

HPLC-DAD 和 UPLC-MS/MS 对蔓花生中二苯乙烯类化合物的研究

韩寒冰^{1*}, 王明阳², 马超¹, 李海航³¹广东石油化工学院化学与生命科学学院; ² 茂名出入境检验检疫局, 茂名 525000;³华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631

摘要: 采用 HPLC-DAD 和 UPLC-MS/MS 对蔓花生中白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷三种二苯乙烯类化合物进行鉴定, 建立 HPLC-DAD 同时测定三种化合物含量的方法。HPLC-DAD 分析采用依利特 ODS1 色谱柱, 柱温 40 °C, 流动相 A 为甲醇, B 为 1% 乙酸水溶液, 流速 1.0 mL/min。UPLC-MS/MS 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱, 流动相 A 为乙腈, B 为水, 电喷雾离子源, 负离子检测, 数据采集方式为多反应监测模式 (MRM)。结果表明: 蔓花生根、茎和叶中白藜芦醇含量分别为 66.28、90.83 和 81.56 μg/g, 白藜芦醇苷含量分别为 123.78、302.77 和 236.53 μg/g, 根和茎中二苯乙烯苷含量分别为 673.60 和 764.65 μg/g, 叶中未检测到二苯乙烯苷。

关键词: 蔓花生; 二苯乙烯类化合物; HPLC-DAD; UPLC-MS/MS

中图分类号: R286

文献标识码: A

Simultaneous Determination of Stilbene Compounds in *Arachis duranensis* by HPLC-DAD and UPLC-MS/MS

HAN Han-bing^{1*}, WANG Ming-yang², MA Chao¹, LI Hai-hang³¹College of Chemistry and Life Sciences, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming;²Maoming Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Maoming, Guangdong 525000, China; ³Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: Simultaneous determination of 3 stilbene compounds, namely resveratrol, polydatin and stilbene glucoside (2, 3, 5, 4'-tetra-hydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside) from *Arachis duranensis* was performed using HPLC-DAD and UPLC-MS/MS. The experimental conditions for HPLC-DAD analysis were as follows: ODS1 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); column temperature, 40 °C; mobile phase A, methanol; mobile phase B, 1% aqueous acetic acid; flow rate, 1.0 mL/min; DAD scanning wavelength, 190-400 nm; detection wavelength, 303 nm. The UPLC-MS/MS conditions were as follows: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); mobile phase A, acetonitrile; mobile phase B, water; ion source, ESI (negative ion mode). UPLC-MS/MS data were collected using multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results showed that resveratrol contents were 66.28, 90.83 and 81.56 μg/g, polydatin contents were 123.78, 302.77 and 236.53 μg/g, in roots, stems and leaves of *A. duranensis*, respectively. The content stilbene glucoside in roots and stems was 673.60 and 764.65 μg/g, respectively, but was not detected in leaves.

Key words: *Arachis duranensis*; stilbene compounds; HPLC-DAD; UPLC-MS/MS

蔓花生 (*Arachis duranensis*) 为蝶形花科蔓花生属多年生宿根草本植物, 原产于亚洲热带及南美洲。由于其生长快、再生能力强、根系发达、抗逆性强、四季常青、花色鲜艳和观赏性强, 在南方各省作为地面覆盖物或园艺观赏被广泛种植^[1]。蔓花生的茎叶营养丰富, 口感好, 易消化, 是动物的良好牧草^[2]。

栽培种花生为异源四倍体, 是由二倍体野生型花生杂交、加倍形成。蔓花生作为花生二倍体野生型的种质资源, 具有较强的抗病、抗虫和抗干旱能力, 在花生基因改良中的作用越来越受到人们的重视^[3,4]。

白藜芦醇(3,4',5-三羟基二苯乙烯)、白藜芦醇苷(白藜芦醇的葡萄糖苷)和二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-O-β-D-葡萄糖苷)为常见的二苯乙烯类天然活性物质。白藜芦醇和白藜芦醇苷是植物体内抵抗病原菌侵染的一类重要的植物抗毒素, 并

收稿日期: 2013-08-19 接受日期: 2014-02-17

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B020310008); 广东省自然科学基金(S201101000368)

* 通讯作者 Tel: 86-668-2793398; E-mail: hhb05@126.com

有显著的抗癌抑癌、心血管保护、抗氧化和清除自由基等药理作用^[5,6]。白藜芦醇及其苷主要存在于虎杖、葡萄和花生等植物中,以虎杖中的含量最高。二苯乙烯苷具有抗衰老、降血脂、保肝护肝、促智、抗肿瘤等作用,是何首乌的主要药效成分^[7]。人们通常用乙醇溶液提取法提取,并用 HPLC 法测定其含量,本实验除了利用乙醇溶液辅助超声提取法外,还使用了柱层析提取法。目前,对蔓花生中二苯乙烯类化合物的研究尚未见报道,因此,本实验对蔓花生中的二苯乙烯类化合物进行了含量测定,为综合利用蔓花生,探索二苯乙烯类化合物的资源开发,改良花生种质资源,提高花生的食用和保健价值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

植物材料采集于广州石牌华南师范大学校园内,经华南师范大学生命科学学院王英强教授鉴定为蔓花生(*Arachis duranensis*),整株或根茎叶分别置 50 °C 烘箱中烘干至恒重,粉碎后过 40 目筛,备用。

白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷对照品购于成都曼思特生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$ 。甲醇和乙腈等色谱纯溶剂为美国 Burdick & Jackson Inc. (Muskegon, MI, USA) 产品,其它试剂均为分析纯。

Agilent 1200 高效液相色谱仪(VWD 检测器),美国安捷伦公司;QUATTRO Premier XE 型三重四级杆串联质谱仪,美国 WATERS 公司;DL-6000 低速冷冻大容量离心机,上海安亭科学仪器厂;KQ5200B 超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱,上海沪粤明科学仪器有限公司。

1.2 样品的制备

1.2.1 HPLC-DAD 定性分析样品

称取整株、根、茎或叶粉末各 1 g,分别置于 10 mL 提取管中,加入 6 mL 60% 乙醇溶液,密封,超声提取 30 min,离心,上清液过 0.22 μm 滤膜,滤液供 HPLC-DAD 检测。

1.2.2 UPLC-MS/MS 定性分析样品

用柱层析提取法提取^[8]。取 10 g 蔓花生茎粉末,用 60% 的乙醇溶液湿样上柱,浸泡 2.0 h,以 60% 乙醇溶液为洗脱溶剂,洗脱液流速 40 mL/h,收集洗脱液 40 mL 浓缩后,经大孔树脂 D101 纯化,用

0.22 μm 滤膜过滤,滤液供 UPLC-MS/MS 定性分析。

1.2.3 HPLC 定量分析样品

用柱层析提取法^[8]提取。分别称取蔓花生根、茎、叶或整株粉末 5 g,采用直径为 1.25 cm 的玻璃层析柱,以 60% 乙醇溶液为提取溶剂,浸泡 2.0 h,收集洗脱液体积除叶以 4.5 mL/g 为一个收集单位(即一份)外,其余均以 4.0 mL/g 为一份,共提取四份。洗脱液用 0.22 μm 滤膜过滤,HPLC 法分别测定各提取液中二苯乙烯类化合物的含量。

1.3 对照品溶液的制备

1.3.1 HPLC-DAD 定性分析对照品混合液

按白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷分配为 50、150 和 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 配制而成。

1.3.2 HPLC 定量分析对照品混合液

分别以 2.5、5、7.5、10、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的白藜芦醇标准溶液,5、10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的白藜芦醇苷标准溶液和 25、50、75、100、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的二苯乙烯苷标准溶液制作三种化合物的浓度与峰面积关系的标准曲线。根据样品中各化合物的峰面积计算样品中各化合物的含量。

1.4 HPLC-DAD 分析条件

色谱条件:色谱柱为依利特 ODS1 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm ,大连依利特公司),柱温 40 °C;流动相:甲醇(A)-1% 乙酸水溶液(B);梯度洗脱程序:0 ~ 14 min,25% ~ 28% A;14 ~ 30 min,28% ~ 30% A;流速 1.0 mL/min;检测波长为 303 nm;进样量 10 μL ,样品与对照品叠加试验的进样量为 20 μL ,HPLC-DAD 的扫描波长为 190 ~ 400 nm。

1.5 UPLC-MS/MS 分析条件

UPLC-MS/MS 分析仪器为 QUATTRO Premier XE 型三重四级杆串联质谱仪(美国 WATERS 公司);色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm \times 50 mm,1.7 μm);流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱程序:0 ~ 1 min,20% A;1 ~ 1.5 min,20% ~ 50% A;1.5 ~ 2.5 min,50% A;2.5 ~ 3.0 min,20% A;流速:0.25 mL/min,柱温:40 °C,进样量 10 μL 。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),负离子检测,离子喷雾电压(IS)为 3.5 kV,离子源温度(TEM)为 110 °C,气帘气(CUR)为 47 L/Hr,雾化气(GAS1)为 700 L/Hr,采集方式为多反应监测(MRM)模式,离子选择以灵敏度高和稳定性好为前提条件。

2 结果与分析

2.1 HPLC-DAD 的定性分析

用 HPLC 分别测定了根、茎、叶和整株提取液, 结果见图 1。与对照品混合液比较, 除叶提取液在二苯乙烯苷相应的位置没有明显出峰之外(图 1D), 其余的在白藜芦醇苷、二苯乙烯苷和白藜芦醇相应的保留时间均有峰出现, 用等量的对照品混合溶液与茎提取液混合做叠加实验(图 1C), 结果保留时间与原来的保持一致, 峰面积也与各自峰面积总

和相等。因此, 可以初步判断蔓花生中存在被鉴定的三种二苯乙烯类化合物, 根茎中二苯乙烯苷含量高, 叶中检测不到, 白藜芦醇含量相对较低。分别对对照品、样品和叠加实验的对应峰进行紫外吸收光谱扫描(DAD), 发现有一致的紫外吸收峰, 白藜芦醇和白藜芦醇苷的两个最大吸收峰波长分别为 303 nm 和 320 nm, 二苯乙烯苷的最大吸收峰的波长为 320 nm。因此, 可以进一步确定样品中含有三种二苯乙烯类化合物。

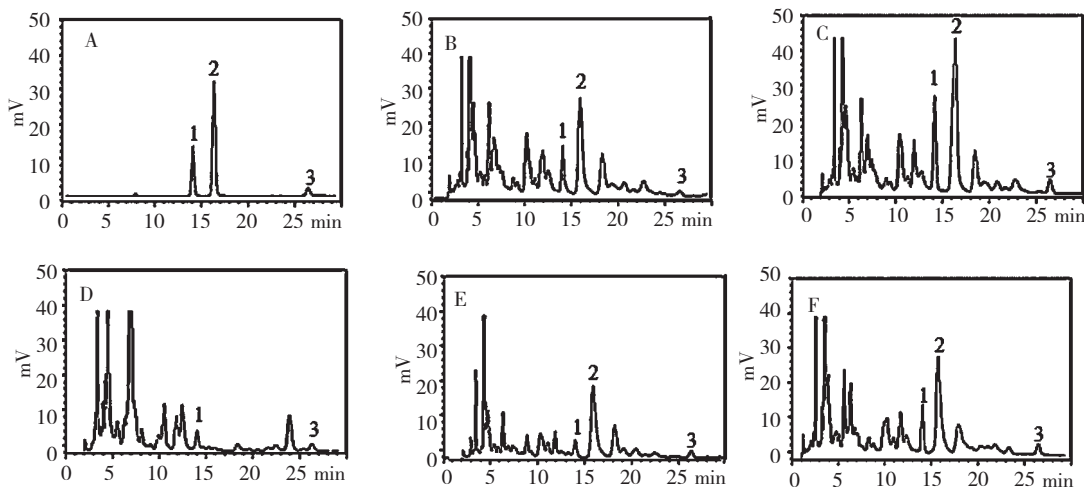


图 1 蔓花生提取液中白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of resveratrol, polydatin and stilbene glucoside in the extracts of *A. duranensis*

A: 对照品(1, 2, 3 分别为白藜芦醇苷、二苯乙烯苷和白藜芦醇); B: 茎提取液; C: 对照品与茎提取液的等量混合液; D: 叶提取液; E: 根提取液; F: 整株提取液

A: mixed standard (1, 2 and 3 represented polydatin, stilbene glucoside and resveratrol, respectively); B: stem extracts; C: mixture of standard compounds and stem extracts; D: leaf extracts; E: root extracts; F: complete plant extracts

2.2 UPLC-MS/MS 定性分析

对纯化的样品提取液进行一级质谱全扫描, 发现准离子的分子量分别为 227.0、388.9、404.9 的三种化合物(图 2)。与对照品白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷的负离子的相对分子量 227.2、389.0 和 404.8 相吻合。分别对疑似白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷三种化合物离子峰进行二级扫描, 得到二级质谱图(图 3), 其碎片离子及离子强度均与对照品二级质谱图显示的结果一致。图 3A 中的碎片离子 m/z 185.1、159.1、143.1 等与文献^[9]分析白藜芦醇的裂解规律和 MS² 一致, 可以确定 m/z 为 227.0 是白藜芦醇。图 3B 中得到的三个接近 m/z 为 227.0 的碎片, 与白藜芦醇苷母离子裂解丢失一个取代葡萄糖基(-C₆H₁₀O₅)生成的苷元, 白藜芦

醇负离子的 m/z 为 227.0 相符, 并与文献^[10]对白藜芦醇苷(虎杖苷)的分析结果一致, 因此, 确定 m/z 为 388.9 的化合物为白藜芦醇苷。图 3C 中主要碎片离子 m/z 242.9、243.3, 与 m/z 为 404.9 的母

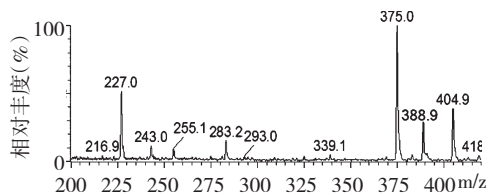


图 2 茎样品中白藜芦醇($m/z = 227.0$)、白藜芦醇苷($m/z = 388.9$)和二苯乙烯苷($m/z = 404.9$)质谱图

Fig. 2 MS spectrum showing resveratrol ($m/z = 227.0$), polydatin ($m/z = 388.9$) and stilbene glucoside ($m/z = 404.9$) in stem extracts

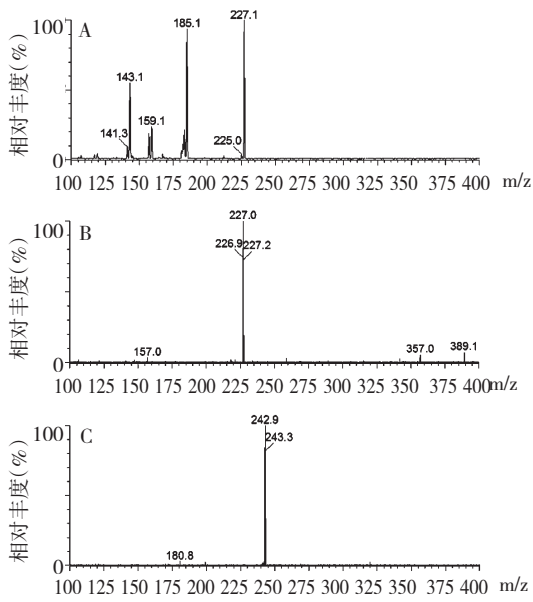


图3 蔓花生样品中白藜芦醇(A)、白藜芦醇苷(B)和二苯乙烯苷(C)的二级质谱图

Fig.3 MS² spectra of resveratrol (A), polydatin (B) and stilbene glucoside (C) in stem extracts

离子裂解丢失一个取代葡萄糖基团(-C₆H₁₀O₅)后 m/z 为 242.9 相符,其二级质谱图与文献^[7]的分析结果相同,因而,确定 m/z 404.9 为二苯乙烯苷。

2.3 不同器官中二苯乙烯类化合物的含量

2.3.1 标准曲线与线性范围

分别以三种对照品的浓度为横坐标,峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线,得到白藜芦醇的回归方程为 $A = 50724x + 1542.2$, $R^2 = 0.9998$,线性范围为 2.5 ~ 12.5 $\mu\text{g/mL}$,白藜芦醇苷的回归方程为 $A = 27947x - 2889.5$, $R^2 = 0.9992$,线性范围为 5 ~

25 $\mu\text{g/mL}$,二苯乙烯苷的回归方程为 $A = 33810x - 1614.8$, $R^2 = 0.9999$,线性范围为 25 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 精密度试验

将对照品混合溶液重复进样 5 次,根据峰面积分别计算出三种成分的含量和 RSD 值,三种对照品的 RSD 值均小于 1%,表明检测方法的精密度良好。

2.3.3 重复性试验

取茎提取液样品 5 份,分别用 HPLC 检测,根据峰面积计算三种成分的 RSD 值,白藜芦醇苷为 1.18%,二苯乙烯苷为 0.97%,白藜芦醇为 1.22%,表明检测方法的重复性良好。

2.3.4 溶液稳定性试验

取茎提取液于室温下分别放置 0、2、4、6、8 h 后,HPLC 检测。根据三种化合物的峰面积计算检测的 RSD 值,白藜芦醇苷为 2.05%,二苯乙烯苷为 3.24%,白藜芦醇为 1.41%,说明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.3.5 加标回收率试验

精密吸取茎提取液 2.0 mL,各平行三份,分别加入对照品混合液(白藜芦醇 15 $\mu\text{g/mL}$,白藜芦醇苷 30 $\mu\text{g/mL}$,二苯乙烯苷 150 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL、1.5 mL、2.0 mL,定容到 10 mL,HPLC 测定各样品的加样回收率,结果见表 2。白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷的平均回收率分别为 99.78%、98.76% 和 98.93%。

2.3.6 定量限和检测限

取蔓花生茎提取液,逐渐稀释,进样 10 μL ,记录色谱图,按 10 倍信噪比计算,测得提取液的定量限为 69.22 ng/mL ,按 3 倍信噪比计算,测得提取液检测限为 24.81 ng/mL 。

表 1 加样回收率试验结果($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of recovery rates of the 3 investigated compounds ($n=3, \bar{x} \pm s$)

| 成分 Analytes | 样品含量 Content (μg) | 加入量 Spiked amount (μg) | 测得量 Detected (μg) | 回收率 Recovery (%) | 平均值 Average recovery (%) | RSD (%) |
|--------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------|
| 白藜芦醇 Resveratrol | 20.25 | 15.00 | 35.19 | 99.82 | 99.78 | 1.02 |
| | 20.25 | 22.50 | 43.08 | 100.77 | | |
| | 20.25 | 30.00 | 49.61 | 98.73 | | |
| 白藜芦醇苷 Polydatin | 68.71 | 30.00 | 98.34 | 99.63 | 98.76 | 0.75 |
| | 68.71 | 45.00 | 111.73 | 98.26 | | |
| | 68.71 | 60.00 | 126.64 | 98.39 | | |
| 二苯乙烯苷 Stilbene glucoside | 274.82 | 150.00 | 424.13 | 99.84 | 98.93 | 0.82 |
| | 274.82 | 225.00 | 493.50 | 98.74 | | |
| | 274.82 | 300.00 | 564.65 | 98.23 | | |

2.3.7 二苯乙烯类化合物提取次数的考察

用柱层析提取法提取, 收集 4 份提取液, HPLC

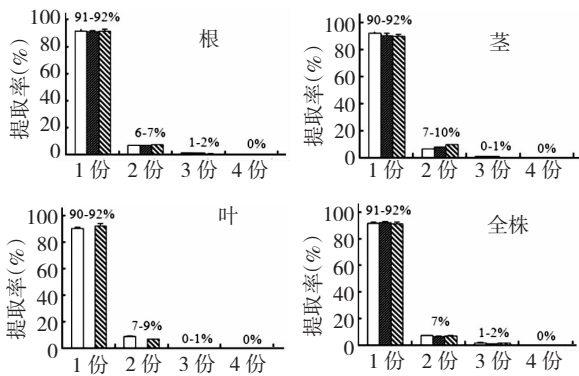


图 4 柱层析法提取蔓花生中二苯乙烯类化合物

Fig. 4 Extraction rates of stilbene compounds from *A. duranensis* by the column chromatographic extraction method

检测含量, 以 4 份提取液中含量的总和作为目标成分的总含量。每份提取液中白藜芦醇苷、二苯乙烯苷和白藜芦醇的提取率见图 4。第 1 份的提取率均达到 90% 以上, 第 2 份为 5% ~ 10% 之间, 第 3 份 1% ~ 2%, 第 4 份均检测不到三种成分。因此, 只需测定三份提取液中目标成分的含量就可准确得出材料中各成分的含量。

2.3.8 蔓花生中二苯乙烯类化合物的含量

用柱层析提取法提取各样品, 收集三份洗脱液, 合并后, 用 HPLC 测定提取液中目标成分的含量。分别测定了蔓花生叶、茎、根及整体植株中三种二苯乙烯类化合物的含量, 结果见表 2。根、茎和叶中的白藜芦醇含量较接近, 均不及白藜芦醇苷的一半, 根茎中二苯乙烯苷含量较高, 是白藜芦醇的 8 ~ 10 倍, 但叶中检测不到二苯乙烯苷, 茎中三种二苯乙烯类化合物的总量最高。

表 2 蔓花生不同器官中二苯乙烯类化合物的含量 ($\mu\text{g/g}$)

Table 2 Contents of stilbene compounds in different organs of *A. duranensis* ($\mu\text{g/g}$)

| 器官 Organ | 白藜芦醇 Resveratrol | 白藜芦醇苷 Polydatin | 二苯乙烯苷 Stilbene glucoside | 总量 Total content |
|----------------|---------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|
| 叶 Leaf | 81.56 \pm 1.94 | 236.53 \pm 3.86 | - | 318.09 |
| 茎 Stem | 90.83 \pm 1.38 | 302.77 \pm 4.97 | 764.65 \pm 20.96 | 1158.25 |
| 根 Root | 66.28 \pm 1.18 | 123.78 \pm 3.32 | 673.60 \pm 18.23 | 863.66 |
| 整株 Whole plant | 84.07 \pm 2.31 | 253.72 \pm 3.21 | 593.51 \pm 13.98 | 931.30 |

3 讨论

采用 HPLC-DAD 和 UPLC-MS/MS 法首次从蔓花生中鉴定了白藜芦醇、白藜芦醇苷和二苯乙烯苷。通过柱层析提取法和 HPLC 检测, 准确测定了根茎叶和整体植株中三种二苯乙烯类化合物的含量, 结果表明, 除叶中检测不到二苯乙烯苷外, 三种器官中都检测到二苯乙烯类化合物, 其中茎中三种化合物的含量均最高。三种化合物中, 白藜芦醇在各器官中的含量最低、二苯乙烯苷的含量最高。茎、根和叶中三种二苯乙烯类化合物的总含量分别为 1158.25、863.66 和 318.09 $\mu\text{g/g}$ 。目前, 同时研究白藜芦醇和白藜芦醇苷的材料主要有中药虎杖、桑椹和葡萄, 其中虎杖中的含量最高, 达到 2% ~ 3%^[5]。桑椹中白藜芦醇含量为 8 ~ 21.9 $\mu\text{g/g}$, 白藜芦醇苷含量为 16.8 ~ 133.8 $\mu\text{g/g}$ ^[11]。研究发现白藜芦醇普遍存在于豆科、葡萄科、百合科、蓼科等植物中, 但含量都普遍很低, 花生中根茎叶的白藜芦醇含量普遍

在 100 $\mu\text{g/g}$ 左右^[12], 葡萄皮中白藜芦醇的含量为 50 ~ 100 $\mu\text{g/g}$, 葡萄酒中白藜芦醇的含量为 1.5 ~ 3 mg/L ^[13]。由于含量低, 要从中提取分离活性成分比较困难。蔓花生中二苯乙烯类化合物的含量比花生、葡萄和桑椹等植物均高得多, 加之它的资源丰富, 成本低, 可作为二苯乙烯类化合物原料。蔓花生作为畜牧业饲料的原料, 由于含有较高的二苯乙烯类化合物, 对提高动物的抵抗力, 减少疾病的发生有一定的作用。

参考文献

- Liu JX(刘金祥), Chen KD(陈款弟), Luo FB(罗凤冰), et al. Weed species investigation and chemical control of *Arachis duranensis* lawn in edge of tropical. *Grassland and Turf* (草原与草坪), 2011, 31(5): 12-15.
- Zhou L(周立), Zheng H(郑荷), Zhang L(张利), et al. Study on fertilizing K_2HPO_4 of *Arachis duranensis* under low temperature stress. *Modern Agric Sci* (现代农业科学), 2008, 15(2): 27-31. (下转第 712 页)