

# 西南委陵菜黄酮的纯化及 HPLC-ESI-MS/MS 分析

陈欣, 姜子涛, 李荣

(天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

**摘要:** 通过静态吸附研究了七种大孔吸附树脂对西南委陵菜黄酮的纯化效果, 利用动态吸附考察了样品液的吸附流速和 pH 值、解吸剂 pH 值和乙醇浓度等影响因素。发现大孔吸附树脂 D101 对西南委陵菜黄酮的纯化效果最佳, 最佳条件为: 样品液 pH 4、吸附流速 2 BV/h、解吸剂 pH 8、解吸剂中乙醇浓度为 60%, 使纯度由 28.24% 提高到 46.60%。利用高效液相色谱电喷雾离子化串联二级质谱 (HPLC-ESI-MS/MS), 根据保留时间、分子离子、二级质谱碎片, 对西南委陵菜黄酮成分进行定性分析。通过多反应监控模式 (MRM) 监控特定碎片离子, 以及三种标准品的标准曲线, 分别利用外标法和内标法对黄酮进行了定量分析。西南委陵菜黄酮的主要成分及其含量为: 芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷酸 (6.66  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )、金丝桃苷 (2.39  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )、紫云英苷 (2.30  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )、野黄芩苷 (1.95  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )、木犀草苷 (0.44  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )、翻白叶苷 A (0.39  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) 和异牡荆素 (0.01  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )。

**关键词:** 西南委陵菜; 黄酮; 纯化; 成分分析; HPLC-ESI-MS/MS

文章编号: 1673-9078(2013)12-3031-3037

## Purification of Flavonoids from *Potentilla fulgens* and Identification by HPLC-ESI-MS/MS

CHEN Xin, JIANG Zi-tao, LI Rong

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

**Abstract:** Purification effects of seven kinds of macroporous resins through static adsorption on the flavonoids from *Potentilla fulgens* were studied. The factors including the flow rate, pH of the sample solution, ethanol concentration and pH of the desorbent were determined through dynamic adsorption. The results showed that macroporous resin D101 was the best to purify flavonoids from *Potentilla fulgens*. The optimal purifying conditions were as follows: the adsorption flow rate 2 BV/h, sample solution pH 4, desorbent pH 8, and 60% ethanol in the desorbent and the purity of flavonoids increased from 28.24% to 46.60%. The flavonoids were qualitatively identified using high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS), according to retention time, molecular ions, and fragment ions in MS/MS. Flavonoids quantitative analyzed by external and internal standard methods through multiple reactions monitoring (MRM) to monitor specific fragment ions and standard curves of three standard substances. The main components in the flavonoids and their contents were apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide (6.66  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), hyperoside (2.39  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), astragaloside (2.30  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), scutellarin (1.95  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), luteoloside (0.44  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), potentillifoside A (0.39  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), and isovitexin (0.01  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

**Key words:** *Potentilla fulgens*; flavonoids; purification; identification; high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry

西南委陵菜 (*Potentilla fulgens*) 蔷薇科委陵菜属植物, 在我国主要分布于湖北、安徽、四川、贵州、云南和广西等地。委陵菜的 Vc 含量非常丰富, 在民间常作为山野菜食用, 是药食两用植物。其性味苦涩, 具有清热解毒, 涩肠止泻, 凉血止血等功效<sup>[1]</sup>。关于

收稿日期: 2013-08-26

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目 (120029); 天津市高校科技发展基金项目 (20110608)

作者简介: 陈欣 (1984-), 男, 硕士, 研究方向: 食品添加剂

通讯作者: 姜子涛 (1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品添加剂

西南委陵菜的研究目前已有部分报道, 但主要集中在总黄酮的提取, 总黄酮的抗氧化活性、清除游离基活性及肿瘤活性等方面。而涉及西南委陵菜化学成分方面的研究甚少, 尚没有关于中国产西南委陵菜黄酮的化学成分及其含量方面的报道。翁贵英等<sup>[2]</sup>分别以乙醇和甲醇为提取剂提取了西南委陵菜根和茎叶部分的总黄酮, 发现 70% 乙醇溶液的提取率最高, 其根部总黄酮的含量明显高于茎叶部分。Jaitak 等<sup>[3]</sup>从喜马拉雅山委陵菜中分离出了两个新的三萜类化合物 (Potentene A 和 Potentene B) 和三个黄酮类化合物, 即二聚儿茶素、

表儿茶素和芦丁。ABTS、DPPH 和 FRAP 实验显示二聚儿茶素的抗氧化活性比表儿茶素更高<sup>[4]</sup>。Radhika 等<sup>[5]</sup>研究了西南委陵菜根的甲醇提取物对埃利希腹水瘤和乳腺癌细胞 (MCF-7) 的抗肿瘤活性, 并且和山柰酚、鞣酸进行了比较。西南委陵菜根的甲醇提取物能降低 MCF-7 癌细胞活性, 并提高携带埃利希腹水瘤细胞小鼠的存活率。前文<sup>[6]</sup>中作者从总体抗氧化能力、对 Fe<sup>2+</sup>诱发卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系的抑制能力、清除 OH· 能力、清除 O<sub>2</sub>· 能力、清除 DPPH· 能力五个方面评价了委陵菜中黄酮类化合物的活性。

本文探讨了利用大孔吸附树脂对西南委陵菜黄酮类化合物进行分离提纯, 从七种大孔吸附树脂中筛选出了最适宜的大孔吸附树脂并确定了黄酮的最佳纯化条件。利用高效液相色谱电喷雾离子化串联二级质谱 (HPLC-ESI-MS/MS) 对西南委陵菜黄酮的化学成分进行了鉴定并测定了其含量, 为西南委陵菜黄酮的进一步开发利用提供了理论依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验材料

西南委陵菜: 安徽省亳州市真源堂药业有限公司, 产地为河北, 洗净后烘干备用; AB-8、ADS-7、ADS-17、ADS-21、D101、NKA-9 和 S-8 七种大孔吸附树脂: 天津南开和成科技有限公司; 芦丁标准品 (分析纯): 北京化学试剂公司; 甲醇 (色谱纯, HPLC 用): 天津市科密欧化学试剂有限公司; 水 (HPLC 用): 杭州娃哈哈集团有限公司出品; 甲醇 (色谱纯, HPLC-MS 用): 德国 Merck; 甲酸 (色谱纯): 美国 Tedia Co. Inc.; 水 (HPLC-MS/MS 用): 广州屈臣氏食品饮料有限公司; 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

高效液相色谱仪: Agilent 1100Series; HPLC-ESI-MS/MS: Agilent 1200 series HPLC 系统和 Agilent 6410 Triple-quadrupole LC-MS/MS, 采用 ESI 离子源; 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C18 (250×4.6 mm, 5 μm); MAS-1 微波萃取仪: 上海新仪微波化学科技有限公司; U-3900 紫外可见分光光度计: 日本 Hitachi High-Technologies Corporation; 722N 可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司; RE52-86A 型旋转蒸发仪: 上海亚荣生化仪器厂; LGJ-10 冷冻干燥机: 北京松源华兴科技发展有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 大孔吸附树脂的筛选

#### 2.1.1 西南委陵菜黄酮样品液的制备和树脂的预处理

按 1:30 的料液比加入 70%(V/V)乙醇溶液为提取剂, 放入微波萃取仪中, 选择微波功率为 400 W, 在 60 °C 下微波萃取 5 min, 待提取液冷至室温后过滤, 滤液经石油醚萃取, 弃掉石油醚层, 再于旋转蒸发仪中减压蒸发至粗提液中无乙醇, 最后经冷冻干燥得到西南委陵菜粗黄酮的干燥粉末。称取适量的西南委陵菜粗黄酮干粉 (约 0.25 g), 用蒸馏水溶解并定容至 250 mL, 即得到浓度约为 0.3 mg/mL 西南委陵菜粗黄酮样品液。用芦丁作为标准品测定该样品液的准确浓度。

将大孔吸附树脂于 95% 乙醇中浸泡 24 h, 用蒸馏水洗至无醇味, 然后用 5% HCl 溶液浸泡 3 h, 用蒸馏水洗至流出液为中性, 用 5% NaOH 溶液浸泡 3 h, 用蒸馏水洗至流出液为中性, 最后用蒸馏水浸泡备用。

#### 2.1.2 树脂的静态吸附与解吸

称取经预处理后的七种大孔树脂各 1.0 g 分别置于 50 mL 具塞三角瓶中, 然后加入 20 mL 0.3 mg/mL 的样品液。室温下于水浴振荡器中振荡 24 h, 振荡频率为 130 r/min, 使之充分吸附, 分别扫描经七种大孔树脂吸附后的上清液在 200~500 nm 的吸收曲线, 并按公式(1)计算各树脂对西南委陵菜粗黄酮的吸附率。

将以上已吸附有西南委陵菜黄酮的七种树脂, 用大量蒸馏水洗净, 分别加入 60% 的乙醇 20 mL, 室温下于水浴振荡器中振荡 12 h, 振荡频率为 130 r/min, 使之充分解吸后分别扫描解吸液在 200~500 nm 的吸收曲线, 并按公式(2)计算解吸率。

$$\text{吸附率 } E = \frac{A_0 - A_a}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{解吸率 } D = \frac{A_d}{A_0 - A_a} \times 100\% \quad (2)$$

注: A<sub>0</sub> 为样品液在 270 nm 的吸光度, A<sub>a</sub> 为吸附后上清液在 270 nm 的吸光度, A<sub>d</sub> 为解吸液在 270 nm 的吸光度。

#### 2.1.3 静态吸附动力学曲线的测定

取 40 mL 浓度为 0.3 mg/mL 的样品液, 加入装有 2.0 g 经预处理后的 D101 大孔吸附树脂的具塞锥形瓶中, 室温下放入水浴振荡器中振荡, 振荡频率为 130 r/min, 每 15 min 测定一次上清液的吸光度, 按公式(3)计算吸附量, 以时间为横坐标, 吸附量为纵坐标绘制 D101 大孔树脂对样品液的静态吸附动力学曲线。

$$\text{吸附量 } Q(\text{mg/g}) = \frac{(A_0 - A_a) \times C_0 \times V}{A_0 \times W}$$

注: A<sub>0</sub> 为样品液在 270 nm 的吸光度, A<sub>a</sub> 为上清液在 270

nm 的吸光度,  $C_0$  为样品液浓度 (mg/mL),  $V$  为样品液体积 (mL),  $W$  为树脂质量 (g)。

## 2.2 西南委陵菜黄酮的动态法纯化

### 2.2.1 样品液流速的确定

准确称取按 2.1.1 方法预处理的 D101 树脂 6.0 g, 采用湿法装柱。将浓度为 0.3 mg/mL 的样品液分别以 1、2 和 3 BV/h 流速通过树脂柱, 每间隔 4 mL 收集一次黄酮流出液, 通过测定流出液的吸光度的值, 来确定树脂吸附的泄露点。当黄酮流出液的吸光度为样品液吸光度的 1/10 时即达到了泄漏点<sup>[7]</sup>。以泄漏点出现最迟的吸附流速为最佳上样流速。

### 2.2.2 样品液的 pH 值确定

将浓度为 0.3 mg/mL 的样品液的 pH 值分别调为 2、4 和 6, 以 2 BV/h 的流速通过树脂柱中, 每间隔 4 mL 收集一次黄酮流出液, 测定其吸光度, 以泄漏点出现最迟的样品液的 pH 值为最佳上样 pH 值。

### 2.2.3 解吸剂 pH 值的确定

取 20 mL 浓度为 0.3 mg/mL、pH 为 4 的样品液以 2 BV/h 通过树脂柱, 然后用大量蒸馏水洗柱, 分别用 pH 值为 4、6、8 和 10 的 60% 乙醇溶液解吸, 流速为 2 BV/h, 间隔 2 mL 收集黄酮解吸液, 测定其吸光度, 得到解吸剂体积与解吸剂 pH 值的关系曲线。其峰面积与解吸量成正比, 按公式(4)计算解吸率, 以能获得最大动态解吸率的 pH 值为最佳条件。

$$\text{动态解吸率 } DD = \frac{\sum_{i=1}^m A_{di} \cdot V_{di}}{A_0 \cdot V_0 - A_e \cdot V_e} \quad (4)$$

注:  $A_{di}$  为每次收集的解吸液在 270 nm 下的吸光度,  $V_{di}$  为每次收集的解吸液体积 (mL),  $A_0$  为样品液在 270 nm 的吸光度,  $V_0$  为通过树脂柱的样品液体积 (mL),  $A_e$  为流出液在 270 nm 的吸光度,  $V_e$  为流出液体积 (mL)。

### 2.2.4 解吸剂乙醇浓度的确定

取 20 mL 浓度为 0.3 mg/mL、pH 为 4 的样品液以 2 BV/h 通过树脂柱, 然后用大量蒸馏水洗柱, 用 pH 值为 8 的浓度为 40%、50%、60% 和 70% 的乙醇溶液解吸, 流速为 2 BV/h, 直至解吸完全, 分别收集用不同浓度乙醇溶液解吸的解吸液, 扫描其在 200~500 nm 下的吸收曲线。

## 2.3 HPLC 检测纯化效果

按 2.2 的方法, 在最佳动态吸附和解吸条件下纯化西南委陵菜粗黄酮, 将收集的解吸液除去乙醇后冷冻干燥, 得纯化的西南委陵菜黄酮粉末。用 30% 甲醇溶解西南委陵菜黄酮粉末并稀释至 0.1 mg/mL, HPLC

色谱柱规格为 Agilent Zorbax SB-C18 (250×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)、水(B)和 5% 乙酸水溶液(C), 流速为 0.8 mL/min, 进样量为 20 μL, 梯度洗脱条件为 0→10 min: 30→80% A; 10→35 min: 80→85% A; 35→45 min: 85→95% A; 0→40 min: 10% C; 40→45 min: 10→5% C。检测波长为 270 nm。

## 2.4 西南委陵菜黄酮纯度计算

采用分光光度法绘制标准芦丁曲线。分别称取 0.1 g 纯化前后的西南委陵菜黄酮粉末, 用 30% 乙醇溶解并定容至 100 mL, 并对纯化前后的西南委陵菜黄酮溶液进行显色反应, 计算纯化前后西南委陵菜黄酮的纯度。

## 2.5 HPLC-ESI-MS/MS 成分分析

### 2.5.1 定性分析

使用 Zorbax SB-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm), 在 30 °C 下, 以两相、0.3 mL/min 的流速进行分析。流动相为 0.1:99.9 (V/V) 的甲酸/甲醇溶液 (A) 和 0.1:99.9 (V/V) 的甲酸/水 (B)。溶液的梯度为 0→10 min: 50→72% A, 10→25 min: 72% A。离子源 [ESI(-)] 的工作条件为毛细管电压 4 kV, 离子源温度 350 °C, 氮气 10 L/min (纯度 >99%) 被用作雾化气和碰撞气。西南委陵菜黄酮溶液的浓度为 50 μg/mL, 进样量为 5 μL; 混合标准品中包含 4 μg/mL 木犀草苷、8 μg/mL 金丝桃苷和 4 μg/mL 紫云英苷, 进样量为 5 μL。根据质谱碎片并对比相关文献, 进行化合物结构的鉴定。

### 2.5.2 定量分析

在二级质谱中, 通过多反应监控模式 (MRM) 监控特定子离子进行西南委陵菜黄酮的定量分析。外标法被用于木犀草苷、金丝桃苷和紫云英苷的定量。在用外标法定量时, 用流动相对标准品进行一系列的稀释, 得到不同浓度的标准品的溶液。以标准品溶液的浓度为横坐标, 以标准品的峰面积为纵坐标, 建立标准曲线。内标法被用于异牡荆素、野黄芩苷、芹黄素-7-O-β-D-葡萄糖苷酸和翻白叶苷 A 的定量。通过比较它们与相邻的化合物的峰面积, 得出其含量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 大孔吸附树脂的筛选

#### 3.1.1 树脂的静态吸附与解吸

根据方法 2.1.2, 扫描七种大孔吸附树脂吸附样品液后上清液和解吸液在 200~500 nm 的吸收曲线, 见图 1 和图 2。

由图 1 可知, 强极性树脂 S-8 和 ADS-7 吸附能力

最强。因为黄酮属于多羟基酚类化合物，具有一定的极性和亲水性，又能生成氢键，与树脂具有较强的作用力。

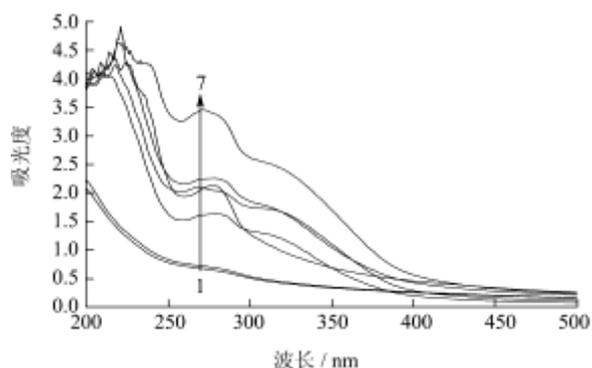


图1 七种树脂吸附样品液后的上清液吸收曲线

Fig.1 Absorption curves of the sample solution after adsorbed by seven kinds of macroporous resins

注：1→7 分别为 S-8、ADS-7、AB-8、ADS-21、NKA-9、D101 和 ADS-17。

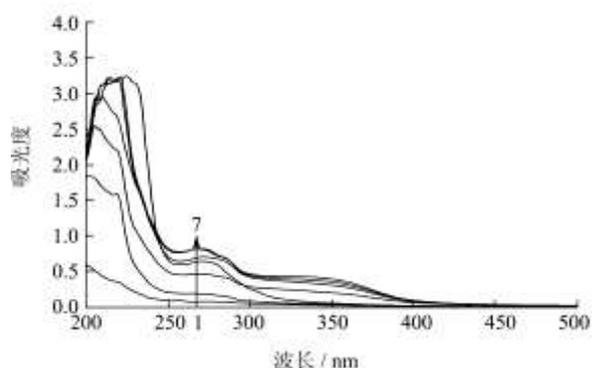


图2 七种大孔树脂乙醇解吸液的吸收曲线

Fig.2 The absorption curves of ethanol desorption solution from seven kinds of macroporous resins

注：1→7 分别为 ADS-21、ADS-7、ADS-17、S-8、NKA-9、AB-8 和 D-101。

表1 七种大孔树脂对西南委陵菜的吸附率与解吸率

Table 1 The adsorption and desorption rates of seven kinds of macroporous resins for *P. fulgens* flavonoids

大孔树脂	极性	比表面积 / (m <sup>2</sup> /g)	平均孔径 / nm	吸附率 / %	解吸率 / %
AB-8	非极性	450~530	13~14	76.61±2.23	76.94±3.00
ADS-7	强极性	≥100	25~30	89.44±2.49	15.14±1.55
ADS-17	中极性	90~150	25~30	49.91±1.60	68.05±2.72
ADS-21	极性	80~100	15~20	70.21±2.24	8.04±1.32
D101	非极性	600~700	12~16	67.47±1.87	88.11±3.16
NKA-9	极性	170~250	15.5~16.5	69.47±2.27	73.48±2.99
S-8	强极性	320~420	28~30	90.09±2.61	52.08±2.02

图2表明，在七种大孔吸附树脂中，D101大孔树脂的乙醇解吸液的吸光度最高，说明在60%乙醇条件

下，D101大孔树脂对其所吸附的西南委陵菜黄酮的保持力最小，容易被解吸下来。按公式(1)和(2)计算各大孔树脂的吸附率与解吸率，结果见表1。

由表1可知，在相同的静态条件下，D101大孔树脂具有较好的纯化性能。故综合图1、图2和表1，选用D101型大孔树脂对西南委陵菜粗黄酮进行纯化。

### 3.1.2 静态吸附动力学曲线

根据方法2.1.3，得到D101树脂吸附量与吸附时间的关系，结果见图3。

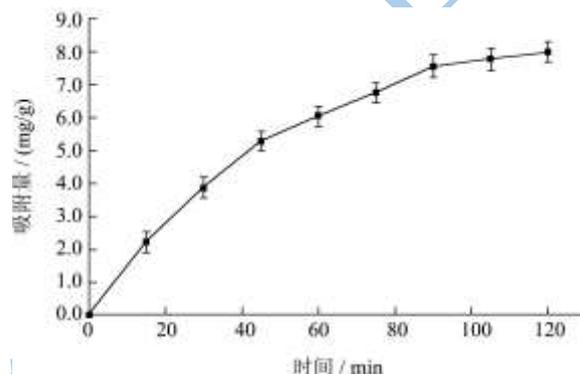


图3 D101大孔树脂对西南委陵菜黄酮的静态吸附动力学曲线

Fig.3 Kinetic curve of static adsorption of resin D101 for *P. fulgens* flavonoids

由图3可知，在0~90 min时间内，树脂的吸附量随时间而增大，但吸附量的变化随时间而减小，90 min以后吸附达到基本平衡，此时其对样品液的吸附量为8.0 mg/g树脂。

## 3.2 西南委陵菜黄酮的动态纯化

### 3.2.1 样品液流速对大孔树脂吸附的影响

根据方法2.2.1，得到大孔树脂对样品液吸附效果与吸附流速的关系，结果见图4。

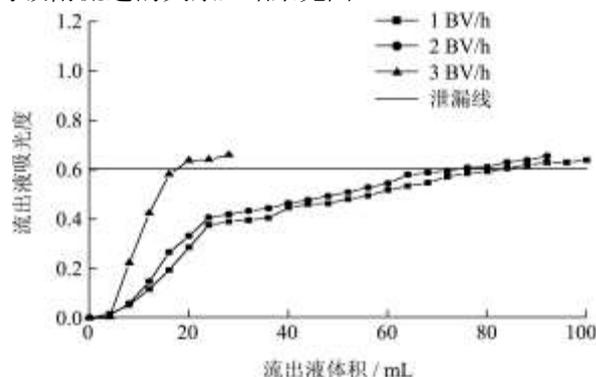


图4 流速对D101树脂吸附的影响

Fig.4 The effect of flow velocity on the adsorption of resin D101

由图4可知，1、2和3 BV/h不同流速的泄漏点分别出现在84、75和18 mL，从树脂吸附能力和时间考虑，选择上样流速为2 BV/h。流速的增加对被吸附物在树脂上的动态吸附能力有负面影响，因为被吸附分

子没有充分的时间经历与树脂表面的活性部位的相互作用。同时,在较低的流速下,能获得最佳吸附效果,也是因为在样品液中具有更好的溶质扩散。

### 3.2.2 样品液 pH 值对大孔树脂吸附的影响

根据方法 2.2.2,得到大孔树脂对样品液吸附效果与样品液 pH 的关系,结果见图 5。

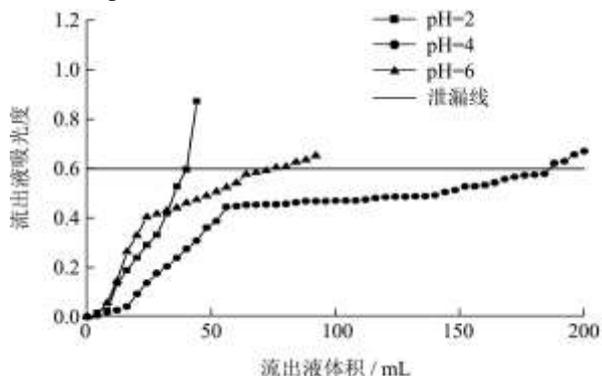


图 5 pH 值对 D101 树脂吸附的影响

Fig.5 The effect of pH on the adsorption of resin D101

由图 5 可知,样品液在 pH 为 4 时比 pH 为 2、6 的吸附能力强,这是由于当样品液酸性的增大,西南委陵菜黄酮会与溶液中的氢离子结合形成伴盐,从而不利于大孔树脂的吸附;当样品液接近碱性时,氢键作用减弱,如此造成了较低的吸附能力。因此选择 pH=4 作为样品液最佳 pH 值。

### 3.2.3 解吸剂 pH 值对西南委陵菜黄酮解吸的影响

根据方法 2.2.3,得到大孔树脂 D101 对西南委陵菜黄酮解吸液体积与解吸剂 pH 值的关系,结果见图 6。

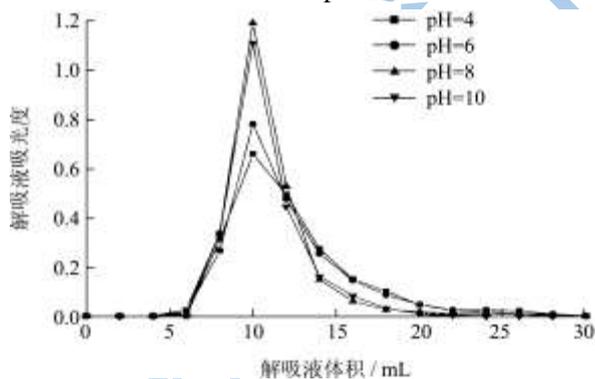


图 6 解吸剂 pH 值对西南委陵菜黄酮解吸的影响

Fig.6 The effect of pH on the desorption of *P. fulgens*

由图 6 可知,当解吸剂 pH 值为 8 和 10 时,西南委陵菜黄酮解吸曲线峰高较大,峰宽较小,拖尾不明显。如上 3.2.2 所述,碱性环境造成氢键作用减弱,从而黄酮易被解吸。由公式(4)计算得到解吸剂 pH 值为 4、6、8 和 10 时,动态解吸率分别为 86.69%、89.20%、97.61% 和 91.66%。因此选择 pH=8 作为最佳解吸剂 pH 值。

### 3.2.4 解吸剂乙醇浓度对西南委陵菜黄酮解吸的影响

根据方法 2.2.4,得到不同乙醇浓度的解吸液吸收曲线,见图 7。

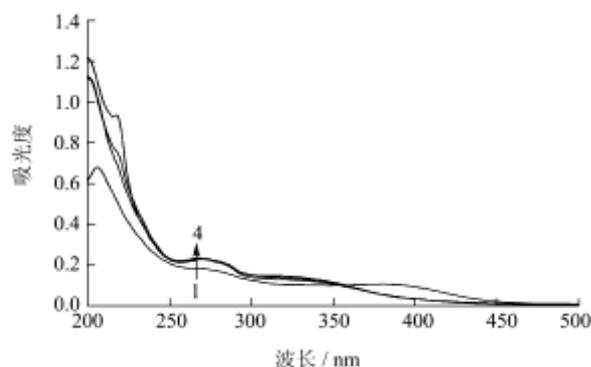


图 7 不同乙醇浓度的解吸液吸收曲线

Fig.7 The absorption curves of the desorption solutions desorbed by different ethanol concentrations

注: 1→4 分别为 40%、50%、60%、70% 乙醇的解吸剂。

由图 7 可知,随着乙醇浓度的增大,从 D101 大孔树脂解吸出的西南委陵菜黄酮越多,当乙醇浓度为 40% 时,吸收曲线在 380 nm 处出峰;当乙醇浓度为 70% 时,峰形在 220 nm 出现变化。这表明,无论乙醇浓度过大还是过小,都会解吸出杂质。选择 60% 作为最佳解吸剂乙醇浓度。因最佳解吸剂乙醇浓度 60% 与 2.2.3 实验所用解吸剂乙醇浓度一致,可由图 6 确定解吸剂用量为 20 mL。

### 3.3 HPLC 结果分析

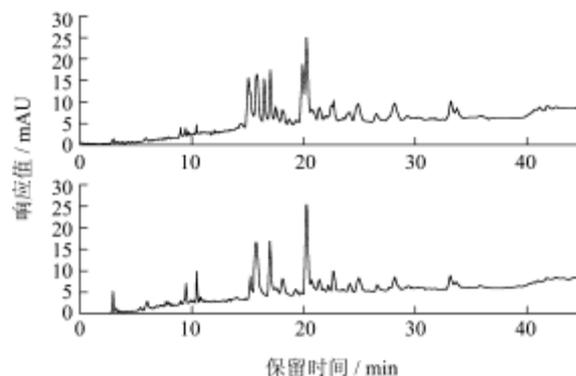


图 8 经 D101 大孔树脂纯化前(上图)后(下图)在 270nm 下西南委陵菜黄酮的 HPLC 图

Fig.8 HPLC chromatograms of *P. fulgens* flavonoids before (upper) and after (lower) purified by resin D101 monitored at 270 nm

按 2.3 方法进行 HPLC 分析,得到西南委陵菜黄酮经 D101 大孔树脂纯化前后在 270 nm 下的色谱,结果见图 8。

由图 8 可知,在西南委陵菜黄酮的吸收波长 270

nm 下, 纯化以后出来的物质的响应值明显增加, 特别是保留时间在 11 min 之前, 西南委陵菜黄酮纯化后的峰高和峰面积为纯化前的 2~3.5 倍。说明 D101 吸附树脂可以用来纯化西南委陵菜中的黄酮类化合物。

### 3.4 西南委陵菜黄酮纯度计算

按 2.4 的方法得到芦丁标准曲线方程, 吸光度与溶液浓度的关系为得线性回归方程  $A=12.660C+0.0013$  ( $r^2=0.9999$ )。计算得纯化前后西南委陵菜黄酮粉末的纯度由 28.24% 提高到 46.60%, 进一步证明 D101 大孔树脂纯化了西南委陵菜黄酮。

### 3.5 HPLC-ESI-MS/MS 成分分析

#### 3.5.1 定性分析

根据 2.5.1 的方法, 得到西南委陵菜黄酮和混合标准品的总离子流图。

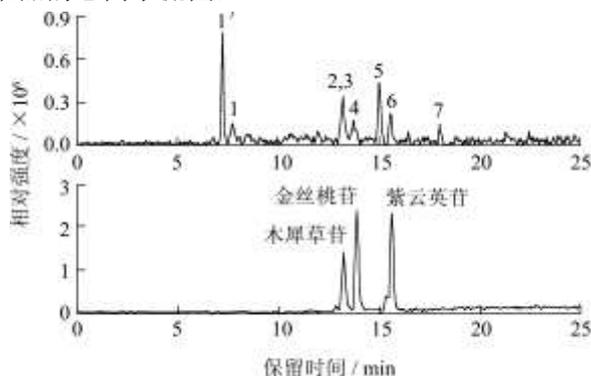


图 9 西南委陵菜黄酮(上)和混合标准品(下)的总离子流图

Fig.9 Total ion chromatograms of *P. fulgens* flavonoids (upper) and mixed standard substances (lower)

在相同的分析条件下, 每种标准品具有与样品中对应化合物相同的保留时间、分子离子和二级质谱碎片, 通过分子离子、碎片离子与相关文献鉴定其它没有标准品的峰。峰 1 的保留时间为 7.768, 分子离子为 431.2 m/z, 碎片离子为 88.9 和 282.9 m/z, 根据文献<sup>[8]</sup>峰 1 可能为异牡荆素。峰 2 和峰 3 为同一时间出现的两个峰, 保留时间为 13.235, 包含两个分子离子, 分别为 447.4 和 461.1 m/z, 前者的碎片离子为 284.7 m/z, 根据文献<sup>[9]</sup>可能为木犀草苷; 后者的碎片离子为 284.7 m/z, 根据文献<sup>[10]</sup>可能为野黄芩苷。峰 4 的保留时间为 13.783, 分子离子为 463.4 m/z, 碎片离子为 299.8 m/z, 根据文献<sup>[11]</sup>峰 4 可能为金丝桃苷。峰 5 的保留时间为 15.063, 分子离子为 445.2 m/z, 碎片离子为 112.9、174.5 和 269.0 m/z, 根据文献<sup>[12]</sup>峰 5 可能为芹黄素-7-O-β-D-葡萄糖苷酸。峰 6 的保留时间为 15.610, 分子离子为 447.4 m/z, 碎片离子为 254.6、283.3 m/z, 根据文献<sup>[13]</sup>峰 6 可能为紫云英苷。峰 7 的保留时间为 18.066,

分子离子为 593.3 m/z, 碎片离子为 285.1、446.8 m/z, 根据文献<sup>[14]</sup>峰 7 可能为翻白叶苷 A。峰 1' 的保留时间为 7.228, 分子离子为 248.9 m/z, 碎片离子为 68.8、110.6、113.0 和 154.5 m/z, 因没有更多文献资料而不能确定是何种化合物。

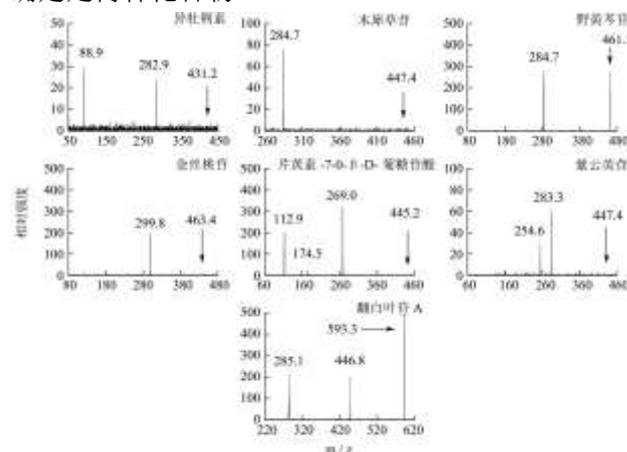


图 10 西南委陵菜中黄酮类化合物的碎片离子质谱图

Fig.10 Mass spectra of fragment ions of *P. fulgens* flavonoids

注: → 处为分子离子。

结果表明西南委陵菜中的黄酮类化合物包括异牡荆素、木犀草苷、野黄芩苷、金丝桃苷、芹黄素-7-O-β-D-葡萄糖苷酸、紫云英苷和翻白叶苷 A。

#### 3.5.2 定量分析

表 2 西南委陵菜黄酮的标准曲线和含量

Table 2 The standard curves and contents of the flavonoids from

<i>P. fulgens</i>				
峰号	黄酮成分	标准曲线	$r^2$	含量/( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
1	异牡荆素			$0.01 \pm 0.00^a$
2	木犀草苷	$y=1.8 \times 105x+12090$	0.9954	$0.44 \pm 0.01$
3	野黄芩苷			$1.95 \pm 0.04^a$
4	金丝桃苷	$Y=68408x+3161$	0.9976	$2.39 \pm 0.06$
5	芹黄素-7-O-β-D-葡萄糖苷酸			$6.66 \pm 0.17^a$
6	紫云英苷	$y=89641x+9861$	0.9988	$2.30 \pm 0.06$
7	翻白叶苷 A			$0.39 \pm 0.01^a$

注: a 为内标法。

使用 2.5.1 的分析条件, 通过 MRM, 绘制木犀草苷、金丝桃苷和紫云英苷的标准曲线, 根据与相邻的化合物比较异牡荆素、野黄芩苷、芹黄素-7-O-β-D-葡萄糖苷酸和翻白叶苷 A 的峰面积, 得出其含量。西南委陵菜黄酮的含量见表 2。由表 2 可知, 西南委陵菜中的主要黄酮及其含量为芹黄素-7-O-β-D-葡萄糖苷酸 ( $6.66 \mu\text{g}/\text{mg}$ )、金丝桃苷 ( $2.39 \mu\text{g}/\text{mg}$ )、紫云英苷 ( $2.30 \mu\text{g}/\text{mg}$ )、野黄芩苷 ( $1.95 \mu\text{g}/\text{mg}$ )、木犀草苷 ( $0.44 \mu\text{g}/\text{mg}$ )、翻白叶苷 A ( $0.39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) 和异牡荆素 ( $0.01$

μg/mg)。

#### 4 结论

在选择七种大孔树脂中, D101 大孔树脂是比较理想的树脂, 对西南委陵菜黄酮纯化效果较好。该方法可以将西南委陵菜粗黄酮的含量由 28.24% 提高到 46.60%。利用 HPLC-ESI-MS/MS 结合相关文献, 对西南委陵菜黄酮成分进行定性和定量分析, 发现西南委陵菜中的主要黄酮成分为芹黄素-7-O-β-D-葡萄糖苷酸、金丝桃苷、紫云英苷和野黄芩苷。

#### 参考文献

- [1] 钟颖, 瞿显友, 张永东. 湘西委陵菜属药用植物资源[J]. 中国民族民间医药杂志, 2004, 71: 344-345  
Zhong Y, Qu X, Zhang Y. The resources of *Potentilla* as medicinal plants in western Hunan [J]. Chinese Journal of Ethnopharmacology and Ethnopharmacology, 2004, 71: 344-345
- [2] 翁贵英, 李金辉. 不同溶剂法对西南委陵菜根、叶的总黄酮含量测定[J]. 六盘水师范高等专科学校学报, 2005, 17(6): 8-9  
Weng G, Li J. Determination of total flavonoid in different solvent of roots and leaves in *Potentilla fulgens* [J]. Journal of Liupanshui Teachers College, 2005, 17(6): 8-9
- [3] Jaitak V, Kaul VK, Himlata, et al. New hopane triterpenes and antioxidant constituents from *Potentilla fulgens* [J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(10): 1561-1566
- [4] Jaitak V, Sharma K, Kalia K, et al. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: an alpine plant of western Himalaya [J]. J Food Compos Anal, 2010, 23: 142-147
- [5] Radhika M, Ghoshal N, Chatterjee A. Comparison of effectiveness in antitumor activity between flavonoids and polyphenols of the methanolic extract of roots of *Potentilla fulgens* in breast cancer cells [J]. Journal of complementary & integrative medicine, 2012, 9(1): 24
- [6] 周媛, 李荣, 姜子涛. 食用委陵菜黄酮的抗氧化性及清除自由基能力研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 17: 102-105  
Zhou Y, Li R, JIANG Z. Investigation of antioxidant activities and free radical scavenging of edible *Potentilla flavones* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 17: 102-105
- [7] Fu Y, Zu Y, Li S, et al. Separation of 7-xylosyl-10-deacetyl paclitaxel and 10-deacetyl baccatin III from the remainder extracts free of paclitaxel using macroporous resins [J]. J Chromatogr A, 2008, 1177: 77-86
- [8] Liu W, Kong Y, Zu Y, et al. Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeon pea leaves and its medicinal product using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217: 4723-4731
- [9] Beara IN, Lesjak MM, Orcic DZ, et al. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, antiinflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. [J]. LWT - Food Science and Technology, 2012, 47: 64-70
- [10] Qu J, Wang Y, Luo G. Determination of scutellarin in *Erigeron breviscapus* extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2001, 919: 437-441
- [11] Plazonic A, Bucar F, Males Z, et al. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycapnos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry [J]. Molecules, 2009, 14: 2466-2490
- [12] Yin L, Shi M, Sun Y, et al. A liquid chromatography - tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of five components of *Ixeris sonchifoliain* (Bge.) Hance in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2013, 931: 12-16
- [13] He J, Feng Y, Ouyang H, et al. A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves [J]. J Pharmaceut Biomed, 2013, 84: 189-195
- [14] Song C, Huang L, Rong L, et al. Anti-hyperglycemic effect of *Potentilla discolor* decoction on obese-diabetic (Ob-db) mice and its chemical composition [J]. Fitoterapia, 2012, 83: 1474-1483