

## LC-MS 导向研究烟根中芦丁、绿原酸的分离及含量测定<sup>①</sup>

杨彩艳<sup>1,2</sup>, 莫丽娟<sup>3</sup>, 陶秋李<sup>1</sup>, 龙清梅<sup>1</sup>, 李丹<sup>1</sup>, 李艳芬<sup>1</sup>, 韦妮<sup>1</sup>

[1. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000 E-mail: yjsyangcaiyan@163.com;

2. 广西高校右江流域地道中药材(民族医药)研究重点实验室, 广西 百色 533000;

3. 广西壮族自治区东兰县人民医院, 广西 东兰 547400]

**摘要:** **目的** 研究烟根中活性化合物芦丁和绿原酸的分离方法及含量。 **方法** 烟根乙醇-水提取物浓缩后经乙酯萃取得乙酯组分和水层浓缩液, 水层浓缩液经大孔吸附树脂柱层析得 90% 乙醇组分和 50% 乙醇组分。使用液质联用(LC-MS)技术分析以上三个组分化学成分, 利用硅胶、MCI GEL CHP 20P 等柱色谱对有效成分进行分离, 利用 HPLC 测定有效成分的含量。 **结果** 烟根 50% 乙醇组分含有芦丁和绿原酸, 90% 乙醇组分仅含有芦丁, 乙酯组分两者皆无; 芦丁和绿原酸在烟根中总含量分别为 151 mg/kg 和 2.67 mg/kg。 **结论** 芦丁和绿原酸的极性较大, 存在于大极性的组分中。

**关键词:** LC-MS; 绿原酸; 芦丁; 烟根

**中图分类号:** S572; Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)01-0014-03

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-5817.2017.01.004

## LC-MS guided isolation and content determination of rutin and chlorogenic acid from the roots of *Nicotiana tabacum*

Yang Caiyan<sup>1,2</sup>, Mo Lijuan<sup>3</sup>, Tao Qiuli<sup>1</sup>, Long Qingmei<sup>1</sup>, Li Dan<sup>1</sup>, Li Yanfen<sup>1</sup>, Wei Ni<sup>1</sup>

[1. *The Pharmaceutical School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China* E-mail: yjsyangcaiyan@163.com; 2. *The Key Laboratory of Guangxi Colleges and Universities for Studying Traditional Chinese Medicinal Herbs (Folk Medicine) in Youjiang River Drainage Area, Baise 533000, Guangxi, China*; 3. *The People's Hospital of Donglan County, Donglan 547400 Guangxi, China*]

**Abstract:** **Objective** To investigate the isolation method and the content of active compounds of rutin and chlorogenic acid in *Nicotiana tabacum* roots. **Methods** The concentrated solution of the roots of *Nicotiana tabacum* extracted with EtOH-H<sub>2</sub>O were partitioned between EtOAc and H<sub>2</sub>O. The extract liquid of EtOAc was evaporated to dryness under low pressure to afford the EtOAc fraction. The extract liquid of H<sub>2</sub>O was subjected to D101 macroporous adsorption resin column chromatography (CC) to produce the EtOH-H<sub>2</sub>O (90 : 10) fraction and the EtOH-H<sub>2</sub>O (50 : 50) fraction. The chemical constituents of the above three fractions were analyzed by LC-MS, the active compounds were isolated by silica gel and MCI GEL CHP 20P column chromatography methods and the contents of active compounds were determined by HPLC method. **Results** In the roots of *Nicotiana tabacum*, the EtOH-H<sub>2</sub>O (50 : 50) fraction contained rutin and chlorogenic acid, the EtOH-H<sub>2</sub>O (90 : 10) fraction only contained rutin, and the EtOAc fraction did not contain these two compounds. The total content of rutin and chlorogenic acid were 151 mg/kg and 2.67 mg/kg in the roots of *Nicotiana tabacum*, respectively. **Conclusion** The polarities of rutin and chlorogenic acid are fairly strong, only exist in high polar fractions.

**Key words:** LC-MS; chlorogenic acid; rutin; the roots of *Nicotiana tabacum*

作为一种重要的经济作物,烟草(*Nicotiana tabacum* L.)的化学成分非常复杂,目前从烟草中鉴定的化学成分达 2549 种之多,烟草中化学成分涉及的骨架类型主要有萜类、黄酮、生物碱以及绿原酸类似物

等<sup>[1-5]</sup>。之前的研究表明烟根提取物 50% 乙醇组分具有很强的抗氧化活性<sup>[6]</sup>。为了阐述抗氧化活性成分,我们使用 LC-MS 技术对烟根不同组分的化学成分进行检测分析,使用硅胶等柱色谱分离方法从烟根的

① 基金项目:广西高校科学技术研究项目重点项目(KY2015ZD095);右江民族医学院博士引进科研启动课题[右医科学(2014)2号]

50%乙醇组分分离得到化合物芦丁和绿原酸,并用高效液相色谱法分析其组分中化合物芦丁和绿原酸的含量。

## 1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 烟草于 2015 年 6 月 16 日采自广西乐业县,食用酒精(广西百色甘化股份有限公司),D101-大孔吸附树脂(天津浩聚树脂科技有限公司),薄层色谱硅胶、柱层析硅胶(200-300 目)(青岛海洋化工厂分厂),MCI GEL CHP 20P(日本三菱化学公司),RP-C<sub>18</sub>半制备柱(5 μm, 10.0 × 250 mm)和 RP-C<sub>18</sub>分析柱(5 μm, 4.6 × 150 mm)(YMC,Japan)。显色剂为(10%)的硫酸乙醇溶液,芦丁和绿原酸对照品(纯度 95%)由本课题组分离纯化获得。

1.2 仪器 LC-MS-IT-TOF 质谱仪(Shimadzu, Kyoto, Japan),Bruker DRX-500 型超导核磁共振仪测定(Bruker, Bremerhaven, Germany),制备液相色谱仪(江苏汉邦科技有限公司)、高效液相色谱仪(LC-20A)(岛津,Japan),RE5220 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),B-100 旋转蒸发仪(步琦实验室设备公司),T6-1650F 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),FA1204B 电子分析天平(上海精科天美仪器有限公司),SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),DLSB-5/10 低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司),ZF-1 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司)。

## 1.3 方 法

1.3.1 提取分离 新鲜烟根(15 kg)依次用 90%乙醇和 50%乙醇在室温下分别浸提 3 次,每次浸泡 3 d。把所有浸提液合并减压浓缩到 6 L,浓缩液用乙酯萃取 3 次。乙酯萃取液回收后得到乙酯组分(31 g)。水组分浓缩后通过大孔吸附树脂柱层析,依次用水、50%乙醇、90%乙醇洗脱,把 50%乙醇和 90%乙醇洗脱液回收得到 50%乙醇组分 52 g 和 90%乙醇组分 5 g。以上三个组分通过 LC-MS-IT-TOF 分析。50%乙醇组分 LC-MS 分析结果,见图 1。在 50%乙醇组分中从 [M - H]<sup>-</sup> 离子(m/z 687.6030 和 353.0896)处分别获得分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub> 和 C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub> 的化合物;在 90%乙醇组分中从 [M - H]<sup>-</sup> 离子(m/z 687.6032)处获得分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub> 的化合物。50%乙醇组分经硅胶柱层析(800 g, 8.0 × 70 cm)氯仿-甲醇-水(90 : 10 : 0 ~ 40 : 60 : 6)洗脱得四个组分 Fr. 1~Fr. 4。Fr. 3(5.6 g)组分通过 MCI GEL CHP 20P 柱色谱(100 g, 2.5 cm × 40 cm)分离,用甲醇-水(5 : 95~100 : 0)洗脱得 Fr. 3.1~Fr. 3.5 五个组分和芦丁(1.1 g)。使用 HPLC 法以甲醇-水(30 : 70)对 Fr. 3.1(2 g)组分分离纯化得到绿原酸(4 mg)。

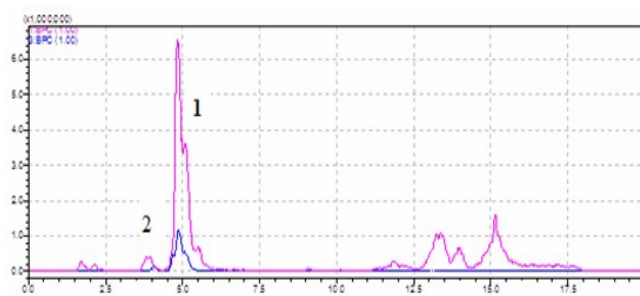


图 1 烟根 50%乙醇组分 LC-MS 色谱图

1.3.2 含量测定 对于极性较大单体成分的含量测定相比于其它方法,HPLC 法更为快速准确。因此本文含量测定方法参考文献<sup>[7]</sup>和用 LC-MS 色谱分析结果,再根据各组分的特点改进。检测波长:芦丁为 346 nm、绿原酸为 330 nm,流动相:甲醇-1%甲酸水(40 : 60),柱温箱温度:25 °C,对照品进样体积为 5 μl,组分进样为 10 μl,采用外标法以峰面积定量。

## 2 实验结果

2.1 化合物芦丁和绿原酸的波谱数据 芦丁(rutin),黄色粉末,紫外灯 254 nm 下有荧光,硫酸显色为黄色。C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>,(-)HRESIMS m/z: 687.60360(M-H)<sup>-</sup>,<sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)δH: 7.64(1H, d, J=2.4 Hz, H-2'), 7.62(1H, dd, J=8.3, 2.4 Hz, H-6'), 6.86(1H, d, J=8.3 Hz, H-5'), 6.38(1H, d, J=1.8 Hz, H-8), 6.18(1H, d, J=1.8 Hz, H-6), 5.02(1H, d, J=7.8 Hz, H-1''), 4.50(1H, d, J=1.8 Hz, H-1'''), 1.10(3H, d, J=6.6 Hz, H-6''').<sup>13</sup>C NMR(125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)δC: 159.0(s, C-2), 135.3(s, C-3), 179.1(s, C-4), 162.7(s, C-5), 100.0(d, C-6), 166.0(s, C-7), 94.6(d, C-8), 158.2(s, C-9), 105.3(s, C-10), 123.0(s, C-1'), 116.0(d, C-2'), 145.5(s, C-3'), 149.5(s, C-4'), 117.4(d, C-5'), 123.2(d, C-6'), 104.4(d, C-1''), 75.3(d, C-2''), 78.2(d, C-3''), 73.6(d, C-4''), 77.0(d, C-5''), 68.2(t, C-6''), 102.1(d, C-1'''), 72.0(d, C-2'''), 71.1(d, C-3'''), 72.0(d, C-4'''), 69.4(d, C-5'''), 17.6(q, C-6'''),以上数据和文献<sup>[8]</sup>中芦丁报道的一致。

绿原酸(chlorogenic acid),淡黄色粉末:(-)HRESIMS m/z 353.0896 [M - H]<sup>-</sup>, 707.1850 [2M - H]<sup>-</sup>; C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>,<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)δH: 7.52(1H, d, J=14.7 Hz, H-7'), 7.00(1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 6.85(1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.73(1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.25(1H, d, J=14.7 Hz, H-8'), 5.33(1H, ddd, J=3.5 Hz, H-5), 4.25(1H, ddd, J=3.5 Hz, H-3), 3.74(1H,

dd,  $J=7.6, 3.5$  Hz, H-4), 2.13(4H, m, H-2, 6),  $^{13}\text{C}$  NMR(125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ C: 76.2(s, C-1), 38.2(t, C-2), 73.2(d, C-3), 74.5(d, C-4), 72.3(d, C-5), 40.4(t, C-6), 179.9(s, C-7), 127.9(s, C-1'), 115.5(d, C-2'), 146.9(s, C-3'), 149.7(s, C-4'), 116.7(d, C-5'), 123.3(d, C-6'), 147.4(d, C-7'), 115.4(d, C-8'), 169.4(s, C-9'), 以上数据和文献<sup>[9]</sup>中绿原酸报道的一致。

2.2 含量测试结果 在 5  $\mu\text{l}$  芦丁对照品(浓度 4.8

mg/ml)、5  $\mu\text{l}$  绿原酸对照品(浓度 2.8 mg/ml)、10  $\mu\text{l}$  90%乙醇组分(浓度 2.0 mg/ml)和 10  $\mu\text{l}$  50%乙醇组分(浓度 9.7 mg/ml)中,各组分芦丁和绿原酸含量测试结果见表 1。烟根中芦丁的总含量为 $(5 \times 0.017/2.0 + 52 \times 0.42/9.7)\text{g}/15 \text{ kg}=0.151 \text{ g}/\text{kg}$ ,绿原酸的含量为 $(52 \times 0.0075/9.7)\text{g}/15 \text{ kg}=0.00267 \text{ g}/\text{kg}=2.67 \text{ mg}/\text{kg}$ ,比烟叶芦丁(433 mg/kg)和绿原酸(15.5 mg/kg)的含量都低。

表 1 各组分中芦丁和绿原酸含量

组分或对照品	芦丁峰面积/ 保留时间(min)	芦丁浓度 (mg/ml)	绿原酸峰面积/ 保留时间(min)	绿原酸浓度 (mg/ml)
芦丁对照品	39773411/10.441	4.8	-	-
绿原酸对照品	-	-	33702108/4.477	2.8
90%乙醇组分	277103/10.413	0.017	0	0
50%乙醇组分	6940458/10.416	0.42	181250/4.476	0.0075

### 3 讨论

黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物,它广泛存在于高等植物及羊齿植物的根、茎、叶、花、果实等中,不仅数量、种类繁多而且结构类型复杂多样<sup>[10]</sup>。具有抑制酶、抗癌、抗菌、抗病毒、抗炎症、抗过敏、抗糖尿病、镇痛、有抗炎、平喘、降血脂、神经保护、预防和治疗心血管疾病等广谱的药理作用和生物活性,对人类肿瘤、衰老、心血管病等退变性疾病的治疗和预防有重要意义<sup>[10-14]</sup>。绿原酸类物质是植物体内有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类次生代谢产物,广泛存在于高等双子叶植物和蕨类植物中,除具有抗菌、抗寄生虫、抗病毒、抗氧化作用外,还具有抗焦虑、保肝利胆、抗肿瘤、降血糖、降血脂、降血压、抑制糖尿病以及抗辐射等生物活性<sup>[2,15-16]</sup>。从烟根 50%乙醇组分 LC-MS 色谱还可见保留时间和芦丁及绿原酸相近的化合物,它们是否为芦丁和绿原酸的类似物有待于进一步研究。前面的研究发现烟根的 50%乙醇组分活性最好,其浓度达到 160 mg/L 时清除 DPPH 自由基的活性接近维生素 C 和常用抗氧化剂 BHT<sup>[11]</sup>;而其中的抗氧化活性是否为芦丁和绿原酸还有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志第 67 卷[M]. 北京:北京科学技术出版社,2005:152.
- [2] 彭黔荣. 烟叶的化学成分与烟叶质量的人工神经网络预测[D]. 成都:四川大学,2004.
- [3] Stedman RL. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke[J]. Chem Rev, 1968, 68(2): 153-207.
- [4] Wahlberg I, Enzell CR. Tobacco isoprenoids[J]. Nat

- Prod Rep, 1987, 4(3): 237-276.
- [5] 杨彩艳,莫丽娟,孙佩玲. 烟草化学成分及生物活性研究现状[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(10):1657-1663.
- [6] 杨彩艳,莫丽娟,韦海玲,等. 烟草不同部位提取物抗氧化活性研究[J]. 右江民族医学院学报,2016,38(5):463-465.
- [7] 谷勋刚,童军华. 应用高效液相色谱法同时测定烟草中 6 种多酚类化合物[J]. 安徽农业大学学报,2006,33(1):134-137.
- [8] 王晓梅,张倩,热娜·卡斯木,等. 锁阳全草化学成分的研究[J]. 中草药,2011,42(3):458-460.
- [9] Zhu XD, Dong XJ, Wang YF, et al. Phenolic compounds from *Viburnum cylindricum*[J]. Helv Chim Acta,2005,88(2):339-342.
- [10] 延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544.
- [11] 韦国锋,韦启后,黄祖良,等. 仙人掌总黄酮的提取及其镇痛作用研究[J]. 右江民族医学院学报,2004,26(6):779-781.
- [12] Zhao Y, Geng CA, Ma YB, et al. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis[J]. J Ethnopharmacol,2014,156(10):147-154.
- [13] 李莹,李钟,郭培国. 烟草中主要生物活性成分的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(12):2157-2163.
- [14] 彭新辉,易建华,周清明,等. 烟草绿原酸的研究进展[J]. 中国烟草学报,2006,12(4):52-57.
- [15] 席利莎,木泰华,孙红男. 绿原酸类物质的国内外研究进展[J]. 核农学报,2014,28(2):292-301.
- [16] Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities[J]. J Ethnopharmacol,2013,150(3):805-817.

收稿日期:2016-12-29;修回日期:2017-02-21