峰(Rt 19.72 min, [M-H]⁻ m/z 447)为山柰酚-3-O-半乳糖苷(kaempferol-3-O-galactoside)。

表1分析结果显示:红凤菜中的黄酮苷多以槲皮素或山

表1 红凤菜新鲜茎叶总黄酮提取物的LC-MS分析结果

Table 1 LC-MS analysis result of total flavonoids extracts from fresh stem and leaf of *Gynura bicolor* DC.

峰号 No. of peak	保留时间/min Retention time	[M-H] ⁻ m/z	化合物 ¹⁾ Compound ¹⁾	样品吸收峰 Absorption peak of samples			
				I	II	III	IV
1	17.64	609	芦丁 rutin*	√	√	√	
			槲皮素-3-O-洋槐苷 quercetin-3-O-rubinoside	√	√		
2	18.35	463	金丝桃苷 hyperoside	√	√		√
3	18.60	463	异槲皮苷 isoquercitrin*	√	√		√
			山柰酚-3-O-洋槐苷 kaempferol-3-O-rubinoside	√	√	√	
4	19.31	593	山柰酚-3-O-芸香苷 kaempferol-3-O-rutinoside	√	√	√	
5	19.72	447	山柰酚-3-O-半乳糖苷 kaempferol-3-O-galactoside	√	√		√
6	20.35	447	紫云英苷 astragalol*	√	√		√
7	20.81	515	异绿原酸 A isochlorogenic acid A*	√			
8	21.66	591	-	√			
			515	异绿原酸 C isochlorogenic acid C*	√		
9	21.89	489	-	√			

¹⁾ *: 与对照品一致 Corresponding to reference substance; -: 未鉴定 Not identified.

柰酚为苷元,其连接的糖包括六碳醛糖[如D-葡萄糖(D-glucose)或D-半乳糖(D-galactose)]和甲基五碳糖[如L-鼠李糖(L-rhamnose)]。鉴于样品I和样品II的1号峰呈不对称肩峰,故推测1号峰(Rt 17.64 min, [M-H]⁻ m/z 609)除含芦丁外,还含有槲皮素-3-O-洋槐苷(quercetin-3-O-rubinoside);2号峰(Rt 18.35 min, [M-H]⁻ m/z 463)和与其相邻的异槲皮苷具有相同的分子量,故推测其为金丝桃苷(hyperoside)。

2.2 红凤菜总黄酮提取物的分离效果分析

由表1还可见:样品I除了具有6组黄酮苷吸收峰外,还

有3个包含4种成分的杂质峰(即7~9号峰),对照文献[5],确定7号峰(Rt 20.81 min, [M-H]⁻ m/z 515)为异绿原酸A(isochlorogenic acid A),8号峰(Rt 21.66 min, [M-H]⁻ m/z 515)为异绿原酸C(isochlorogenic acid C),另外2种成分尚未能确定。样品I经过聚酰胺柱层析得到的样品II中不含有7~9号杂质峰,且保留了6个黄酮苷吸收峰,说明聚酰胺柱层析可有效纯化红凤菜黄酮苷提取物。

样品III含有1号峰(Rt 17.64 min, [M-H]⁻ m/z 609)、3号峰(Rt 18.67 min, [M-H]⁻ m/z 593)和4号峰(Rt 19.31

min, $[M-H]^- m/z$ 593) 3 个峰信号; 样品 IV 含有 2 号峰 (Rt 18.35 min, $[M-H]^- m/z$ 463)、3 号峰 (Rt 18.60 min, $[M-H]^- m/z$ 463)、5 号峰 (Rt 19.72 min, $[M-H]^- m/z$ 447) 和 6 号峰 (Rt 20.35 min, $[M-H]^- m/z$ 447) 4 个峰信号。与样品 I 不同的是, 样品 III 中的 1 号峰为对称的峰信号, 3 号峰只有 1 个分子离子峰信号 ($[M-H]^- m/z$ 593), 而样品 IV 中的 3 号峰也只有 1 个分子离子峰信号 ($[M-H]^- m/z$ 463)。以上结果说明, 采用聚酰胺柱层析结合重结晶方法可使红凤菜中的不同黄酮苷成分得到较好的分离。

3 讨 论

在上述获得的黄酮苷成分中, 槲皮素-3-O-洋槐苷和槲皮素-3-O-半乳糖苷在红凤菜化学成分的相关研究中未见报道, 造成这一结果的原因除与分离手段不同有关外, 还与供试样品的性质不同有关。前人的研究多采用红凤菜干燥叶片, 而作者采用的是红凤菜新鲜茎叶, 采用新鲜植物样品能更全面地保留原有的化学成分。虽然如此, 还应采用其他分析手段对红凤菜中上述 2 种成分进行进一步的验证。

此外, 从红凤菜新鲜茎叶中分离或检测到的黄酮苷成分主要以槲皮素或山柰酚为苷元, 这与他人的研究结果^[2-5]一致。因此, 在测定红凤菜总黄酮成分时建议将样品中的黄酮苷进行酸水解, 并以槲皮素和山柰酚为对照品采用高效液相法进行定量测定, 以获得较准确的结果。

采用“体积分数 95% 乙醇提取-NKA 大孔树脂柱层析-聚酰胺柱层析-重结晶”的工艺流程可有效地从红凤菜新鲜茎叶中分离获得总黄酮, 该工艺能耗低、操作简便、产品纯度高, 可用于工厂化生产。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 988-989.
- [2] 卓敏, 吕寒, 任冰如, 等. 红凤菜化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(1): 30-32.
- [3] 吕寒, 裴咏萍, 李维林. 红凤菜中黄酮类化学成分的研究[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(7): 613-614.
- [4] 吕寒, 裴咏萍, 李维林, 等. 红凤菜中黄酮类化合物的高效液相色谱与多级质谱联用分析[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2582-2583.
- [5] 陈剑. 红凤菜、白子菜的降血糖活性成分研究[D]. 南京: 中国药科大学中药学院, 2013: 156-179.
- [6] 蔡正宗, 陈中文, 杨正宪. 红凤菜所含两种主要花色苷之研究[J]. 食品科学(台北), 1995, 22(2): 149-160.
- [7] 陈剑, MANGELINCKX S, 李维林, 等. 红凤菜地上部分的化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(2): 114-116.
- [8] 吴立军. 天然药物化学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 173-216.

(责任编辑: 佟金凤)

欢迎订阅 2015 年《生态与农村环境学报》

《生态与农村环境学报》系国家环境保护部主管、国家环境保护部南京环境科学研究所主办的学术期刊, 是中文核心期刊(GCJC)、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊、中国科技核心期刊, 被 CSTPCD、CSSCI、CAJCED、CJFD、中国核心期刊(遴选)数据库、CA、CABI、BA、BP、BD、UPD、GeoBase、ZR、EM、Scopus、AGRIS、中国农业文摘、中国生物学文摘、中国学术期刊文摘、地球与环境科学信息网等收录。系全国优秀环境科技期刊和江苏省优秀期刊, 为中国期刊协会赠建全国百家期刊阅览室指定赠送期刊。

本刊宗旨: 及时报道生态与农村环境保护领域研究的动态、理论、方法与成果等。主要栏目: 研究报告、研究简报、研究方法、专论与综述、学术讨论与建议等。主要内容: 1) 区域环境与发展, 包括生态环境变化与全球环境影响、区域生态环境风险评价、环境规划与管理、区域生态经济与生态安全等;

2) 自然保护与生态, 包括自然资源保护与利用、生物多样性与外来物种入侵、转基因生物环境安全与监控、生态保护、生态工程与生态修复、有机农业与农业生态等; 3) 污染控制与修复, 包括污染控制原理与技术、土壤污染与修复、水环境污染与修复、农业废物综合利用与资源化、农用化学品(包括化学品)风险评价与监控等。主要读者对象: 从事生态学、环境科学、农学、林学、地学、资源科学等研究、教学、生产的科技人员, 相关专业的高等院校师生以及各级决策与管理人。

双月刊, A4 开本。国内外公开发售; 国内邮发代号 28-114, 每期定价 20.00 元; 国外由中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)负责发行, 国外发行代号 Q5688。如漏订, 可向本刊编辑部补订。地址: 江苏省南京市蒋王庙街 8 号(邮编 210042); 电话: 025-85287036, 85287052, 85287053; E-mail: ere@vip.163.com, bjb@nies.org; 网址: http://www.ere.ac.cn。