

基于液质联用分析方法对酸枣仁中欧鼠李叶碱(Frangulofoline)提取方法的研究

胡彦周,丁 轲*,韩 涛,陈湘宁

北京农学院食品科学与工程学院 食品质量与安全北京实验室
农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室,北京 102206

摘要:建立酸枣仁中欧鼠李叶碱(酸枣仁碱 A)的高效液相色谱-三重四极杆质谱分析方法,在此基础上,以酸枣仁为原料,以欧鼠李叶碱的提取率为考察指标,通过单因素试验和正交试验对酸枣仁中欧鼠李叶碱回流提取过程中的提取溶剂、提取溶剂中的酸、提取温度、酸浓度、液固比和提取时间进行优化,确定了乙醇为理想提取溶剂,提取溶剂中添加乙酸,最优回流提取工艺条件为:提取温度 60 ℃,液固比 20:1 (V:g),乙酸浓度 8%,提取时间 4 h。最优提取工艺条件下欧鼠李叶碱的提取率为 32.286 μg/g。

关键词:酸枣仁;欧鼠李叶碱;高效液相色谱-串联质谱;正交试验

中图分类号:R284.2;O657.63

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.008

Extraction of Frangulofoline from *Semen Zizyphi Spinosae* by High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

HU Yan-zhou, DING Ke*, HAN Tao, CHEN Xiang-ning

College of Food Science and Engineering, Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; Beijing Key Laboratory of Detection and

Control of Spoilage Microorganisms and Pesticide Residues in Agricultural Products, Beijing 102206, China

Abstract: A sensitive high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was developed for the determination of frangulofoline (sanjoinine A) from *Semen Zizyphi Spinosae*. The reflux extraction conditions (extraction solvent, the acid in extraction solvent, extraction temperature, acid concentration, liquid-solid ratio, extraction time) of frangulofoline from *Semen Zizyphi Spinosae* were investigated by single factor tests and orthogonal experiment with the extraction rate of frangulofoline as the index. The results showed that the optimal extraction solvent was ethanol and the optimal acid was acetic acid. The optimal extraction conditions were as follows: extraction temperature 60 ℃, liquid-solid ratio 20:1 (V:g), acetic acid concentration 8%, extraction time 4 h. Under the optimal extraction conditions, the extraction rate of frangulofoline was 32.286 μg/g.

Key words: *Semen Zizyphi Spinosae*; frangulofoline; HPLC-MS/MS; orthogonal experiment

酸枣仁(*Semen Zizyphi Spinosae*)为鼠李科植物酸枣的种子,属于药食同源原料,具有宁心、安神、养肝、敛汗等功效^[1],临床上用于治疗多种类型的失眠症^[2],使用历史悠久。目前,以酸枣仁或酸枣仁提取物为原料的保健品众多,它们都声称具有改善睡眠的功能,但大都没有明确指出其具体功能成分,

酸枣仁中改善睡眠功能成分的研究还有待进一步深入。有研究发现酸枣仁皂苷和黄酮具有改善睡眠的功能^[3],并进一步确定了改善睡眠的活性成分为酸枣仁皂苷 A、B^[4-7]和黄酮斯皮诺素、阿魏酰斯皮诺素^[8,9]。然而,酸枣仁中还有一大类成分——生物碱,包括阿朴芬型生物碱和环肽型生物碱^[10-13],有学者发现酸枣仁生物碱也具有改善睡眠的功能^[14],并且有文献报道其中的活性成分是环肽型生物碱中的欧鼠李叶碱^[15](frangulofoline),又叫酸枣仁碱 A (sanjoinine A),分子式为 C₃₁H₄₂N₄O₄,结构式见图 1。目前,关于欧鼠李叶碱的研究相对较少,市场上又买不到其标准品,所以无论是研究其改善睡眠活

收稿日期:2018-01-29 接受日期:2018-03-26

基金项目:北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划(CIT&CD20154045);北京市自然科学基金委员会—北京市教育委员会联合资助项目(KZ201710020014);北京农学院青年基金—实验技术体系研发基金(SXST201604)

* 通讯作者 E-mail:dingk@tom.com

性还是用其开发保健食品,其提取方法的研究都是必不可少的。

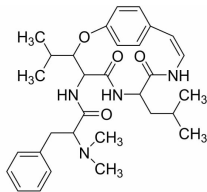


图1 欧鼠李叶碱的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of franguloline

生物碱按溶解性可分为亲脂性生物碱和亲水性生物碱两大类,且亲脂性生物碱占绝大部分。常用的提取溶剂为酸+水、酸+极性较强的有机溶剂和碱+极性较弱的有机溶剂^[16,17],加酸的目的是让生物碱成盐,增大其在极性溶剂中的溶解度^[18,19],加碱的目的是避免生物碱成盐,保证亲脂性生物碱在弱极性有机溶剂中的溶解度^[20]。

本文使用本实验室从酸枣仁中分离纯化得到的欧鼠李叶碱纯品,建立欧鼠李叶碱的液质分析方法,在此基础上,以欧鼠李叶碱的提取率为考察指标,对酸枣仁中欧鼠李叶碱回流提取中影响提取率的因素进行单因素和正交优化,建立一种简单有效的提取方法,为酸枣仁中欧鼠李叶碱的进一步研究与开发提供参考。

1 材料与设备

1.1 材料与试剂

中药材酸枣仁(*Semen Zizyphi Spinosa*),购于河北安国中药材市场。

无水乙醇、三氯甲烷、硫酸、盐酸、乙酸、氨水、石油醚(均为分析纯)北京化工厂;甲醇(色谱纯)韩国

DUKSAN 药品工业;甲酸(色谱纯)上海阿拉丁试剂有限公司;欧鼠李叶碱标准品($C_{31}H_{42}N_4O_4$, HPLC $\geq 95\%$)本实验室分离纯化得到。

1.2 仪器与设备

FW135 型中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;HWJB-2100C 型恒温磁力搅拌器 河南中良科学仪器有限公司;L530 型台式低速离心机 湖南赫西仪器装备有限公司;RE-2000 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;Alpha 1-2 LD plus 型冻干机 德国 CHRIST 冻干机有限公司;Agilent 1200-6410B 型液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(配有电喷雾离子源(ESI)及 Agilent MassHunter 工作站软件) 美国 Agilent 公司;TechMate C_{18} -ST 色谱柱($4.6 \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$)北京泰克美高新技术有限公司。

2 方法

2.1 欧鼠李叶碱液质联用分析方法的建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱: TechMate C_{18} -ST ($4.6 \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$);流动相:A 为 0.1% 的甲酸水溶液,B 为甲醇;洗脱梯度:0~10 min,80% B~100% B;10~15 min,100% B;总流速:0.3 mL/min;柱温 40 °C;进样量 5 μL 。

2.1.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI);检测方式:多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM),采集参数如表 1 所示;干燥气温度:350 °C;干燥气流速:10 L/min;雾化气压力:25 psi;毛细管电压:4000 V。欧鼠李叶碱的 TIC 图谱及 MRM 图谱见图 2。

表 1 质谱采集参数

Table 1 MS parameters

名称 Name	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Relative molecular mass	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	碎裂电压 Breakup voltage(V)	碰撞电压 Collision voltage(V)	电离模式 Ionization mode
欧鼠李叶碱	$C_{31}H_{42}N_4O_4$	534	535.4	148* 133	135	30 50	+

注:* 为定量离子。

Note: * Quantitative ion.

2.2 提取工艺流程

回流提取→离心→旋蒸除去有机溶剂→溶于水→石油醚萃取除油→水相用氨水调 pH = 10 并旋蒸浓缩→冻干→三氯甲烷索氏提取→旋蒸除去三氯

甲烷→欧鼠李叶碱。

2.3 提取率的测定

用欧鼠李叶碱标准品配置 6 个梯度浓度(125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.90625 ng/mL)的标

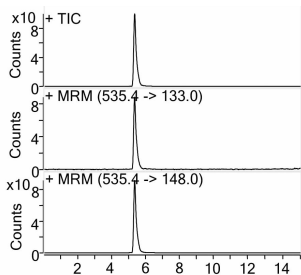


图2 欧鼠李叶碱的 TIC 图谱及 MRM 图谱

Fig. 2 TIC and MRM Spectrum of franguloline

表2 标准曲线及检出限、定量下限

Table 2 Standard curves, limit of detection and limit of quantitation

线性方程 Linear equation	线性范围 (ng/mL)	相关系数 R^2	检出限 LOD (ng/mL)	定量下限 LOQ (ng/mL)
$Y = 49.9146X - 11.5032$	3-125	0.9998	3	10

后的提取物与瓶的总质量,将提取物取出并称量瓶中残留提取物和瓶的质量,将残留提取物洗净再次称量瓶的质量。以三氯甲烷为提取剂对取出的提取物进行索氏提取(65 °C, 6 h),提取结束后在真空旋转蒸发仪上除去三氯甲烷,然后用 15 mL 甲醇溶解提取物,再用甲醇稀释 450 倍,用孔径 0.22 μm 的有机滤膜过滤到进样瓶中。将处理好的样品用已建立的酸枣仁欧鼠李叶碱液质分析方法测定,根据标准曲线计算样品中欧鼠李叶碱的浓度,进而计算欧鼠李叶碱提取率,提取率按公式(1)计算:

$$\text{欧鼠李叶碱提取率}/\mu\text{g/g} = \frac{c \times 450 \times 15(m_1 - m_3)}{1000 \times m_0(m_1 - m_2)} \quad (1)$$

式中: c 为测得的样品中欧鼠李叶碱的浓度/ng/mL; m_0 为用于回流提取的酸枣仁粉末质量/g; m_1 为冻干后的回流提取物与瓶的总质量/g; m_2 为

准样品,用已建立的液质分析方法进行测定,根据标样浓度和欧鼠李叶碱定量离子峰面积制作标准曲线,结果如表 2 所示。

将干燥后的酸枣仁粉碎,称取一定质量的酸枣仁粉末进行回流提取,提取结束后进行离心(4000 rpm, 15 min),取出上清在真空旋转蒸发仪上除去有机溶剂,将剩余提取物溶于水中,用石油醚萃取除油,用氨水将水相 pH 调为 10 并在真空旋转蒸发仪上旋蒸浓缩,浓缩后置于冻干机中冻干。称量冻干

提取物取出后残留提取物与瓶的总质量/g; m_3 为瓶子的质量/g。

2.4 单因素试验

精确称取 20 g 酸枣仁粉末,分别考察不同提取溶剂(水、乙醇、三氯甲烷);提取溶剂中的酸(乙酸、盐酸、硫酸);提取温度(40、50、60、70、80 °C);酸浓度(2%、4%、6%、8%、10%);液固比(5:1、10:1、15:1、20:1、25:1 V:g);提取时间(2、4、6、8、10 h)对酸枣仁中欧鼠李叶碱提取率的影响。

2.5 正交试验

在单因素试验基础上,按照 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行四因素四水平正交试验,以欧鼠李叶碱的提取率为考察指标,通过极差分析和方差分析法确定最佳提取工艺条件。因素水平表见表 3。

表3 正交试验因素水平表

Table 3 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平	A 提取温度 (°C)	B 酸浓度 (%)	C 液固比 (V:m)	D 提取时间 (h)
1	50	2	5:1	2
2	60	4	10:1	4
3	70	6	15:1	6
4	80	8	20:1	8

2.6 验证试验

对正交优化得到的最优提取条件进行 3 次重复试验,对最优提取条件进行验证。

3 结果与分析

3.1 单因素试验结果与分析

3.1.1 提取溶剂的优化

分别以 5% 的乙酸水溶液、5% 的乙酸乙醇溶液和 5% 的氨水氯仿溶液为提取剂对 20 g 酸枣仁粉末在 60 °C 回流提取 6 h,提取率结果见图 3。由结果

可知,以乙醇为提取剂时酸枣仁中欧鼠李叶碱的提取率最高,远远高于以水和氯仿为提取剂时的提取率,所以选择乙醇为酸枣仁中欧鼠李叶碱的提取溶剂。

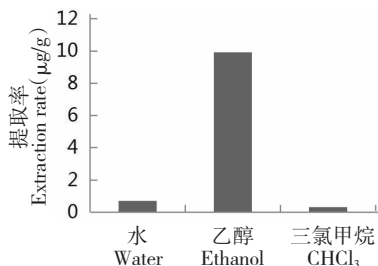


图3 不同提取溶剂对提取率的影响

Fig. 3 Effect of extraction solvent on the extraction rate

3.1.2 提取溶剂中酸的优化

分别用含有2%乙酸、2%盐酸、2%硫酸的乙醇溶液对20g酸枣仁粉末在60℃回流提取6h,提取率结果见图4。由结果可知,选用醋酸时酸枣仁中欧鼠李叶碱的提取率最高,远远高于盐酸和硫酸,所以选择乙酸。

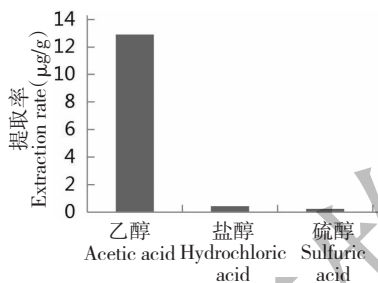


图4 提取溶剂中不同酸对提取率的影响

Fig. 4 Effect of acid on the extraction rate

3.1.3 提取温度

以5%的冰醋酸乙醇溶液为提取剂,20:1(V:g)的液固比,在不同提取温度下回流提取6h,考察提取温度对欧鼠李叶碱的提取率的影响,结果见图5。

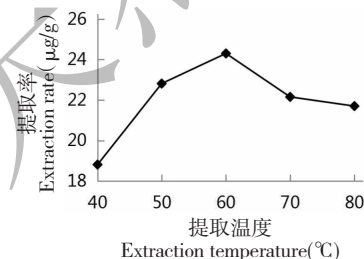


图5 提取温度对欧鼠李叶碱提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction temperature on the extraction rate

由图5可知,随着提取温度的升高,欧鼠李叶碱的提取率先升高后降低,温度为60℃时提取率最

高。这是因为随着提取温度的升高,传质速率增大,有利于欧鼠李叶碱的浸出,但提取温度过高会破坏欧鼠李叶碱的结构,导致提取率有所下降。

3.1.4 乙酸浓度

以含有不同浓度乙酸的乙醇溶液为提取剂,20:1(V:g)的液固比,在60℃回流提取6h,考察乙酸浓度对欧鼠李叶碱的提取率的影响,结果见图6。

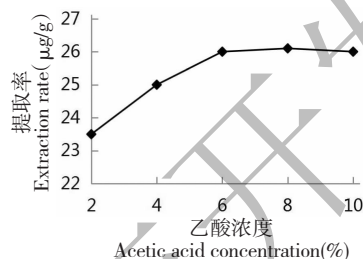


图6 乙酸浓度对欧鼠李叶碱提取率的影响

Fig. 6 Effect of acetic acid concentration on the extraction rate

图6显示欧鼠李叶碱提取率随提取液中乙酸浓度的增大先上升后几乎保持不变。这是因为加酸可以使生物碱成盐,增大其在极性溶剂中的溶解度,有利于提取,但过多的酸会造成不必要的浪费,所以提取剂中乙酸浓度选择6%左右为宜。

3.1.5 液固比

以6%的冰醋酸乙醇溶液为提取剂,不同液固比,在60℃回流提取6h,考察液固比对欧鼠李叶碱的提取率的影响,结果见图7。

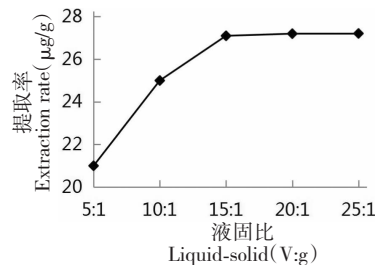


图7 液固比对欧鼠李叶碱提取率的影响

Fig. 7 Effect of liquid-solid ratio on the extraction rate

由图7可以看出,液固比在5:1到15:1之间时,欧鼠李叶碱的提取率随着液固比的增大而增大,当液固比大于15:1时,随着液固比的继续增大,提取率几乎保持不变。造成这种现象的原因是液固比影响提取时物料分散程度,并且影响提取剂中目标物的浓度以及提取剂对目标物的溶解量,液固比越大,提取过程中物料越分散,提取液中目标物的浓度越低,提取剂对目标物的溶解量越大,越有利于目标物的浸出,但是过高的液固比会造成不必要的提取剂

浪费,增加提取成本,所以液固比在 15:1 左右为宜。

3.1.6 提取时间

以 6% 的冰醋酸乙醇溶液为提取剂,20:1(V:g) 的液固比,在 60 °C 回流提取不同时间,考察提取时间对欧鼠李叶碱的提取率的影响,结果见图 8。

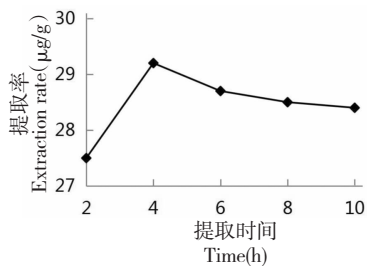


图 8 提取时间对欧鼠李叶碱提取率的影响

Fig. 8 Effect of extraction time on the extraction rate

由图 8 可知,欧鼠李叶碱的提取率随着提取时间的延长先增大,当提取时间达到 4 h 时提取率最大,当提取时间大于 4 h 时,随着提取时间的继续延长,欧鼠李叶碱的提取率缓慢降低。这是因为提取时间过短不利于欧鼠李叶碱的充分浸出,而提取时间过长,长时间的加热会对欧鼠李叶碱的结构产生一定的破坏。所以提取时间在 4 h 左右为宜。

3.2 正交试验结果与分析

对正交试验结果进行极差分析,结果见表 4。结果显示 $R_A > R_C > R_B > R_D$,所以选取的 4 个因素对酸枣仁中欧鼠李叶碱提取率的影响大小依次为:提取温度 > 液固比 > 酸浓度 > 提取时间。最优提取条件为 $A_2B_4C_4D_2$,即提取温度为 60 °C,乙酸浓度为 8%,液固比为 20:1(V:g),提取时间为 4 h。

表 4 正交试验结果

Table 4 Results of the orthogonal experiment

试验号 Number	A	B	C	D	空列 Empty column	提取率 Extraction rate (µg/g)
1	1	1	1	1	1	4.934
2	1	2	2	2	2	20.979
3	1	3	3	3	3	8.149
4	1	4	4	4	4	22.184
5	2	1	2	3	4	22.930
6	2	2	1	4	3	17.625
7	2	3	4	1	2	28.018
8	2	4	3	2	1	31.830
9	3	1	3	4	2	15.032
10	3	2	4	3	1	24.115
11	3	3	1	2	4	13.208
12	3	4	2	1	3	20.735
13	4	1	4	2	3	21.117
14	4	2	3	1	4	14.391
15	4	3	2	4	1	14.177
16	4	4	1	3	2	15.690
K_1	56.246	64.013	51.457	68.077	75.056	
K_2	100.403	77.109	78.820	87.133	79.718	
K_3	73.089	63.552	69.402	70.885	67.625	
K_4	65.375	90.439	95.433	69.017	72.713	
k_1	14.061	16.003	12.864	17.019	18.764	
k_2	25.101	19.277	19.705	21.783	19.930	
k_3	18.272	15.888	17.351	17.721	16.906	
k_4	16.344	22.610	23.858	17.254	18.178	
R	11.039	6.722	10.994	4.764	3.023	

对正交试验结果进行方差分析,结果见表5。从方差分析可以看出提取温度和液固比对酸枣仁中欧鼠李叶碱的提取率影响显著($P < 0.05$),酸浓度

和提取时间对酸枣仁中欧鼠李叶碱的提取率影响不显著($P > 0.05$),其中提取温度对欧鼠李叶碱的提取率影响最大,提取时间对提取率影响最小。

表5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

变异来源 Source of variation	离均差平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值	F_{α}
A	271.836	3	90.612	14.324 *	$F_{0.05}(3, 3) = 9.28$ $F_{0.01}(3, 3) = 29.5$
B	122.155	3	40.718	6.437	
C	252.934	3	84.311	13.328 *	
D	60.472	3	20.157	3.186	
误差	18.978	3	6.326		
总变异	726.375	15			

注: * 表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: * Significant difference ($P < 0.05$).

3.3 验证试验

在最优提取条件下进行3次平行试验,酸枣仁中欧鼠李叶碱提取率的平均值为32.286 $\mu\text{g/g}$,高于正交试验中任何一组结果,所以正交试验得到的 $A_2B_4C_4D_2$ 是最优提取条件。

4 结论

本文建立的欧鼠李叶碱液质分析方法有效、可靠,对欧鼠李叶碱定量分析准确,为欧鼠李叶碱的定量分析提供了便利。本文通过单因素试验考察回流提取中提取溶剂、提取溶剂中的酸、提取温度、酸浓度、液固比和提取时间对酸枣仁中欧鼠李叶碱提取率的影响,并通过正交试验优化酸枣仁中欧鼠李叶碱回流提取工艺条件,发现乙醇为提取酸枣仁中欧鼠李叶碱的理想溶剂,乙酸为提取溶剂中加入的理想酸;影响欧鼠李叶碱提取率的因素主次顺序为:提取温度 > 液固比 > 酸浓度 > 提取时间;最优提取工艺条件为:提取温度60 $^{\circ}\text{C}$,乙酸浓度8%,液固比20:1(V:g),提取时间4 h。最优提取条件下欧鼠李叶碱的提取率为32.286 $\mu\text{g/g}$ 。

参考文献

- Hu MY(胡明亚). Pharmacological effects and modern clinical application research of Suanzao Ren[J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2012, 4: 20-21.
- Peng KD(彭凯迪), Cheng S(程思), Li A(李奥), et al. Evaluation of sleep quality improvement by advanced extraction of jujube kernel oil by subcritical butane[J]. *J Chin Cereal Oil Ass* (中国粮油学报), 2017, 32: 113-120.

- Lu XF(芦晓芳), Zhao JZ(赵晋忠), Chang LP(常丽萍). Research progress on extraction and purification for jujuboside[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1976-1982.
- Cao JX, Zhang QY, Cui SY, et al. Hypnotic effect of jujubosides from *Semen Ziziphi Spinosae* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130: 163-166.
- Ostuka H, Akiyama T, Kawai K, et al. The structure of jujubosides A and B, the saponins isolated from the seeds of the *Zizyphus jujube* [J]. *Pytochemistry*, 1978, 17: 1349-1352.
- Ding K, Lu JJ, Lu WJ, et al. Preparative chromatographic purification and separation of individual jujubosaponins from *Zizyphi Spinosi Semen* [J]. *Sep Sci Technol*, 2011, 46: 2526-2530.
- Wang JZ, Yang JS. Structural elucidation of triterpene saponins from the seeds of *Zizyphus jujuba* Mill [J]. *Chinese J Org Chem*, 2008, 28(1): 69-72.
- Niu CY, Wu CS, Sheng YX, et al. Identification and characterization of flavonoids from *Semen Zizyphi Spinosae* by high performance liquid chromatography/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry [J]. *Asian Nat Prod Res*, 2010, 12: 300-312.
- Wang LE, Bai YJ, Shi XR, et al. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from *Semen Zizyphi Spinosae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system [J]. *Pharmacol Biochem Be*, 2008, 90: 399-403.
- Han BH, Park MH, Han YN. Aporphine and tetrahydrobenzylisoquinoline alkaloids from the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosus* [J]. *Arch Pharm Res*, 1989, 12: 263-268.
- Han BH, Park MH, Han YN. Cyclic peptide and peptide alkaloids from seeds of *Zizyphus vulgaris* [J]. *Pytochemistry*, 1990, 29: 3315-3319.