

高效液相色谱-串联质谱联用技术鉴定 樱桃叶中的黄酮成分

李 晨, 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: 采用高效液相色谱-串联质谱联用(HPLC-MS-MS)技术对樱桃叶中黄酮成分进行分离鉴别, 流动相为0.1%甲酸溶液-甲醇溶液, 梯度洗脱, 在ESI负离子模式下采集数据, 结合标准品对比, 根据相对分子质量、质谱碎片等信息, 从樱桃叶中鉴定出9种酚类成分, 利用外标法及内标法对其进行定量, 分别为: 木犀草苷(14.42mg/g)、牡荆素(24.67mg/g)、芦丁(54.66mg/g)、金丝桃苷(56.74mg/g)、紫云英苷(44.20mg/g)、绿原酸(28.12mg/g)、奎宁酸(10.12mg/g)、槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(20.15mg/g)、山奈酚-3-O-芸香糖苷(86.57mg/g)。建立的HPLC-MS-MS法快速有效可以用于鉴定樱桃叶中的化学成分。

关键词: 樱桃叶; 黄酮; 高效液相色谱-串联质谱联用; 山奈酚-3-O-芸香糖苷

Identification of Chemical Constituents of Flavonoids in the Leaves of *Prunus pseudocerasus* L. by HPLC-MS-MS

LI Chen, 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: Flavonoids in the leaves of *Prunus pseudocerasus* L. were analyzed and identified by HPLC-MS-MS method. The mobile phase used for gradient elution was methanol/water containing 0.1% formic acid. Data acquirement was performed in the ESI negative ion mode. By comparison with authentic standards and based on details of molecular weight and mass spectral fragments, 9 flavonoid components were identified and their quantitative determination was performed using external and internal standard methods, which were luteoloside (14.42 mg/g), vitexin (24.67 mg/g), rutin (54.66 mg/g), hyperoside (56.74 mg/g), astragalin (44.20 mg/g), quinic acid (28.12 mg/g), chlorogenic acid (10.12 mg/g), quercetin-3-rutinoside-glucoside (20.15 mg/g), kaempferol-3-O-rutinoside (86.57 mg/g). The proposed method is rapid and reproducible and is useful to analyze flavonoids in the leaves of *P. pseudocerasus*.

Key words: *Prunus pseudocerasus* L. leaves; flavonoids; HPLC-MS-MS; kaempferol-3-O-rutinoside

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0226-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316045

从可食性植物资源中筛选具有抗氧化活性的天然抗氧化剂抑制一直是食品工作者关注的热点, 由于黄酮类化合物具有抑制脂质过氧化、杀菌、抗病毒、抗衰老和调节免疫力等功效, 已成为目前倍受关注的天然活性产物之一。

樱桃叶为蔷薇科李属植物樱桃(*Prunus pseudocerasus* L.)的叶片。樱桃在中国种植广泛, 主要分布在河北、山东、山西、陕西、甘肃、江苏、江西、贵州和广西等地。樱桃的根、叶、核及鲜果皆可入药, 性味甘温, 有调中、益脾之功, 可治四肢瘫痪、风湿腰疼等症^[1-2]。

近年来, 高效液相色谱法广泛应用于植物中黄酮类化合物成分的分析^[3-6]。Wang Haibo等^[7]发现欧洲产酸樱桃(*Prunus cerasus*)中含有具有抗氧化活性的黄酮类成分。但令人遗憾的是, 以往的研究多局限在植物总黄酮的提取及性质研究, 而关于黄酮类化合物结构鉴定方面的报道甚少。樱桃叶作为樱桃的副产品, 其水煎液具有较好的降压功能, 但其所含黄酮类成分的研究目前还未见报。在前期研究^[8-9]中, 本课题组曾利用75%乙醇溶液为溶剂, 通过微波辅助提取法提取了樱桃叶黄酮, 探究了D101大孔吸附树脂纯化樱桃叶黄酮的条件, 并测定了

收稿日期: 2013-06-06

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计划项目(20110608)

作者简介: 李晨(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品添加剂。E-mail: lichen428@163.com

*通信作者: 姜子涛(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品分析、食品资源开发。E-mail: ztjiang@tjcu.edu.cn

纯化后黄酮的抗氧化活性和清除自由基的能力。为了充分利用樱桃的副产品樱桃叶这一天然资源,本实验在前期工作的基础上,采用高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem multiple mass spectrometry, HPLC-MS-MS)技术对大孔吸附树脂纯化后的黄酮类化合物的化学成分进行结构鉴定,结合标准品质谱对比,确定了中国樱桃叶黄酮类化合物的化合组成及含量,为樱桃叶的进一步应用提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

樱桃叶(采自山东省威海市),洗净后于真空干燥箱烘干,粉碎过40目筛备用。

甲醇(色谱纯) 德国Mallinckrodt Baker公司;甲酸(色谱纯) 美国Columbus Chemical Industries公司;纯净水 杭州娃哈哈集团有限公司;D101大孔吸附树脂 南开大学化工厂;木犀草苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷和紫云英苷 上海顺勃有限公司;绿原酸 成都思科华生物技术有限公司;奎宁酸 天津一方科技有限公司。

G6410A LC-MSD QQQ液相色谱-质谱-质谱联用 美国Agilent Technologies公司;BP211D型十万分之一电子天平 德国Satorius集团;FA1104N型电子天平 上海精密仪器有限公司;AS10200A型超声波清洗器 昆山超声仪器有限公司;MAS-I型微波萃取仪 上海新仪微波化学科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 樱桃叶黄酮溶液的制备

樱桃叶黄酮的提取及利用D101大孔树脂纯化过程按照文献[8-9]的方法进行,纯化后的黄酮混合物用甲醇稀释质量浓度为10 μ g/mL,用针管式过滤器使用0.45 μ m的微孔滤膜过滤,得到樱桃叶溶液,供HPLC-MS-MS分析用。

1.2.2 标准品溶液的配制

用十万分之一电子天平分别称取各标准品0.0006g,用3mL甲醇完全溶解后得到质量浓度为200 μ g/mL的标准品甲醇储备液。再用微量移液器移取上述标准品甲醇储备液50 μ L于1.5mL PTFE试管中,加入950 μ L甲醇,微波振荡2min,得到质量浓度为10 μ g/mL的标准品溶液,供HPLC-MS-MS比较分析用。

1.2.3 HPLC-MS-MS分析条件

色谱柱条件: ZORBAX SB-C₁₈(4.6mm \times 150mm)反相色谱柱,柱温为30 $^{\circ}$ C。流动相为甲醇-水体系(含0.1%甲酸),梯度洗脱条件为0~10min,甲醇:水(50:50, V/V); 10~20min: 甲醇:水(50:50, V/V)匀速梯度至甲醇:水(72:28, V/V); 流速0.3mL/min,进样量为5 μ L。

电离方式: 电喷雾(electrospray ionization, ESI) 负离子模式; 扫描方式: 多反应检测(multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: 4000V; 雾化气体: N₂; 雾化气压力: 35psi; 雾化气流速: 10L/min; 离子源温度: 350 $^{\circ}$ C; 碰撞气体: 高纯氮气; 碰撞气压力: 0.15MPa。

2 结果与分析

2.1 樱桃叶黄酮及标准品的总离子流图

樱桃叶黄酮样品液和7个标准品溶液,按照上述的色谱和质谱条件,进行HPLC-MS-MS分析,得到总离子流图如图1、2所示。图1中1、2、3、5、6、7和8号化合物的保留时间与图2中相同峰号的7种标准品一致。因此,可以初步判定樱桃叶黄酮样品中的这7种物质和7种标准品是相同的化合物。

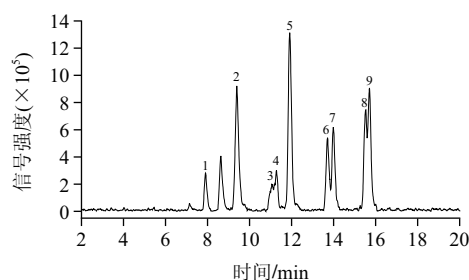


图1 樱桃叶黄酮的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of flavonoids in Chinese cherry leaves

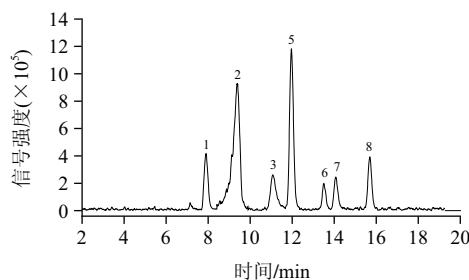
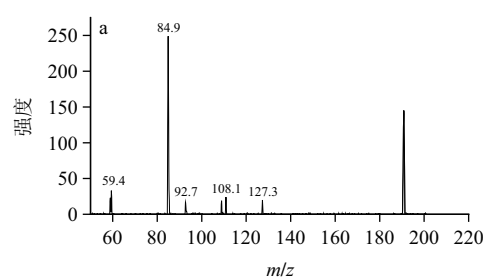


图2 标准品的总离子流图

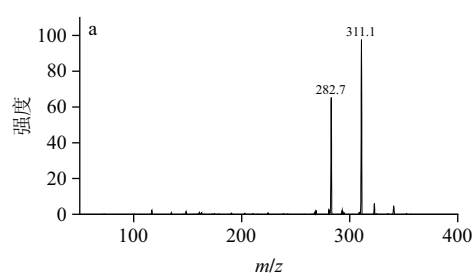
Fig.2 Total ion chromatogram of authentic standards of flavonoids

2.2 樱桃叶溶液的质谱分析结果

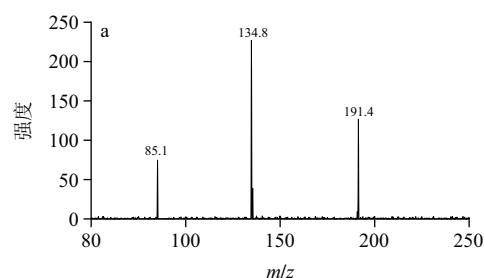
分别对樱桃叶黄酮样品中分离得到的7种化合物和相应的标准品进行质谱分析,结果发现这7种化合物的一级质谱所得到的分子离子峰 m/z 与相应的标准品的分子离子峰 m/z 相同。对分子离子进行二级质谱分析结果显示,这7种化合物的分子离子的二级质谱碎片离子峰与相应的标准品基本一致(图3)。结合保留时间的结果,因此可以确定樱桃叶黄酮样品中的1、2、3、5、6、7号和8号峰所代表的化合物,分别为奎宁酸、绿原酸、木犀草苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷和紫云英苷。



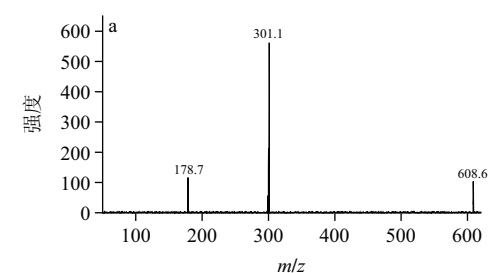
A. 化合物1和奎宁酸标准品



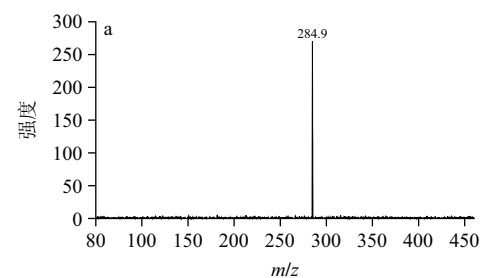
D. 化合物5和牡荆素标准品



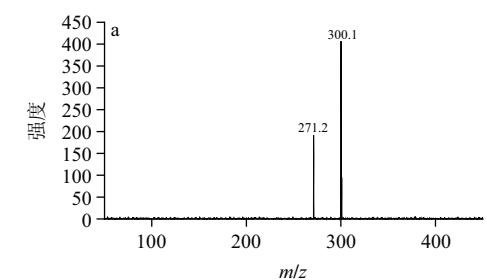
B. 化合物2和绿原酸标准品



E. 化合物6和芦丁标准品



C. 化合物3和木犀草苷标准品



F. 化合物7和金丝桃苷标准品

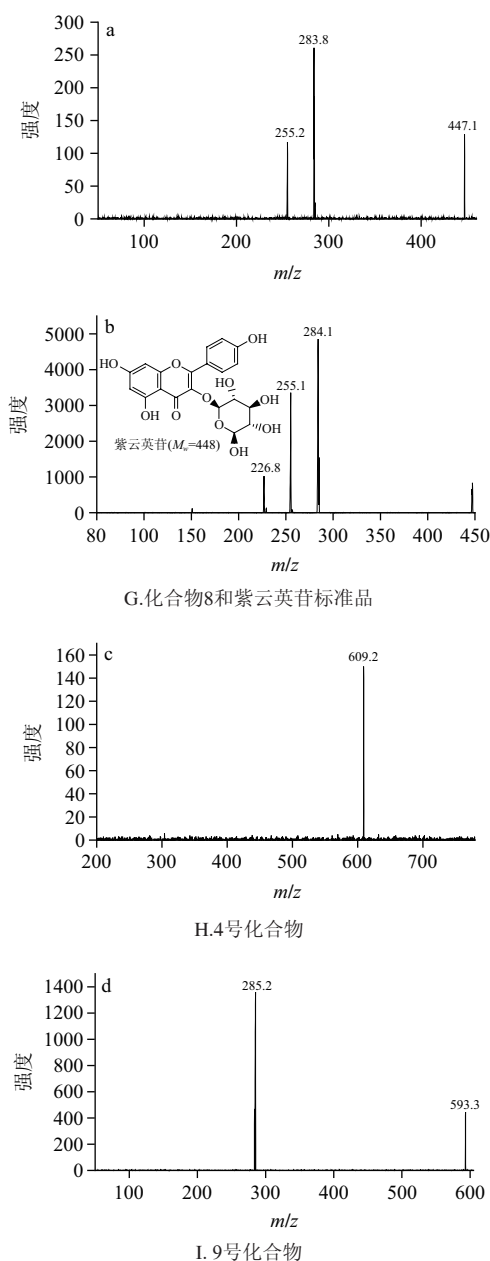


图3 化合物(1、2、3、5、6、7、8)(a)和标准品(b)以及4号(c)和9号(d)化合物的二级质谱图

Fig.3 Secondary mass spectrometry patterns of the identified compounds (1, 2, 3, 5, 6, 7 and 8) as well as their authentic standards and unknown compounds 4 and 9

4号化合物的结构鉴定:由准分子离子峰 $[M-H]^-$ (m/z 771)可知,该物质的相对分子质量为772,准分子离子峰失去一个 m/z 162的中性片段,产生碎片离子 $[M-H-162]^-$ (m/z 609.2),根据相对分子质量,初步断定 m/z 162的中性片段为葡萄糖。 $[M-H-162]^-$ (m/z 609.2)为槲皮素-3-芸香糖苷片段,结合文献[10-11]对苦荞麸皮和芦笋废弃物中该黄酮苷的MS分析结果,可以确定樱桃叶黄酮样品中的4号化合物为槲皮素-3-芸香糖苷,其二级质谱见图3,裂解途径如图4所示。

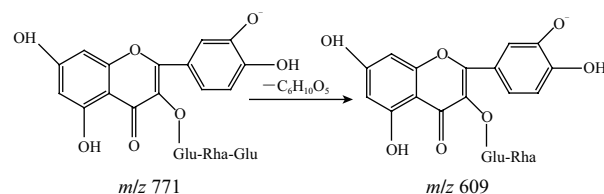


图4 槲皮素-3-芸香糖苷的二级质谱裂解途径

Fig.4 MS² fragmentation pattern of quercetin-3-rutinoside

9号化合物的结构鉴定:由准分子离子峰 $[M-H]^-$ (m/z 593)可知该物质的相对分子质量为594,准分子离子峰失去一个 m/z 309的中性片段,产生碎片离子 $[M-H-308]^-$ (m/z 285)。根据相对分子质量初步判断 m/z 308的中性片段为芸香糖苷, $[M-H-308]^-$ (m/z 285)为山奈酚。结合文献对欧洲接骨木^[12]、高羊茅^[13]和葫芦巴^[14]等植物中山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的MS分析结果^[15-21],因此确定樱桃叶黄酮样品中的9号物质为山奈酚-3-*O*-芸香糖苷,其二级质谱见图3,裂解途径如图5所示。

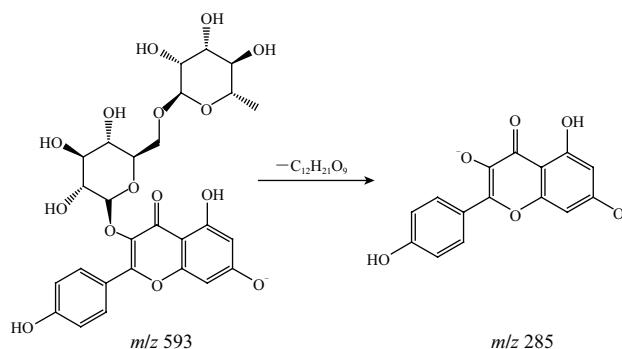


图5 山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的二级质谱裂解途径

Fig.5 MS² fragmentation pattern of kaempferol-3-*O*-rutinoside

表1显示了樱桃叶中主要成分的质谱分析结果。可见利用75%乙醇作为提取液所得到的提取物除奎宁酸和绿原酸两种酸类化合物外,均为黄酮类化合物。这一结果从分子结构的角度上诠释了樱桃叶的醇提取物具有很强的抗氧化活性、清除自由基能力的根本原因^[8]。

表1 樱桃叶中主要成分的质谱分析结果

Table 1 Mass spectral analysis results of main flavonoid components in Chinese cherry leaves

峰号	保留时间/min	分子离子峰(m/z)	MS ² 主要碎片离子(m/z)	化合物名称
1	7.924	191	127.3, 108.1, 92.7, 84.9, 59.4	奎宁酸
2	9.388	353	191.4, 134.8, 85.1	绿原酸
3	11.171	447	284.9	木犀草苷
4	11.272	771	609.2	槲皮素-3-芸香糖苷
5	11.911	431	311.1, 282.7	牡荆素
6	13.716	609	301.1, 178.7	芦丁
7	13.983	463	300.1, 271.2	金丝桃苷
8	15.521	447	183.8, 255.2	紫云英苷
9	15.706	593	285.2	山奈酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷

2.3 樱桃叶成分含量的确定

对樱桃叶中的有标准品的7种成分通过外标法进行定量,表2中给出了这7种成分的线性方程。另外,槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷以槲皮苷作为内标物来进行定量计算。最后折算成干樱桃叶中多酚及黄酮成分的含量,结果见表2。

表2 樱桃叶多酚类成分的含量
Table 2 Polyphenol content in Chinese cherry leaves

化合物	标准工作曲线	R	含量(mg/g)	检出限(μg/mL)	回收率/%
奎宁酸	$y=11772x+1980$	0.9993	10.12	1.42	96.73
绿原酸	$y=578350x+370$	0.9998	28.12	0.15	99.22
木犀草苷	$y=6307175x+71792$	0.9994	14.42	0.99	104.58
槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷*			20.15		
牡荆素	$y=122055025x-442171$	0.9983	24.67	0.13	101.45
芦丁	$y=9664450x+62303$	0.9982	54.66	3.64	98.61
金丝桃苷	$y=4669975x+29971$	0.9984	56.74	1.35	102.29
紫云英苷	$y=29933000x+12870$	0.9991	44.20	2.86	100.58
山奈酚-3-O-芸香糖苷*			86.57		
总计			339.65		

注:*.内标法定量。

由表2可以看出,通过外标法定量的7种物质在一定的范围内,质量浓度与峰面积有良好的线性关系,相关系数在0.9982~0.9998之间,各物质的检出限也很低。7种物质的回收率在96.73%~104.45%范围内,RSD为0.16%~1.79%。由上可知此方法具有较高的灵敏度和准确度。

3 结论

采用微波辅助乙醇提取法从植物中分离黄酮等多酚类成分,可以大大缩短提取时间^[8]。利用大孔树脂提纯该提取物^[9],在一定程度上提高了多酚类化合物分析鉴定的准确性。本实验通过HPLC-MS-MS技术,从樱桃叶乙醇提取物中鉴定出了9种多酚类成分,其中包括奎宁酸(10.12mg/g,均以干质量计算,下同)和绿原酸(28.12mg/g)两种酚类化合物,以及木犀草苷(14.42mg/g)、槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(20.15mg/g)、牡荆素(24.67mg/g)、芦丁(54.66mg/g)、金丝桃苷(56.74mg/g)、紫云英苷(44.20mg/g)和山奈酚-3-O-芸香糖苷(86.57mg/g)7种黄酮类化合物。可见樱桃叶中的黄酮含量还是非常丰富的,并且在成分上和欧洲酸樱桃有很大的差异^[7]。

参考文献:

- [1] 高海燕, 赵镭, 胡小松, 等. 樱桃色素的提取及稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(4): 54-57.
- [2] 赵素云. 原色中草药图集花果种子[M]. 广州: 广东世界图书出版公司, 2003: 280-291.
- [3] 单鸣秋, 钱雯, 高静, 等. UPLC-MS分析侧柏叶中黄酮类化合物[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1626-1629.
- [4] 高蓓. 广陈皮黄酮类化合物和挥发油成分及其活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [5] 胡碧波. 杭白菊指纹图谱及其主要黄酮苷成分分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [6] 周永刚, 刘畅, 毛飞, 等. 荷叶化学成分的HPLC-TOF/MS分析[J]. 药实践杂志, 2011, 29(5): 342-346.
- [7] WANG Haibo, NAIR M G, STRASBURG G M, et al. Antioxidant polyphenols from tart cherrier (*Prunus cerasus*)[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(3): 840-844.
- [8] 李晨, 姜子涛, 李荣. 樱桃叶黄酮的微波提取及抗氧化性质的研究[J]. 中国食品添加剂, 2012(4): 103-108.
- [9] 李晨, 姜子涛, 李荣. 大孔吸附树脂纯化樱桃叶中总黄酮的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(9): 212-217.
- [10] 王军. 苦荞皮总黄酮提取工艺及高效液相色谱-质谱指纹图谱研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2007.
- [11] 宋佳, 马越, 张超, 等. 芦笋废弃物中黄酮类化合物的结构鉴定及其稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 94-96.
- [12] CHRISTENSEN L P, KAACK K, FRETTE X C. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acid[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 227(1): 293-305.
- [13] BERTOLDI C D, LEO M D, ERCOLI L, et al. Chemical profile of *Festuca arundinacea* extract showing allelochemical activity[J]. Chemoecology, 2012, 22(1): 13-21.
- [14] BELGUITH-HADRICHE O, BOUAZIZ M, JAMOSSI K, et al. Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(4): 2116-2122.
- [15] DERBEL S, BOUAZIZ M, DHOUIB A, et al. Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu[J]. C R Chim, 2010, 13(4): 473-480.
- [16] 苗爱清, 程悦, 梁祈, 等. 白叶单枞不同发酵茶中多酚类成分的HPLC-MS/MS分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 360-366.
- [17] 王有志, 罗奇志, 罗佳波. 高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法测定双黄连粉针剂中奎宁酸的含量[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(2): 401-402.
- [18] 杨岚, 李华峰, 刁海鹏, 等. 蒲公英花中总酚酸和总黄酮含量测定及其抗氧化性能研究[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 160-163.
- [19] 李荣, 周媛, 杨立琛, 等. 利用HPLC-MS/MS测定三叶委陵菜中的黄酮类化合物[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 263-266.
- [20] 郭玉蓉, 韩舜愈, 刘鹏, 等. 荞麦黄酮类化合物的提取分离及结构鉴定[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 131-134.
- [21] 莫开菊, 程超, 黄鹏, 等. 生姜黄酮提取纯化及结构的初步鉴定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 229-233.