太行山区酸枣叶化学成分的 UPLC-QTOF-MS 分析

叶　嘉[1,2],杨明建[1,2],杨香瑜[1,2],张　浩[1,2],昝立峰[1,2*]

[1]邯郸学院生命科学与工程学院;[2]河北省高校冀南太行山区野生资源植物应用研发中心,邯郸 056005

摘　要:为评价冀南太行山产酸枣叶的质量,本研究采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术对其化学成分进行系统分析。选用反相 Waters BEH Amide(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)色谱柱,乙腈与水(含 0.5% 甲酸)作为流动相二元线性梯度洗脱,检测波长 340 nm,流速 0.20 mL/min,柱温 40 ℃;以 G2 Q-TOF 联用系统进行检测。通过得到的样品电喷雾-质谱(ESI-MS)正离子和负离子扫描模式下的准分子离子峰、碎片信息、保留时间,并结合相关文献,从酸枣叶中共鉴定出 53 个化合物,其中包括黄酮 10 个、三萜皂苷 14 个、三萜酸 13 个、生物碱 3 个、脂肪酸和有机酸 13 个。分析结果表明,UPLC-Q-TOF-MS 技术可快速、灵敏地鉴定冀南太行山区酸枣叶中的化学成分,可为有效控制该药材质量,为阐明其药效物质基础提供理论依据。

关键词:酸枣叶;化学成分;超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱;分析

中图分类号:R932;Q946.8　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2019)7-1183-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.7.010

Analysis of chemical constituents in *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium by UPLC-QTOF-MS

YE Jia[1,2],YANG Ming-jian[1,2],YANG Xiang-yu[1,2],ZHANG Hao[1,2],ZAN Li-feng[1,2*]

[1]*School of Life Science and Engineering*,*Handan College*;

[2]*Wild Plant Resources Research Centre in Taihang Mountain of Southern Hebei Province*,*Handan College*,*Handan 056005*,*China*

Abstract:In order to evaluate the quality in *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium from Taihang Mountain of Southern Hebei Province,the chemical compositions were analyzed by ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). Waters BEH Amide(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)chromatographic column and the G2 Q-TOF spectrometer were used to analyze the extract sample. The mobile phases used were acetonitrile and 0.5% formic acid in water. The analysis was conducted at a flow rate was 0.20 mL/min and detection wavelength of 340 nm. The column temperature was kept at 40 ℃. The ESI-MS positive and negative molecular ion peaks,product ions,the retention time and together with the references were used to tentatively identify the chemical constituents. The results indicated that 53 metabolites from ethanol extract of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium were identified,including 10 flavones,14 terpenoid saponins,13 triterpenoids,3 alkaloids,13 fatty acids and organic acids. This method is rapid,sensitive,which can provide the reference for evaluation of the quality of the *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium and clarifying the material basis.

Key words:*Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium;chemical compositions;UPLC-Q-TOF-MS;analysis

酸枣(*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*)隶属于鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus*)木本植物,一种灌木或小乔木,广泛分布于我国华北、西北等地,尤其在太行山地区野生资源十分丰富[1]。酸枣干燥成熟种子酸枣仁是中医常用的宁心安神药,具补肝、宁心、敛汗、生津等功效[2]。而酸枣叶在我国民间广泛将其加工成茶,以养心安眠为其主要保健功效,具有利尿、促进胆酸合成、消炎等多种活性,常称作“东方睡叶”[3]。《本草纲目》中记载酸枣叶可“敛疮解毒,治胫廉疮”功能[4],现代研究发现酸枣叶中主要含有生物碱、黄酮、三萜皂苷、有机酸等多种类型的化学成分,具有镇静抗惊厥、保温作用,并且可使心脑血管收缩性增强,致使血压持续下降[5]。

国内对酸枣叶的研究多集中在酸枣叶茶的加工

收稿日期:2018-12-05　　接受日期:2019-06-14

基金项目:河北省高等学校科学研究计划(ZD2017302);邯郸市科学技术研究与发展计划(1727201061-2)

*通信作者 E-mail:tengfei007zlf@126.com

天然产物研究与开发

技术研究方面,而对酸枣叶的化学成分及药理研究的文献报道较少。超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术兼具液相色谱的高效分离能力与质谱的高灵敏度、高检测能力,在天然产物的分析研究、药效物质基础研究等方面具有独特的优势。为了进一步明确产自河北省太行山区酸枣叶的活性成分,本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对其乙醇提取物的化学成分进行了系统分析,建立酸枣叶化学成分的快速分析方法,为阐明其药效作用的物质基础提供实验方法和依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸枣叶于 2017 年 8 月采集于河北省冀南太行山区五指山,采集后经摊晾、45 ℃烘干,5 ~ 8 ℃放置备用。

乙腈和甲酸为色谱级,其余试剂均为分析纯,实验用水为 Milli-Q 超纯水。LX-17 型大孔吸附树脂由西安蓝晓科技新材料股份有限公司提供。

1.2 仪器与设备

Acquity UPLC-G2 QTOF 联用系统(美国 Waters 公司);Waters BEH Amide 色谱柱(100 mm × 2.1 mm,1.7 μm);N-1200B 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);Mill-Q Advantage A10 超纯水仪(美国 Millipore);高速万能粉碎机(常州市国旺仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

采用多功能高速粉碎机对酸枣叶样进行粉碎(20 ~ 40 目),准确称取粉碎后的酸枣叶 200 g,用 60% 的乙醇在超声波 45 ℃辅助浸提 2 次,每次 2 h,合并提取液并离心过滤,离心液在温度为 40 ℃减压浓缩至无醇状态的水溶液,水溶液采用大孔吸附树脂吸附分离纯化,75% 乙醇解吸得到解吸液,解吸液减压蒸发浓缩后冷冻干燥得到 3.6 g 物质,分析前用甲醇溶解并过 0.22 μm 滤膜,即得样品溶液。

1.3.2 色谱条件

色谱柱为 Waters BEH Amide(100 mm × 2.1 mm,1.7 μm);流动相 A 为水溶液(含 0.5% 甲酸),B 相为乙腈,流动相梯度洗脱过程如下:10% A(0 ~ 1 min),10% ~ 100% A(1 ~ 45 min),100% A(45 ~ 47 min),100% ~ 10% A(47 ~ 47.1 min),10% A(47.1 ~ 50 min);流速为 0.2 mL/min;进样量为 10 μL;柱温 40 ℃。

1.3.3 质谱条件

电喷雾电离(ESI)离子源,质量扫描范围质荷比(m/z) 100 ~ 2 000,扫描方式为正负离子模式,毛细管电压为 3 000 V,样品锥电压 40 V,提取锥电压 4 V,源温 110 ℃,脱溶剂气温度 300 ℃,脱溶剂气流速度 700 L/h。

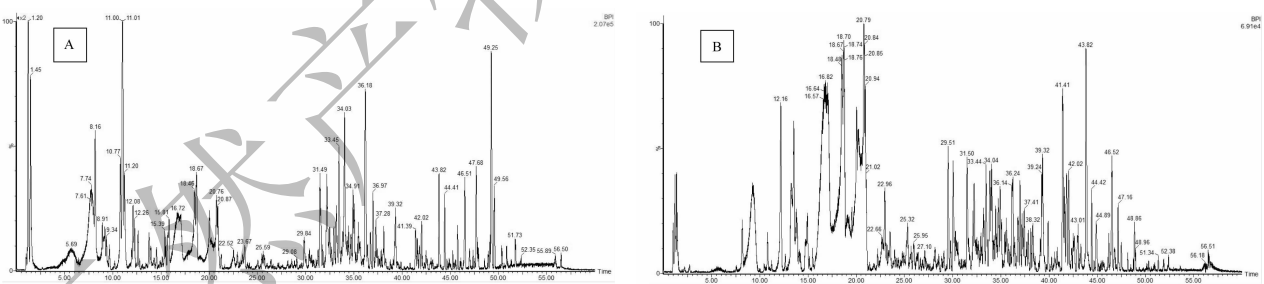

图 1 酸枣叶提取物正(A)负(B)离子模式下的 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatograms in positive (A) and negative ion mode (B) of extracts from *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium using UPLC-Q-TOF-MS

2 结果与分析

图 1 为产自冀南太行山区酸枣叶乙醇提取物的 UPLC-QTOF-MS 总离子流色谱图,从图 1 中看出 UPLC 分离条件可以有效地将酸枣叶中的主要成分分开,在 UPLC-QTOF-MS 条件下得到质谱图,化学成分在 ESI 离子源正离子谱中主要出现 $[M+H]^+$ 准分子离子峰;在负离子谱中黄酮、三萜酸、有机酸和脂肪酸主要出现 $[M-H]^-$ 准分子离子峰,而三萜皂苷类物质则具有基本相同的一级质谱,基峰为 $[M-H+HCOOH]^-$,二级质谱主要的碎片峰为 $[M-H]^-$,总离子峰面积为 213 762 mV · min。

2.1 黄酮类化合物

黄酮化合物的裂解规律已有较多的文献报道[6],裂解规律相似,从酸枣叶乙醇提取物中共鉴

天然产物研究与开发

定出 10 个黄酮成分,详细结果见表 1 所示。

化合物 **1** 和 **2** 在正负离子模式下均产生相同的分子离子峰,推测其可能为同分异构体,在负离子模式下准离子峰 *m/z* 595.166 4 [M-H]⁻,正离子模式下产生 *m/z* 597.183 3 $[M+H]^+$ 的分子离子峰,确定化合物分子量为 596,根据元素组成分析分子式为 $C_{27}H_{32}O_{15}$,二级、三级质谱碎片中有碳苷的常见碎片丢失,参照文献[7]并结合出峰时间推测化合物 **1** 和 **2** 分别为 6,8-di-C-glucosyl-2(*S*)-naringenin 或 6,8-di-C-glucosyl-2(*R*)-naringenin。

化合物 **3** 和 **4** 在负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 609.144 8 [M-H]⁻,碎片为 463.087 6、301.032 9;正离子模式下化合物产生 *m/z* 611.160 9 $[M+H]^+$ 的分子离子峰,二级质谱碎片离子 *m/z* 465.102 3 由 *m/z* 611.160 9 失去一分子鼠李糖(146)产生,进一步失去一分子葡萄糖(162),产生碎片 *m/z* 303.050 3;确定化合物分子量为 610,根据元素组成分析分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$,且两个化合物产生相同的分子离子峰,结合出峰时间,参考文献[8]推测其分别为 Quercetin-3-*O*-robinobioside 和芦丁。

化合物 **5** 和 **7** 负离子模式下产生 *m/z* 593.148 8 [M-H]⁻分子离子峰,正离子基峰 *m/z* 595.168 0 $[M+H]^+$,确定化合物分子量为 594,产生碎片离子 *m/z* 449.108 6 由 *m/z* 595.108 6 失去一分子鼠李糖(146)产生,进一步失去一分子葡萄糖(162),产生碎片 *m/z* 287.056 2;根据元素组成分析分子式为 $C_{27}H_{30}O_{15}$,且两个化合物产生相同的分子离子峰,推测为同分异构体,结合出峰时间并参考文献[9]推测其分别为 Kaempferol 3-glucoside-7-rhamnoside 和 Kaempferol 3-rhamnoside-7-glucoside。

化合物 **6** 正离子模式下产生 *m/z* 581.149 7 $[M+H]^+$ 的分子离子峰,碎片峰 *m/z* 303.051 9 由母离子脱掉 1 分子阿拉伯糖(132)和 1 分子鼠李糖(146)产生,查阅数据库(Lipidomics Gateway)并参考文献[9]推断化合物为 Kaempferol 3-rhamnoside-7-glucoside。

化合物 **8** 正离子分子离子峰为 *m/z* 447.092 3 $[M+H]^+$,主要碎片为 287.055 3 和 271.061 4,失去 1 分子葡萄糖苷(160)产生,并进一步脱氧(16)产生 271.055 3 碎片;负离子模式下产生 *m/z* 445.075 5 [M-H]⁻离子峰,确定分子量为 446,根据元素组成分析分子式为 $C_{21}H_{18}O_{11}$,由数据库(Lipidomics Gateway)查阅推断化合物为黄芩苷(Baicalein 7-glucuronide)。

化合物 **9** 在负离子模式下产生 *m/z* 563.140 1 [M-H]⁻的分子离子峰,主要碎片为 431.099 9 和 285.031 7;而正离子模式下,化合物产生 *m/z* 565.155 0 $[M+H]^+$ 的分子离子峰,主要碎片为 433.102 8 和 287.056 2,确定化合物分子量为 564,根据元素组成分析分子式为 $C_{22}H_{28}O_{14}$,碎片 433.102 8 为母离子脱掉 1 分子木糖(132),继续脱掉 1 分子鼠李糖(146)产生碎片 287.056 2,参考文献[9]确定化合物为 Kaempferol 3-rhamnoside-7-xyloside。

化合物 **10** 在负离子模式下产生 *m/z* 755.182 4 [M-H]⁻的负离子分子离子峰,首先脱掉 1 分子对香豆酰基(146),产生碎片峰 *m/z* 609,继续脱掉 1 分子鼠李糖和葡萄糖,产生碎片峰 *m/z* 301,结合文献[9]推断化合物为槲皮素的衍生物(Quercetin 3-(6‴-p-coumarylglucosyl)(1→2)-rhamnoside)。

表 1　UPLC-Q-TOF-MS 鉴定酸枣叶提取物中的黄酮化合物

Table 1　The flavonoids identified from *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium by UPLC-Q-TOF-MS

序号 No.	保留时间 t_R(min)	分子式 Molecular formula	选择离子 Selected ion	实测值 Experimental	计算值 Theoretical	碎片 Fragmentation	积分面积 Integral area	化合物 Compound
1	9.23	$C_{27}H_{32}O_{15}$	$[M+H]^+$	597.180 1	597.181 9	177.057 6	12 804	6,8-Di-C-glucosyl-2(*S*)-naringenin
2	12.16	$C_{27}H_{32}O_{15}$	$[M+H]^+$	597.181 6	597.181 9	177.054 9	6 918	6,8-Di-C-glucosyl-2(*R*)-naringenin
3	16.82	$C_{27}H_{29}O_{16}$	[M-H]⁻	609.144 8	609.145 6	300.026 3	36 225	Quercetin 3-*O*-robinobioside
4	18.70	$C_{27}H_{29}O_{16}$	[M-H]⁻	609.146 7	609.145 6	300.026 8	20 741	Quercetin-3-*O*-rutinoside (Rutin)
5	20.03	$C_{27}H_{31}O_{15}$	$[M+H]^+$	595.166 0	595.166 3	287.056 6	6 609	Kaempferol 3-Glucoside-7-rhamnoside
6	20.76	$C_{26}H_{29}O_{15}$	$[M+H]^+$	581.150 5	581.150 6	303.056 3	15 400	Quercetin 3-xyloside-7-rhamnoside
7	20.94	$C_{27}H_{29}O_{15}$	[M-H]⁻	593.150 3	593.150 6	285.039 5	6 424	Kaempferol 3-Rhamnoside-7-glucoside
8	22.52	$C_{21}H_{19}O_{11}$	$[M+H]^+$	447.092 3	447.092 7	287.050 9	1 221	Baicalein 7-glucuronide(Baicalin)
9	22.96	$C_{26}H_{27}O_{14}$	[M-H]⁻	563.140 2	563.146 0	285.031 7	2 792	Kaempferol 3-Rhamnoside-7-xyloside
10	23.50	$C_{36}H_{35}O_{18}$	[M-H]⁻	755.182 4	755.182 3	301.033 7	1 040	Quercetin 3-(6‴-p-Coumarylglucosyl)(1→2)-rhamnoside

天然产物研究与开发

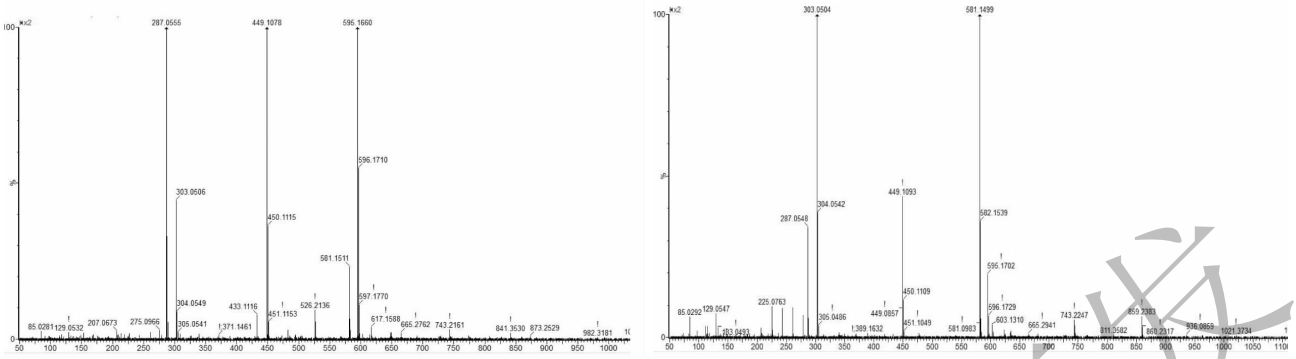

图 2 化合物山奈酚-3-葡萄糖-7-鼠李糖和槲皮素-3-木糖苷-7-鼠李糖的质谱图

Fig. 2 The mass spectra (positive mode) of compound kaempferol 3-glucoside-7-rhamnoside and quercetin 3-xyloside-7-rhamnoside

2.2 三萜皂苷

从酸枣叶中共鉴定出 14 个三萜皂苷成分,结构以达玛烷型三萜皂苷为主,糖多取代在 C-3、C-20 位,有 L-鼠李糖、D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-木糖、L-6-脱氧塔络糖和乙酰鼠李糖等,详细信息见表 2 所示。

化合物 **11** 在负离子模式下分子离子峰为 *m/z* 957.507 1 [M-H + HCOOH]$^-$,而正离子模式下分子离子峰为 *m/z* 913.519 3 [M + H]$^+$,确定分子量为 912,分别失去 1 分子鼠李糖、1 分子木糖、1 分子葡萄糖产生碎片为 767.454 0(146)、635.403 0(132)、473.340 4(162),根据元素组成分析化合物分子式为 $C_{47}H_{76}O_{17}$,结合文献[10]推测化合物为 Zizynummin。

化合物 **12** 在负离子模式下准分子离子峰为 *m/z* 1 103.563 8 [M-H + HCOOH]$^-$,二级谱离子峰为 *m/z* 1 057.553 8 [M-H]$^-$,而正离子模式下分子离子峰为 *m/z* 1 059.571 7 [M + H]$^+$,确定分子量为 1058,正离子模式产生碎片 895.504 8、733.451 0、587.391 8、455.350 7,分别失去 2 分子葡萄糖、1 分子鼠李糖和 1 分子阿拉伯糖。根据元素组成分析化合物分子式为 $C_{53}H_{86}O_{21}$,并查阅 Chemical spider 数据库,推测该化合物为 Ilekudinoside A (Oleanolic acid 3-O-[*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside])。

化合物 **13** 和 **20** 负离子峰为 *m/z* 941.510 6 [M-H + HCOOH]$^-$,二级谱离子峰为 *m/z* 895.507 4 [M-H]$^-$,正离子峰为 *m/z* 897.524 1 [M + H]$^+$,分子量为 896,分子式为 $C_{47}H_{76}O_{16}$。正离子峰分别失去 2 分子鼠李糖和 1 分子阿拉伯糖产生碎片 733.455 4、587.395 7、455.354 8,参考文献[11],推测其为 Jujubasaponin I (3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl (1→2)-α-L-arabinopyranosyl-20-*O*-α-L-rhamnopyranosyl jujubogenin)及其异构体(Oleanolic acid 3-*O*-β-D-glucosyl-(1→3)-α-L-ramnosyl (1→2)-α-L-arabinoside)。

化合物 **14** 和 **21** 负离子基峰为 *m/z* 983.523 6 [M-H + HCOOH]$^-$,二级谱离子峰为 *m/z* 937.519 3 [M-H]$^-$,正离子峰为 *m/z* 939.528 9 [M + H]$^+$,综合确定分子量为 938,分子式为 $C_{49}H_{78}O_{17}$。正离子峰分别失去 2 分子鼠李糖和 1 分子阿拉伯糖产生碎片 733.455 9、587.393 6、455.359 2,参考文献[11],并结合出峰时间推测其为 Jujubasaponin II 和 Jujubasaponin III。

化合物 **15** 负离子基峰为 *m/z* 1 005.527 7 [M-H + HCOOH]$^-$,二级谱离子峰为 *m/z* 959.523 3 [M-H]$^-$,正离子峰为 *m/z* 961.539 1 [M + H]$^+$,综合确定分子量为 942 结合 1 分子水,分子式为 $C_{48}H_{80}O_{19}$ ($C_{48}H_{78}O_{18} \cdot H_2O$)。正离子峰产生碎片 797.471 0 [961-hexosyl + H]$^+$、651.402 7 [797-deoxyhexosyl + H]$^+$,同时失去 1 分子半乳糖、1 分子葡萄糖和 1 分子鼠李糖形成碎片 587.395 8、489.359 9、455.357 9,结合文献[12],推测化合物为 Jujubasaponin Ⅳ或 Ⅴ。

化合物 **16** 正离子基峰为 *m/z* 797.474 4 [M + H]$^+$,确定分子量为 796,分子式为 $C_{42}H_{68}O_{14}$,产生碎片 651.4125 [M + H-deoxyhexosyl]$^+$,参考文献[12],推测化合物为 Jujubasaponin Ⅵ [Trevoagenin D 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside]。

化合物 **17** 在正离子模式下基峰为 *m/z*

天然产物研究与开发

1 045.559 4 [M + H]$^+$,分子量为 1 044,分子式为 $C_{52}H_{84}O_{21}$,分别失去 1 分子 L-阿拉伯糖、D-葡萄糖、6-deoxy-L-talose 和木糖产生碎片 947.521 0、733.452 1、587.395 0、455.352 9,参照文献[13]推测化合物为 Zizyphus saponin III。

化合物 **18** 和 **19** 在正离子模式下基峰为 *m/z* 931.528 4 [M + H]$^+$,分子量为 930,分子式为 $C_{47}H_{78}O_{18}\cdot H_2O$,分别失去 1 分子阿拉伯糖、葡萄糖和鼠李糖,产生碎片 785.467 4、653.424 0、455.359 2。参照文献[13]并根据出峰时间推测化合物为 Zizyphus saponin I 和 II。

化合物 **22** 正离子基峰为 *m/z* 1 075.570 8 [M + H]$^+$,分子量为 1 074,分子式为 $C_{53}H_{86}O_{22}$,结合碎片信息参照文献[14]鉴定为 Jujuboside I。

化合物 **23** 和 **24** 在正离子模式下基峰为 *m/z* 981.541 2 [M + H]$^+$,分子量为 980,分子式为 $C_{51}H_{80}O_{18}$,失去系列糖产生碎片 835.484 4、733.453 4、587.391 5、455.351 5,结合文献[15]推测化合物分别为 Ziziphin 和其异构体(3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-20-*O*-(2,3-di-*O*-acetyl)-α-L-rhamnopyranosyl jujubogenin)。

表 2　UPLC-Q-TOF-MS 鉴定酸枣叶生茶中的皂苷化合物

Table 2　The saponins identified from *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium by UPLC-Q-TOF-MS

序号 No.	保留时间 t_R(min)	分子式 Molecular formula	选择离子 Selected ion	实测值 Experimental	计算值 Theoretical	碎片 Fragmentation	积分面积 Integral area	化合物 Compound
11	28.86	$C_{47}H_{77}O_{17}$	[M + H]$^+$	913.514 6	913.516 1	471.347 8	421	Zizynummin
12	30.40	$C_{53}H_{87}O_{21}$	[M + H]$^+$	1 059.568 0	1 059.568 1	455.352 5	683	Ilekudinoside A
13	31.49	$C_{47}H_{77}O_{16}$	[M + H]$^+$	897.521 1	897.521 2	455.354 8	3 670	Jujubasaponin I
14	32.20	$C_{49}H_{79}O_{17}$	[M + H]$^+$	939.528 9	939.531 7	455.351 8	2 672	Jujubasaponin II
15	32.50	$C_{48}H_{79}O_{18}\cdot H_2O$	[M + H]$^+$	961.539 6	961.537 2	455.356 4	739	Jujubasaponin Ⅳ或Ⅴ
16	32.67	$C_{42}H_{69}O_{14}$	[M + H]$^+$	797.472 5	797.468 7	455.352 8	484	Jujubasaponin Ⅵ
17	33.26	$C_{52}H_{85}O_{21}$	[M + H]$^+$	1 045.558 1	1 045.558 3	455.352 8	706	Zizyphus saponin III
18	33.45	$C_{47}H_{79}O_{18}$	[M + H]$^+$	931.527 5	931.526 6	473.463 3	2 833	Zizyphus saponin I
19	34.03	$C_{47}H_{79}O_{18}$	[M + H]$^+$	931.525 8	931.526 6	473.362 5	3 530	Zizyphus saponin II
20	34.44	$C_{47}H_{77}O_{16}$	[M + H]$^+$	897.520 8	897.521 2	455.350 6	896	Jujubasaponin I 异构体
21	34.91	$C_{49}H_{79}O_{17}$	[M + H]$^+$	939.532 0	939.531 7	455.453 0	2 066	Jujubasaponin III
22	35.63	$C_{53}H_{87}O_{22}$	[M + H]$^+$	1 075.570 8	1 075.574 8	473.363 2	1 236	Jujuboside I
23	36.18	$C_{51}H_{81}O_{18}$	[M + H]$^+$	981.544 1	981.542 3	733.454 7	3 462	Ziziphin
24	36.97	$C_{51}H_{81}O_{18}$	[M + H]$^+$	981.546 6	981.542 3	733.459 5	1 765	Ziziphin 异构体

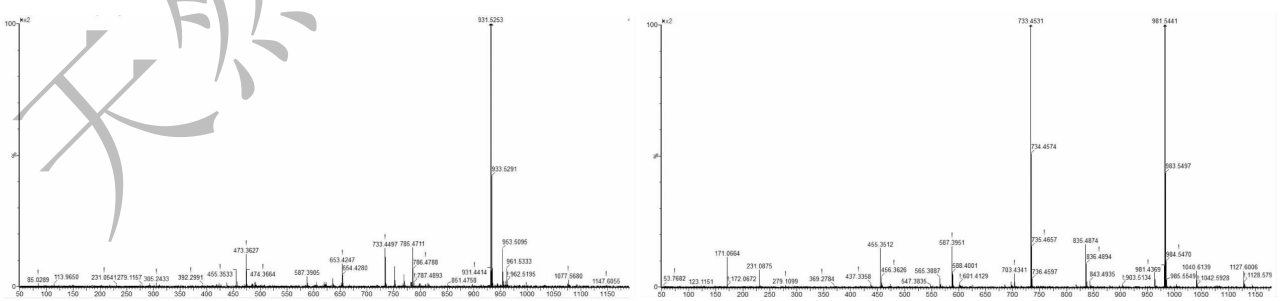

图 3　化合物大枣皂苷 I 和 Ziziphin 的质谱图

Fig. 3　The mass spectra (positive mode) of compound zizyphus saponin I and ziziphin

2.3　三萜酸

酸枣叶中含有大量的三萜酸类次生代谢产物,主要结构为羽扇豆烷型、齐墩果烷型及美洲茶烷型等五环三萜类。裂解规律具有基本相同的一级质

天然产物研究与开发

谱,如化合物 25 和 34 具有相同的基峰和碎片离子,在负离子模式下基峰为 *m/z* 485.326 7 [M-H]⁻,2 倍分子量 *m/z* 971.661 4 [2M-H]⁻,失去 1 分子水产生碎片 469.332 6,正离子模式下基峰为 *m/z* 487.342 4 $[M+H]^+$,2 倍分子量 [2M-H]⁻为 *m/z* 973.675 8,确定化合物分子量为 486,正离子模式失去 1 分子羧基产生碎片 441.336 8,进一步失去 1 分子水产生碎片为 423.320 1。根据元素组成分析化合物分子式为 $C_{30}H_{46}O_5$,结合化合物出峰时间,推断化合物 25 和 34 分别为美洲茶酸(Ceanothic acid)和异美洲茶酸(Epiceanothic acid)。其他三萜化合物裂解规律与化合物 25 相似或相同,结合文献[16-19]共鉴定出 13 个三萜类化合物,结果如表 3 所示。

表 3 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定酸枣叶中的三萜酸化合物

Table 3 The triterpenic acids from *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium by UPLC-Q-TOF-MS

序号 No.	保留时间 t_R(min)	分子式 Molecular formula	选择离子 Selected ion	实测值 Experimental	计算值 Theoretical	碎片 Fragmentation	积分面积 Integral area	化合物 Compound
25	39.32	$C_{30}H_{47}O_5$	$[M+H]^+$	487.342 4	487.342 3	441.336 8	4 064	Ceanothic acid
26	40.28	$C_{30}H_{45}O_6$	$[M-H]^-$	501.322 3	501.321 6	501.322 2	268	24-Hydroxyceanothic acid
27	41.39	$C_{30}H_{47}O_4$	$[M+H]^+$	471.346 1	471.347 4	407.327 2	6 324	Zizyberanalic acid
28	41.58	$C_{30}H_{45}O_6$	$[M-H]^-$	501.323 5	501.321 6	501.320 6	1 803	27-Hydroxyceanothic acid
29	41.80	$C_{30}H_{49}O_4$	$[M+H]^+$	473.357 5	473.357 4	409.344 2	2 773	2α-hydroxyursolic acid
30	42.02	$C_{30}H_{49}O_4$	$[M+H]^+$	473.358 3	473.357 4	409.344 2	2 329	Alphitolic acid
31	42.33	$C_{30}H_{47}O_4$	$[M+H]^+$	471.351 7	471.351 8	407.332 9	457	Pomonic acid
32	42.52	$C_{31}H_{47}O_5$	$[M-H]^-$	499.341 5	499.342 3	277.216 4	581	Poricoic acid H
33	43.02	$C_{30}H_{45}O_3$	$[M-H]^-$	453.300 3	453.300 5	409.311 2	1 594	Oleanolic acid
34	43.82	$C_{30}H_{45}O_5$	$[M-H]^-$	485.327 2	485.326 7	423.326 7	9 100	Epiceanothic acid
35	44.42	$C_{31}H_{47}O_5$	$[M-H]^-$	499.345 0	499.342 3	499.343 4	1 844	Serjanic acid
36	44.93	$C_{30}H_{47}O_3$	$[M-H]^-$	455.353 2	455.352 5	455.353 9	1 553	Betulinic acid
37	46.52	$C_{30}H_{43}O_3$	$[M-H]^-$	451.320 9	451.320 2	451.319 7	3 657	Betulonic acid

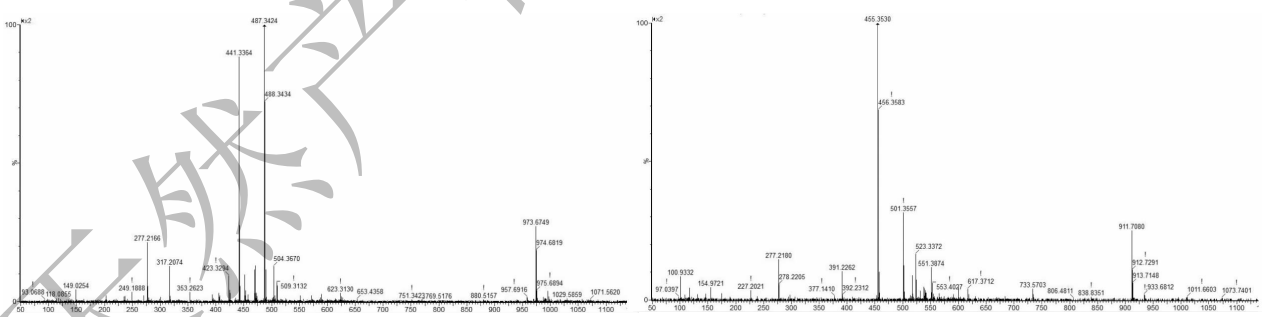

图 4 化合物美洲茶酸(正)和白桦脂酸(负)的质谱图

Fig. 4 The mass spectra of compound ceanothic acid (positive mode) and betulinic acid (negative mode)

2.4 生物碱化合物

酸枣叶中生物碱可以延长环己烯巴比妥干预小鼠睡眠时间起到镇静作用,具有一定的安神作用[21]。通过化合物的分子基峰、碎片信息以及查阅相关文献[20,21],从酸枣叶中鉴定出 3 个生物碱化合物,见表 4 所示,其中化合物 38 在正离子模式下基峰为 *m/z* 286.144 8 $[M+H]^+$,根据元素组成分析分子式为 $C_{17}H_{19}NO_3$,产生生物碱常见碎片 107.049 6(C_7H_7O),查阅 Chemical spider 数据库并参考文献,确定化合物为 Coclaurine。同样化合物 39 和 40 产生碎片信息为 269.088 3($C_{17}H_{17}O_3$)和 107.049 6(C_7H_7O),确定化合物 39 和 40 为 Zizyphusine 和 Lotusine。

天然产物研究与开发

表 4　UPLC-Q-TOF-MS 鉴定酸枣叶生茶中的生物碱化合物

Table 4　The alkaloids identified from *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium by UPLC-Q-TOF-MS

序号 No.	保留时间 t_R(min)	分子式 Molecular Formula	选择离子 Selected ion	实测值 Experimental	计算值 Theoretical	碎片 Fragmentation	积分面积 Integral area	化合物 Compound
38	7.74(11.0)	$C_{17}H_{20}NO_3$	$[M+H]^+$	286.144 8	286.144 3	269.117 8,208.126 8,107.049 6	18 298(15 076)	Coclaurine
39	11.20	$C_{20}H_{24}NO_4$	$[M+H]^+$	342.171 4	342.170 5	297.107 7,282.087 8,269.088 3	5 257	Zizyphusine
40	12.62	$C_{19}H_{24}NO_3$	$[M+H]^+$	314.176 9	314.175 6	269.117 7,237.091 3,107.049 6	1 418	Lotusine

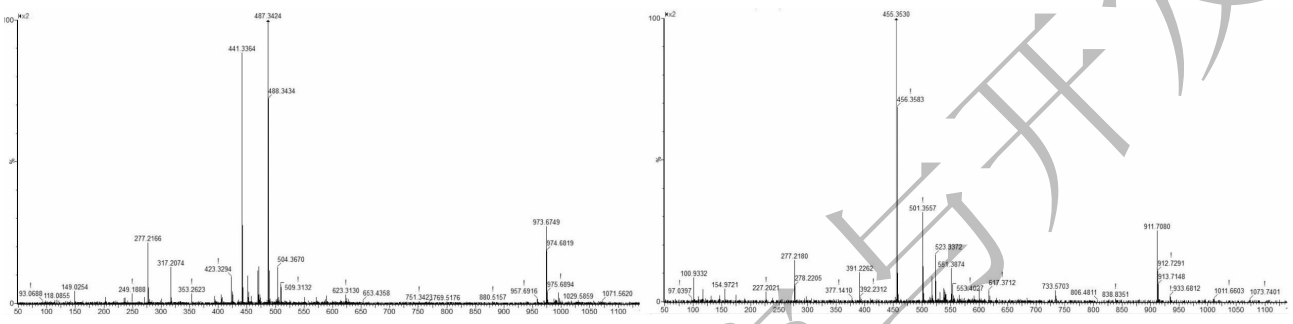

图 5　化合物乌药碱和酸李碱的质谱图

Fig. 5　The mass spectra (positive mode) of compound coclaurine and zizyphusine

2.5　有机酸及脂肪酸

参照文献报道有机酸和脂肪酸的裂解规律和质谱特征,并结合质谱数据库(lipidomics gateway)检索,共从酸枣叶醇提物种鉴定出 13 个有机酸和脂肪酸。如表 5 所示,裂解规律具有基本相同的一级质谱,如化合物 44,在负离子模式下基峰为 *m/z* 315.254 0 $[M-H]^-$,确定化合物分子量为 316,失去 1 分子水产生碎片 297.238 6,根据元素组成分析化合物分子式为 $C_{18}H_{36}O_4$,结合质谱数据库,推断化合物 44 为 9,10-Dihydroxystearic acid。

表 5　UPLC-Q-TOF-MS 鉴定酸枣叶中的有机酸和脂肪酸

Table 5　The fatty acids from *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* folium by UPLC-Q-TOF-MS

序号 No.	保留时间 t_R(min)	分子式 Molecular Formula	选择离子 Selected ion	实测值 Experimental	计算值 Theoretical	碎片 Fragmentation	积分面积 Integral area	化合物 Identification
41	13.26	$C_9H_9O_5$	$[M-H]^-$	197.044 5	197.045 0	124.014 7	4 830	Syringic acid
42	29.51	$C_{12}H_{19}O_4$	$[M-H]^-$	227.127 6	227.128 3	–	3 662	Dodecenedioic acid
43	29.78	$C_{18}H_{31}O_5$	$[M-H]^-$	327.216 5	327.217 1	179.054 1	772	Linoleic acid
44	39.90	$C_{18}H_{35}O_4$	$[M-H]^-$	315.254 0	315.253 5	297.238 6	1 215	9,10-Dihydroxystearic acid
45	47.16	$C_{16}H_{31}O_2$	$[M-H]^-$	255.232 1	255.232 4	255.231 5	1 483	Hexadecanoic acid
46	47.50	$C_{18}H_{33}O_2$	$[M-H]^-$	281.247 3	281.248 1	255.230 2	565	Hexadecenyl acetate
47	48.15	$C_{20}H_{31}O_3$	$[M-H]^-$	319.228 9	319.227 3	275.238 7	296	12-Hydroxy-5Z,8Z,10Z,14Z-EicOsatetraenoic acid
48	48.48	$C_{22}H_{34}O_3$	$[M-H]^-$	345.243 3	345.243 0	301.253 5	144	6-((*Z*)-pentadec-10-en-1-yl) salicylic acid
49	48.86	$C_{18}H_{35}O_2$	$[M-H]^-$	283.263 7	283.263 7	283.263 3	1 209	Octadecanoic acid
50	51.34	$C_{22}H_{43}O_2$	$[M-H]^-$	339.326 3	339.326 3	339.321 6	246	Docosanoic acid
51	51.90	$C_{23}H_{46}O_2$	$[M-H]^-$	353.340 7	353.342 0	279.234 2	143	3-Methyl-2-butenyl octadecanoate
52	52.38	$C_{24}H_{48}O_2$	$[M-H]^-$	367.358 8	367.357 6	279.230 7	188	Hexyl octadecanoate
53	53.60	$C_{26}H_{52}O_2$	$[M-H]^-$	395.3901	395.388 9	395.3886	102	Hexacosanoic acid

天然产物研究与开发

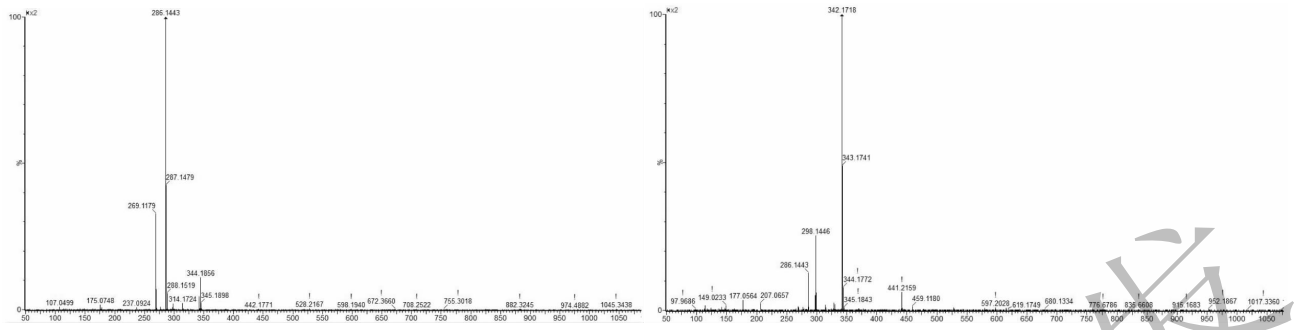

图 6 化合物十六烷酸和十八烷酸的质谱图

Fig. 6 The mass spectra (negative mode) of compound Hexadecanoic acid and Octadecanoic acid

3 结论

河北省冀南太行山区拥有丰富的酸枣资源,但综合开发利用深度不够,国内外学者对酸枣仁进行了大量的化学成分研究,但关于酸枣叶有效成分的系统认识仍然不足。本研究采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)对酸枣叶乙醇提取物中的主要化学成分进行系统定性分析,采用正离子、负离子两种模式并结合相关文献资料对其成分进行推断,结果从酸枣叶乙醇提取物中鉴定出 10 个黄酮化合物、14 个三萜皂苷、13 个三萜酸、3 个生物碱以及 13 脂肪酸物质。根据离子峰面积计算黄酮相对含量为 51.54%、三萜皂苷相对含量为 11.77%、三萜酸相对含量为 17.00%、生物碱相对含量为 11.68%、脂肪酸相对含量为 6.95%,从相对含量分析发现酸枣叶中黄酮相对含量较高,占总含量的一半以上;脂肪酸种类较多,但相对含量较低。有研究表明黄酮化合物芦丁和 6,8-di-C-glucosyl-2(*S*)-naringenin 对血管有舒张作用,能拮抗血小板活化因子作用,可清除自由基,抑制生物膜上不饱合脂肪酸的过氧化而起到抗氧化作用,同时可延长戊巴比妥干预睡眠时间起到镇静作用,这与酸枣叶茶的养血安神作用相一致[8]。分析发现三萜皂苷类化合物为酸枣叶的主要成分,达玛烷型三萜皂苷化合物 Ziziphin 及其衍生物 Jujubasaponins II-VI 能够提高人体对蔗糖溶液味感的阈值起到甜味抑制作用,其中 Ziziphin、Jujubasaponins II 和 III 活性最强,可以作为甜味抑制剂产品的原料进行开发[15]。齐墩果烷型三萜类化合物 Oleanonic acid 通过抗补体作用,促进淋巴细胞增殖和巨噬细胞功能而具有免疫调节作用,化合物 Betulinic acid 通过抑制 COX-1、COX-2 活性而具有抗肿瘤活性,故可以作为肿瘤细胞增殖抑制剂,或作为抗肿瘤药物先导化合物[19,20]。酸枣叶中丰富多样的物质具有良好的改善心肌功能及抗心肌缺血作用和安神镇静等多种药理活性和保健功能,这些化合物的发现可以为酸枣叶的功能深入研究奠定了理论基础。

参考文献

1 Lu XF, Zhao JZ, Chang LP. 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.

2 Zhai XF, Xiao XC, Lou YJ, et al. The sedative and hypnotic effection and effects on EEG in insomnia rats of raw and processed semen *Ziziphi spinosae*[J]. Pharm Clin Chin Materia Medica(中药药理与临床), 2015, 31(6): 94-96.

3 Wang SH, Shi XY. The component determination and development of wild jujube leaf in Xingtai mountain area[J]. North Hortic (北方园艺), 2012, 17: 39-40.

4 Yan Y, Fu C, Du CH. Research progress on nutrient composition, health functions andproduct development of *Ziziphus jujuba* leaves[J]. Sci Technol Food Indus(食品工业科技), 2018, 39: 330-336.

5 Silvia D, Martino F, Arpan D, et al. Antioxidant and antibiofilm activities of secondary metabolites from *Ziziphus jujuba* leaves used for infusion preparation[J]. Food Chem, 2017, 230(1): 24-29.

6 Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids[J]. J Mass Spectrom, 2004, 39: 1-15.

7 Okamura N, Yagi A, Nishioka I. Studies on the constituents of zizyphi fructus. V. structures of glycosides of benzyl alcohol, vomifoliol and naringenin[J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29: 3507-3514.

8 Cheng G, Bai YJ, Zhao YY, et al. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*[J]. Tetrahedron, 2000, 56: 8915-8920.

天然产物研究与开发

9 Zhang RT, Chen JH, Shi Q. Quality control method for commercially available wild jujube leaf tea based on HPLC characteristic fingerprint analysis of flavonoid compounds[J]. J Sep Sci, 2014, 37(1-2): 45-52.

10 Sharma SC, Kumar R. Zizynummin, a dammarane saponin from *Zizyphus nummularia*[J]. Phytochem, 1983, 22: 1469.

11 Yoshikawa K, Shimono N, Arihara S. Antisweet substances, jujubasaponins I-III from *Zizyphus* jujuba-revised structure of ziziphin[J]. Tetrahedron Lett, 1991, 32: 7059-7062.

12 Yoshikawa K, Shimono N, Arihara S, et al. Antisweet natural products VI. Jujubasaponins IV, V and VI from *Zizyphus jujuba* Mill[J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40: 2275-2278.

13 Okamura N, Nohara T, Yagi A, et al. Studies on constituents of zizyphi fructus III structures of dammarane-type saponins [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29: 676-683.

14 Wu Y, Zhang J, Wang D, et al. Triterpenoid saponins from *Zizyphus jujuba* var. *spinosa*[J]. Chem Nat Comp, 2013, 49: 677-681.

15 Kennedy LM, Halpern BP. Fly chemoreceptors: a model system for the taste modifier ziziphin[J]. Physiol Behav, 1980, 24(1): 135-143.

16 Lee SM, Park JG, Lee YH, et al. Anti-complementary activity of triterpenoides from fruits of *Zizyphus jujuba* [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 1883-1886.

17 Guo S, Duan JA, Tang YP, et al. Triterpenoids from the fruits of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa*[J]. Biochem Syst Ecol, 2011, 39: 880-882.

18 Memon AA, Memon N, Bhanger MI, et al. Assay of phenolic compounds from four species of ber(*Ziziphus mauritiana* L.) fruits: Comparison of three base hydrolysis procedure for quantification of total phenolic acids[J]. Food Chem, 2013, 139: 496-502.

19 Lee SM, Park JG, LeeYH, et al. Anti-complementary activity of triterpenoides from fruits of *Zizyphus jujuba* [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 1883-1886.

20 Elaloui M, Laamouri A, Ennajah A, et al. Phytoconstituents of leaf extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. plants harvested in Tunisia[J]. Ind Crop Prod, 2016, 83: 133-139.

21 Zhang FX, Li M, Qiao LR, et al. Rapid characterization of *Ziziphi spinosae* semen by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species[J]. J Pharmaceut Biomed, 2016, 122: 59-80.

(上接第 1215 页)

12 Wang JF, Wang Z, Ju ZR, et al. Cytotoxic cytochalasins from marine-derived fungus *Arthrinium arundinis*[J]. Planta Med, 2015, 81: 160-166.

13 Wei MY, Xu RF, Du SY, et al. A new griseofulvin derivative from the marine-derived *Arthrinium* sp. fungus and its biological activity[J]. Chem Nat Compd +, 2016, 52: 1011-1014.

14 Bao J, He F, Yu JH, et al. New chromones from a marine-derived fungus, *Arthrinium* sp. and their biological activity[J]. Molecules, 2018, 23: 1982.

15 Bao J, Zhai HJ, Zhu KK, et al. Bioactive pyridone alkaloids from a deep-sea-derived fungus *Arthrinium* sp. UJNMF0008 [J]. Mar Drugs, 2018, 16: 174.

16 Yao QF, Wang J, Zhang XY, et al. Cytotoxic polyketides from the deep-sea-derived fungus *Engyodontium album* DFFSCS021[J]. Mar Drugs, 2014, 12: 5902-5915.

17 Ratnayake R, Lacey E, Tennant S, et al. Kibdelones: novel anticancer polyketides from a rare Australian actinomycete [J]. Chem-A European Journal, 2010, 13: 1610-1619.

18 Wu B, Kwon SW, Hwang GS, et al. Eight new 2-(2-phenylethyl)chromone(=2-(2-phenylethyl)-4h-1-benzopyran-4-one) derivatives from *Aquilaria malaccensis* agarwood [J]. Helv Chim Acta, 2012, 95: 1657-1665.

19 Tian Y, Qin X, Lin X, et al. Sydoxanthone C and acremolin B produced by deep-sea-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01[J]. J Antibiot, 2015, 68: 703-706.

20 JulesDésiré D, Suzanna P, Philippe L, et al. Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine[J]. Eur J Plant Pathol, 2009, 124: 303-308.

21 Khamthong N, Rukachaisirikul V, Tadpetch K, et al. Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35: 461-468.

天然产物研究与开发