

液质联用测定薯蓣中黄酮类化合物的构成

罗丽萍^{1,2}, 高荫榆^{1,2,*}, 洪雪娥¹, 夏冬华¹

(1.食品科学与技术国家重点实验室(南昌大学), 江西 南昌 330047;

2.生物质转化教育部工程研究中心, 江西 南昌 330047)

摘要: 以我国广泛栽培的徐薯 18 薯蓣为原料, 中试设备水提多糖后的滤渣经醇提、AB-8 树脂精制获得薯蓣黄酮(FSPV)。利用 HPLC-ESI-MS 对 FSPV 进行分析, 从获得的质谱分子量信息初步鉴定出了 6 个主要的黄酮甙元。进一步结合 HPLC, 通过与标样保留时间对比, 确定 FSPV 中存在: 染料木素、木犀草素、槲皮素、刺芒柄花素、芹菜素、山奈酚 6 种黄酮甙元。其中, 首次报道薯蓣中存在染料木素和刺芒柄花素。

关键词: 高压液相色谱-电喷雾离子阱质谱; 高压液相色谱; 构成; 黄酮类化合物; 薯蓣

Component Analysis of Flavonoids from Sweet Potato Vines by HPLC-MS

LUO Li-ping^{1,2}, GAO Yin-yu^{1,2,*}, HONG Xue-e¹, XIA Dong-hua¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2.Engineering Research Center of Biomass Conversion, Ministry of Education, Nanchang 330047, China)

Abstract: To exploit the rich resources, sweet potato vines (SPV) of Xushu 18 were selected as raw materials since this kind was cultivated in China widely. The remains of the SPV after extracting polysaccharides by hot water were used to extract flavanoid by ethanol in pilot instrument. Then flavonoid from sweet potato vines (FSPV) were purified and obtained by AB-8 resin. The kinds of flavonoid aglycones in FSPV were identified by the molecular weight information from HPLC-ESI-MS. Comparing the retention time of FSPV with those of standard samples, it was determined that there are six aglycones in FSPV. They are genistein, leteolin, quercetin, formononetin, apigenin and kaempferol respectively. This is the first time to report genistein and formononetin existing in SPV.

Key words: HPLC-ESI-MS; HPLC; component analysis; flavonoids; sweet potato vines

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0052-04

黄酮类化合物(flavonoids)是自然界中以 C₆-C₃-C₆ 的方式构成的三环天然有机化合物, 在植物界分布很广泛, 是许多中药的功能性成分, 以其多方面的生物活性和药理作用在国内外备受关注和研究^[1-2]。

甘薯(*Ipomoea batatas* Lam.)为旋花科甘薯属植物, 薯蓣为其地上茎部分。我国是世界上甘薯栽培面积最大的国家, 薯蓣资源丰富, 年产干薯蓣达 3.5×10^{10} kg^[3-4], 但目前大部分都被废弃, 造成资源浪费和环境污染。薯蓣富含黄酮类化合物, 李文芳等^[5]测定甘薯叶中黄酮类化合物含量为 9.37%, 嫩茎含量为 3.07%, 明显高于一般植物。甘薯叶的营养保健功能与高黄酮类化合物含量可能有密切关系。为充分高效地利用我国巨大的薯蓣资源中蕴藏的黄酮类化合物, 不仅要能从薯蓣中有效地提

取, 还需要了解其化学构成, 以便在最终应用时更加有效、安全和可靠。

本研究以中试水提多糖后的薯蓣滤渣为原料, 采用乙醇提取法再从中试提取获得薯蓣粗黄酮, AB-8 树脂进一步精制, 制备出薯蓣黄酮(flavonoids from sweet potato vines, FSPV)。采用高压液相色谱-电喷雾离子阱质谱技术(HPLC-ESI-MS)获得分子量信息, 进而通过 HPLC 与标样保留时间对比, 确定 FSPV 中的黄酮甙元, 以期薯蓣中黄酮类化合物的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2007-11-30

基金项目: 江西省科技厅农业重大攻关项目(2003CB415100)

作者简介: 罗丽萍(1972-), 女, 副教授, 研究方向为食物资源(含生物质)的开发利用。E-mail: lluo2@126.com

* 通讯作者: 高荫榆(1940-), 女, 教授, 研究方向为食物资源(含生物质)的开发利用。E-mail: yygaoncu@163.com

徐薯 18 薯蔓于 10 月中下旬采自江西省农业科学院。

AB-8 树脂 南开大学化工厂；芦丁(BR) 中国药品生物制品检定所；槲皮素、山奈酚标样 中国科学院昆明植物所；染料木素、木犀草素、芹菜素、刺芒柄花素标样 陕西慧科植物开发有限公司；乙腈(色谱纯) Merck 公司；95% 食用酒精 洪都试剂厂；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

DBQ 多功能植物提取器 湖南省东泰医药机械制造有限公司；Agilent 1100 高效液相色谱仪[含光电二极管阵列检测器(DAD)、G2180AA(LC 化学工作站)、色谱柱 Spherisorb 5 μ m ODS(4.6mm \times 250mm)] 安捷伦公司；LC-MS Waters ZQ4000/2695 高效液相色谱-质谱联用仪(含二极管阵列检测器 PDA 2996、数据采集与分析软件 Masslynx data system) Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 FSPV 的制备

薯蔓切成 1~2cm 小段后晒干备用。在多功能植物提取器中先经热水提多糖，滤渣采用醇提法提取其中的黄酮类化合物，用 70% 乙醇提取，物料比为 1:30，85 $^{\circ}$ C 常压蒸煮一次，时间 4h，过滤，滤液为黄酮粗提液。粗提液经浓缩、离心、AB-8 树脂柱精制，获得薯蔓黄酮(FSPV)。采用以芦丁为对照品的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaNO_2 显色比色法，测得 FSPV 中总黄酮含量(纯度)为 72.5%。

FSPV 用旋转蒸发器干燥后备用，供试 FSPV 溶液包括原样和水解样两种。

原样制备：取 20mg FSPV 溶于 50ml 无水甲醇后，过 0.25 μ m 滤膜，5 μ l 直接进样分析；供试水解样制备：准确称取 FSPV 样品 20mg，置于 50ml 圆底烧瓶，加入甲醇-25% HCl (6:1)的水解液 35ml，放入 85 $^{\circ}$ C 恒温水浴槽内回流，水解 2h。用无水甲醇定容至 50ml 棕色容量瓶中，滤膜过滤，作为供试水解样。

1.3.2 FSPV 的 HPLC-ESI-MS 分析

利用 HPLC-ESI-MS 获得 FSPV 中黄酮类化合物的分子量信息分析 FSPV 的构成。

HPLC 分析条件为：温度为室温，紫外检测波长为 310nm；柱温为 30 $^{\circ}$ C；流速为 0.8ml/min，进样量为 5 μ l，光谱采集为 190~360。梯度洗脱条件见表 1。

MS 分析条件：采用 ESI 法。色谱柱流出组分进入质谱仪的流速为 10 μ l/min。扫描方式为正负离子扫描。扫描范围为 100~900amu。ESI⁺毛细管电压 3.0kV，锥孔电压 30V，离子源温度 150 $^{\circ}$ C，脱溶剂温度 350 $^{\circ}$ C；ESI⁻毛细管电压 2.6kV，锥孔电压 30V，离子源温度 150 $^{\circ}$ C，脱溶剂温度 350 $^{\circ}$ C。0.4ml/min 脱溶剂气流量 350L/h，锥孔气流量 50L/h，使用气体 N_2 。

1.3.3 FSPV 的 HPLC 分析

1.3.3.1 标样溶液的制备

精密称取已减压干燥至恒重的各标样，分别加无水乙醇定容于 5ml 容量瓶，即得标样溶液。

1.3.3.2 FSPV 的 HPLC 检测

柱子、HPLC 及梯度洗脱条件同 1.3.2，流动相 A 改为 0.1% H_3PO_4 。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Condition of gradient elutions

时间(min)	0	7	15	23	28	35	40
流动相 A: 0.1% 甲酸(%)	100	85	85	75	75	60	100
流动相 B: 乙腈(%)	0	15	15	25	25	40	0

2 结果与分析

2.1 FSPV 的 HPLC-ESI-MS 分析结果

2.1.1 文献已报道甘薯叶中的黄酮类化合物

HPLC-MS 技术的一级质谱能给出化合物的准分子离子峰，这样通过化合物的相对分子质量可以排除大部分化合物，大大缩小了鉴定化合物的范围。因此，检索化合物的相对分子质量是解析质谱、鉴定化合物的第一步。通过文献检索得知甘薯叶中已报道的黄酮类化合物及其相对分子质量。结合标样，即可较为准确地确定相应峰所代表化合物的结构类型，并由此判断薯蔓中所含的黄酮类化合物。

目前已有的对甘薯叶黄酮的研究报道，甘薯叶中有槲皮素、杨梅黄酮、芹菜素、木犀草素、山奈酚、商陆黄素、银槎苷、紫云英苷、鼠李柠檬素等黄酮类化合物^[6-10]。

2.1.2 FSPV 的 HPLC-MS 结果与分析

质谱图是将收集到的离子按质荷比和相对丰度的大小记录下来。纵坐标代表离子的相对丰度，横坐标代表质荷比(但对电荷离子而言即为离子的质量值)。对于化合物的结构鉴定来说，质谱最大的作用就是在图谱中给出了物质的分子离子峰，根据分子离子峰便很容易得知该化合物的分子量。

从图 1、2 可见，FSPV 原样及水解样中的主要成分能够达到基线分离，分析时间为 40min 左右。由于仪器的差异和采用的是梯度洗脱，与 2.2 中的 HPLC 图谱相比存在一定的差异。FSPV 水解之后存在大量的黄酮甙元，由于黄酮骨架结构连接的取代基中含有大量的羟基，所以以负离子源为离子方式得到的谱图效果最好，而正离子流色谱图效果不佳。

对出峰时间分别为 27.55、29.42、31.42、37.85min

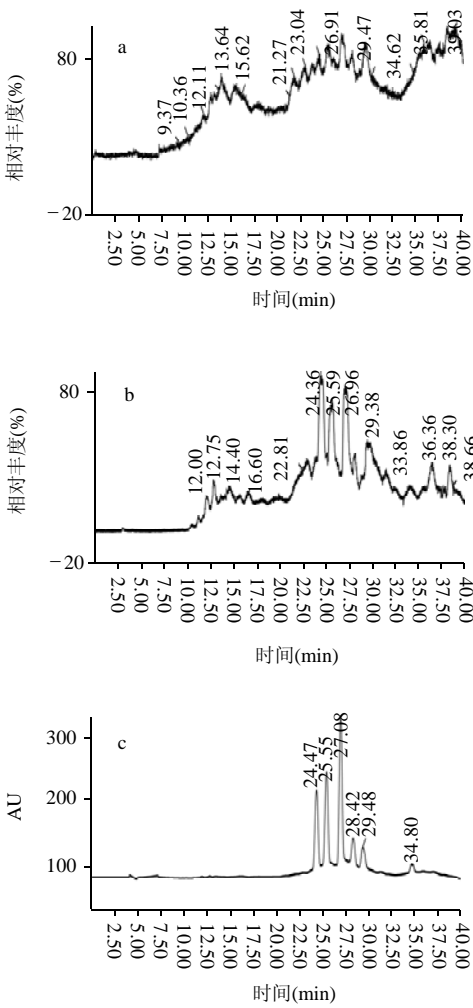


图1 FSPV 原样的高压液相色谱图(c)及总离子流色谱图(a、b)
Fig.1 HPLC of FSPV (c) and total ion chromatography (a and b)

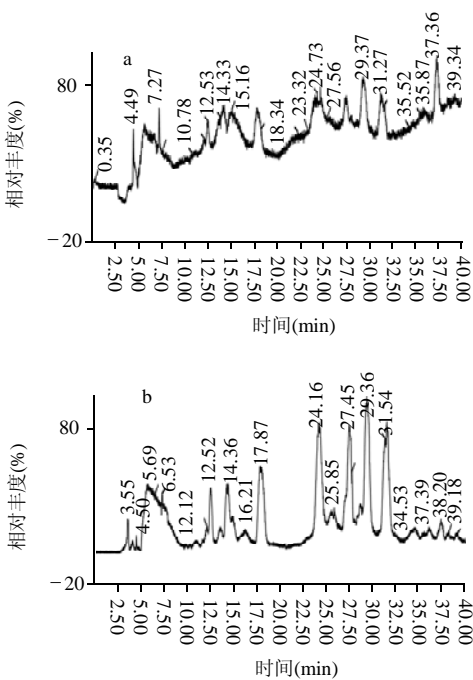


图2 FSPV 水解样的高压液相色谱图(c)及总离子流色谱图(a、b)
Fig.2 HPLC of FSPV hydrolyzed sample (c) and total ion chromatography (a and b)

的化合物进行质谱扫描。从质谱扫描结果可得知相应出峰时间物质的分子量分别为285.87、269.79、301.82、267.84。结合文献检索结果推断,具有上述分子量的物质可能是:山柰酚、木犀草素、染料木素、芹菜素、槲皮素、刺芒柄花素(表2)。

表2 从HPLC-ESI-MS获得分子量信息推断FSPV可能的黄酮甙元
Table 2 Flavonoid aglycones existing in FSPV according to results of HPLC-ESI-MS

黄酮甙元	分子量	质谱图中获得的分子量
山柰酚	286.23	285.87
木犀草素	286.23	285.87
染料木素	270.23	269.79
芹菜素	270.25	269.79
槲皮素	302.23	301.82
刺芒柄花素	268.26	267.84

2.2 FSPV 的 HPLC 分析结果

FSPV 原样及水解样经 HPLC 检测,结果见图3、4。可以看出,FSPV 经 HPLC 得到较好分离。FSPV 原样中主要有6个峰,而水解之后出现更多的峰。这些主要峰基本达到基线分离,分离峰窄而高、峰形尖锐、对称、基线较平衡、无漂移,各峰间保留时间差异明显。由此可见,HPLC 法能将 FSPV 中的各主要组成有效分离,为薯蓣黄酮纯化产品的质量评价提供重要依据。通过对照水解样品和标样的保留时间,发现样品中有6个峰与

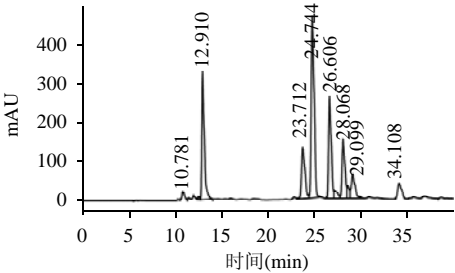


图3 FSPV 原样的 HPLC 图谱
Fig.3 HPLC spectrogram of FSPV original sample

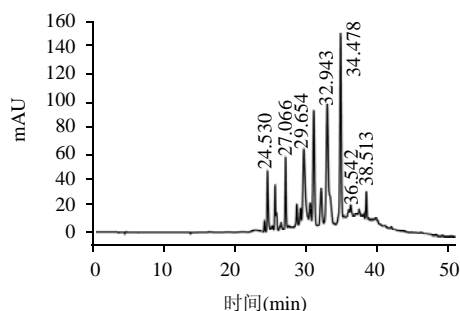


图4 FSPV水解样的HPLC图谱

Fig.4 HPLC spectrogram of FSPV hydrolyzed sample

表3 水解样品和6种标样的保留时间

Table 3 Retention time of hydrolyzed sample and six reference substances

标样	分子量	相对峰面积大小	标样保留时间 (min)	样品保留时间 (min)
木犀草素	286.23	2	31.079	31.046
槲皮素	302.23	3	32.028	32.061
染料木素	270.23	1	34.480	34.478
芹菜素	270.25	5	36.569	36.542
山奈酚	286.23	6	37.104	37.107
刺芒柄花素	268.26	4	38.516	38.523

6种标样的保留时间完全一致(表3)。结合 HPLC-ESI-MS 结果, 确定 FSPV 中存在这6种黄酮甙元。

3 讨论

本研究结果表明, 由中试综合提取工艺(先水提薯蔓中的多糖, 再醇提滤渣中的黄酮类化合物)获得的 FSPV 由木犀草素、染料木素、槲皮素、刺芒柄花素、芹菜素和山奈酚构成, 其中的染料木素和刺芒柄花素为薯蔓中首次报道。国内外学者对上述6种黄酮类化合物的理化性质、药理与临床都进行了大量的研究工作。已有研究表明, 槲皮素具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒、抗癌和抗突变等多种生理功能, 且是已知最强抗癌剂之一, 只要 mmol/L 浓度即可直接阻滞癌细胞增殖^[11-12]。染料木素具有极强的抗癌性、抗氧化性、抗菌和消炎等性能^[13]。木犀草素具有很强的抗氧化活性, 有关药理及临床实验的结果还表明, 木犀草素在体内具

有抗菌、抗病毒及降低血脂和胆固醇的作用^[14]。芹菜素也具有多种药理活性^[15]。刺芒柄花素有雌激素作用, 能增加小鼠等动物子宫的重量。山奈酚具有抗癌、抗炎、抗氧化、抗溃疡等作用^[1,16]。这些黄酮类化合物丰富的生理活性为 FSPV 所表现出来的多方面的药理作用提供了物质基础。研究结果对深度开发利用我国丰富的薯蔓资源具有积极意义。

参考文献:

- [1] GIULIA D C, NICOLA M, ANGELO A I, et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs[J]. Life Sci, 1999 (4): 337-353.
- [2] HORVATHOVA K, VACHALKOVA A, NOVOTNY L. Flavonoids as chemoprotective agents in civilization diseases[J]. Neoplasma, 2001(6): 435-41.
- [3] Food and Agriculture Organization. Production yearbook[R]. Rom: FAO, 2000.
- [4] VILLAREAL R L, ISON S C S, LIN S K. Use of sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaf tips as vegetable. II. Evaluation of yield and nutritive quality[J]. Br Poultry Sci, 1979, 15:117-122.
- [5] 李文芳, 田春莲, 黄美娥. 甘薯叶和茎中黄酮类化合物含量的初步测定[J]. 中国农学通报, 2005(4):119-121.
- [6] 刘法锦, 余幼兰, 彭源贵. 番薯藤化学成分的研究[J]. 中国中药, 1991 (9): 551-552.
- [7] 向仁德, 丁健辛, 韩英. 引种的巴西甘薯叶化学成分研究[J]. 中草药, 1994(4): 179-181.
- [8] 邹耀洪. 国产甘薯叶黄酮类成分研究[J]. 分析测试学报, 1996(1): 71-74.
- [9] 罗建光, 孔令义. 巴西甘薯叶黄酮类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2005(7): 516-518.
- [10] USDA. USDA database for the flavonoid content of selected foods[R]. 2003.
- [11] 俞一心, 戈升荣, 王桂珍. 槲皮素及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2003(12): 902-904.
- [12] 朱蕾, 何丽娅. 槲皮素抗癌作用的分子机制[J]. 武汉科技大学学报: 自然科学版, 2004(2): 194-197.
- [13] 张秀琦, 郑建斌, 高鸿. 抗癌新药染料木素的电化学行为及其应用研究[J]. 化学学报, 2001(4): 571-577.
- [14] 王宪楷. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 272-289.
- [15] 孙斌, 瞿伟青, 张晓玲. 芹菜素的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2004 (7): 531-534.
- [16] KUNTZ S, WENZEL U, DANIEL H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines[J]. Eur J Nutr, 1999, 38: 133-142.