

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.02.0159

## 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 的广枣果肉化学成分分析

杨璐萌<sup>1</sup>, 杨凌鉴<sup>1</sup>, 贾璞<sup>1</sup>, 兰薇<sup>1</sup>, 张亚军<sup>1</sup>, 王世祥<sup>1</sup>, 张鹏<sup>2\*</sup>, 郑晓晖<sup>1\*</sup>

1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069

2. 陕西省人民医院药剂科, 西安 710068

**[摘要]** **目的** 采用高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)法对广枣醇提物的主要化学成分进行分析鉴定。**方法** 采用回流提取法制备广枣醇提物,以 Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm)柱为分析柱,并以 0.2%甲酸-甲醇溶液为流动相,流速 0.7 mL/min,柱温 30℃,进样量 25 μL,进行梯度洗脱;质谱采用电喷雾离子源,毛细管电压 4.0 kV,干燥器流速 10.0 L/min,干燥器温度 350℃,雾化器压力 35.0 psi(1 psi=6 894.8 Pa),正负离子模式下扫描采集数据,并对各主要色谱峰进行归属。**结果** 通过正负离子质谱信息及元素组成分析,并结合相关文献和对照品数据对照,共鉴定出 42 种化合物,主要为氨基酸类、有机酸类及黄酮类,其中首次在广枣中发现的成分有 17 种。**结论** HPLC-Q-TOF-MS/MS 兼具色谱的高分离特性和质谱的高灵敏度双重优势,能对广枣的主要化学成分进行定性分析,可为广枣药效物质的基础研究提供依据。

**[关键词]** 广枣;化学成分;高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱;定性分析

**[中图分类号]** R 931.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)02-0159-08

### HPLC-Q-TOF-MS/MS-based analysis of chemical constituents in *Choerospondiatis fructus*

YANG Lu-meng<sup>1</sup>, YANG Ling-jian<sup>1</sup>, JIA Pu<sup>1</sup>, LAN Wei<sup>1</sup>, ZHANG Ya-jun<sup>1</sup>, WANG Shi-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Peng<sup>2\*</sup>, ZHENG Xiao-hui<sup>1\*</sup>

1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

2. Department of Pharmacy, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To apply high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS) method in analyzing and identifying the main components in the ethanol extract of *Choerospondiatis fructus*. **Methods** The ethanol extract of *Choerospondiatis fructus* was prepared by the refluxing methods, and the main components in the extracts were separated by the gradient elution method with Agilent TC-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), methanol-0.2% formic acid as the mobile phase, at flow rate 0.7 mL/min, column temperature 30℃, and sample volume 25 μL. Mass spectrometry was applied for the qualitative analysis under the positive and negative ion modes and ESI ion source was used for mass spectra, V<sub>cap</sub> 4.0 kV, drying gas 10 L/min, gas temperature 350℃, and nebulizer 35 psi (1 psi=6 894.8 Pa). The main chromatographic peaks were assigned by Q-TOF. **Results** Forty-two compounds were identified through direct comparison of both positive and negative ion mass data, the element composition analysis, the data of the literature and the information from reference substances, including amino acids, organic acids, and flavonoids. Among them 17 constituents have been firstly found in *Choerospondiatis fructus*. **Conclusion** HPLC-Q-TOF-MS/MS has the advantage of the efficient separation ability of HPLC and highly sensitive detection of MS, and is capable of making a qualitative analysis of the main components in *Choerospondiatis fructus*, which provides an evidence for study.

**[Key words]** *Choerospondiatis fructus*; chemical components; high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; qualitative analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(2): 159-166]

**[收稿日期]** 2015-08-31 **[接受日期]** 2015-11-07

**[基金项目]** 教育部长江学者和创新团队发展计划 (IRT1174), 陕西省重点科技创新团队计划 (2013KCT-24), 陕西省自然科学基金 (2013JC2-07). Supported by Changjiang Scholars and Innovative Research Team Plan of Ministry of Education, China (IRT1174), Key Science and Technology Innovation Team Project of Shaanxi Province (2013KCT-24), and Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2013JC2-07).

**[作者简介]** 杨璐萌, 硕士生. E-mail: ylmiaomeili@163.com

\* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 029-85251331-3253, E-mail: 13335383051@163.com; Tel: 029-88302686, E-mail: zhengxh@nww.edu.cn

广枣为漆树科南酸枣属植物南酸枣 [*Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill] 的干燥成熟果实,性味甘、酸、平,有行气活血、养心安神之功<sup>[1]</sup>。广枣具有抗心肌缺血和心律失常、抑制血小板聚集、抗缺氧、清除自由基、抗氧化以及诱导细胞凋亡等多种药理作用,临床上常用于治疗气滞血瘀、胸痹作痛、心悸气短、心神不安等心血管疾病<sup>[2-6]</sup>。而广枣的化学成分及药效作用的物质基础尚不明确,因此对其化学成分的研究工作十分重要。高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法(HPLC-Q-TOF-MS/MS)是一种将色谱的高效在线分离与质谱的高灵敏度、高选择性完美结合的联用技术,能够准确快速地对药材化学成分进行定性分析。当前对广枣化学成分的研究基本按分离、提纯、鉴定的方式进行,很少采用液相色谱-质谱分析法<sup>[7]</sup>。本研究采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 法对广枣醇提物进行定性分析,用电喷雾电离源正离子模式和负离子模式对色谱流出物进行检测,通过高分辨质谱分析结合对照品数据、数据库及相关文献共鉴定了 42 个化合物,其主要成分为氨基酸类、有机酸类、黄酮类等物质,旨在为广枣的药效物质基础研究提供有力依据。

## 1 材料和方法

1.1 仪器 安捷伦科技公司 1200 Series 型高效液相色谱系统,包括在线脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器;6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS/MS,配有采集与数据处理软件(mass hunter workstation software version B.04.00)。XS105Dual Range 万分之一天平(瑞士 METTLER-TOLEDO)。

1.2 试剂 没食子酸(批号 110831-201204)、原儿茶酸(批号 110809-201205)、原儿茶醛(批号 110810-201007)、槲皮素(批号 100081-200907)、熊果酸(批号 110742-201220)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-201308)、儿茶素(批号 110877-201203)等对照品均购于中国食品药品检定研究院;柠檬酸、对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸、水杨酸、鞣花酸等对照品均购于国药集团化学试剂有限公司;色谱纯甲醇及甲酸购于美国 Fisher 公司;实验用水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

广枣药材购于西安市万寿路药材市场,并由西北大学生命科学学院房敏峰副教授鉴定为漆树科植物南酸枣 *Choerospondias axillaris* (Roxb.) 的干燥成熟果实。

### 1.3 样品制备

1.3.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸、原儿茶酸、原儿茶醛、槲皮素、熊果酸、5-羟甲基糠醛和儿茶素、柠檬酸、对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸、水杨酸、鞣花酸对照品各 20 mg,置于 5 mL 避光容量瓶,用甲醇定容,制成质量浓度为 4 mg/mL 的混合对照品溶液,连续 2 次 4 倍稀释至质量浓度为 0.25 mg/mL,于 4℃ 冷藏保存。

1.3.2 广枣醇提物的制备 将干燥至恒质量的广枣药材去核,将果肉粉碎,过 40 目筛。称取 50 g 样品 4~6 倍 70% 乙醇回流提取 2 次<sup>[8]</sup>,每次时间均为 1 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至约 20 mL,转移至 25 mL 容量瓶,加水定容,制得含生药质量浓度为 2 g/mL 的广枣乙醇提取液。将广枣醇提取液稀释 10 倍,0.45 μm 有机微孔滤膜过滤,取续滤液进行 HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析。

### 1.4 HPLC-Q-TOF-MS/MS 条件

1.4.1 液相色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:0.2% 甲酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱,0~15 min 10% B,15~60 min 10%~85% B,60~70 min 100% B;流速:0.7 mL/min;柱温:30℃;进样量:25 μL;柱后 3:1 分流,1/4 导入质谱进行定性分析。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);毛细管电压:4.0 kV;干燥气温度:350℃;干燥气流速:10 L/min;雾化气压力:35 psi(1 psi=6 894.8 Pa);碎裂电压:135 V;正负离子模式下扫描检测,一级质谱扫描范围:100~1 000 m/z,二级质谱扫描范围:50~1 000 m/z;正离子模式下参比离子设置为 m/z 121.050 9 和 922.009 8,负离子模式下参比离子设置为 m/z 112.985 5 和 966.000 7。

## 2 结果

在拟定的分析条件下,广枣醇提物和混合对照品在正负离子模式下的总离子流图如图 1 和图 2 所示。通过对正负离子模式下的一级、二级质谱图(图 3)进行分析,并根据保留行为结合数据库

METLIN、Massbank 和 Human Metabolome Database (HMDB) 及相关文献报道进行结构鉴定,

共确定了 42 种成分(表 1), 其中已有报道的有 25 种成分, 首次在广枣中发现的成分有 17 种。

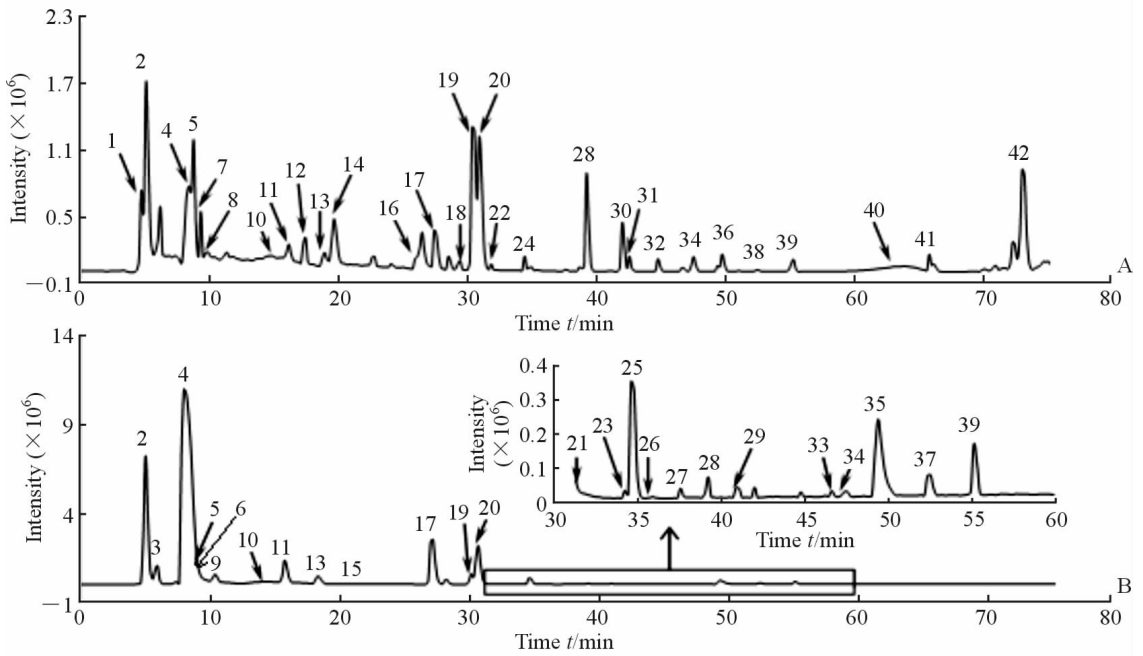


图 1 广枣醇提物总离子流图

Fig 1 The total ion chromatogram of ethanol extract of *Choerospondiatis fructus*

A; Positive mode; B; Negative mode. 1: Proline; 2: Quinic acid; 3: Malic acid; 4: Citric acid; 5: Isoleucine; 6: Succinic acid; 7: Leucine; 8: Tyrosine; 9: Monoglyceride citrate; 10: Chebulic acid; 11: Gallic acid; 12: Phenylalanine; 13: Methylcitrate; 14: 5-Hydroxymethylfurfural; 15: Methylcitrate; 16: Pantothenic acid; 17: Protocatechuic acid; 18: Comenic acid; 19: Triethyl citrate; 20: Triethyl citrate; 21: Protocatechualdehyde; 22: Dimeric catechin; 23: *p*-Hydroxybenzoic acid; 24: Catechinic acid; 25: 2-Isopropyl malic acid; 26: *m*-Hydroxybenzoic acid; 27: Salicylic acid; 28: 6-Hydroxy indole lactic acid; 29: Ethyl gallate; 30: Scopoletin; 31: Quercetin-3-*O*-arab sugar-glucoid; 32: Methyl ellagic acid glucoside; 33: Dimethoxy ellagic acid glycosidase; 34: Hyperin; 35: Gallogen; 36: Quercetin-3'-*O*-rhamnoside; 37: Methyl ellagic acid; 38: Quercetin; 39: 3,3'-Dimethyl ellagic acid; 40: Stearic acid; 41: Dibutyl phthalate; 42: Ursolic acid

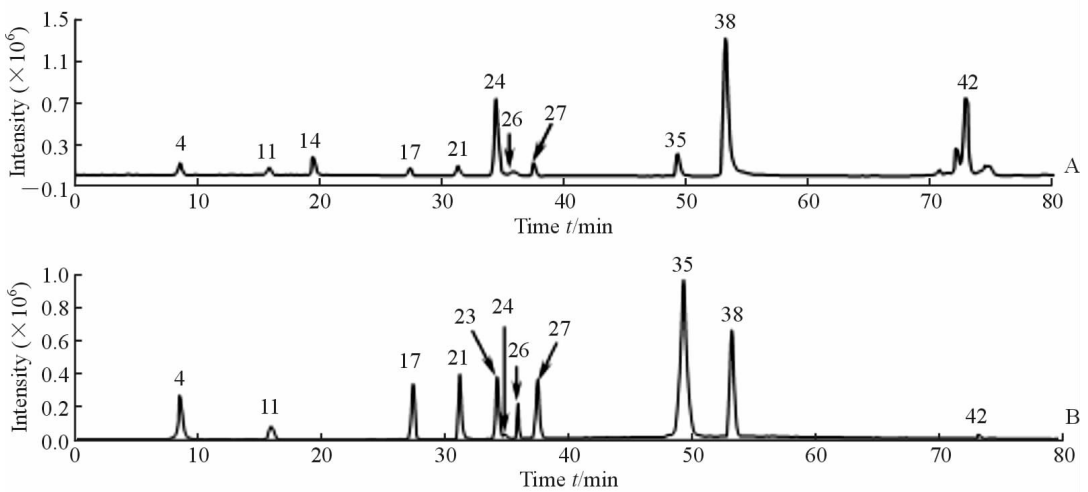


图 2 混合对照品总离子流图

Fig 2 The total ion chromatogram of the mixed reference solution

A; Positive mode; B; Negative mode. 4: Citric acid; 11: Gallic acid; 14: 5-Hydroxymethylfurfural; 17: Protocatechuic acid; 21: Protocatechualdehyde; 23: *p*-Hydroxybenzoic acid; 24: Catechinic acid; 26: *m*-Hydroxybenzoic acid; 27: Salicylic acid; 35: Gallogen; 38: Quercetin; 42: Ursolic acid

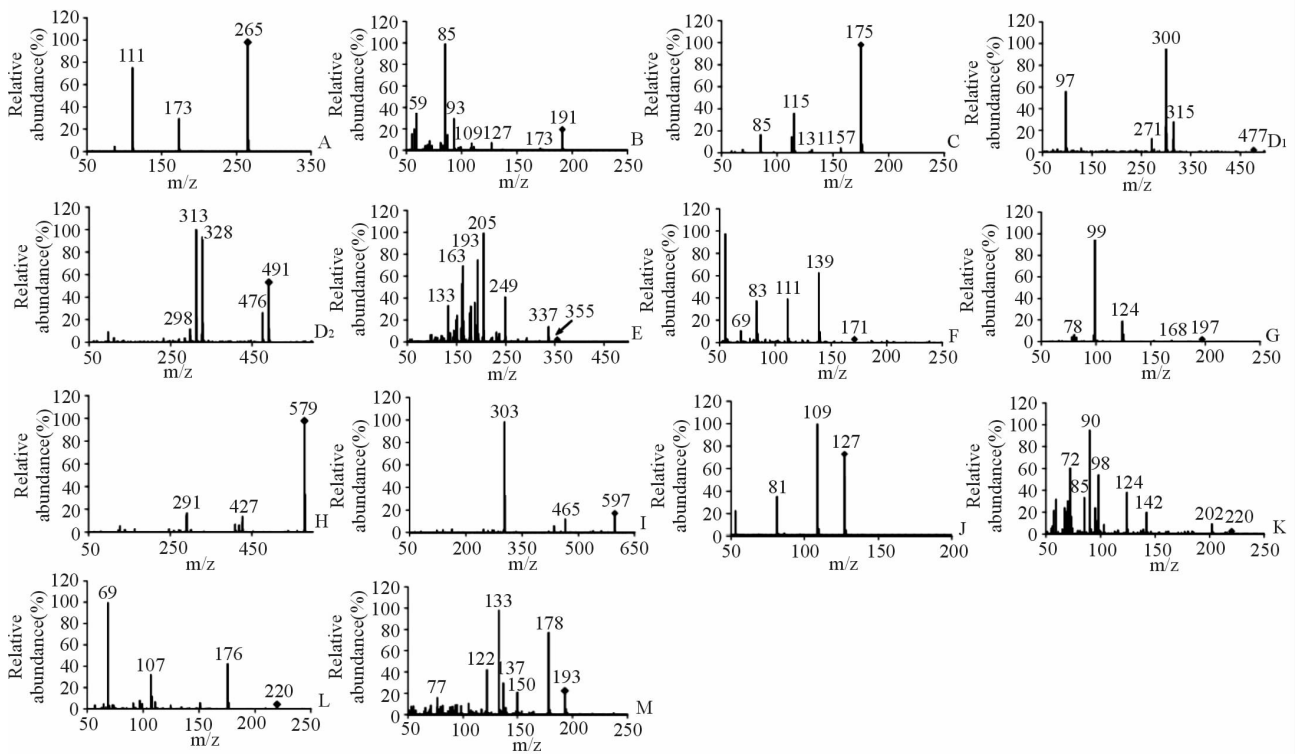


图3 广枣化学成分二级质谱图

Fig 3 MS2 spectrum of chemical constituents in *Choerospondiatis fructus*

A: Monoglyceride citrate; B: Quinic acid; C: 2-Isopropyl malic acid; D<sub>1</sub>: Methyl ellagic acid glucoside; D<sub>2</sub>: Dimethoxy ellagic acid; E: Chebulic acid; F: Comenic acid; G: Ethyl gallate; H: Dimeric catechin; I: Quercetin-3-O-arab sugar-glucoid; J: 5-Hydroxymethylfurfural; K: Pantothenic acid; L: 6-Hydroxy indole lactic acid; M: Scopoletin

2.1 氨基酸类成分 在正离子模式下,从广枣中鉴定出5种氨基酸,m/z分别为116.0698、132.1021、132.1020、182.0812、166.0859,保留时间为4.7、8.7、9.3、9.8、17.4 min,在裂解过程中均易产生HCOOH(46)和NH<sub>3</sub>(17)质谱二级特征碎片离子,是α-氨基酸特有的中性碎片丢失<sup>[9]</sup>。通过EIC扫描与METLIN数据库中的二级碎片离子峰对比,结合文献报道<sup>[4]</sup>,鉴定化合物1、8和12为脯氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。提取m/z 132.1021色谱图有2个色谱峰,它们的二级碎片均为m/z 86 [M+H-46]<sup>+</sup>和m/z 69 [M+H-46-17]<sup>+</sup>,保留时间为8.7和9.3 min,即说明化合物5和7是同分异构体,而化合物5裂解产生m/z 69的离子丰度远大于化合物7,并通过保留时间可判断化合物6的极性比化合物8大,同时根据文献报道<sup>[4]</sup>,可鉴定化合物5为异亮氨酸,7为亮氨酸。

## 2.2 有机酸类成分

### 2.2.1 脂肪酸及其衍生物 在负离子模式下,鉴定

了12个脂肪酸及其衍生物。其中已报道的成分包括苹果酸(3)、柠檬酸(4)、琥珀酸(6)、柠檬酸甲酯(13,15)、柠檬酸乙酯(19,20)、硬脂酸(40)和熊果酸(42)。首次在广枣果肉中发现奎宁酸(2)、柠檬酸单甘油酯(9)和2-异丙基苹果酸(25)。通过对照品的保留时间、一级质谱和二级碎片信息结合文献报道<sup>[10]</sup>,确定化合物4为柠檬酸(m/z 191.0198,保留时间8.4 min)。化合物13、15、20、9与柠檬酸有相同的离子碎片m/z 173和111,如图3A,推测它们是柠檬酸衍生物。其中化合物13和15为柠檬酸甲酯的同分异构体,化合物19和20为柠檬酸乙酯的同分异构体。通过HMDB数据库比对推测化合物9为柠檬酸单甘油酯,化合物2、25分别为奎宁酸和2-异丙基苹果酸,见图3B和图3C,奎宁酸具体裂解途径如图4。由图3C和相关文献<sup>[10]</sup>,推测化合物3为苹果酸。按同样方法鉴定化合物6、40、42分别为琥珀酸、硬脂酸和熊果酸,其一级质谱和二级质谱信息均与数据库中的相应化合物一致。

表 1 广枣醇提物的 HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果

Tab 1 HPLC-Q-TOF-MS/MS analysis results of ethanol extracts from *Choerospondiatis fructus*

No.	RT <i>t</i> /min	Ion mode	<i>m/z</i>	Error ( $\times 10^{-6}$ )	Formula	Name	Fragment ions
1	4.7	+	116.069 8	7.36	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Proline	70,58
2	5.0	-	191.056 7	-2.93	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Quinic acid*	127,93,85,59
3	5.8	-	133.014 6	-2.44	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Malic acid	115,73,71
4	8.4	-	191.020 9	-5.99	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Citric acid	111,87,67,57
5	8.7	+	132.102 1	-1.10	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Isoleucine	86,69
6	9.1	-	117.019 3	0.51	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Succinic acid	92,73,65
7	9.3	+	132.102 0	-0.35	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Leucine	86,69
8	9.8	+	182.081 2	0.10	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Tyrosine	165,147,136,123
9	10.4	-	265.057 9	-5.15	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Monoglyceride citrate*	173,111
10	14.8	-	355.031 6	-2.49	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>11</sub>	Chebulic acid*	337,249,205,193,179,163,133
11	16.1	-	169.015 0	-4.29	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Gallic acid	125,107,79
12	17.4	+	166.085 9	2.43	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Phenylalanine	120,103,93,77
13	18.9	-	205.036 5	-5.34	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Methylcitrate	173,143,111,87
14	19.6	+	127.039 1	-0.84	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	5-Hydroxymethylfurfural*	109,81,59
15	20.4	-	205.036 6	-5.83	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Methylcitrate	173,143,111,87
16	26.1	+	220.118 0	-0.01	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	Pantothenic acid*	202,142,124,98,90,72
17	27.4	-	153.020 4	-6.80	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Protocatechuic acid	109,108,91,81
18	29.4	+	171.028 5	1.75	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Comenic acid*	139,111,83,55
19	30.3	-	219.051 6	-2.49	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Triethyl citrate	173,111
20	30.9	-	219.051 5	-2.03	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Triethyl citrate	173,157,111,87
21	31.2	-	137.024 5	-1.86	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Protocatechualdehyde*	108,92,80
22	31.9	+	579.149 4	0.56	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	Dimeric catechin*	427,409,291,289
23	34.2	-	137.024 5	-0.40	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	93,65
24	34.5	+	291.086 1	0.82	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Catechinic acid	207,161,147,139,123
25	34.6	-	175.062 0	-4.43	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	2-Isopropyl malic acid*	115,113,85,69
26	35.9	-	137.024 5	-0.40	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid*	93,65
27	37.5	-	137.024 5	-0.40	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Salicylic acid	93,80
28	39.2	-	220.062 3	-3.25	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	6-Hydroxy indole lactic acid*	176,107,69
29	40.8	-	197.045 6	-0.13	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Ethyl gallate*	169,124,99
30	42.5	+	193.049 3	1.34	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Scopoletin*	178,150,137,133,122,105
31	44.7	+	597.145 1	-0.11	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	Quercetin-3- <i>O</i> -arab sugar-glucoid*	465,435,303
32	46.3	-	477.068 8	-2.74	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	Methyl ellagic acid glucoside*	315,300
33	46.6	-	491.083 1	0.09	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	Dimethoxy ellagic acid glycosidase*	476,328,313,298
34	47.5	+	465.103 1	-0.70	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	Hyperin	303,229,153,137,85
35	49.3	-	300.999 6	-1.93	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	Gallogen	283,245,200,173 145,117
36	49.7	+	449.108 4	-1.20	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Quercetin-3'- <i>O</i> -rhamnoside	303,287,85,71
37	52.5	-	315.014 7	-0.10	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	Methylellagic acid*	300,217
38	53.2	+	301.035 7	-0.98	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Quercetin	179,151,121,107
39	55.2	-	329.030 5	-0.55	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	3,3'-Dimethyl ellagic acid	314,299,271
40	63.9	+	285.278 7	0.45	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Stearic acid	103,89,71,57
41	65.8	+	279.159 2	-0.33	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Dibutyl phthalate	237,205,149,57
42	73.0	+	457.367 4	0.53	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Ursolic acid	322,293,179,135,107,81

\* Refers to the newly discovered chemical component

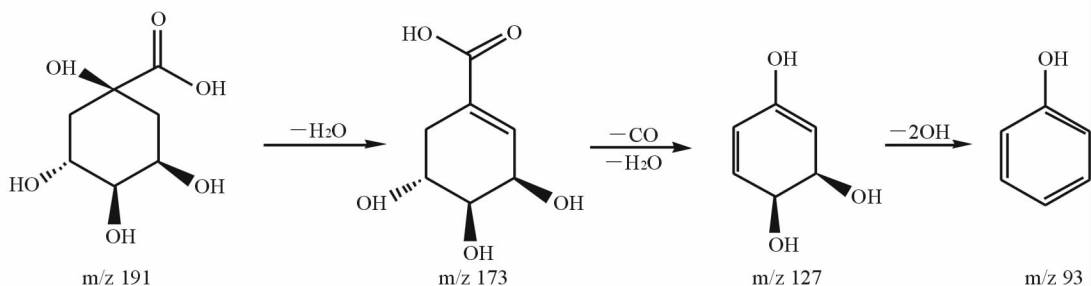


图 4 奎宁酸裂解途径

Fig 4 Fragment pathway of quinic acid

2.2.2 芳香酸及其衍生物 在负离子模式下分析并鉴定了广枣中的 15 种芳香酸及其衍生物,其中已报道的芳香酸及其酯类包括没食子酸(11)、原儿茶酸(17)、对羟基苯甲酸(23)、水杨酸(27)、鞣花酸(35)、3,3'-二甲基鞣花酸(39)、邻苯二甲酸二丁酯(41)。首次在广枣果皮中发现的芳香酸及衍生物分别为诃子次酸(10)、comenic acid(18)、原儿茶醛(21)、间羟基苯甲酸(26)、没食子酸乙酯(29)、甲基鞣花酸-葡萄糖苷(32)、二甲基鞣花酸-葡萄糖苷(33)、甲基鞣花酸(37)。与对照品比对,确定化合物 11、17、21、23、26、27、35 分别为没食子酸、原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸、水杨酸、鞣花酸,见图 2。化合物 11 裂解途径如图 5。提取离子  $m/z$  137.024 5 出现保留时间为 31.2、34.2、35.9 和 37.5 min,理论分子式均为  $C_7H_6O_3$  的 4 个色谱峰,即是同分异构体。根据 METLIN 数据库二级碎片信息、反相色谱出峰特点及相应对照品可知化合物 21、23、26、27 分别为原儿茶醛、对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸、水杨酸(图 2)。鞣花酸的质荷比  $m/z$  为 300.999 6,从二级质谱图中可观察到含有特征离子  $m/z$  299.997 3 的 3 个色谱峰,分别标记为化合物 35、37 和 39,其中 35 已证明

为鞣花酸,推测化合物 37 和 39 是鞣花酸衍生物。根据二级碎片离子峰(图 3D<sub>1</sub>、3D<sub>2</sub>),以及文献报道<sup>[11-12]</sup>鉴定化合物 37、39 分别为甲基鞣花酸、3,3'-二甲基鞣花酸,裂解途径如图 6。化合物 32 和 33 分子离子峰分别为  $m/z$  477.068 8、491.083 1,并且均中性丢失 162 的碎片峰  $m/z$  315 $[M-H-glucoside]^-$  和  $m/z$  328 $[M-H-glucoside]^-$ ,可知是化合物 37 和 39 的葡萄糖苷类,即 3-甲基鞣花酸-葡萄糖苷和 3,3'-二甲基鞣花酸-葡萄糖苷,糖苷的结合位置需进一步研究确认(图 3D<sub>1</sub>、3D<sub>2</sub>)。化合物 10 根据  $m/z$  355.031 6、分子式  $C_{14}H_{12}O_{11}$  以及主要碎片离子  $m/z$  337、249、205、193、163 和 133(图 3E),推测为诃子次酸,与文献报道<sup>[12]</sup>一致。化合物 18  $[M+H]^+$  为  $m/z$  171.028 5,与没食子酸为同分异构体,其二级质谱图中的碎片离子与 comenic acid 的结构相符(图 3F),根据文献报道<sup>[13]</sup>,推测化合物 18 为 comenic acid。化合物 29  $[M-H]^-$  197.046 2、分子式  $C_9H_{10}O_5$  以及主要碎片离子  $m/z$  169 $[M-H-28]^-$ ,124,99,推测为没食子酸的衍生物,分子式比没食子酸的多  $C_2H_4$  (28),即为没食子酸乙酯(图 3G)。

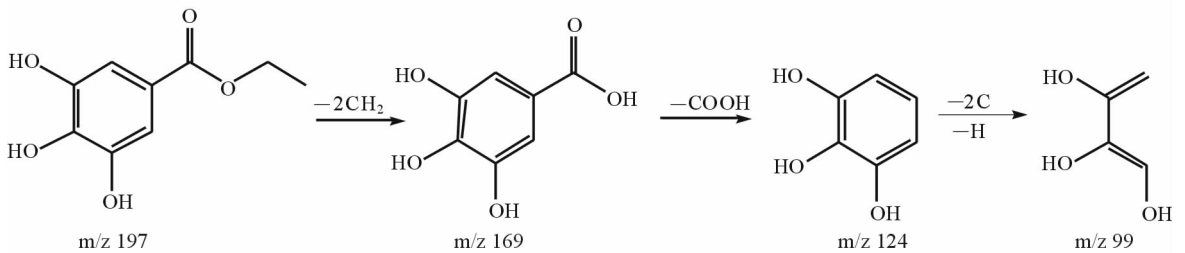


图 5 没食子酸乙酯裂解途径

Fig 5 Fragment pathway of ethyl gallate

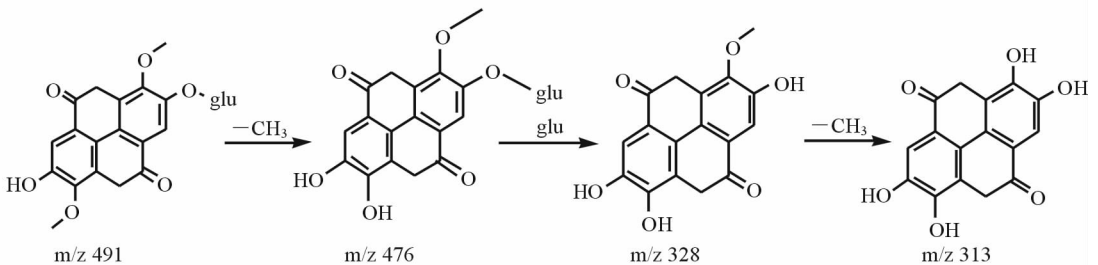


图 6 二甲基鞣花酸-葡萄糖苷裂解途径

Fig 6 Fragment pathway of dimethoxy ellagic acid-glucoside

2.3 黄酮类成分 在正离子模式下,共分析并鉴定

出 6 个黄酮类成分,分别是二聚儿茶素(22)、儿茶素

(**24**)、槲皮素-3-O-(阿拉伯糖苷-葡萄糖苷)(**31**)、金丝桃苷(**34**)、槲皮素-3-O-鼠李糖苷(**36**)和槲皮素(**38**)。其中二聚儿茶素和槲皮素-3-O-(阿拉伯糖苷-葡萄糖苷)为首次在广枣中发现。通过与对照品的保留时间、一级质谱信息和二级碎片离子进行比对(图2、图3H),结合文献报道<sup>[14-15]</sup>,确定化合物**24**、**36**为儿茶素和槲皮素。化合物**22**的保留时间、准分子离子峰、计算分子式、二级碎片与文献报道中Procyanidin B的信息<sup>[16]</sup>一致,由此推测化合物**22**为二聚儿茶素(图3H),裂解途径如图7。化合物

**31**、**34**、**36** 二级质谱图中均含有碎片离子  $m/z$  303.0508,即是槲皮素衍生物。二级碎片离子分别为  $[M+H-162-132]^+$ 、 $[M+H-162]^+$  和  $[M+H-146]^+$ ,符合苷类中性丢失规律,丢失162说明含有葡萄糖苷,丢失146说明含有鼠李糖苷,丢失132说明含有阿拉伯糖苷。参考文献报道<sup>[17-18]</sup>可知化合物**34**为金丝桃苷,**36**为槲皮素-3-O-鼠李糖苷,其裂解途径如图8。而化合物**31**根据文献报道<sup>[19]</sup>初步推测为槲皮素-3-O-(阿拉伯糖苷-葡萄糖苷),阿拉伯糖苷和葡萄糖苷的结合位点仍有待进一步检测(图3D)。

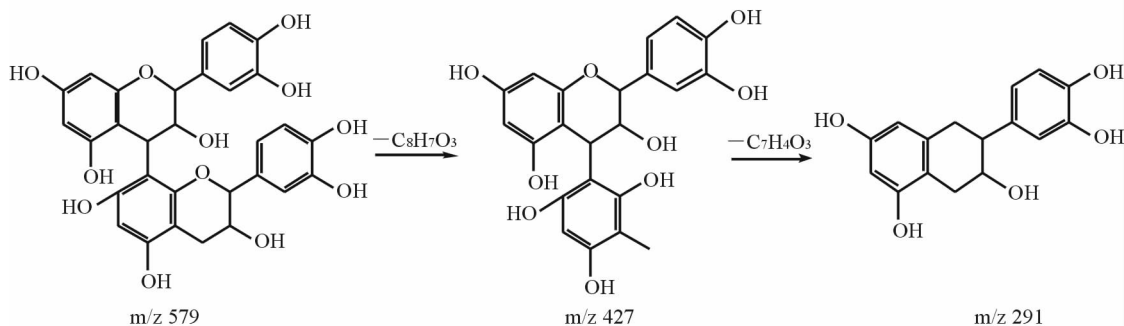


Fig 7 Fragment pathway of dimeric catechin

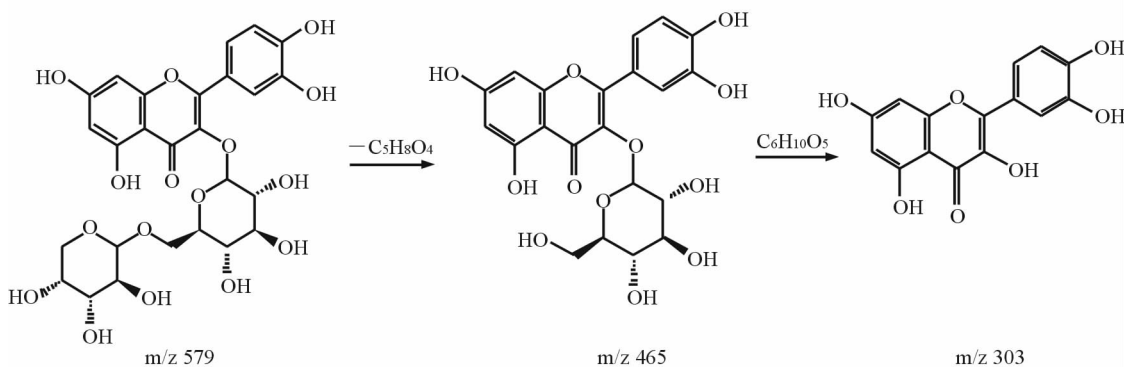


Fig 8 Fragment pathway of quercetin-3-O-(arabinoside-glucoside)

2.4 其他化合物 利用 HPLC-ESI-TOF-MS 所提供的保留时间、分子式和质谱碎片信息,参考文献研究结果,本实验还首次从广枣的醇提取物中鉴定出5-羟甲基糠醛(**14**)、泛酸(**16**)、6-羟基吡啶乳酸(**28**)和东莨菪内酯(**30**)4个化合物。具体解析和归属过程如下:化合物**14**的分子离子峰、计算分子式、二级质谱碎片峰与文献报道中5-羟甲基糠醛的质谱信息<sup>[20]</sup>一致;最后通过与对照品比较后确认化合物**14**为5-羟甲基糠醛(图3J),其裂解途径如图9。在正离子模式下可检测到化合物**16**和化合物**30**,通过在 METLIN 数据

库检索并进行二级质谱图比对,最后初步推测化合物**16**为泛酸(图3K),化合物**28**为6-羟基吡啶乳酸(图3L),化合物**30**为东莨菪内酯(图3M)。它们的确切结构还需采用其他分析手段进行验证。

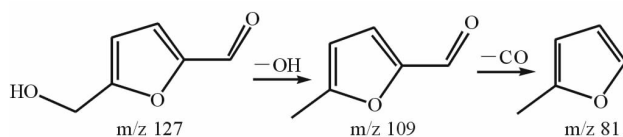


Fig 9 Fragment pathway of 5-hydroxymethylfurfural

### 3 讨论

参考2015年版《中华人民共和国药典》<sup>[1]</sup>中广枣主要指标成分没食子酸的分析条件,本实验选用了适用性广的C<sub>18</sub>色谱柱(Aglient TC-C<sub>18</sub>, 4.5 mm × 250 mm, 5 μm)。通过考察不同浓度的甲酸比例及纯水比较得知,向水相中加入体积分数为0.2%的甲酸,改善了峰形并保证较高的离子化效率和质谱响应。广枣药材成分复杂,各类成分的极性相差较大,因此选择了大范围、长时间的梯度洗脱,使尽可能多的成分在色谱柱上实现较好分离。采用正、负离子两种模式下同时扫描样品,能最大程度地获取质谱信息。根据各个色谱峰在质谱中的精确相对分子质量、碎片信息、质谱裂解规律和色谱保留规律,并结合标准品的质谱信息和参考文献,最终鉴定出广枣药材果肉提取物中42个化学成分,其中占绝大多数的是有机酸类成分。在已鉴定的42个成分之中,首次在广枣中发现的成分有17个,包括奎宁酸、柠檬酸单甘油酯、诃子次酸、5-羟甲基糠醛、泛酸、comenic acid、原儿茶醛、二聚儿茶素、2-异丙基苹果酸、间羟基苯甲酸、6-羟基吡啶乳酸、没食子酸乙酯、东莨菪内酯、槲皮素-3-阿拉伯糖-7-葡萄糖苷、甲基鞣花酸-葡萄糖苷、二甲基鞣花酸-葡萄糖苷、甲基鞣花酸,这些化合物的结构确证还需进行LC/MS/SPE/NMR分析。从样品总离子流图可以看出,有一些响应较好的色谱峰其质量数未能在已有数据库中找到,表明广枣中还有一些未知成分,有待进一步研究开发。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 64.

[2] 王晓琴, 王力伟, 赵岩, 马超美. 广枣的化学成分和药理活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35: 281-285.

[3] 李胜华, 伍贤进, 郑尧, 蒋崇亮. 南酸枣树皮化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 32: 1542-1544.

[4] 柳克铃, 温俊达, 金幼蓝. 广枣的氨基酸和无机元素分析[J]. 湖南中医杂志, 1992, 8: 48.

[5] 汤喜兰, 刘建勋, 李磊, 李澎, 马彦雷, 史跃, 等. 广枣模拟总有机酸对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19: 168-172.

[6] 包俊萍, 金明, 杨雨民, 高晓慧, 舒亮, 邢慧慧, 等. 广枣总黄酮对体外培养大鼠心脏成纤维细胞I, III型胶原 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 药理学报,

2014, 49: 136-141.

[7] Zhao X F, Zhang W J, Kong S S, Zheng X H, Zheng J B, Shi R J. A valid assay for the pharmacokinetic study of Gallic acid from *Choerospondias fructus* in rabbit plasma by LC/MS/MS[J]. J Liq Chromatogr R T, 2007, 30: 235-244.

[8] 唐丽, 李国玉, 杨柄友, 匡海学. 广枣化学成分的研究[J]. 中草药, 2009, 40: 541-543.

[9] 陈惜贞. 高效毛细管电泳法快速测定血清中游离氨基酸[J]. 检验医学与临床, 2007, 4: 516-517.

[10] 刘晓庚, 陈优生. 南酸枣果实的成分分析[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19: 35-40.

[11] 王乃利, 倪艳, 陈英杰, 姚新生. 广枣活血有效成分的研究 I[J]. 沈阳药学院学报, 1987, 4: 203.

[12] Pfundstein B, El Desouky S K, Hull W E, Haubner R, Erben G, Owen R W. Polyphenolic compounds in the fruits of egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 1132-1148.

[13] Volynkin V A, Pachuev A V, Pirogova A N, Panyushkin V T, Shurygin A Y. An NMR study of comenic acid and its salts with Li<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in aqueous solution and solid state[J]. J Struct Chem, 2011, 52: 892-896.

[14] 王玉兰, 吕永镇, 楼朱雄, 祖景余, 梁华清, 周卓伦. 南酸枣树皮中橘柑素和南酸枣苷的分离鉴定[J]. 药理学报, 1983, 18: 199-202.

[15] 连珠, 张承忠, 李冲, 周亚伟. 蒙药广枣化学成分的研究[J]. 中药材, 2003, 26: 23-24.

[16] Sun W, Miller J M. Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin[J]. J Mass Spectrom, 2003, 38: 438-446.

[17] Khabir M, Khatoun F, Ansari W H. Kaempferol-5-O-arabinoside—a new flavonol glycoside from the leaves of choerospondias-axillaris[J]. Indian J Chem B, 1987, 26: 85.

[18] 唐丽. 广枣和洋金花化学成分的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2003.

[19] Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland H S, Johannessen T, Giske N H. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*[J]. J Food Compos Anal, 2005, 18: 61-68.

[20] Teixidó E, Moyano E, Santos F J, Galceran M T. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods [J]. J Chromatogr A, 2008, 1185: 102-108.