

## 芹菜中芹菜素的分离纯化鉴定方法研究

李荣华

(山东省济宁市疾病预防控制中心, 山东济宁, 272000)

**【摘要】**目的: 本文建立了分离纯化鉴定芹菜中芹菜素的方法。方法: 芹菜叶经过 80% 乙醇提取后, 减压蒸馏, 萃取得粗提物, 薄层色谱选择柱层析流动相条件, 采用干法上柱法, 用选择的流动相作为洗脱剂, 洗脱液进行 RR-HPLC 分析, 然后进核磁共振和 MS 分析。结果: 薄层层析分析在氯仿与甲醇配比为 25: 1 时, 芹菜素能与杂质分开, 洗脱液经 RR-HPLC 分析为单一组分,  $t_R$  为 14.437min, 与对照品芹菜素:  $t_R$  为 14.564min 相同, 核磁共振结果显示与标准品的主要峰位及强度相同, MS 测定结果表明: 与对照品芹菜素的分子量相同为 270。结论: 由此可以鉴定该洗脱液组分为芹菜素。

**【关键词】**芹菜; 柱层析; RR - HPLC; 核磁共振; MS; 芹菜素

Isolation, Purification and Identification of apigenin in celery

**【Abstract】**Objective: The method for isolation, purification and identification apigenin in celery was established in this article. Method: The crude extracts of celery was obtained after celery leaves were extracted with 80% ethanol and extracted with ethyl acetate, the extracts were concentrated under reduced pressure. The obtained crude extracts were subjected to silica gel column and eluted with the successive eluting solvent mixture of chloroform, methanol-chloroform 1:25. The eluted fractions were analyzed by RR-HPLC. The further purity was analyzed with NMR and MS. Results: The elution chloroform-methanol 25:1 was indicated to consist of only one kind of constituent by HPLC, whose retention time ( $t_R$ ) was 14.437 min. The retention time of sample products was the same with the standard samples. The NMR spectra of the test solution were similar to the apigenin; On the other hand, the MS experiments indicated that the molecular weight is 270. Conclusion: So the fraction can be identified as apigenin.

**Key Words** celery; Silica gel column; RR - HPLC; NMR; MS; apigenin

芹菜俗称香芹、蒲芹, 属伞形科二年生草本植物, 有旱芹和水芹之分。我国栽培历史悠久, 早在《诗经》中对此就有记载。芹菜性味甘苦, 微寒, 有平肝清热、祛风降压、健脾利湿、醒脑安神的生物学功效。芹菜的主要化学成分包括蛋白质、糖类、钙、铁、维生素和黄酮类物质, 其中黄酮类物质以芹菜素为主。

芹菜素 (apigenin, 化学结构见图 1), 广泛存在于蔬菜水果中, 其中芹菜中含量最丰富<sup>[1]</sup>。研究发现, 芹菜素具有多种生物学作用, 如抗癌、抗氧化、延缓衰老等<sup>[2-4]</sup>, 但是关于蔬菜中芹菜素的分离检测报道不多, 本文分离纯化鉴定了芹菜中的芹菜素, 为芹菜素的进一步开发利用提供了理论依据。

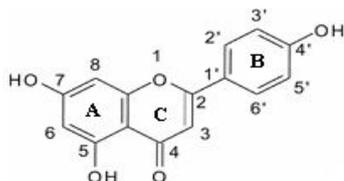


图1 芹菜素分子结构

## 1 实验部分

### 1.1 材料、仪器和试剂

Waters 高效液相色谱分析仪 (WatersTM2690分离系统, Waters996二极管阵列检测器, Waters色谱工作站, Millennium32软件)、旋转蒸发器RE-52A(上海精科实业有限公司)、红外光谱分析仪 (NIRLET380)、质谱分析仪 (3200Q TRAP)、超导核磁共振谱仪 (Bruker Avance 400 NMR Spectrometer), ESJ180-4型分析天平 (沈阳龙腾电子秤量仪器有限公司); 硅胶AR 级, 青岛海洋化工厂; 无水乙醇、甲醇、冰醋酸、乙酸乙酯等 (均为AR级); 色谱纯甲醇; 芹菜素标准品 (sigma公司), 芹菜为当地芹菜 (9月份)。

### 1.2 色谱条件

薄层层析条件: 分别取芹菜素标准品溶液和样品溶液, 在同一硅胶G薄层板上点样, 展开, 显色, 测定并计算标准品和样品的Rf值。展开剂: 不同配比的氯仿甲醇溶液; 显色剂: 三氯化铁-铁氰化钾显色 (1%铁氰化钾与2%三氯化铁溶液, 用时等体积混合)。最

后选择Rf值在0.2~0.4之间的液体作为柱层析的洗脱剂。

柱层析条件: 采用干法装柱、干法上样, 取 $\Phi 15 \times 300$ mm的硅胶层析玻璃柱, 以薄层层析选择的条件, 即氯仿: 甲醇=25: 1作为洗脱剂, 以芹菜素标准品作为参照, 按照前项薄层色谱鉴定方法检测不同时间的馏分。收集 Rf 值与芹菜素标准品相同的馏分, 旋转蒸发仪浓缩并第二次上柱, 以相同的洗脱剂洗脱, 同样收集 Rf 值与芹菜素标准品相同的馏分, 旋转蒸发仪蒸干, 得油状物, 用甲醇溶解, 真空干燥得浅绿色粉末。

RR-HPLC 条件: 色谱柱为 Phenomenex C18 柱 (250 × 4.60mm, 4 $\mu$ ), 流动相为甲醇: 水 = 60: 40 (体积比), 用三氟乙酸调节至 PH2.5, 流速 1ml/min, 进样量 12 $\mu$ l (自动进样), 检测波长 338nm, 柱温为 20 $^{\circ}$ C。

### 1.3 实验溶液的配制

对照品溶液的制备: 精密称取芹菜素标准品 1mg, 置 50ml 容量瓶中, 加入甲醇约 20ml, 微热溶解, 冷却至室温, 加入少量冰醋酸<sup>[5]</sup>, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 20mg/l 的对照品储备溶液。

供试品粗溶液的制备: 将市售芹菜, 去枯叶洗净, 于烤箱中 40 $^{\circ}$ C 烤干, 备用。精确称取蔬菜干品 4.0000g, 加入 80% 乙醇/水 100ml (其中每 100ml 溶液中含 10ml 纯盐酸), 同时加入 0.2g 特丁基对苯二酚 (TBHQ), 90 $^{\circ}$ C 下回流 3 小时, 冷却至室温, 用 Bucher 过滤, 精确回收滤液备用。供试品溶液上柱前离心机 3000 转离心 20 分钟。

供试品洗脱溶液的制备: 柱层析洗脱液, 旋转蒸发仪蒸干, 用甲醇溶解, 用 Bucher 过滤, 精确回收滤液备用。供试品溶液上柱前离心机 3000 转离心 20 分钟。

## 2 结果

### 2.1 装柱方式的选择

本文采用干法装柱, 让黄酮类化合物先吸附在硅胶表面, 再根据黄酮类化合物性质的差异, 用不同极性的溶剂萃取。选用 $\Phi 15 \times 300$ mm的玻璃柱, 装柱时下层预置脱脂棉, 以防溶剂萃取时硅胶脱落, 将吸附总黄酮后的硅胶轻轻倒入柱内, 并不断敲击玻璃柱, 柱底抽真空, 使硅胶紧密, 装柱均匀。

### 2.2 芹菜素样品 (柱洗脱液) 及对照品的 HPLC 分析

依芹菜素 HPLC 检测条件检测, 得芹菜素对照品和样品色谱分

析图 2 和图 3:

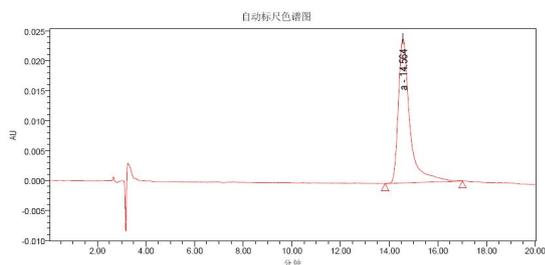


图 2 芹菜素对照品色谱图

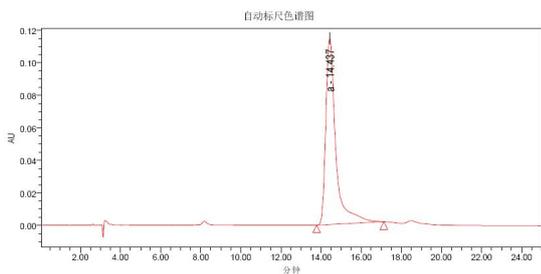


图 3 芹菜素样品色谱图

芹菜素对照品:  $t_R=14.564\text{min}$ ,  $\lambda=338\text{nm}$

芹菜素样品:  $t_R=14.437\text{min}$ ,  $\lambda=338\text{nm}$

根据芹菜素样品保留时间与最大吸收波长可基本判定, 芹菜素样品与芹菜素标准品为相同化合物, 可以从芹菜中分离纯化出来。

芹菜素样品纯度分析结果见表 1:

表 1 芹菜素样品纯度分析结果

序号	峰面积	测得样品纯度 (%)	平均样品纯度 (%)	RSD (%)
1	3947226	92.58	92.58	0.243
2	3936326	92.32		
3	3958126	92.83		

由表 1 可见, 通过本实验的方法处理样品, 经柱层析两次过柱后, 芹菜中芹菜素提取物的纯度可达到 92.58%。

### 2.4 芹菜素样品 MS 鉴定

芹菜素标样品 MS 分析图如下:

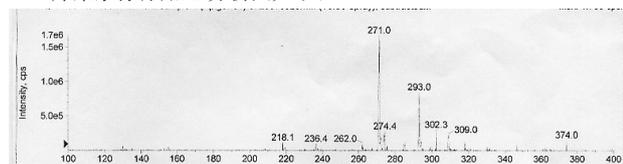


图 4 芹菜素样品 MS 图

质谱检测证明, 样品的分子量为 270, 与芹菜素分子量相同。

### 2.5 芹菜素样品核磁共振分析

芹菜素样品核磁共振分析图如下

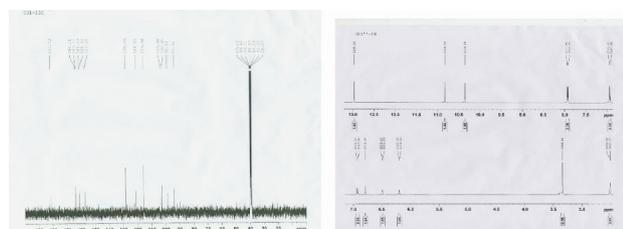


图 5 芹菜素标准品  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$

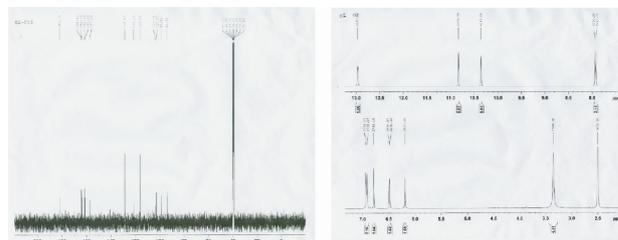


图 6 芹菜素样品  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$

核磁共振鉴定分析了芹菜素样品的功能基团, 数据如下:  $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}) \delta: 12.98, 10.90, 10.02, 7.88, 6.91, 6.71, 6.42, 6.13$ .  $^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO}) \delta: 181.74, 164.11, 163.72, 161.43, 161.16, 157.29, 128.47, 121.15, 115.94, 103.71, 102.83, 98.81, 93.95, 40.13, 39.92, 39.71, 39.50, 39.30, 39.09, 38.88$ .

### 3 讨论

溶剂萃取是植物有效成分分离精制的经典方法, 本研究根据芹菜素的性质选择乙酸乙酯作为萃取剂, 结果显示, 乙酸乙酯层无色时可以达到充分萃取, 并且可以去除混有的水溶性物质, 达到初步纯化的目的。

薄层层析是一种简便、快捷、微量的层析方法, 可以用于选择柱层析条件<sup>[6]</sup>。在本研究中选择薄层硅胶作为吸附剂, 不同配比的氯仿和甲醇作为展开剂。结果显示氯仿: 甲醇=25: 1 (体积比) 时,  $R_f$  值在 0.3 ~ 0.4 之间, 可以作为柱层析条件。同时薄层层析还用于柱层析馏分的检测, 可简便、快捷的检测馏分的成分。

芹菜素是一种极性较弱的黄酮类化合物, 所以本研究采用吸附柱色谱, 硅胶作为填充剂。柱色谱有两种装柱方式, 即湿法装柱和干法装柱。本研究预实验中先采用湿法装柱, 结果发现在上样品的过程中容易使样品液面倾斜, 无法分离纯化, 同时还造成样品的损失。而在干法装柱中就可以避免此现象, 所以本研究采用干法上柱。

本研究选用干法上柱和干法上样, 柱硅胶作填充剂, 氯仿: 甲醇=25: 1 为流动相, 样品经两次上柱得到纯度为 92.58% 的芹菜素样品。

高效液相色谱、红外光谱、质谱、核磁共振是鉴定一种物质的经典方法, 本研究采用这几种方法对芹菜素鉴定分析其分子结构, 结果显示, 芹菜素提取物与标准品是同一物质。

经检测本实验建立的提取分离工艺可以很好的分离纯化芹菜素, 达到高效分离的效果。

综上所述, 本研究建立的提取工艺流程为:

- (1) 蔬菜前处理: 40℃ 电热恒温鼓风干燥箱干燥。
- (2) 蔬菜粗提取物提取: 按料液比  $\geq 1: 10$ , 80% 乙醇/水提取 3h (内含 1.2mol/L 盐酸, 2g/L 的 TBHQ)。
- (3) 蔬菜粗提取物的萃取: 乙酸乙酯作为萃取剂, 按实验方法所述方法进行萃取, 直至乙酸乙酯层无色为止。
- (4) 蔬菜萃取物的柱层析分析: 采用干法装柱和干法上样, 柱硅胶 (60-100 目) 作为填充剂, 氯仿: 甲醇=25: 1 作为流动相, 样品两次过柱, 薄层层析检测不同时间馏分, 选择与对照品相同的馏分收集。

### 4. 结论

芹菜经 80% 乙醇提取后, 用乙酸乙酯萃取, 减压蒸馏得粗提取物。粗提取物干法上硅胶柱, 氯仿: 甲醇=25: 1 作为流动相, RR-HPLC 检测其为单一成分,  $t_R=14.564\text{min}$ ,  $\lambda=338\text{nm}$ , 与芹菜素标准品的  $t_R=14.437\text{min}$ ,  $\lambda=338\text{nm}$  相同, 并且两次上柱芹菜素样品的纯度为 92.58%; 样品质谱鉴定, 分子量为 270, 与标准品相同; 核磁共振结果显示, 样品与标准品的主要峰位相同, 进一步证明了样品为芹菜素。由此可以鉴定本实验的提取物样品为芹菜素单品,

(下转第 205 页)

(上接第 20 页)  
为芹菜及其它蔬菜中芹菜素的提取提供科学依据,同时为芹菜的进一步开发利用提供证据。

**参考文献:**

- [1] 杨红霞, 孙倩. 芹菜素的现代研究进展[J]. 长治医学院学报, 2012, 26(5): 397-400.
- [2] HUANG J Y, YANG Y, LI Y R, et al. Research progress of apigenin [J]. Jiangsu Sci Technol Inf (江苏科技信息), 2015, 27(9): 1193-1196.
- [3] LIN L W, XIN Q. Progress in the research of pharmacology of apigenin [J]. China Trop Med (中国热带医学), 2012, 12(8):1023-1026.
- [4] Wang W, Heideman L, Chung CS, et al. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines [J]. Mol Carcinog. 2000, 28(2):102-110.
- [5] 朱华, 肖建波, 邹登峰, 等. 硅胶柱色谱/ RP-HPLC/LC-ESI-MS 分离纯化鉴定拳卷地钱中芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷[J]. 中医药学刊, 2005, 28(1): 20-22
- [6] 吴坤主编. 营养与食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2005:92-93.

**作者简介:**

李荣华(1980~), 女, 硕士研究生, 职称主管医师, 研究方向: 营养与食品卫生和食源性疾病预防。