

超高压液相色谱 - 飞行时间质谱法分析国产油橄榄叶中酚类化合物

王百川¹, 付绍平¹, 王 丹¹, 王龙星², 肖红斌², 朱靖博^{1,*}

(1. 大连工业大学食品学院, 植物资源化学与应用研究所, 辽宁 大连 116034;

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘 要: 建立国产油橄榄(*Olea europaea* L.)叶中酚类化合物的超高压液相色谱-飞行时间质谱(ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC/Q-TOF-MS)定性分析方法。液相色谱条件为 Waters BEH-C₁₈(10.0mm × 2.1mm, 1.7 μm)色谱柱, 乙腈和甲酸溶液梯度洗脱, 流速 0.25mL/min, 紫外检测波长 280nm; 质谱条件为 Waters ACQUITY Q-TOF-MS 质谱仪, 电喷雾电离接口, 负离子模式检测。采用该方法得到了国产油橄榄叶提取物的紫外检测的色谱图、负离子监测的总离子流图以及一级质谱图, 成功鉴定了国产油橄榄叶中的 15 种酚类化学成分。

关键词: 超高压液相色谱-飞行时间质谱法(UPLC/Q-TOF-MS); 国产油橄榄叶; 酚类化合物

Characterization of Phenolic Compounds in Domestic Olive Leaf by Ultra-performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry

WANG Bai-chuan¹, FU Shao-ping¹, WANG Dan¹, WANG Long-xing², XIAO Hong-bin², ZHU Jing-bo^{1,*}

(1. Institute of Chemistry and Applications of Plant Resource, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: An ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) method was established to characterize phenolic compounds in domestic olive (*Olea europaea* L.) leaf. UPLC separation was performed on a Waters BEH-C₁₈ column (10.0 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) using a mobile phase consisting of 0.1% formic acid water solution (A) and acetonitrile (B). The gradient program used was as follows: 0–10 min, 10% B–30% B; 10–12 min, 30% B–33% B; 12–17 min, 33% B–38% B. The flow rate was set at 0.25 mL/min and the detection wavelength at 280 nm. The mass spectrometer used was a Waters ACQUITY Q-TOF-MS equipped with an electrospray ionization (ESI) interface in negative mode. Fifteen phenolic compounds were identified from the extracts of domestic olive leaf by analyzing the total ion current (TIC) chromatograms and MS fragmentation patterns.

Key words: ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS); domestic olive leaf; phenolic compounds

中图分类号: O657.63; TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0225-05

油橄榄(*Olea europaea* L.)为木犀科木犀榄属常绿乔木, 是世界著名的木本油料兼果用树种, 栽培品种有较高食用价值, 其果实含丰富优质食用橄榄油, 叶中含有大量裂环烯醚萜类及其他酚类组分。在油橄榄果生长过程中, 会产生大量的初级农副产品(油橄榄叶), 每年每棵油橄榄树光修剪过程就要产生 25kg 的嫩枝和树叶。

作为优质油料, 橄榄油已逐渐被国人所接受, 油橄榄已在我国许多地方大量种植, 甘肃省陇南市武都区是目前全国最大油橄榄种植和橄榄油生产基地。国内对于油橄榄叶的化学研究及其提取物的开发报道很少, 对橄榄叶的研究多集中于在分属和品种上都不同于油橄榄的果用橄榄(*Canarium album* Raeuseh)。药理研究报道

收稿日期: 2010-11-11

基金项目: 中国科学院分离分析化学重点实验室开放基金项目

作者简介: 王百川(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为活性物质分离与结构鉴定。E-mail: wangbc.bm@gmail.com

* 通信作者: 朱靖博(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然产物分离分析。E-mail: zhujingb@sina.com

表明,油橄榄叶提取物具有降低血压、增加冠脉流量、和广泛的抗病毒活性^[1-3],在欧洲,油橄榄叶已被深加工并广泛用于化妆品、药品和食品补充剂行业。

国外对于油橄榄叶中化学成分分离和质谱鉴定已有相关的研究^[4-6],但是对于国产油橄榄叶中酚类组分分离和结构鉴定还未见研究报道。本实验采用超高压液相色谱-飞行时间质谱法(ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC/Q-TOF-MS)对甘肃油橄榄基地的油橄榄叶中的酚类化合物进行分离和结构鉴定,以期推进我国油橄榄叶资源开发和综合利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙腈(色谱纯) 美国 Fisher 公司; 甲醇(色谱纯) 山东禹王实业; 油橄榄叶产于甘肃陇南市武都区,由大连工业大学张宗申教授鉴定为木犀科木犀榄属油橄榄(*Olea europaea* L.)的干燥树叶,样本保存于大连工业大学植物资源化学与应用研究所。

1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC/Q-TOF-MS 质谱仪 美国 Waters 公司; FW100 型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; UC-3120 超声波振荡仪 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; MDF 反渗透纯水机 大连美德环保设备有限公司。

1.3 超高压液相色谱-飞行时间质谱条件

色谱条件: 色谱柱为 Waters BEH-C₁₈ 柱(10.0mm × 2.1mm, 1.7 μm); 流动相 A 相为体积分数 0.1% 甲酸溶液, B 相为乙腈; 梯度洗脱条件为 0~10min 10% B → 30% B、10~12min 30% B → 33% B、12~17min 33% B → 38% B; 流速 0.25mL/min; 柱温 30℃; 紫外检测波长 280nm; 进样量 10 μL。

质谱条件: ACQUITY UPLC/Q-TOF-MS 质谱仪,配有电喷雾电离接口,采用负离子模式进行检测;使用高纯度氮气做雾化气和辅助气,氩气做碰撞气;毛细管电压 3kV; 离子源温度 120℃; 加热毛细管温度 350℃; 脱溶剂气流速 800L/h, 锥孔气流速 50L/h; 锥孔电压 40V; 碰撞能 35~40eV; 质量扫描范围 m/z 200~2000。

1.4 样品处理

准确称取干燥粉碎的油橄榄叶 5.0g 置于 50mL 具塞锥形瓶中,加入 40mL 甲醇,混匀,超声萃取 30min,过滤。再次加入 20mL 甲醇重复萃取 2 次,过滤后合并所有滤液。滤液旋转蒸发至少量体积后加 5g 硅胶后继续浓缩至干装入硅胶柱以进行柱层析。硅胶柱先用 10mL 石油醚淋洗以除去非极性杂质,再用 20mL 甲醇淋洗得到样品,最后用甲醇定容于 25mL 容量瓶中,分析前用 0.22 μm 有机滤膜过滤。

2 结果与分析

样品经 UPLC/Q-TOF-MS 分析, 280nm 液相色谱图和总离子流图(负离子模式)见图 1。从总离子流图中可以看出, 总共检测到 15 个明显的峰, 而液相色谱图中的峰 4、5、6、15 由于灵敏度低而未能检测出。

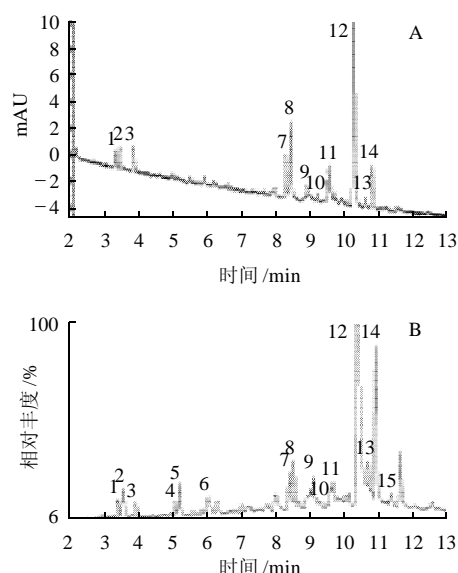
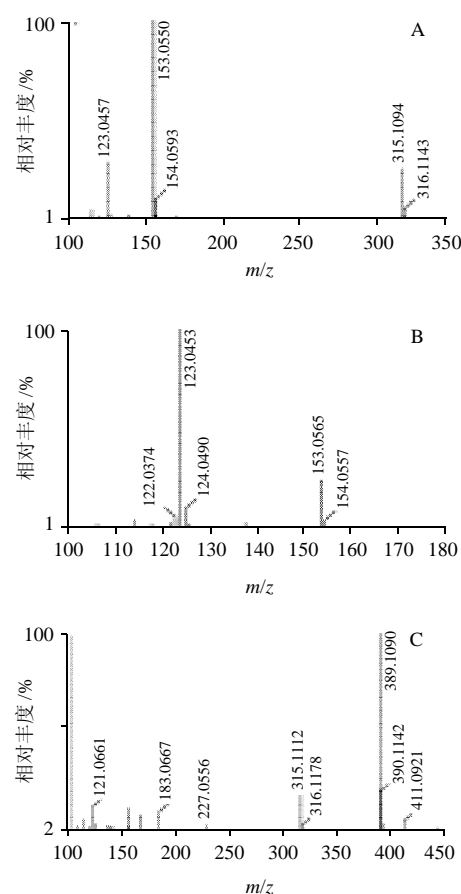
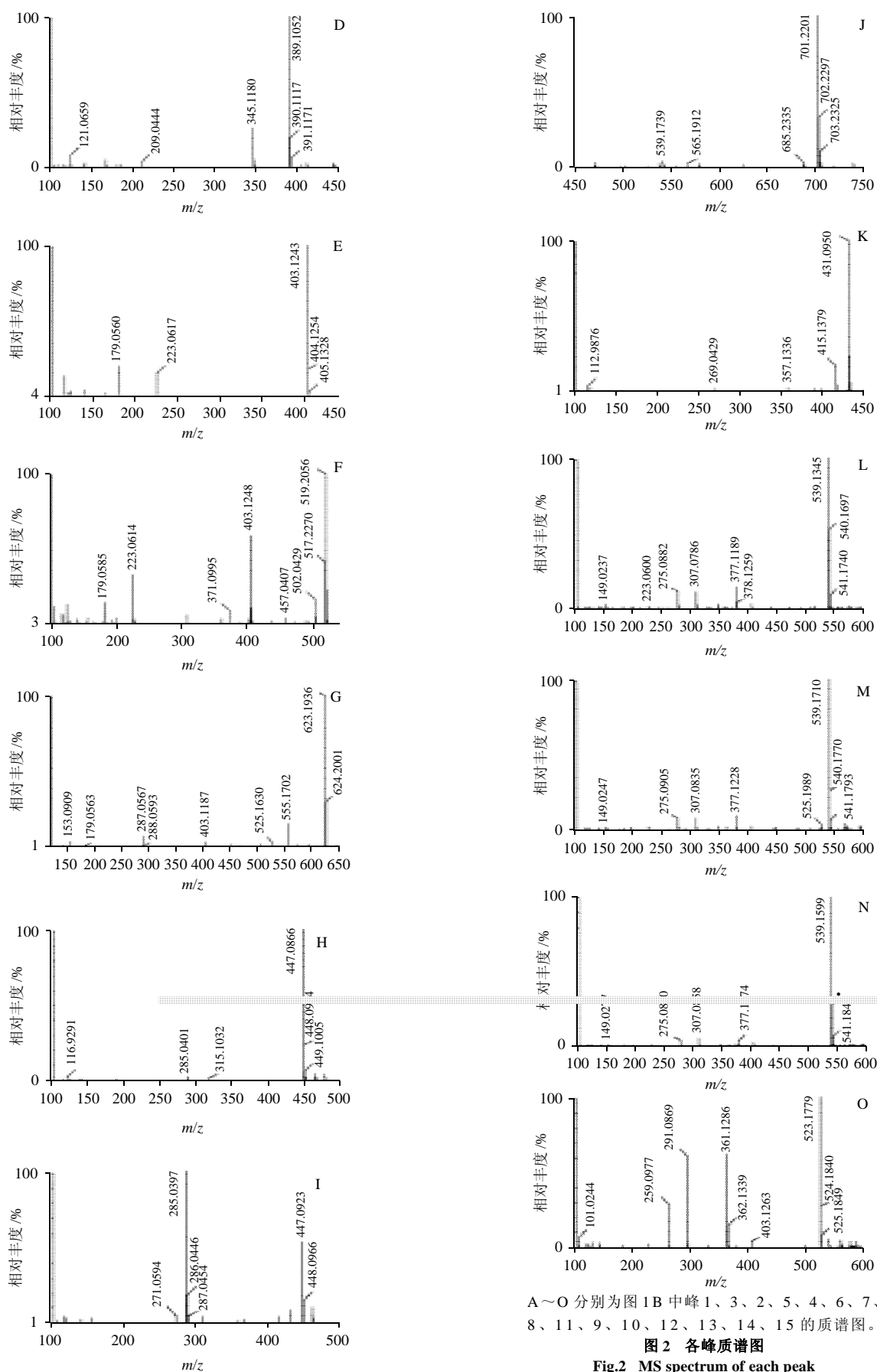


图1 国产油橄榄叶提取物的液相色谱图(A)和总离子流图(B)
Fig.1 Liquid chromatogram and TIC chromatogram of domestic olive leaf extract





A~O 分别为图 1B 中峰 1、3、2、5、4、6、7、8、11、9、10、12、13、14、15 的质谱图。

图 2 各峰质谱图

Fig.2 MS spectrum of each peak

从图 2A 可以推断: 峰 1 的碎片 m/z 153 应由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 315 失掉一分子葡萄糖残基(162u)形成, 而 m/z 153 碎片离子进一步失掉 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 部分后形成 m/z 123 的碎片离子, 这与文献报道的 3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷(hydroxytyrosol-glucoside)质谱数据相同^[7], 因此峰 1 鉴定为 3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷。从图 2B 可以看出, 峰 3 的分子离子峰为 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 153, 又根据峰 3 与峰 1 有相同的碎片离子 m/z 123 以及保留时间关系(多酚类苷元的葡萄糖缀合物通常在多酚类苷元之前洗脱)^[7], 峰 3 应该是峰 1 的苷元(3,4-二羟基苯乙醇)。

从图 2C 可以看出, 峰 2 质谱图中含有碎片离子 m/z 227、183。碎片离子 m/z 227 应该是由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 389 失去葡萄糖残基(162u)而形成, 而碎片离子 m/z 227 进一步失去 CO_2 (44u)形成碎片离子 m/z 183。图 2D 显示峰 5 含有碎片离子 m/z 345、209。碎片离子 m/z 345 应该是由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 389 失掉 CO_2 (44u)形成, 而 m/z 209 碎片离子是由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 389 失掉一分子葡萄糖(180u)形成。这两个峰质谱断裂规律均与文献报道的 oleoside 和四乙酰开联番木鳖苷(secologanoside)相同, 而且文献报道在反相色谱条件下四乙酰开联番木鳖苷于 oleoside 之后洗脱^[8], 因此, 峰 2 鉴定为 oleoside, 峰 5 鉴定为四乙酰开联番木鳖苷。

从图 2E 可以看出, 峰 4 质谱图中含有碎片离子 m/z 223、179。碎片离子 m/z 223 应由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 403 失去一分子葡萄糖(180u)形成, 而 m/z 223 碎片离子进一步失去 CO_2 (44u)形成 m/z 179 碎片离子, 这与文献报道的橄榄酸葡萄糖苷(elenolic acid glucoside)质谱数据相同^[8], 因此峰 4 鉴定为橄榄酸葡萄糖苷。

从图 2F 可以看出, 峰 6 质谱图中存在碎片离子 m/z 502、457、403、371、223、179。分子离子峰 m/z 519 的化合物在油橄榄中尚未发现过。峰 6 的碎片离子 m/z 403 碎片离子恰为橄榄酸葡萄糖苷的分子离子峰且与橄榄酸葡萄糖苷有相似的碎片离子 m/z 371、223、179^[8], 推断峰 6 应该是橄榄酸葡萄糖苷的结构衍生物, 但峰 6 的具体结构还有待进一步的确认。

从图 2G 可以看出, 峰 7 的分子离子峰为 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 623, 且有碎片离子 m/z 179、153。碎片离子 m/z 179 应为咖啡酸的特征碎片离子, 而碎片离子 m/z 153 应为 3,4-二羟基苯乙醇的特征碎片离子, 这与文献报道的毛蕊花糖苷(verbascoside)质谱裂解规律大致相同^[9], 故峰 7 初步鉴定为毛蕊花糖苷。

从图 2H、2I 可以看出, 峰 8、11 均出现了碎片离子 m/z 285。 m/z 285 是黄酮母环的特征离子, 它应该是分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 447 失去一分子葡萄糖残基(162u)形成的。这两个峰质谱断裂规律均与文献报道的毛地黄黄

酮-7-*O*-葡萄糖苷(luteolin-7-*O*-glucoside)和毛地黄黄酮-4'-*O*-葡萄糖苷(luteolin-4'-*O*-glucoside)相同, 而且文献报道在反相色谱条件下毛地黄黄酮-7-*O*-葡萄糖苷于毛地黄黄酮-4'-*O*-葡萄糖苷之前洗脱^[8], 因此峰 8 鉴定为毛地黄黄酮-7-*O*-葡萄糖苷, 峰 11 鉴定为毛地黄黄酮-4'-*O*-葡萄糖苷^[10]。

从图 2J 可以看出, 峰 9 有碎片离子 m/z 565、539。碎片离子 m/z 539 应由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 701 失去一分子葡萄糖残基(162u)形成, 碎片离子 m/z 565 则是由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 701 失去一分子 3,4-二羟基苯乙醇残基形成。峰 9 的碎片离子 m/z 565 表明 3,4-二羟基苯乙醇应在该化合物分子结构的末端, 而且在峰 9 中找到 m/z 341 的双糖特征碎片离子, 这与文献报道的橄榄苦苷二葡萄糖苷(oleuropein diglucoside)质谱数据完全相同^[8], 故峰 9 应为橄榄苦苷二葡萄糖苷。

从图 2K 可以看出, 峰 10 出现碎片离子 m/z 269, 该离子是黄酮母环的特征离子, 它是由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 431 失去一分子葡萄糖残基(162u)形成的。这与文献报道的芹菜苷元-7-葡萄糖苷(apigenin-7-glucoside)质谱数据相同^[7], 故峰 10 鉴定为芹菜苷元-7-葡萄糖苷。

从图 2L、2M、2N 可以看出, 峰 12、13、14 都含有碎片离子 m/z 377、307、275。碎片离子 m/z 377 应由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 539 失去一分子葡萄糖残基(162u)形成, 而碎片离子 m/z 377 进一步失去 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$ (70u)形成碎片离子 m/z 307, 后者进一步失去 CH_3OH (32u)形成碎片离子 m/z 275。这与文献报道油橄榄叶中存在的橄榄苦苷(oleuropein)、oleuroside 和另外一种同分异构体质谱数据完全相同。根据这 3 种同分异构体和它们在反相液相色谱条件下的固定的洗脱次序^[8], 峰 12 鉴定为橄榄苦苷, 峰 14 鉴定为 oleuroside。峰 13 的保留时间在橄榄苦苷和 oleuroside 中间, 峰 13 鉴定为橄榄苦苷的另外一种同分异构体。在国产油橄榄叶 TIC 中峰面积最大的峰是保留时间 10.33min 的峰 12(橄榄苦苷), 表明即使国产油橄榄叶中橄榄苦苷和欧洲产油橄榄叶一样是含量最高的化合物。

从图 2O 可以看出, 峰 15 有碎片离子 m/z 361、291、259。碎片离子 m/z 361 应由分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 523 失去一分子葡萄糖残基(162u)形成, 而碎片离子 m/z 361 进一步失去 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$ (70u)形成碎片离子 m/z 291, 后者进一步失去 CH_3OH (32u)形成碎片离子 m/z 259。这与文献报道的 ligstroside 质谱数据完全相同^[8], 因此峰 15 鉴定为 ligstroside。

表 1 总结了本实验鉴定的峰 1~15 的化合物, 可以看出, UPLC/Q-TOF-MS 由于具有高分离能力、并且能够提供未知化合物精确分子质量和化学式, 根据化合物

表1 图1B中峰1~15的质谱数据
Table 1 MS spectral data and identification of peaks 1-15

化合物峰编号	保留时间/min	化学式	[M-H] ⁻	碎片(m/z)	化合物名称
1	3.27	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	315.1094	153、123	3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷 hydroxytyrosol-glucoside
2	3.47	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389.1084	227、183	oleoside
3	3.8	C ₈ H ₁₀ O ₃	153.0565	123	3,4-二羟基苯乙醇 hydroxytyrosol
4	4.93	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.1233	223、179	橄榄酸葡萄糖苷 elenolic acid glucoside
5	5.08	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389.1052	345、209	四乙酰开联番木鳖苷 secologanose
6	5.91	C ₂₃ H ₃₆ O ₁₃	519.2056	502、457、403、371、223、179	橄榄酸葡萄糖苷衍生物 elenolic acid glucoside derivatives
7	8.35	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.1890	179、153	毛蕊花糖苷 verbascoside
8	8.45	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0858	285	毛地黄黄酮-7-O-葡萄糖苷 luteolin-7-O-glucoside
9	9.00	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₈	701.2201	565、539	橄榄苦苷二葡萄糖苷 oleuropein diglucoside
10	9.52	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0950	269	芹菜苷元-7-葡萄糖苷 apigenin-7-glucoside
11	9.62	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0898	285	毛地黄黄酮-4'-O-葡萄糖苷 luteolin-4'-O-glucoside
12	10.33	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.1672	377、307、275	橄榄苦苷 oleuropein
13	10.61	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.1709	377、307、275	橄榄苦苷同分异构体 oleuropein isomer
14	10.83	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.1749	377、307、275	橄榄苦苷同分异构体 oleurosides
15	11.56	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	523.1800	361、291、259	ligstroside

的一级质谱信息和相关文献数据,成功鉴定了国产油橄榄中的15种酚类化合物。

3 结 论

本实验运用UPLC/Q-TOF-MS对国产油橄榄叶中的化学成分进行了色谱分离及结构鉴定,根据各个色谱峰在质谱中的精确分子质量、化学式和质谱碎片结构信息、质谱裂解规律和色谱保留规律,参考前人相关工作为基础,成功鉴定了国产油橄榄中的15种酚类化合物,其中化合物1、3为酚醇类,化合物2、4、5、6、9、12、13、14、15为裂环烯醚萜类,化合物7为苯乙烯酸衍生物,化合物8、10、11为黄酮类。实验表明UPLC/Q-TOF-MS能有效分析和表征油橄榄中的酚类化合物,国产油橄榄叶中酚类化合物的分离、鉴定有助于国产油橄榄叶进一步综合利用和开发。

参考文献:

- [1] PERRINJAQUET-MOCCEITTI T, BUSJAHN A, SCHMIDLIN C, et al. Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins[J]. *Phytother Res*, 2008, 22(9): 1239-1242.
- [2] ZARZUELO A, DUARTE J, JIMENEZ J, et al. Vasodilator effect of olive leaf[J]. *Planta Med*, 1991, 57(5): 417-417.
- [3] FREDRICKSON W R. Method and composition for antiviral therapy with olive leaves: US, 6117844[P]. 2000-09-12.
- [4] ARRAEZ-ROMAN D, SAWALHA S, SEGURA-CARRETERO A, et al. Identification of phenolic compounds in olive leaves using CE-ESI-TOF-MS[J]. *Agro Food Ind Hi Tec*, 2008, 19(6): 18-22.
- [5] PAIVA-MARTINS F, PINTO M. Isolation and characterization of a new hydroxytyrosol derivative from olive (*Olea europaea* L.) leaves[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(14): 5582-5588.
- [6] FU Shaoping, ARRAEZ-ROMAN D, MENENDEZ J A, et al. Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(1): 51-59.
- [7] OBIED H K, BEDGOOD D R Jr., PRENZLER P D, et al. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 603(12): 176-189.
- [8] FU Shaoping, ARRAEZ-ROMAN D, EGURA-CARRETERO A, et al. Qualitative screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(2): 643-654.
- [9] RYAN D, ROBARD SA K, PRENZLER P, et al. Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 855(10): 529-537.
- [10] MEIRINHOS J, MSILVA B, VALENTAO P, et al. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars[J]. *Natural Product Research*, 2005, 19(2): 189-195.