

基于HPLC-MS/MS对枇杷叶水提组分分析及萜类物质的结构鉴定

李佳美, 徐伟, 张雪, 邵百琪, 谢红瑶, 吴凡, 马智宇, 陈华

HPLC-MS/MS Analysis of Water-Extracted Components of Loquat Leaves and Structural Identification of Terpenoids

LI Jiamei, XU Wei, ZHANG Xue, SHAO Baiqi, XIE Hongyao, WU Fan, MA Zhiyu, and CHEN Hua

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040180>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

海参低聚肽的高通量HPLC-MS/MS分析鉴定和活性筛选

Analysis, Identification and Activity Screening of *Apostichopus japonicus* Oligopeptides by High Throughput of HPLC-MS/MS
食品工业科技. 2020, 41(3): 1-5, 11

基于主要功能成分含量的不同品种枇杷叶评价

Evaluation of Loquat Leaves of Different Varieties Based on the Content of Main Functional Components
食品工业科技. 2021, 42(14): 93-98

微波耦合漆酶法水提枇杷叶浸膏工艺的响应面优化

Response Surface Optimization of Water Extraction Technology of Loquat Leaves Extract by Microwave-coupled Laccase
食品工业科技. 2021, 42(6): 208-213, 240

黄山贡菊抗氧化活性成分提取工艺优化与HPLC-MS分析

Extraction Optimization of Active Ingredients in Huangshan Gongju and Analysis of HPLC-MS
食品工业科技. 2020, 41(22): 150-156, 164

液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS/MS)快速测定凉茶中的5种罂粟壳类生物碱

Rapid Determination of Five Alkaloids in Poppy Shell in Herbal Tea by HPLC-MS/MS
食品工业科技. 2021, 42(23): 266-272

猴头菇醇提物乙酸乙酯萃取相组分的分离与鉴定

Isolation and Identification of the Components of the Fractions in Ethyl Acetate Phase from Ethanol Extract of *Hericium erinaceus*
食品工业科技. 2019, 40(21): 32-37



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李佳美, 徐伟, 张雪, 等. 基于 HPLC-MS/MS 对枇杷叶水提组分分析及萜类物质的结构鉴定 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 295–303. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040180

LI Jiamei, XU Wei, ZHANG Xue, et al. HPLC-MS/MS Analysis of Water-Extracted Components of Loquat Leaves and Structural Identification of Terpenoids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 295–303. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040180

基于 HPLC-MS/MS 对枇杷叶水提组分分析及萜类物质的结构鉴定

李佳美¹, 徐伟^{1,*}, 张雪¹, 邵百琪¹, 谢红瑶¹, 吴凡¹, 马智宇¹, 陈华²

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

2. 南通市天籟村农业科技发展有限公司, 江苏海门 226100)

摘要: 利用高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS/MS) 技术, 对枇杷叶水提组分进行分析, 并且对萜类物质进行解析。采用 C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 以水+0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱, 使用 ESI 离子源, 在正、负离子模式下采集质谱数据, 共检测到 120 个化合物; 包括 18 种萜类化合物, 总相对含量 1452.693 μg/mL; 24 种黄酮类化合物, 总相对含量 10378.081 μg/mL; 18 种酚类化合物, 总相对含量 36967.955 μg/mL; 5 种香豆素类化合物, 总相对含量 214.778 μg/mL; 进一步鉴定出 18 种萜类化合物的结构, 主要包括乌苏烷型 6 种、齐墩果烷型 7 种、3 种倍半萜、1 种二萜类物质和 1 种特殊的环烯醚萜类物质; 其中标癸酸、银杏内酯 B、Prespatane、山柰酚甲酯、Icariside B₅、皂皮酸、积雪草酸、18β-甘草次酸在以往的枇杷叶活性物质中未见报道。本文为枇杷叶水提成分的研究提供参考。

关键词: 枇杷叶, 水提组分, HPLC-MS/MS, 萜类物质, 结构鉴定

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)01-0295-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040180

本文网刊:



HPLC-MS/MS Analysis of Water-Extracted Components of Loquat Leaves and Structural Identification of Terpenoids

LI Jiamei¹, XU Wei^{1,*}, ZHANG Xue¹, SHAO Baiqi¹, XIE Hongyao¹, WU Fan¹, MA Zhiyu¹, CHEN Hua²

(1. School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Nantong Tianlai Village Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd., Haimen 226100, China)

Abstract: Using high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) technology, the components in the water extract of loquat leaves were analyzed, and the terpenoids were analyzed. Using a C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), using water +0.1% formic acid solution as mobile phase gradient elution, using ESI ion source, collecting mass spectrometry data in positive and negative ion modes, a total of 120 compounds were detected; Including 18 kinds of terpenoids with a total relative content of 1452.693 μg/mL; 24 kinds of flavonoids with a total relative content of 10378.081 μg/mL; 18 kinds of phenolic compounds with a total relative content of 36967.955 μg/mL; 5 kinds of coumarins compounds with a total relative content of 214.778 μg/mL; The structures of 18 terpenoids were further identified, including 6 ursane type, 7 oleanane type, 3 sesquiterpenes, and 1 diterpenoid. And a special iridoid glycosides; Roburic acid, ginkgolide B, prespatane, shanzhiside methyl ester, icaric acid, quillaic acid, asiatic acid, 18β-glycyrrhetic acid were no report in the previous active substances of loquat leaves. This article provides a reference for the research on the water-extracted components of loquat leaves.

Key words: loquat leaves; water-extracted components; HPLC-MS/MS; terpenoids; structure identification

收稿日期: 2021-04-26

基金项目: 企业横向课题 (201703210300804)。

作者简介: 李佳美 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1277851510@qq.com。

* 通信作者: 徐伟 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: xuwei@hrbcu.edu.cn。

枇杷叶又名巴叶,为蔷薇科植物枇杷(*Eriobotryae japonica* (Thunb.) Lindl.)的干燥叶片^[1]。我国是世界上最大的枇杷生产国,枇杷树是四季均枝繁叶茂的树种,尤其初冬花芽分化前,对枇杷树进行修剪会产生大量的枇杷叶。枇杷叶富含萜类、挥发油类、黄酮类、多酚类、有机酸类以及皂苷类等物质^[2]。萜类是枇杷叶组织中的次生代谢物质,根据含有的异戊二烯单位数目的不同,可分为单萜、倍半萜、二萜、三萜和多萜等^[3]。枇杷中主要含有的是由 6 个异戊二烯单位组成的熊果烷型、齐墩果烷型的五环三萜类,目前从枇杷叶中分离出的主要三萜类物质有:熊果酸、科罗索酸、委陵菜酸、齐墩果酸、山楂酸、桦木酸等^[4-5]。

据《中国药典》记载,药用枇杷叶中齐墩果酸和熊果酸总含量大于 0.70%^[6]。叶广亿等^[7]研究发现蜜炙枇杷叶水提物平喘效果明显优于醇提物。张娜等^[8]研究了枇杷叶水提物的祛痰、止咳及抗炎作用,发现枇杷叶水提取物剂量为 0.8~3.2 g/kg 时有止咳活性。WU 等^[9]发现枇杷叶的水提物和醇提物均具有镇咳祛痰作用,且黄酮含量较高的枇杷叶水提物具有较强的祛痰活性,而三萜含量较高的枇杷叶醇提物具有较强的镇咳活性。HPLC-MS/MS 在植物药物分析领域被广泛应用,不仅具有色谱的高效分离能力,同时还能得到化合物的分子量以及离子碎片等信息,可快速确定化合物的结构^[10]。

2014 年国家卫计委发布关于批准枇杷叶等 9 种新食品原料的公告(2014 年第 20 号),为枇杷叶用于食品加工原料提供了依据,但目前国内外关于枇杷叶的研究主要集中在药用成分的醇提物上,水溶性活性物质研究报道较少。本课题采用 HPLC-MS/MS 技术,确定枇杷叶水提组分中化合物的成分,并进一步对萜类化合物进行结构鉴定,为枇杷叶水提成分的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枇杷叶(2019 年 9~11 月份) 采自江苏省海门市枇杷园;纤维素酶(1×10⁴ U/g) 东恒华道生物科技有限公司;漆酶(1×10⁵ U/g) 河北仟盛生物科技有限公司;二氯苯丙氨酸 阿拉丁试剂公司;甲醇、乙腈 LC-MS 级,Merck KGaA;甲酸 LC-MS 级,山东西亚化学工业有限公司。

HX-MC-1 实验室微波合成仪 Thermo Vanquish UHPLC 超高效液相色谱仪、Q-Exactive HF 高分辨质谱仪 Thermo Fisher Scientific; Zorbax Eclipse C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱 Agilent Technologies。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 阴干枇杷叶粉碎过 10 目筛,置于洁净的三角瓶中加入 1% 纤维素酶和 1% 漆酶,按水料比 20:1 mL/g 加入蒸馏水并将其搅拌均匀,置于

微波反应装置中,微波提取条件为:微波功率 500 W,微波时间 15 min,微波温度 50 ℃。将提取液过滤后进行旋转蒸发浓缩,浓缩至原体积的 1/5,旋转蒸发仪设置真空度为-0.085 MPa,水浴温度为 60 ℃,转速 120 r/min^[11]。

取 2 mL 枇杷叶水提组分于 5 mL 离心管中,加入 1.5 mL 的 70% 甲醇,涡旋 1 min,室温超声提取 10 min(温度:50 ℃,功率 200 W),于 4 ℃ 冰箱冷藏浸提过夜,加入 10 μL 浓度为 100 μg/mL 的内标溶液二氯苯丙氨酸,使样品溶液中内标浓度为 1 μg/mL。之后 4 ℃,5000 r/min 离心 5 min,取出上清液,根据物质内含物含量进行稀释,过膜上机。

1.2.2 液质条件 色谱条件:仪器分析平台:LC-MS(Thermo, Ultimate 3000LC, Q Exactive HF);色谱柱:C₁₈ 色谱柱(Zorbax Eclipse C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm));色谱分离条件为:柱温为 30 ℃;流速 0.3 mL/min;流动相组成 A:水+0.1% 甲酸, B:纯乙腈;进样量为 2 μL,自动进样器温度 4 ℃;流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱流动相条件
Table 1 Mobile phase conditions of liquid chromatography

时间(min)	流速(μL/min)	梯度	B 乙腈(%)
0~2	300	—	5
2~6	300	线性梯度	30
6~7	300	—	30
7~12	300	线性梯度	78
12~14	300	—	78
14~17	300	线性梯度	95
17~20	300	—	95
20~21	300	线性梯度	5
21~25	300	—	5

质谱条件:正离子模式下加热器温度 325 ℃;鞘气流速:45 Arb;辅助气流速:15 Arb;吹扫气流速:1 Arb;电喷雾电压:3.5 kV;毛细管温度:330 ℃;S-Lens RF Level:55%。负离子模式下加热器温度 325 ℃;鞘气流速:45 Arb;辅助气流速:15 Arb;吹扫气流速:1 Arb;电喷雾电压:3.5 kV;毛细管温度:330 ℃;S-Lens RF Level:55%。

扫描模式:一级全扫描(Full Scan, m/z 100~1500)与数据依赖性二级质谱扫描(dd-MS₂, TopN = 10);分辨率:120000(一级质谱)& 60000(二级质谱)。碰撞模式:高能碰撞解离(HCD)。

1.3 数据处理

质谱数据通过 Xcalibur 2.0 for DSQ II 软件处理,结合质谱数据库信息注释和分类,再参考文献报道和 PubChem, MassBank 等数据库中相同成分的碎片离子信息进行匹配分析,推测化学成分裂解规律。

2 结果与分析

2.1 枇杷叶水提组分总离子流测定结果

利用 HPLC-MS/MS 技术对枇杷叶水提组分在

正、负离子模式下进行分析,得到的总离子流图(TIC)如图 1、图 2 所示,共检测到 120 个化合物,本研究针对枇杷叶水提组分中的蒽类化合物进行结构解析。包括 18 种蒽类化合物,总相对含量 1452.693 $\mu\text{g/mL}$; 24 种黄酮类化合物,总相对含量 10378.081 $\mu\text{g/mL}$; 18 种酚类化合物,总相对含量 36967.955 $\mu\text{g/mL}$; 5 种香豆素类化合物,总相对含量 214.778 $\mu\text{g/mL}$; 还包括 16 种挥发性物质、10 种氨基酸、11 种有机酸类和 18 种其他化合物。

2.1.1 枇杷叶水提组分中黄酮类化合物种类及含量

从枇杷叶水提组分中检测到 24 种黄酮类化合物,总相对含量 10378.081 $\mu\text{g/mL}$ 。主要包括黄酮醇类 16 种: 槲皮素(112.970 $\mu\text{g/mL}$)、槲皮苷(25.693 $\mu\text{g/mL}$)、

异槲皮苷(885.100 $\mu\text{g/mL}$)、二氢槲皮素(5.206 $\mu\text{g/mL}$)、芦丁(1273.691 $\mu\text{g/mL}$)、山奈酚(55.994 $\mu\text{g/mL}$)、二氢山奈酚(1.502 $\mu\text{g/mL}$)、金丝桃苷(22.906 $\mu\text{g/mL}$)、异鼠李素(0.537 $\mu\text{g/mL}$)、阿福豆苷(1867.205 $\mu\text{g/mL}$)、山奈酚-7-O-B-D-葡萄糖苷(13.435 $\mu\text{g/mL}$)、山奈酚-3-O-芸香糖苷(12.804 $\mu\text{g/mL}$)、槲皮素-3,4'-二-O-葡萄糖苷(957.863 $\mu\text{g/mL}$)、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(7.060 $\mu\text{g/mL}$)、蒽藜苷(槲皮素-3-O-A-L-吡喃阿拉伯糖苷)(1.704 $\mu\text{g/mL}$)、花旗松素-3-O-A-L-吡喃鼠李糖苷(440.546 $\mu\text{g/mL}$); 黄烷醇类 4 种: 表儿茶素(83.833 $\mu\text{g/mL}$)、儿茶素(1330.307 $\mu\text{g/mL}$)、原花青素 B₁(2355.336 $\mu\text{g/mL}$)、原花青素 C₁(666.048 $\mu\text{g/mL}$); 异黄酮类 1 种: 葛根素(157.034 $\mu\text{g/mL}$); 黄

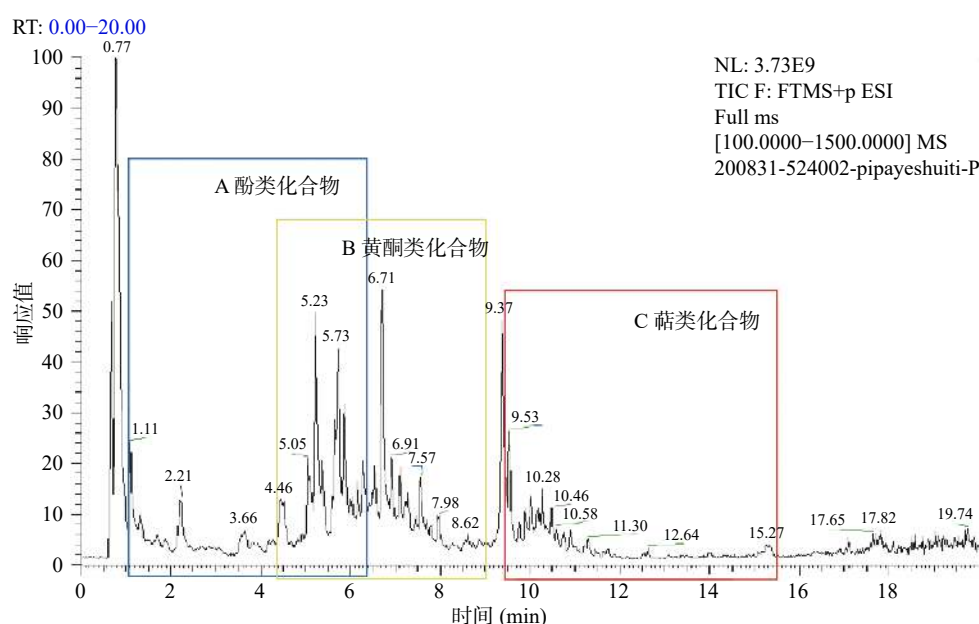


图 1 枇杷叶水提组分正离子流图

Fig.1 Positive ion flow diagram of the water-extracted components of loquat leaves

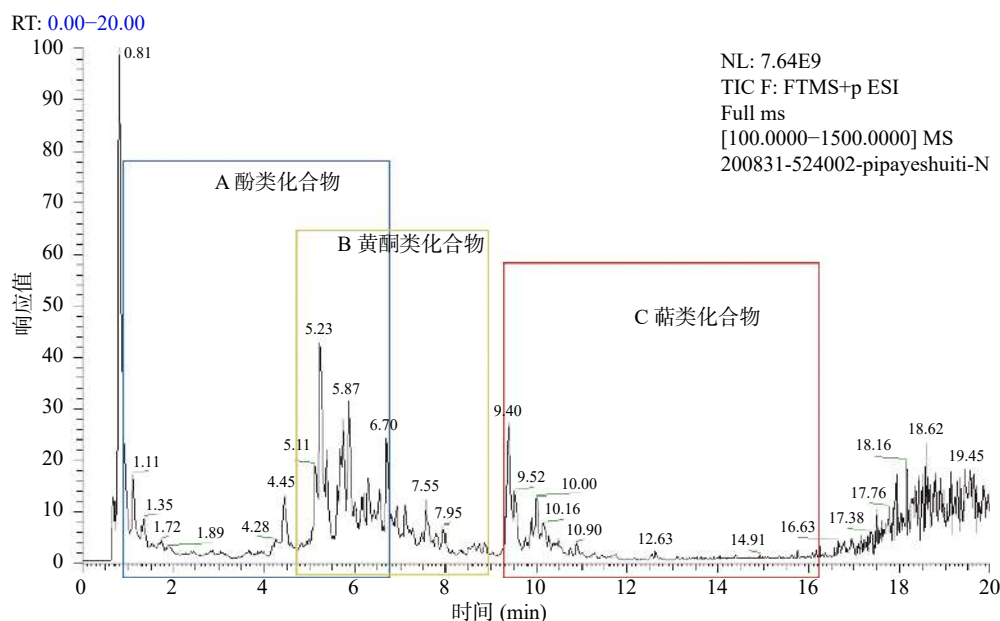


图 2 枇杷叶水提组分负离子流图

Fig.2 Negative ion flow diagram of water-extracted components of loquat leaves

酮类 2 种: 木犀草素(47.249 $\mu\text{g/mL}$)、圣草酚(2.667 $\mu\text{g/mL}$); 二氢查尔酮 1 种: 根皮苷(51.391 $\mu\text{g/mL}$)。

其中异鼠李素、异槲皮苷、芦丁、葛根素等均为枇杷叶主要功效成分。异鼠李素具有抗动脉粥样硬化、抗氧化、抗高血压等作用; 霍宇航等^[12]对“大五星”枇杷叶中主要成分进行分析, 发现异槲皮苷和芦丁含量分别为 8.08、3.86 mg/100 g, 芦丁作为枇杷叶中最主要的黄酮类物质, 具有治疗毛细血管的脆性、降胆固醇、糖尿病等作用; 葛根素是一种异黄酮类物质, 主要具有解酒毒、心肌保护等作用。

2.1.2 枇杷叶水提组分中酚类化合物种类及含量

枇杷叶水提组分检测到 18 种多酚类化合物, 总相对含量 36967.955 $\mu\text{g/mL}$ 。主要包括羟基苯甲酸类 5 种: 原儿茶酸(1.400 $\mu\text{g/mL}$)、没食子酸(16.304 $\mu\text{g/mL}$)、4-甲氧基水杨酸(2.497 $\mu\text{g/mL}$)、龙胆酸(183.657 $\mu\text{g/mL}$)、高龙胆酸(56.682 $\mu\text{g/mL}$); 羟基肉桂酸类 13 种: 咖啡酸(1.889 $\mu\text{g/mL}$)、绿原酸(219.009 $\mu\text{g/mL}$)、新绿原酸(5067.336 $\mu\text{g/mL}$)、绿原酸甲酯(31.764 $\mu\text{g/mL}$)、4-香豆酸(45.482 $\mu\text{g/mL}$)、右旋奎宁酸(23875.628 $\mu\text{g/mL}$)、3-O-阿魏酰奎尼酸(531.482 $\mu\text{g/mL}$)、2-羟基肉桂酸(15.804 $\mu\text{g/mL}$)、Caffeic acid hexoside(40.490 $\mu\text{g/mL}$)、Coumaroyl Hexoside(395.100 $\mu\text{g/mL}$)、Coumaroyl quinic acid(6386.499 $\mu\text{g/mL}$)、osmanthuside H(93.410 $\mu\text{g/mL}$)、

反-3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂(3.468 $\mu\text{g/mL}$)。

2.1.3 枇杷叶水提组分香豆素类化合物种类及含量

5 种香豆素类化合物, 总相对含量 214.778 $\mu\text{g/mL}$ 。香豆素(3.633 $\mu\text{g/mL}$)、5, 7-二羟基-4-甲基香豆素(2.466 $\mu\text{g/mL}$)、羟甲香豆素(5.982 $\mu\text{g/mL}$)、7-羟基香豆素(198.719 $\mu\text{g/mL}$)、7-甲氧基香豆素(3.978 $\mu\text{g/mL}$)。香豆素类化合物常存在于白芷中, 在枇杷叶水提物中首次被发现。袁园等^[13]采用微波辅助法提取白芷中香豆素类成分发现其含量为 11.94 mg/g。香豆素类物质具有重要生理活性: 如防止凝血、抑制病毒、清除自由基、抗氧化和抗衰老等活性。

2.1.4 枇杷叶水提组分中挥发类及其他类物质

枇杷叶水提组分中还检测到 16 种挥发性物质包括: 大茴香醛(茴芹和山楂香气)、茉莉酸甲酯(红茶主体香气)、环己基(苯基)甲醇、异佛尔酮(樟脑气味)、麝香酮、对羟基苯甲醛、邻苯二甲醛、3,4-二羟基苯甲醛、对羟基安息香醛、麦芽醇、4-吡啶甲醛、吡啶(茉莉花香)、4-羟基-3-甲氧基苯乙酮、苯乙酮(甜味)、呋喃酮(强烈的焦糖香气, 同时具有浓郁的水果香味及果酱味, 稀释后具有复盆子香味)、花椒油素。其中枇杷叶水提组分中麦芽醇含量最高为 65.21 $\mu\text{g/mL}$, 为主体呈香物质, 具有草莓香气。

此外, 枇杷叶水提组分中还检测到有机酸类 11 种, 包括 4-茴香酸、1-丁烯-2,3,4-三羧酸、柠檬

表 2 枇杷叶水提组分中萜类物质的 UPLC-MS/MS 成分检测鉴定结果

Table 2 UPLC-MS/MS component detection and identification results of terpenoids in the water-extracted components of loquat leaves

序号	化合物名称	分子式	MS ¹ m/z	二级质谱(m/z)	保留时间(min)	相对含量($\mu\text{g/mL}$)
#1	山梔苷甲酯 ^[14] Shanzhiside methyl ester	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	405.1408[M-H] ⁻	243.4643	1.694	898.279
2	银杏内酯B ^[15-16] Ginkgolide B	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	425.1422[M+H] ⁺	425.1421, 407.1098, 365.0654	5.627	3.353
#3	Icariside B ₅	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	389.2173[M+H] ⁺	389.2173	6.382	4.509
4	石竹素Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	221.1902[M+H] ⁺	221.1902, 203.1797	7.963	8.704
#5	Prespatane ^[17]	C ₁₅ H ₂₄	205.1953[M+H] ⁺	205.1953, 149.1327	9.377	57.968
6	熊果酸衍生物(3 β ,5 ξ ,9 ξ)-3,6,19-Trihydroxyurs-12-en-28-oic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	489.3577[M+H] ⁺	489.3577	9.41	5.660
#7	光甘草内酯 ^[14] Glabrolide	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	469.3316[M+H] ⁺	469.3316, 451.3209	10.521	3.701
8	三羟基齐墩果酸 ^[18] Arjungenin	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503.3388[M-H] ⁻	503.3388	10.524	115.929
#9	皂皮酸Quillaic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	487.3421[M+H] ⁺	487.3421	10.745	1.622
10	熊果酸衍生物3,19-Dihydroxyurs-12-ene-23,28-dioic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	503.3374[M+H] ⁺	503.3374	10.904	5.853
11	熊果酸衍生物(1 α ,2 α ,3 β ,5 ξ ,9 ξ ,18 ξ)-1,2,3,19-Tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	505.3531[M+H] ⁺	505.3531	11.058	0.325
#12	积雪草酸 ^[18] Asiatic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.3439[M-H] ⁻	487.3437	11.735	220.031
13	齐墩果酸衍生物(3 β ,5 ξ ,9 ξ)-3,23-Dihydroxy-1-oxoolean-12-en-28-oic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	487.3426[M+H] ⁺ 485.3283[M-H] ⁻	487.3426	12.755	0.568 95.881
14	熊果酸 ^[18] Ursolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	458.3522[M+H] ⁺	458.3521	13.497	1.306
15	科罗索酸 ^[18] Corosolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	473.3629[M+H] ⁺	473.3629	13.498	0.683
#16	18 β -甘草次酸18 β -Glycyrrhetic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.3329[M-H] ⁻	469.3329	15.364	9.547
#17	栝楼酸 ^[19-20] Roburic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	441.3134[M+H] ⁺	441.3734, 423.3627, 395.3679	15.403	9.868
18	齐墩果酸 ^[18] Oleanolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.3539[M-H] ⁻	455.3538	16.482	9.476

注: 该水提组分含水量为20%; #表示该物质在以往的枇杷叶活性物质中未见报道。

酸、1-氨基环己烷羧酸、己二酸、壬二酸、 α -桐酸、亚麻酸、2-羟基戊二酸、莽草酸、曲酸;氨基酸类 10 种,包括 D-(+)-脯氨酸、谷氨酸、L-异亮氨酸、L-正亮氨酸、L-苯丙氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸、2-羟基苯丙氨酸、N-果糖基异亮氨酸、2-哌啶甲酸;核苷类:鸟嘌呤、腺嘌呤;一种双环单萜酮类:D-(+)-樟脑;一种柠檬苦素类物质:柠檬酮;生物碱 3 种:巴豆苷、甜菜碱、当归碱;维生素类 3 种:泛酸、烟酸(维生素 B₃)、吡哆醇(维生素 B₆)。

2.2 萜类化合物的结构鉴定

再根据化合物的二级质谱信息,通过数据库、分子量、质谱碎片、裂解规律、结合文献信息等进行对比,进一步鉴定出了水提组分中 18 种萜类化合物的

结构。萜类化合物的鉴定结果、质谱数据等信息见表 2。18 个萜类化合物,主要包括乌苏烷型 6 种:化合物 6、10、11、12、14、15;齐墩果烷型 7 种:7、8、9、13、16、17、18;3 种倍半萜类物质:化合物 3、4、5;1 种二萜类物质:化合物 2;1 种特殊的环烯醚萜苷:化合物 1。化学结构式如图 3 所示。

根据化合物的保留时间和质谱数据,对化合物进行了鉴定。三萜皂苷类成分,在质谱中发生高能碰撞,容易脱去葡萄糖基,而对于三萜酸类成分容易失去 H₂O、CO 等中性基团^[21]。

化合物 1,在正离子模式下的一级质谱为 m/z 405.1408[M-H],提示其分子量为 406.1482。二级质谱中出现明显的碎片离子峰 243.4643,是(M-H)脱

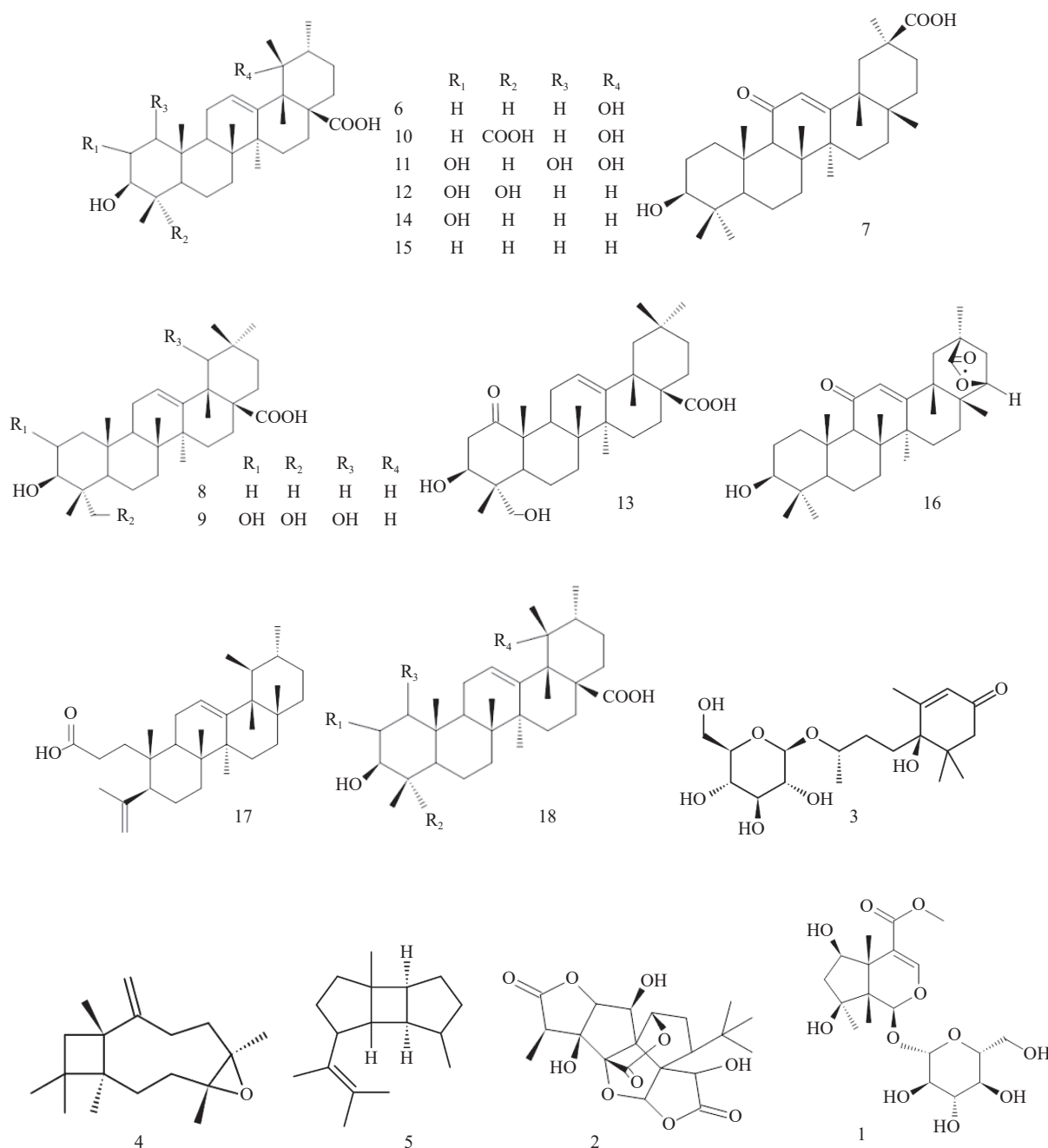


图 3 枇杷叶水提组分中萜类化学成分结构式

Fig.3 Structural formula of terpenoids in water extract of loquat leaves

去一个葡萄糖基后的特征碎片峰($M-H-Glu$)⁻。基于质谱数据、并结合文献数据^[22]比较分析最终鉴定化合物 1 为山梔苷甲酯,其二级质谱图和裂解途径解析如图 4 所示。山梔苷甲酯在以往的枇杷叶活性物质中未见报道,是一种特殊的环烯醚萜类,具有镇痛、抗炎和止血等功效^[23],这与枇杷叶主要功能相吻合。

化合物 2,其在正离子模式下的一级质谱为 m/z 425.1422 [$M+H$]⁺,提示其分子量为 424.1349。二级质谱中出现明显的碎片离子峰 407.1098 和 365.0654,分别是($M+H$)⁺脱去一分子水后的特征碎片峰

($M+H-H_2O$)⁺和($M+H-H_2O-H_2-CO_2$)⁺基于质谱数据,并结合文献数据^[15-16]比较分析最终鉴定化合物 2 为银杏内酯 B,其二级质谱图和裂解途径解析如图 5 所示。

银杏内酯 B 是一种二萜内酯,为银杏叶的主要活性物质,在以往的枇杷叶活性物质中未见报道,是有效的血小板激活因子拮抗剂,被广泛应用于心脑血管疾病^[15]。

化合物 4,在正离子模式下的一级质谱为 m/z 221.1906 [$M+H$]⁺,提示其分子量为 220.1830。二级

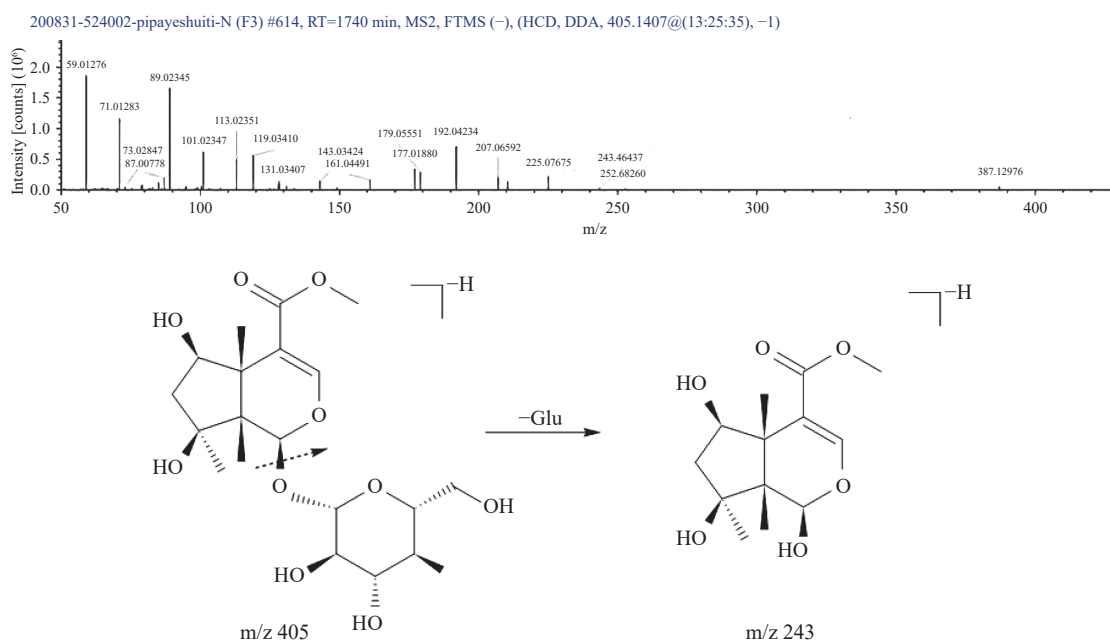


图 4 山梔苷甲酯二级质谱图及裂解途径

Fig.4 MS spectrum and cleavage pathway of kaempferol methyl ester

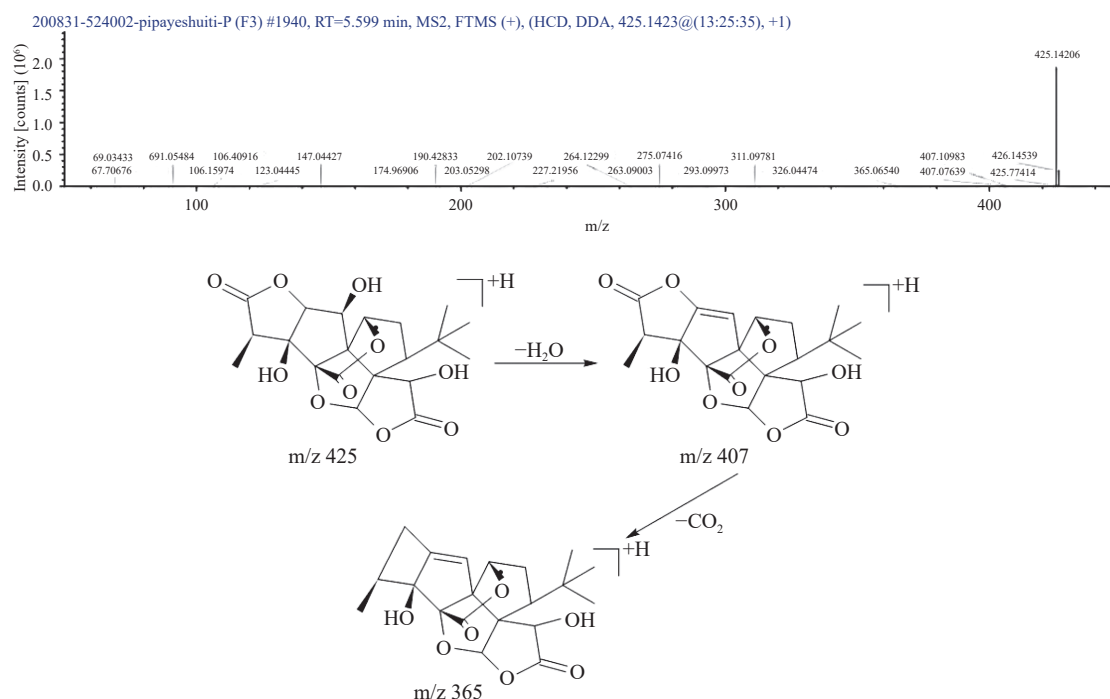


图 5 银杏内酯 B 二级质谱图及裂解途径

Fig.5 Ginkgolide B secondary mass spectrum and its cleavage pathway

质谱中出现明显的碎片离子峰 203.1797, 是 $(M+H)^+$ 脱去一分子水后的特征碎片峰 $(M+H-H_2O)^+$ 。基于质谱数据、并结合文献数据比较分析最终鉴定化合物 4 为石竹素。化合物 5, 在正离子模式下的一级质谱为 m/z 205.1952 $[M+H]^+$, 提示其分子量为 204.1880。二级质谱中出现明显的碎片离子峰 149.1327, 是 $(M+H)^+$ 脱去 C_4H_8 的特征碎片峰 $(M+H-C_4H_8)^+$ 。基于质谱数据、并结合文献数据^[17] 比较分析最终鉴定化合物 5 为 Prespatane。

以化合物 12 为例, 其在负离子模式下的一级质谱为 m/z 487.3439 $[M-H]^-$, 提示其分子量为 488.3511, 二级质谱中现明显的碎片离子峰 487.3437。基于质谱数据、色谱 t_R 、并结合文献数据^[18] 比较分析最终鉴定化合物 12 为积雪草酸, 其二级质谱图和裂解途径解析如图 6 所示。化合物 14、15、11、6、10、18、8、7、16、13 结构与积雪草酸类似, 皆为五环三萜类, 有相似的质谱裂解规律, 此处不再赘述, 推测为熊果酸、科罗素酸、 $(1\alpha, 2\alpha, 3\beta, 5\zeta, 9\zeta, 18\zeta)$ -1,2,3,19-Tetrahydroxurs-12-en-28-oic acid (熊果酸衍生物)、 $(3\beta, 5\zeta, 9\zeta)$ -3,6,19-Trihydroxurs-12-en-28-oic acid (熊果酸衍生物)、3,19-Dihydroxurs-12-ene-23,28-dioic acid (熊果酸衍生物)、齐墩果酸、三羟基齐墩果酸、光甘草内酯、 18β -甘草次酸、 $(3\beta, 5\zeta, 9\zeta)$ -3,23-Dihydroxy-1-oxoolean-12-en-28-oic acid (齐墩果酸衍生物)。

熊果酸及其衍生物、齐墩果酸及其衍生物均为枇杷叶主要功能成分, 具有抗炎、降血糖等功效。莫颖华等^[24] 采用醇回流法提取枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸总量为 8.21 $\mu\text{g/mL}$, 本实验检测到水提枇杷叶组分中熊果酸和齐墩果酸总量为 16.51 $\mu\text{g/mL}$; 与以往报道相比, 积雪草酸、光甘草内酯、 18β -甘草次酸为首次在枇杷叶中发现。积雪草酸来源于积雪草, 李伊莎等^[25] 采用 HPLC 法检测醇提法提取积雪草中积

雪草酸含量为 1.155 g/kg, 本实验检测到水提枇杷叶组分中积雪草酸含量为 220.031 $\mu\text{g/mL}$ 。据报道, 积雪草酸具有治疗皮肤创伤、抗抑郁、抗阿尔茨海默病、修复神经损伤等多种药理作用^[26]。光甘草内酯和 18β -甘草次酸是甘草的特征性成分, PELLATTI 等^[27] 发现, 18β -甘草次酸是持续外阴阴道念珠菌病局部治疗的一种有前途的生物成分; 且对引起呼吸道感染的病毒有体外抗病毒作用, 如流感病毒和严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒。

化合物 17, 其在正离子模式下的一级质谱为 m/z 441.3134 $[M+H]^+$, 提示其分子量为 440.3659。二级质谱中出现明显的碎片离子峰 423.3627 和 395.3679, 是 $(M+H)^+$ 脱去一分子水后和 CO 的特征碎片峰 $(M+H-H_2O)^+$ 、 $(M+H-H_2O-CO)^+$, 基于质谱数据、色谱 t_R 、并结合文献数据^[19-20] 比较分析最终鉴定化合物 17 为栲瘿酸, 其二级质谱图和裂解途径解析如图 7 所示。

栲瘿酸为 A 环开裂的五环三萜类化合物, 常从大叶秦艽的脂溶性成分中被分离出来^[28], 陈玉芬等^[29] 发现栲瘿酸可使被动皮肤过敏小鼠耳朵的染色变浅、肿胀程度减轻, 具有体内抗炎活性。

3 结论

利用高效液相色谱-质谱对枇杷叶水提组分进行分析检测及主要成分的结构鉴定, 正、负离子模式下水提组分中共检测到 120 个化合物。包括 18 种蒽类化合物, 总相对含量 1452.693 $\mu\text{g/mL}$; 24 种黄酮类化合物, 总相对含量 10378.081 $\mu\text{g/mL}$; 18 种酚类化合物, 总相对含量 36967.955 $\mu\text{g/mL}$; 5 种香豆素类化合物, 总相对含量 214.778 $\mu\text{g/mL}$; 通过数据库、分子量、质谱碎片、裂解规律、结合文献信息等进行对比, 鉴定出 18 种蒽类化合物的结构, 主要包括乌苏烷型 6 种、齐墩果烷型 6 种、3 种倍半萜、1 种二

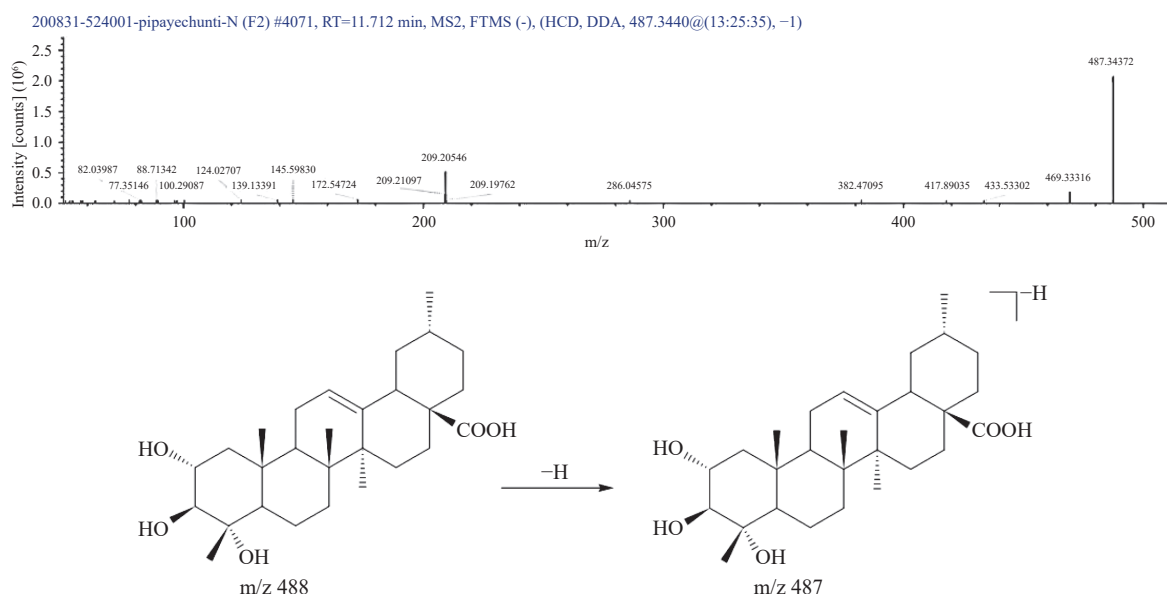


图 6 积雪草酸二级质谱图及裂解途径

Fig.6 Asiatic acid secondary mass spectrum and its cleavage pathway

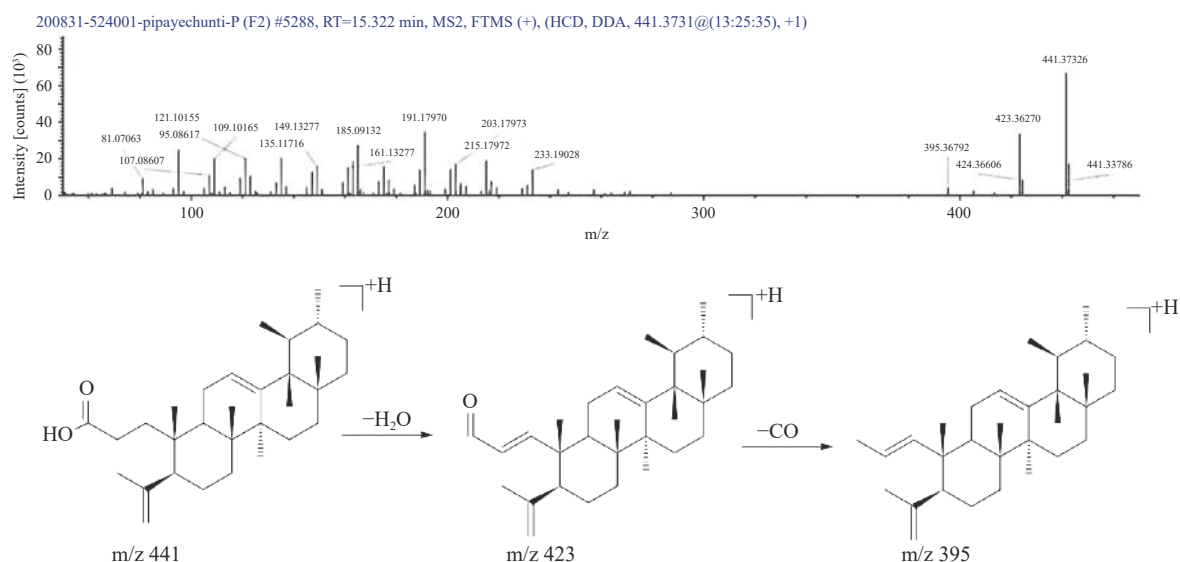


图7 栲瘿酸二级质谱图及裂解途径

Fig.7 Quercus acid secondary mass spectrum and cleavage pathway

萜类物质和 1 种特殊的环烯醚萜苷类物质。与以报道的枇杷叶萜类物质相比, 栲瘿酸、银杏内酯 B、Prespatane、山梔苷甲酯、Icariside B₅、皂皮酸、积雪草酸、18 β -甘草次酸。本研究为全面解析枇杷叶水提组分提供参考, 为枇杷叶水提物应用于功能食品开发研究提供依据。

参考文献

- [1] 魏鑫. 枇杷叶的三萜酸类化学成分研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2014. [WEI X. The study on chemical constituents of triterpene acids in loquat leaves[D]. Kunming: Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 2014.]
- [2] 孙燕丽, 胡巧云, 谢茹胜. 枇杷叶的化学成分及药理作用研究进展[J]. 海峡药理学, 2019, 31(8): 57-59. [SUN Y L, HU Q Y, XIE R S. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of loquat leaves[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2019, 31(8): 57-59.]
- [3] ASHOUR M, WINK M, GERSHENZON J. Biochemistry of terpenoids: Monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes[M]//Wink M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. 2nd ed. Wiley Blackwell, 2010: 258-303.
- [4] 陈欢, 陈光, 任红梅, 等. 枇杷叶中三萜类成分的研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2012, 39(3): 40-45. [CHEN H, CHEN G, REN H M, et al. Isolation of the triterpenes from *Eriobotrya japonica* leaves[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2012, 39(3): 40-45.]
- [5] 吕寒, 陈剑, 李维林, 等. 枇杷叶中三萜类化学成分的研究[J]. 中药材, 2008, 29(9): 1351-1354. [LV H, CHEN J, LI W L, et al. Studies on the triterpenes from loquat leaf (*Eriobotrya japonica*) [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 29(9): 1351-1354.]
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015. [National Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.]
- [7] 叶广亿, 李书渊, 陈艳芬, 等. 枇杷叶不同提取物的止咳化痰平喘作用比较研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 100-102. [YE G Y, LI S Y, CHEN Y F, et al. Comparative study of different extracts of loquat leaf in antitussive an expectorant and antiasthmatic effects[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2013, 29(2): 100-102.]
- [8] 张娜, 吴绍康, 沈先荣, 等. 枇杷叶水提物祛痰止咳及抗炎作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(9): 2175-2177. [ZHANG N, WU S K, SHEN X R, et al. Study on expectorant, antitussive and anti-inflammatory effects of aque extract of *Eriobotrya japonica* leaves[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2014, 32(9): 2175-2177.]
- [9] WU Y X, JIAN T Y, LV H, et al. Antitussive and expectorant properties of growing and fallen leaves of loquat (*Eriobotrya japonica*) [J]. Revista Brasileira De Farmacognosia, 2018: S0102695X 17305264.
- [10] 黄家晋, 黄智霖, 陈鸿庚, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析凉粉草多酚组分的化学成分[J/OL]. 天然产物研究与开发: 1-18 [2021-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20210318.1727.009.html>. [HUANG J J, HUANG Z L, CHEN H G, et al. Analysis of polyphenols from *Mesona chinensis* by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J/OL]. Natural Product Research and Development: 1-18 [2021-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20210318.1727.009.html>.]
- [11] 徐伟, 李佳美, 马智宇, 等. 微波耦合漆酶法水提枇杷叶浸膏工艺的响应面优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 208-213, 240. [XU W, LI J M, MA Z Y, et al. Response surface optimization of water extraction technology of loquat leaves extract by microwave-coupled laccase[J]. Food Industry Technology, 2021, 42(6): 208-213, 240.]
- [12] 霍宇航, 李檐堂, 刘丽丽, 等. 基于主要功能成分的 6 个品种枇杷叶分析评价[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 234-240. [HUO Y H, LI Z T, LIU L L, et al. Analysis and evaluation of main functional components of loquat leaf different positions from 6 varieties]

- ies[J]. *Food Science*, 2019, 40(24): 234–240.]
- [13] 袁园, 张燕军, 张孝琴. 白芷中香豆素类成分的提取工艺研究[J]. *山东化工*, 2016, 45(10): 29–31. [YUAN Y, ZHANG Y J, ZHANG X Q. Study on extraction and stability of coumarins in *angelica dahurica*[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2016, 45(10): 29–31.]
- [14] 王婷婷, 安骛, 梁琨, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的葛根芩连汤的化学成分分析[J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1498–1507. [WANG T T, AN R, LIANG K, et al. Chemical constituent analysis of Gegen Qinlian decoction based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(6): 1498–1507.]
- [15] BUCKOW R, KASTELL A, TEREFE N S, et al. Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58(18): 10076–10084.]
- [16] YANG L, LIU R H, HE J W. Rapid analysis of the chemical compositions in *Semiliquidambar cathayensis* roots by ultra high-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4098.]
- [17] 张聪, 刘建勋, 孙明谦, 等. 3 种银杏内酯成分的质谱裂解途径研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(20): 4093–4096. [ZHANG C, LIU J X, SUN M Q, et al. Study on fragmentation pathways of three ginkgolides by mass spectrometry[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43(20): 4093–4096.]
- [18] 李泮霖, 黄昕, 云莎, 等. 基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 技术的银杏叶提取物注射液化学物质基础研究[J]. *中中药学*, 2017, 15(5): 573–579. [LI P L, HUANG X, YUN S, et al. Chemical material basis of extract of *Ginkgo biloba* leaves injection by ultrafast liquid chromatography/triple time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Central South Pharmacy*, 2017, 15(5): 573–579.]
- [19] NABETA K, YAMAMOTO M, KOSHINO H, et al. Absolute configuration of kelsoene and prepatane[J]. *Bioence Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 63(10): 1772–1776.]
- [20] 陈方超, 高守红, 王志鹏, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定藤梨根的化学成分[J]. *中国药房*, 2020, 31(14): 1725–1731. [CHEN F C, GAO S H, WANG Z P, et al. Identification of chemical components in *Actinidia chinensis* root by UHPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *China Pharmacy*, 2020, 31(14): 1725–1731.]
- [21] 莫颖华, 冯白茹, 刘道军. 枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸的提取工艺研究[J]. *汕头大学医学院学报*, 2017, 30(3): 137–138, 171. [MO Y H, FENG B R, LIU D J. The study on the extraction process of ursolic acid and oleanolic acid in loquat leaves[J]. *Journal of Shantou University Medical College*, 2017, 30(3): 137–138, 171.]
- [22] 李伊莎, 夏彬彬, 徐唯哲, 等. 积雪草酸提取工艺及其在 70 种中药中质量分数的测定[J]. *首都医科大学学报*, 2013, 34(5): 766–769. [LI Y S, XIA B B, XU W Z, et al. The extraction process of asiatic acid and the determination of its mass fraction in 70 kinds of traditional chinese medicine[J]. *Journal of Capital Medical University*, 2013, 34(5): 766–769.]
- [23] 李季, 崔兵兵, 曲远均. 积雪草药理活性及新制剂研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(12): 200–204. [LI J, CUI B B, QU Y J. Research progress in chemical constituents, pharmacological activities a new preparations of *Centella asiatica*[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 22(12): 200–204.]
- [24] PELLATI D, FIORE C, ARMANINI D, et al. *In vitro* effects of glycyrrhetic acid on the growth of clinical isolates of *Candida albicans*[J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 23(4): 572–574.]
- [25] LI Z, DU Y, YUAN Y, et al. Integrated quality evaluation strategy for multi-species resourced herb medicine of Qinjiao by metabolomics analysis and genetic comparison[J]. *Chinese Medicine*, 2020; 15.]
- [26] WANG C C, CAI Z C, SHI J J, et al. Comparative metabolite profiling of wild and cultivated licorice based on ultra-fast liquid chromatography coupled with triple quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 67(10): 1104–1115.]
- [27] 聂安政, 林志健, 王雨, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(3): 597–608. [NIE A Z, LIN Z J, WANG Y, et al. Advance in studies on chemical constituents of *Gentianae macrophylla* Radix and their pharmacological effects[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(3): 597–608.]
- [28] 陈玉芬. 栎瘿酸的抗炎作用及机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2017. [CHEN Y F. The anti-inflammatory effect of roburic acid and the related mechanism [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2017.]
- [29] SELEMANI M A, KAZINGIZI L F, MANZOMBE E, et al. Phytochemical characterization and in vitro antibacterial activity of *Xeroderris stuhlmannii*(Taub.) Mendonca & EP Sousa bark extracts[J]. *South African Journal of Botany*, 2021, 142: 344–351.]