

中华猕猴桃籽中抗氧化化学成分研究及总酚酸含量测定

张珊, 宋乐园, 陈林玉, 王云雨, 商冲, 毕跃峰* (郑州大学药学院, 郑州 450001)

摘要:目的 研究中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)籽中抗氧化活性部位的化学成分及建立猕猴桃籽提取物总酚酸含量的测定方法。方法 采用 AB-8 型大孔吸附树脂、硅胶柱色谱和超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)等多种色谱方法对猕猴桃籽提取物进行分离纯化,结合化合物的理化性质、对照品、NMR 等波谱学方法鉴定结构;并以阿魏酸为对照品,利用紫外-可见分光光度法对猕猴桃籽提取物进行总酚酸含量测定。结果 从猕猴桃籽活性部位中分离并鉴定了 12 个化合物,分别为原儿茶酸(1),香草酸(2),丁香酸(3),原儿茶醛(4),3,4-二羟基苯乙酮(5),二氢松柏醇(6),4,4-二羟基二苯甲烷(7),莽草酸(8),阿魏酸(9),3-乙酰氧基甲基-4-甲氧基苯甲酸甲酯(10),bis(4-methoxyphenyl) methane(11)和咖啡酸甲酯(12)。猕猴桃籽提取物中总酚酸含量分析的线性范围为 1.6~16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,回归方程为 $y=0.0878x+0.0458$, $r^2=0.9993$,平均回收率为 99.36%,RSD 为 2.8698%;猕猴桃籽总浸膏的总酚酸含量为 6.61%,活性部位的总酚酸含量为 42.46%。结论 化合物 5~7,10~12 均为首次从该植物中分离得到;结果表明,猕猴桃籽中抗氧化活性成分主要为酚酸类化合物,含量测定方法操作简便,重现性好,可用于猕猴桃籽提取物中总酚酸的含量测定。

关键词:猕猴桃籽;抗氧化化学成分;UPLC-MS/MS;分离鉴定;总酚酸含量

doi:10.11669/cpj.2019.20.004 中图分类号:R932 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)20-1653-07

Antioxidant Chemical Composition and Determination of Total Content of Phenolic Acid in Seeds of *Actinidia chinensis* Planch

ZHANG Shan, SONG Le-yuan, CHEN Lin-yu, WANG Yun-yu, SHANG Chong, BI Yue-feng* (School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the chemical constituents of the antioxidant active sites and establish the determination method of the total content of phenolic acid in *Actinidia chinensis* Planch. seeds. **METHODS** AB-8 macroporous adsorption resin, silica gel and ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) were used to separate and purify the compounds, and the compounds were identified according to the properties and spectral data of the compounds. The total content of phenolic acid was determined by the spectrophotometry. To establish a method for determination of total content of phenolic acid using ferulic acid as a positive control and ferric chloride-potassium ferricyanide solution as a color developer and methodological investigation was carried out. **RESULTS** Twelve compounds were isolated and identified from the active parts of *Actinidia chinensis* Planch. seeds, which were protocatechuic acid (1), vanillic acid (2), syringic acid (3), protocatechuic aldehyde (4), 3,4-dihydroxyacetophenone (5), dihydroconiferyl alcohol (6), 4,4-dihydroxydiphenylmethane (7), shikimic acid (8), ferulic acid (9), 3-acetoxymethyl-4-methoxy methyl benzoate (10), bis(4-methoxyphenyl) methane (11), and methyl caffeate (12). The total content of phenolic acid in kiwifruit seeds was determined by ultraviolet spectrophotometry. The linear range of the method was 1.6-16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The regression equation is $Y=0.0878x+0.0458$, $r^2=0.9993$, the average recovery is 99.36%, and the RSD is 2.8699%. The total content of phenolic acid in the total extract was 6.61%, and the active site was 42.46%. The total content of phenolic acid in the active site is about 7 times that of the total extract. It can be seen from the results that the extraction process can effectively enrich the phenolic acid compounds. **CONCLUSION** Compounds 5-7 and 10-12 are isolated from the plant for the first time. The determination method of total content of phenolic acid is simple, fast, stable and reproducible, which provides a scientific basis for the systematic study of phenolic acid compounds in kiwifruit seeds.

KEY WORDS: Kiwi Seed; antioxidant chemical constituent UPLC-MS/MS; separation; identification; phenolic acid; total content

中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)又称为羊桃、藤梨等,为猕猴桃科猕猴桃属多年生藤本植

物,主要分布于河南、陕西和湖南等地区。猕猴桃籽为中华猕猴桃的干燥种子,呈棕褐色,椭圆形,质地

作者简介:张珊,女,硕士 研究方向:天然药物化学
发 Tel:13939091607 E-mail: 2000byf@sina.com

* 通讯作者:毕跃峰,女,教授 研究方向:天然药物化学及天然健康产品研发

坚硬。猕猴桃全株均可药用,中医认为其果性寒,味酸、甘,具有调中理气、生津润燥、解热除烦、通淋的功效。随着猕猴桃种植业与加工产业的兴起,大量猕猴桃籽被作为加工副产品废弃。有研究表明,猕猴桃籽中富含粗脂肪、粗蛋白与碳水化合物,还含有酚类、有机酸、生物碱等类化合物^[1]。现代医学研究证明,猕猴桃籽含有多种人体必需氨基酸和不饱和脂肪酸,其中 α -亚麻酸含量高达63%^[2];猕猴桃籽具有降血脂、抑制血小板凝聚、改变血液流变特性、抗炎、抗自身免疫反应、抗变态及抗肿瘤等作用^[3],是一种极具开发价值的资源。

课题组前期对猕猴桃籽进行了提取工艺和抗氧化活性部位筛选研究,得到活性部位KWS-B,采用DPPH法和ABTS法测定自由基清除率,其 IC_{50} 分别为16.251 2和8.563 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (阳性对照为维生素C, IC_{50} 分别为2.698 3和2.334 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。本实验主要对活性部位化学成分及总酚酸含量进行测定研究,共分离鉴定了12个化合物,分别为原儿茶酸(1),香草酸(2),丁香酸(3),原儿茶醛(4),3,4-二羟基苯乙酮(5),二氢松柏醇(6),4,4-二羟基二苯甲烷(7),莽草酸(8),阿魏酸(9),3-乙酰氧基甲基-4-甲氧基苯甲酸甲酯(10),bis(4-methoxyphenyl)methane(11)和咖啡酸甲酯(12)。其中化合物5~7,10~12均为首次从该植物中分离得到。据文献报道,酚酸类化合物具有明显抗氧化活性,课题组从猕猴桃籽KWS-B部位分离得到多个酚酸类化合物,此外,建立了以阿魏酸作为对照品的总酚酸含量测定方法。论文研究为猕猴桃籽的进一步开发利用及质量标准研究提供了科学依据。

1 仪器与材料

Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱仪(美国Dionex公司);Thermo Fisher Q ExactiveTM组合型四级杆Orbitrap质谱仪(美国Thermo Fisher公司);Bruker Avance DPX-400核磁共振仪(德国Bruker公司),内标为TMS;薄层层析硅胶(青岛海洋化工厂);AB-8大孔吸附树脂(天津南开大学);紫外-可见分光光度计UV-2550(日本岛津公司);铁氰化钾(宿州化学试剂厂);三氯化铁(天津市大茂试剂厂);盐酸(洛阳市化学试剂厂);十二烷基硫酸钠(SDS,天津市大茂试剂厂);阿魏酸(中国药品生物制品检定研究院);甲醇和甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

猕猴桃籽购自河南西峡,经郑州大学潘成学副

教授鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)的干燥种子,样品保存于郑州大学药学院标本馆。

2 提取分离与结构鉴定

2.1 提取分离

称取中华猕猴桃籽5 kg,加入10倍量的体积分数75%乙醇,组织破碎提取3次,合并所得滤液,浓缩得到总浸膏。对总浸膏分别用石油醚、乙酸乙酯-体积分数95%乙醇梯度萃取,得到石油醚部位、乙酸乙酯-体积分数95%乙醇部位(即活性部位KWS-B)和水部位。取活性部位KWS-B 40 g,上AB-8大孔吸附柱色谱,甲醇-水梯度(0,10%,20%,30%,40%,50%,60%,80%)洗脱,得到8个馏分Fr 1~8。其中Fr 1经硅胶柱色谱用石油醚-乙酸乙酯-甲酸(20:10:0.1)作为洗脱剂进行洗脱,得到化合物1(17.2 mg)和化合物9(1.5 mg);Fr 3经硅胶柱色谱用石油醚-乙酸乙酯-甲酸(8:6:0.1)作为洗脱剂进行洗脱,得到化合物2(1.3 mg)、化合物3(2.3 mg)和化合物12(2.1 mg);Fr 4经硅胶柱色谱用二氯甲烷-甲醇-甲酸(30:1:0.1)作为洗脱剂进行洗脱,得到化合物4(10.6 mg);Fr 5经硅胶柱色谱用二氯甲烷-甲醇-甲酸(30:1:0.1)作为洗脱剂进行洗脱,得到化合物5(0.4 mg)、化合物10(3.1 mg)和化合物11(4.8 mg);Fr 6经硅胶柱色谱用二氯甲烷-乙酸乙酯(8:1)作为洗脱剂进行洗脱,得到化合物6(2.1 mg)和化合物8(3.5 mg);Fr 8经硅胶柱色谱用二氯甲烷-乙酸乙酯(10:1)作为洗脱剂进行洗脱,得到化合物7(21.2 mg)。其中化合物1~7分别通过核磁共振波谱进行结构鉴定,化合物8~12,利用UPLC-MS/MS结合其理化性质、对照品进行了结构鉴定。

2.2 结构鉴定

化合物1:淡黄色粉末,硅胶薄层板检识溴酚蓝显色阳性,提示该化合物含有羧基;三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色,提示该化合物含有酚羟基。¹H-NMR(C_3D_6O ,400 MHz) δ :7.53(1H,d, $J=2.0$ Hz,H-2),7.48(1H,dd, $J=8.0,2.0$ Hz,H-6),6.90(1H,d, $J=8.0$ Hz,H-5)。¹³C-NMR(C_3D_6O ,100 MHz) δ :167.7(C-7),150.7(C-4),145.6(C-3),123.6(C-6),123.1(C-1),117.5(C-2),115.7(C-5),氢谱中化学位移7.53(1H,d, $J=2.0$ Hz,H-2),7.48(1H,dd, $J=8.0,2.0$ Hz,H-6),6.90(1H,d, $J=8.0$ Hz,H-5)构成一个典型的ABX偶合系统,推测

为该化合物苯环上的3个氢质子信号, δ 167.7 (C-7) 位于低场, 提示为强吸电子基相连, 即羧基碳, 碳谱中化学位移 150.7 (C-4), 145.6 (C-3) 为与羟基相连碳信号, 123.6 (C-6), 123.1 (C-1), 117.5 (C-2), 115.7 (C-5) 为苯环上碳, 上述数据与文献[4]报道基本一致, 且与对照品对照 R_f 值一致, 故推断化合物 1 为原儿茶酸。

化合物 2: 白色粉末, 硅胶薄层板检识溴酚蓝显色阳性, 提示该化合物含有羧基; 三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色, 提示该化合物含有酚羟基。 $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 400 MHz) δ : 7.59 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 7.57 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 3.91 (3H, s, H-OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 , 100 MHz) δ : 167.5 (-COOH), 152.1 (C-4), 148.1 (C-3), 124.9 (C-6), 122.9 (C-1), 115.5 (C-5), 113.5 (C-2), 56.3 (-OCH₃)。氢谱中化学位移 7.59 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 7.57 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 为典型的 ABX 偶合系统, 推测为苯环上的3个质子信号, 3.91 (3H, s, H-OCH₃) 推测为甲氧基上的氢质子信号, 从碳谱峰个数推测含碳个数, 167.5 为羧基碳, 152.1, 148.1 为与羟基相连碳信号, 56.3 为甲基碳与氧相连, 其余碳为苯环上碳, 上述数据与文献[5]报道基本一致, 且与标准品对照 R_f 值一致, 故推断化合物 2 为香草酸。

化合物 3: 淡黄色固体, 硅胶薄层板检识溴酚蓝显色阳性, 提示该化合物含有羧基; 三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色, 提示该化合物含有酚羟基。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 400 MHz) δ : 7.33 (2H, s, H-2, H-6), 3.89 (6H, s, H-OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 100 MHz) δ : 167.5 (C-COOH), 148.4 (C-3, C-5), 141.6 (C-4), 121.5 (C-1), 108.2 (C-2, C-6), 56.7 (C-OCH₃)。氢谱中化学位移 7.33 为单峰, 积分为 2 个氢, 提示该化合物为具有对称结构及苯环四取代; 化学位移 3.89 为单峰, 6 个氢提示为苯环上 2 个甲氧基取代对称结构, 上述数据与文献[6]报道基本一致, 且与标准品对照 R_f 值一致, 故推断化合物 3 为丁香酸。

化合物 4: 淡黄色结晶, 硅胶薄层板检识溴酚蓝显色阴性, 说明不含有羧基; 三氯化铁-铁氰化钾显蓝色, 提示该化合物为酚类物质。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 9.69 (1H, s, H-CHO), 7.35 ~ 7.28 (2H, m, H-2, H-6), 6.91 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 氢谱化学位移为 9.69 处为单峰, 位于低场, 提示为活泼氢,

因溴酚蓝显色为阴性, 推测为醛基氢; 与标准品对照, R_f 值与标准品一致, 综上所述, 上述数据与文献[7]报道基本一致, 故推断化合物 4 为原儿茶醛。

化合物 5: 淡黄色粉末, 硅胶薄层板检识溴酚蓝显色阴性, 说明不含有羧基; 三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色, 提示该物质为酚羟基物质。ESI-MS m/z : 153 [M + H]⁺。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.44 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6), 7.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 2.50 (3H, s, H-CH₃)。氢谱中化学位移 7.44 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6), 7.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2) 和 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5) 为 ABX 偶合, 提示苯环上 3 个质子所在位置, 化学位移 2.50 为单峰, 3 个氢提示为与吸电子基团相连的甲基。上述数据与文献[8]报道基本一致, 且与标准品对照 R_f 值一致, 故推断化合物 5 为 3,4-二羟基苯乙酮。

化合物 6: 无色油状物, 硅胶薄层板检识溴酚蓝显色阴性, 说明不含有羧基; 三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色, 提示该物质为酚羟基物质。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 400 MHz) δ : 6.81 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.64 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6), 3.82 (3H, s, H-OCH₃), 3.55 (2H, m, H-9), 3.52 ~ 3.45 (1H, m), 2.62 ~ 2.56 (2H, m, H-7), 1.82 ~ 1.73 (2H, m, H-8)。 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 100 MHz) δ : 148.2 (C-3), 145.5 (C-4), 134.6 (C-1), 121.5 (C-6), 115.6 (C-5), 112.8 (C-2), 61.8 (C-9), 56.2 (-OCH₃), 35.9 (C-8), 32.5 (C-7)。氢谱中化学位移 6.81 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5) 和 6.64 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6) 为 ABX 偶合, 提示苯环上 3 个质子所在位置, 3.82 (3H, s, H-OCH₃) 提示为甲氧基, 3.55 (2H, m, H-9) 提示为以羟基相连的亚甲基结构, 2.62 ~ 2.56 (2H, m, H-7), 1.82 ~ 1.73 (2H, m, H-8) 为与苯环相连的亚乙基结构。上述数据与文献[9]报道基本一致, 且与标准品对照 R_f 值一致, 故推断化合物 6 为二氢松柏醇。

化合物 7: 白色针状结晶, 硅胶薄层板检识溴酚蓝显色阴性, 说明不含有羧基; 三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色, 提示该物质为酚羟基物质。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 400 MHz) δ : 8.07 (2H, s, H-4, H-4'), 7.01 (4H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-3', H-5, H-5'), 6.74 (4H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, H-2', H-6, H-6'), 3.77 (2H, s, H-7)。 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 100 MHz) δ : 156.5 (C-4, C-4'), 133.7 (C-1, C-1'), 130.5 (C-2, C-2', C-6, C-6'),

115.9(C-3,C-3',C-5,C-5'),40.7(C-7)。氢谱中化学位移 7.01(4H,d, $J=8.4$ Hz,H-3,H-3',H-5,H-5'),6.74(4H,d, $J=8.4$ Hz,H-2,H-2',H-6,H-6')提示 2 个对称苯环,每个苯环含有 2 个取代基,3.77(2H,s,H-7)为亚甲基,与 2 个苯环相连,上述数据与文献[10]报道基本一致,且与标准品对照 R_f 值一致,故推断化合物 7 为 4,4-二羟基二苯甲烷。

2.3 UPLC-MS/MS 定性分析

利用 UPLC-MS/MS,结合薄层检识、理化性质和对照品,对化合物 8~12 进行了结构鉴定,并对酚酸类化合物 UPLC-MS/MS 的碎片离子峰的特征进行了初步探索。

2.3.1 质谱条件 采用 Thermo Fisher 公司生产的四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(Q Exactive),离子源为加热型电喷雾(HESI),鞘气流速 $35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,辅助气流速为 $8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,吹起流速为 $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,正离子和负离子模式下喷雾电压分别为 3.5、2.8 kV,传输毛细管温度 $320\text{ }^\circ\text{C}$,鞘气温度为 $350\text{ }^\circ\text{C}$;扫描模式为 Full MS 和 Full MS/dd-MS2。

2.3.2 结果分析 利用精确质量数及分子式,对样品中的 5 种化合物做出鉴定,并做出质谱解析,见表 1。

化合物 8:薄层检识通用显色剂磷钼酸和硫酸-乙醇 2 种显色剂显示为阳性;三氯化铁-铁氰化钾显示阴性,表明不含有酚羟基;溴酚蓝显色阳性,表明其含有羧基功能基团。采用全扫描质谱,负离子模式检测获得准分子离子峰 m/z 173.044 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$,脱去 1 分子水形成特征碎片 m/z 155.034 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$,再脱去 1 分子水形成特征碎片 m/z 137.023 3 $[\text{M}-\text{H}-2\times\text{H}_2\text{O}]^-$;准分子离子峰 m/z 173.044 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 脱去 $-\text{CO}_2$ 形成特征碎片 m/z 129.054 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 。特征碎片 m/z 155 再脱去 $-\text{CO}_2$ 形成特征碎片 m/z 111 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$ 。根据元素组成分析,该化

合物分子式为 $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_5$,相对分子质量为 173.044 5,实测值为 173.044 8,误差为 1.7×10^{-6} ,结合理化性质,推断该化合物为莽草酸,且与标准品对照 R_f 值一致。

化合物 9:薄层检识通用显色剂磷钼酸和硫酸-乙醇 2 种显色剂显示为阳性;三氯化铁-铁氰化钾显蓝色,表明含有酚羟基;溴酚蓝显色阳性,表明含有羧基。采用全扫描质谱,负离子模式检测获得准分子离子峰 m/z 193.049 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$,脱去 $-\text{CH}_3$ 形成特征碎片 m/z 178.026 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$,再脱去 $-\text{CO}_2$ 形成特征碎片 m/z 134.036 4 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}_2]^-$;准分子离子峰 m/z 193.049 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 脱去 $-\text{CO}_2$ 形成特征碎片 m/z 149.060 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 。根据元素组成分析,该化合物分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$,相对分子质量为 193.049 5,实测值为 193.049 7,误差为 1.0×10^{-6} ,结合理化性质,因此推断该化合物为阿魏酸,且与标准品对照 R_f 值一致。

化合物 10:薄层检识通用显色剂磷钼酸和硫酸-乙醇 2 种显色剂显示为阳性;三氯化铁-铁氰化钾显示为阴性,表明不含有酚羟基;溴酚蓝显色阴性,表明不含羧基。采用全扫描质谱,正离子模式检测获得准分子离子峰 m/z 239.088 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$,脱去 $-\text{OCH}_3$ 形成特征碎片 m/z 208.073 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{OCH}_3]^+$,再脱去 $-\text{CO}$ 形成特征碎片 m/z 181.085 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{OCH}_3-\text{CO}]^+$;准分子离子峰 m/z 239.088 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 脱去 $-\text{COOCH}_3$ 形成特征碎片 m/z 181.085 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{COOCH}_3]^+$ 。根据元素组成分析,该化合物分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$,相对分子质量为 239.091 4,实测值为 239.088 4,误差为 1.2×10^{-5} 。因此推断该化合物为 3-乙酰氧基甲基 4-甲氧基苯甲酸甲酯,且与标准品对照 R_f 值一致。

化合物 11:薄层检识通用显色剂磷钼酸和硫酸-乙醇 2 种显色剂显示为阳性,三氯化铁-铁氰化钾显示为阴性,表明不含有酚羟基;溴酚蓝显色阴性,表明不含羧基。后采用全扫描质谱,负离子模式检测获得准分子离子峰 m/z 227.1069 $[\text{M}-\text{H}]^-$,

表 1 部分化合物液质联用数据

Tab. 1 UPLC-MS/MS data of partial compounds

Compound	Name	Molecular formula	Measured value	Theoretical value	Fragment ion
8	Shikimic acid	$\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_5$	173.044 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	173.044 5	155,137,129,111
9	Ferulic acid	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	193.049 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	193.049 5	178,149,134
10	Methyl 3-acetoxymethyl 4-methoxybenzoate	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$	239.088 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$	239.091 4	208,181
11	Bis(4-methoxyphenyl) methane	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_2$	227.106 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$	227.106 6	212,196
12	Methyl palmitate	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	195.065 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$	195.065 2	177,163,135

脱去 $-\text{OCH}_3$ 形成特征碎片 m/z 196.088 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{OCH}_3]^-$; 准分子离子峰 m/z 227.106 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 脱去 $-\text{CH}_3$ 形成特征碎片 m/z 212.083 1 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$, 该碎片再次撞击失去 $-\text{CH}_3$ 形成特征碎片 m/z 197.060 6 $[\text{M}-\text{H}-2\times\text{CH}_3]^-$ 。根据元素组成分析, 该化合物分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_2$, 相对分子质量为 227.106 6, 实测值为 227.106 9, 误差为 4.4×10^{-7} 。因此推断该化合物为 bis(4-methoxyphenyl) methane, 且与标准品对照 R_f 值一致。

化合物 12: 薄层检识通用显色剂磷钼酸和硫酸-乙醇 2 种显色剂显示为阳性; 三氯化铁-铁氰化钾显蓝色, 表明含有酚羟基; 溴酚蓝显色阴性, 表明不含羧基。采用全扫描质谱, 正离子模式检测获得准分子离子峰 m/z 195.065 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 脱去 $-\text{OCH}_3$ 形成特征碎片 m/z 163.038 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{OCH}_3]^+$, 再脱去 $-\text{CO}$ 形成特征碎片 m/z 135.043 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{OCH}_3-\text{CO}]^+$; 准分子离子峰 m/z 195.065 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 脱去 $-\text{H}_2\text{O}$ 形成特征碎片 m/z 177.054 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 。根据元素组成分析, 该化合物分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$, 相对分子质量为 195.065 2, 实测值为 195.065 4, 误差为 3.0×10^{-6} , 因此推断该化合物为咖啡酸甲酯, 且与标准品对照 R_f 值一致。

3 总酚酸含量测定

3.1 试液配制

3.1.1 对照品溶液的制备 精确称取阿魏酸对照品 5.0 mg, 于 25 mL 量瓶中用甲醇定容, 即得质量浓度为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照品溶液。

3.1.2 供试品溶液的制备 精密称取猕猴桃籽总浸膏 40.0 mg, 于 10 mL 量瓶中用甲醇定容, 配置质量浓度为 $4.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

精密称取猕猴桃籽活性部位浸膏 20.0 mg, 于 10 mL 量瓶中用甲醇定容, 配置质量浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

3.1.3 显色剂溶液配制 精密称取 SDS 0.300 g, 加水 100 mL 溶解, 制得 0.3% 的 SDS 试液; 精密量取浓盐酸 4.1 mL, 加超纯水至 500 mL, 制得 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸水溶液; 精密称取 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 粉末 0.450 g, 加超纯水至 50 mL, 得 0.9% 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 试液; 精密称取 FeCl_3 固体 0.300 g, 加超纯水至 50 mL, 制得 0.6% 的 FeCl_3 试液, 临用前将 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 试液与 FeCl_3 试液 1:1 混合。

3.2 测定波长的选择

精密吸取配置好的对照品/供试品溶液适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至 5 mL, 加 0.3% SDS 溶液 2 mL 及 0.6% FeCl_3 -0.9% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) 混合溶液 1 mL, 暗处静置 5 min; 加 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液定容至刻度, 摇匀, 暗处静置 20 min, 于 300~900 nm 内扫描, 对照品及供试品的波长扫描峰形相似, 均在 720 nm 处有最大吸收, 故选择测定波长为 720 nm。

3.3 三氯化铁-铁氰化钾比色法测定总酚酸含量的方法学考察

3.3.1 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至 5 mL, 加 0.3% SDS 溶液 2 mL 及 0.6% FeCl_3 -0.9% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) 混合溶液 1 mL, 暗处静置 5 min, 用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液定容, 暗处静置 20 min, 于 720 nm 处测定吸光度 (A), 以阿魏酸的质量浓度 (ρ) 为横坐标, 以吸光度 (A) 为纵坐标, 得线性方程 $y = 0.0878\rho + 0.0458$, $r^2 = 0.9993$, 结果证明阿魏酸在 $1.6\sim 16\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

3.3.2 精密密度实验 精密吸取 0.5 mL 总浸膏供试品溶液于 25 mL 量瓶中, 按“3.1.3”条件显色后, 重复测定吸光度 6 次, 计算 RSD 为 0.1426%, 表明仪器精密密度良好。

3.3.3 稳定性实验 精密吸取总浸膏供试品溶液 0.5 mL, 按“3.1.3”条件显色后, 分别于 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 min 后测定吸光度, 计算 RSD 为 1.6824%, 表明供试品溶液在 80 min 内稳定性良好。

3.3.4 重现性实验 分别称取同一批次猕猴桃籽总浸膏 6 份, 先按“3.1.3”方法制备供试品溶液, 再按“3.1.3”条件显色后, 测定吸光度值, 计算 RSD 为 1.8576%, 表明该方法重现性良好。

3.3.5 回收率实验 分别精密吸取总浸膏供试品溶液 6 份, 再分别精密加入等量对照品溶液, 显色后测定吸光度, 结果见表 2, 计算平均回收率为 99.36%, RSD 为 2.8698%, 表明该方法准确度良好。

3.4 样品测定

分别精密吸取总浸膏供试品溶液与活性部位 KWS-B 供试品溶液量瓶规格为 0.5 mL、0.25 mL 于 25 mL 量瓶中, 按“3.1.3”方法显色后, 测得吸光度, 计算总酚酸含量, 结果见表 3。

表2 回收率实验结果

Tab. 2 The results of recovery rate test

Group	<i>m</i> (Original)/ μg	<i>m</i> (Added)/ μg	Absorbance	<i>m</i> (Found)/ μg	Recovery rate/%	The average recovery rate/%
1	66.07	40.00	0.416 35	105.873 3	99.81	99.36
2	66.07	40.00	0.405 59	102.798 0	96.91	
3	66.07	40.00	0.419 48	106.768 1	100.6	
4	66.07	40.00	0.400 14	101.238 9	95.45	
5	66.07	40.00	0.433 38	110.736 5	104.3	
6	66.07	40.00	0.413 03	104.923 1	98.92	

表3 猕猴桃籽提取物总酚酸含量测定结果

Tab. 3 The total phenolic acid content (total content of phenolic acids) of Kiwi seed extracts

Group	KWS-B	Total extract
Absorbance	0.509 20	0.792 41
	0.509 82	0.787 44
	0.510 56	0.794 26
Average absorbance	0.509 86	0.791 37
Total content of phenolic acids/%	6.61	42.46

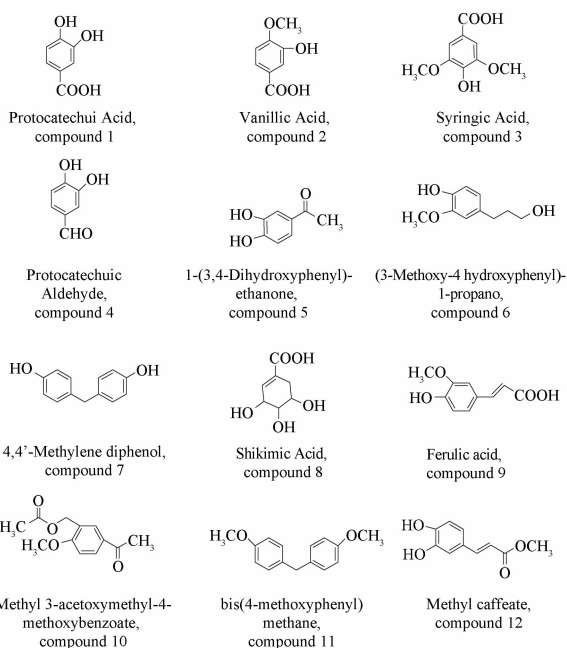


图1 中华猕猴桃籽中化合物1~12的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-12

4 讨论

猕猴桃作为河南省西峡县的特色经济作物,种植面积高达40余万亩,猕猴桃籽是果汁加工过程从果渣中分离的副产品,除少数用于种子、饲料外大多被废弃,若能猕猴桃籽进一步开发为具有抗氧化、增强免疫力等保健功能的食品,形成猕猴桃特色产业链,则能显著提高其经济价值,具有广阔的市场前景。

寻找天然产物快速识别和高效分离的方法,是天然药物化学领域亟待解决的关键问题。课题组前期筛选得到了猕猴桃籽抗氧化活性 KWS-B 部位,本实验采用柱色谱法、首次结合 UPLC-MS/MS 对该部位进行分离纯化和结构鉴定,阐明了猕猴桃籽抗氧化活性的化学成分。液质联用技术具有其高分辨率、高灵敏度和专属性的特点,随着 LC-MS 技术发展的日臻完善,其在天然产物结构鉴定研究中的应用也越来越广泛,特别是 UPLC-HR MS/MS (orbitrap MS) 的快速发展为天然药物化学研究提供有力帮助,对微量化合物的分离鉴定的应用已取得一定的成效和认可^[11],但因为数据库尚不完善,需要对分子离子峰和碎片离子峰严谨的推断和分析。化合物 8~12 含量低,结构较为简单,因此我们尝试采用 UPLC-MS/MS,研究探索碎片离子峰特点,结合化合物结合理化性质和对照品进行结构鉴定,为天然药物化学高效分离鉴定技术的发展完善进行有效探索。以化合物 9 为例,经 UPLC-MS/MS 检测得到该化合物的准分子离子峰荷质比为 m/z 193.049 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$,根据元素组成分析,相对分子质量为 193.049 5,推断该化合物分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$;根据分子式从 Chem Spider 等网站检索可能的化合物结构式,MS/MS 显示碎片离子峰 m/z 178.026 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$ 为负离子模式的准分子离子峰 m/z 193.049 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 脱去 $-\text{CH}_3$ 形成特征碎片,再脱去 $-\text{CO}_2$ 形成特征碎片 m/z 134.036 4 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}_2]^-$;同时也检测到准分子离子峰 m/z 193.049 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 脱去 $-\text{CO}_2$ 形成特征碎片离子峰 m/z 149.060 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$,结合其理化性质知化合物含有酚羟基和羧基基团,推断该化合物可能为阿魏酸,结合生源途径,并进一步通过薄层色谱检识与标准品对照,确定该化合物是阿魏酸。

猕猴桃籽抗氧化活性部位富含酚酸类化合

物,测定总酚酸含量发现,抗氧化活性部位总酚酸含量高达42.46%,而总浸膏中总酚酸含量为6.61%,活性部位总酚酸含量约为总浸膏的7倍,从结果可以看出,酚酸类化合物是影响猕猴桃籽抗氧化活性的重要组成部分,该提取工艺则能够有效富集酚酸类化合物,为系统研究猕猴桃籽中酚酸类成分及该植物资源的开发利用提供了科学依据。

致谢:感谢郑州大学药学院徐霞教授在UPLC-MS/MS分析中提供的帮助。

REFERENCES

- [1] MA J G, YANG S Y, LIN S P. Preliminary study on the organic constituents of Kiwifruit Seeds [J]. *Acta Bot Boreali-Ocalident Sin*(西北植物学报),2003,23(12):2172-2175.
- [2] YAO M J, LIU F. Study on supercritical CO₂ extraction and microcapsulation of Kiwi Fruit Seed oil [J]. *Food Sci*(食品科学),2007,28(7):162-165.
- [3] LUAN X, LI X J, GUO M M. Xiangxi kiwifruit seed component and characteristics of kiwifruit seed oil [J]. *China Oils Fats*(中国油脂),2017,42(8):136-139.
- [4] ZHANG Y L, FENG Z Y, ZHENG X K, *et al.* Chemical constituents from fresh leaves of *Rehmannia Glutinosa* Lihosch [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志),2014,49(1):15-21.
- [5] XIE W, FAN D H, YIN L, *et al.* Antiphlogistic constituents from *Gaultheria yunnanensis* Seeds [J]. *Chem Ind Forest Products*(林产化学与工业),2015,35(2):142-146.
- [6] WU P Y, CAI B X, WANG G K, *et al.* Studies on chemical constituents from *Wisteria sinensis* Tumor [J]. *J Chin Med Mater*(中药材),2017,40(2):338-341.
- [7] CHENG L Z, GUO P X, DAI W F, *et al.* Phenolic compounds from *Lycium ruthenicum* [J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药),2018,20(2):159-162.
- [8] WANG L, KONG F D, MA Q Y, *et al.* Analysis of chemical constituents from the fruiting bodies of *Retiboletus kauffmanii* [J]. *J Trop Biol*(热带生物学报),2017,8(4):466-473.
- [9] WANG X L, CHEN M H, WANG F, *et al.* Chemical constituents from root of *Isatis indigotica* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2013,38(8):1172-1182.
- [10] ZHANG W, SONG Q S. Chemical constituents of cultivated *Gastrodia elata* under the forest in Guizhou [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2010,41(11):1782-1785.
- [11] ZHANG J Y, QIAO Y J, ZHANG Q, *et al.* Progress on application of LC-MS technology in structural identification of the natural products [J]. *Chin J Pharm Anal*(分析化学),2013,33(2):349-354.

(收稿日期:2019-03-15)