

## 检测分析

# UPLC – PDA – MS 鉴定经大孔树脂纯化 美藤果壳酚类物质

杨 婉,段佳辉,赵晨伟,唐年初

(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

**摘要:**以经大孔树脂纯化的美藤果壳酚类物质为原料,用预制硅胶板薄层层析法将其粗分为4个条带,富集各个条带中的物质后使用UPLC – PDA – MS检测,确定其中的酚类物质为:1号条带中有香草酸己糖苷,1,2 – 芥子酰阿魏酸酰龙胆二糖(待定),矢车菊素3 – (6" – 阿魏酰槐糖苷) – 5 – 葡萄糖苷,锦葵花色素3 – 葡萄糖苷,锦葵花色素3 – 葡萄糖苷二倍体;2号条带中有香草酸己糖苷,香草酸己糖苷三倍体以及香草酸己糖苷二倍体;3号条带中有对羟基苯甲酸,羟基苯甲酸己糖苷,对香豆酸己糖苷以及对香豆酸四倍体;4号条带中有对羟基苯甲酸以及对香豆酸。

**关键词:**美藤果壳酚类物质;预制薄层层析法;UPLC – PDA – MS;结构鉴定

中图分类号:O657.63;TS229 文献标识码:A 文章编号:1003 – 7969(2018)11 – 0140 – 05

## Identification of phenolic compounds from Sacha Inchi shells purified by macroporous resin using UPLC – PDA – MS

YANG Wan, DUAN Jiahui, ZHAO Chenwei, TANG Nianchu

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:**The phenolic compounds from Sacha Inchi shells purified by macroporous resin were divided into four bands by preparative thin layer chromatography. Then UPLC – PDA – MS was used to analyze the compounds in every band after enrichment. The structures of phenolic compounds were identified as follows: vanillic acid hexoside, 1,2 – disinapoyl – feruloyl – gentiobiose (undecided), cyanidin 3 – (6" – feruloylsphoroside) – 5 – glucoside, malvidin 3 – glucoside and malvidin 3 – glucoside dimer in band 1; vanillic acid hexoside, vanillic acid hexoside trimer and vanillic acid hexoside dimer in band 2; *p* – hydroxybenzoic acid, hydroxybenzoic acid hexoside, *p* – coumaroyl hexose and *p* – coumaric acid tetramer in band 3; *p* – hydroxybenzoic acid and *p* – coumaric acid in band 4.

**Key words:**phenolic compounds from Sacha Inchi shells; preparative thin layer chromatography; UPLC – PDA – MS; structure identification

美藤果又称“印加花生”,一种大戟科植物,生长在亚马逊森林里,起初该植物在秘鲁被广泛种植,是秘鲁各种原生部落种群饮食的重要组成部分<sup>[1]</sup>。如今,美藤果在哥伦比亚南部也被广泛种植,因其高的含油量以及高水平的亚油酸(34%)和亚麻酸

(48%),被认为是一种具有较好前景以及较大应用潜力的作物<sup>[2-3]</sup>。

我国路甬祥院士于2006年从秘鲁将美藤果引种西双版纳植物园并且试种成功,2009年西双版纳印奇生物资源开发有限公司与西双版纳植物园签订了关于美藤果产业发展的协议,总投资4亿元打造美藤果种植、加工及销售的基地,政府也出台了关于加强产业发展规划的计划<sup>[4-5]</sup>。2011年7月,普洱联众生物资源开发有限公司向中科院昆明植物研究所提出申请,经鉴定将美藤果正式定名为“美藤

收稿日期:2018 – 03 – 08;修回日期:2018 – 03 – 22

作者简介:杨 婉(1992),女,在读硕士,研究方向为美藤果壳中酚类物质的提取、纯化、分离、鉴定(E-mail)jnyangwan@126.com。

通信作者:唐年初,副教授(E-mail)tangnc@126.com。

果”,同时也向卫生部申报美藤果油为新资源食品,2013年1月,国家卫生部正式批准美藤果油为新资源食品<sup>[6]</sup>。

关于农作物外壳综合利用的文献并不少见,例如姜红宇等<sup>[7]</sup>以花生壳为原料提取其中的黄酮类物质并对提取工艺进行了优化;郑菲<sup>[8]</sup>对橡实壳中酚类物质的提取工艺,大孔树脂纯化等工艺进行了研究,对其酚类物质的抗氧化及抑菌等生物活性进行了探讨。对于美藤果,目前与其相关的研究多为种油以及其仁中的蛋白质,果壳作为油料加工的副产品,其相关研究很少。笔者前期对大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质进行了研究<sup>[9]</sup>,以前期研究为基础,使用UPLC-PDA-MS技术对经大孔树脂纯化的美藤果壳酚类物质进行鉴定,为后续美藤果的综合利用以及研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

经NKA-9大孔树脂纯化的美藤果壳酚类物质<sup>[9]</sup>(总酚含量为73.8%,以没食子酸当量计);硅胶板GF254,购于青岛海洋化工厂分厂;三氯甲烷、甲醇、丙酮,分析纯;色谱级乙腈;超纯水。

WatersMaldi SYNAPT Q-TOF MS液质联用仪,Waters Aquity PDA 检测器。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 经纯化的美藤果壳酚类物质的粗分

经纯化的美藤果壳酚类物质的粗分采用预制硅胶板薄层层析法,展开剂为三氯甲烷-甲醇(体积比10:1),展开后取出,挥干溶剂后喷茴香醛显色剂,而后在电炉上进行烤板显色,将显色成功的板标作为样板。继续点板采用上述方法进行层析,待展开、挥干溶剂后,对照样板上的显色条带进行刮板,用丙酮对刮下来的硅胶相反复萃取后蒸掉溶剂,再用色谱级甲醇进行复溶,过膜,待进样。

#### 1.2.2 美藤果壳酚类物质的鉴定

UPLC-MS条件:Q-TOF MS液质联用仪设置双通道,通道1和通道2碰撞能量分别为6.0 eV和25.0 eV;毛细管温度300℃,毛细管电压3.0 kV;离子源温度100℃;脱溶剂气温度400℃,脱溶剂气流量700 L/h;扫描范围( $m/z$ )50~1 000;负离子模式。MS/MS的碰撞能量30 eV,脱溶剂气温度450℃,其余条件与Q-TOF MS相同。BEH C18色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),柱温45℃,进样量2 μL。

流动相梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	A 乙腈/%	B 0.1% 甲酸/%
0	0.3	0.0	100.0
0.10	0.3	0.0	100.0
5.00	0.3	20.0	80.0
7.00	0.3	40.0	60.0
10.00	0.3	80.0	20.0
12.00	0.3	100.0	0.0
12.10	0.3	0.0	100.0

## 2 结果与讨论

### 2.1 预制硅胶板薄层层析结果(见图1)

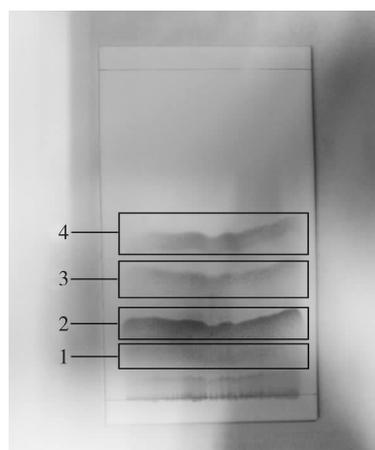


图1 薄层层析结果

由图1可知,点样经茴香醛显色剂显色后,样品被分为4个条带。重新点样多块预制板,经展开后对照样板将4个条带刮下,经溶剂反复萃取后氮气吹干,经色谱级甲醇复溶后过膜,待进UPLC-PDA-MS分析。

### 2.2 UPLC-PDA-MS 结果分析

#### 2.2.1 1号条带结果分析(见图2)

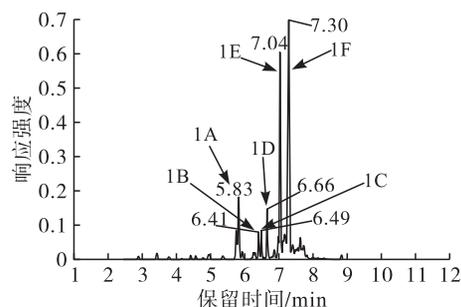


图2 1号条带物质UPLC-PDA检测结果

由图2可知,在PDA检测器下出现6个较大的峰,剩余的均为杂峰。根据6个峰对应的质谱及相关碎片以及在PDA下的特征吸收,整理得表2。根据表2中的相关信息并结合相关文献分析这6种物质的结构。

表 2 1号条带质谱碎片分析

组分	保留时间/min	$\lambda$ /nm	$[M-H]^-$	MS/MS 碎片	物质鉴定
1A	5.83	228,252,350	329	167,123	香草酸己糖苷
1B	6.41	228,265	723	677	1,2-芥子酰阿魏酸酰龙胆二糖(待定)
1C	6.49	227,266	836	790	未知
1D	6.66	235,526	949	787,449,287	矢车菊素3-(6"-阿魏酰槐糖苷)-5-葡萄糖苷
1E	7.04	282,526	493	331	锦葵花色色素3-葡萄糖苷
1F	7.30	282,526	987	493,331	锦葵花色色素3-葡萄糖苷二倍体

由表 2 可知,1A 的保留时间为 5.83 min,在 228、252、350 nm 下均有特征吸收,共得到两个碎片离子 167、123,母离子  $m/z$  329 失去 1 个己糖苷 162 得到碎片 167,167 碎片失去 1 分子  $CO_2$  得到碎片 123,香草酸  $C_8H_8O_4$  相对分子质量为 168,由此推断出 1A 可能为香草酸己糖苷,该断裂规律与参考文献[10]中香草酸己糖苷的断裂规律一致,且特征吸收波长相近。1B 的保留时间为 6.41 min,在 228 nm 和 265 nm 下有特征吸收,母离子  $m/z$  为 723,MS/MS 碎片为 677,无其他碎片。在文献中检索到  $m/z$  为 723 的花色苷为 1,2-芥子酰阿魏酸酰龙胆二糖,而关于该物质的特征吸收未见报道,同样  $m/z$  为 723 的其他物质未见文献报道,因此推断 1B 物质可能为 1,2-芥子酰阿魏酸酰龙胆二糖,具体结构的鉴定需分离单体后进一步检测。1C 的保留时间为 6.49 min,在 227 nm 与 266 nm 下有特征吸收,母离子  $m/z$  为 836,断裂无规律可循且在已知的文献中尚未找到与之匹配的物质,由此推断出 1C 物质为未知化合物。1D 的保留时间为 6.66 min,在 235 nm 与 526 nm 下有特征吸收,母离子  $m/z$  为 949,MS/MS 碎片为 787、449、287,949 失去 162 的葡萄糖苷碎片得到 787 的碎片,787 碎片失去 1 个己糖苷的碎片 162 和阿魏酸的碎片 176,得到碎片 449,449 失去 1 个己糖苷的碎片 162 得到碎片 287,为矢车菊素特征碎片,该断裂规律与文献[11]中矢车菊素 3-(6"-阿魏酰槐糖苷)-5-葡萄糖苷的断裂规律一致,由此推断出 1D 为矢车菊素 3-(6"-阿魏

酰槐糖苷)-5-葡萄糖苷。1E 的保留时间为 7.04 min,在 282 nm 与 526 nm 下有特征吸收,母离子  $m/z$  为 493,MS/MS 碎片为 331,493 失去 1 个葡萄糖苷 162 的碎片得到碎片 331,为锦葵花色色素的特征碎片,与文献[12]中锦葵花色色素 3-葡萄糖苷的断裂规律一致,由此推断出 1E 为锦葵花色色素 3-葡萄糖苷。1F 的保留时间为 7.30 min,在 282 nm 与 526 nm 下有特征吸收,母离子  $m/z$  为 987,MS/MS 碎片为 493、331,根据特征碎片的规律推断出该物质为 1E 的二倍体,也即锦葵花色色素 3-葡萄糖苷二倍体。

### 2.2.2 2号条带结果分析(见图3)

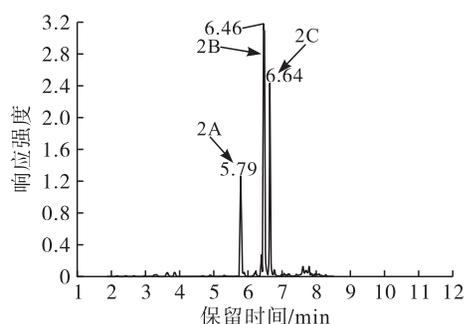


图 3 2号条带物质 UPLC-PDA 检测结果

由图 3 可知,在 PDA 检测器下出现 3 个可分析的峰,剩余均为杂峰。整理该 3 个峰所对应的质谱及相关碎片以及在 PDA 下的特征吸收波长得表 3。根据表 3 中的相关信息并结合相关文献分析这 3 种物质的结构。

表 3 2号条带质谱碎片分析

组分	保留时间/min	$\lambda$ /nm	$[M-H]^-$	MS/MS 碎片	物质鉴定
2A	5.79	292,269	329	167,123	香草酸己糖苷
2B	6.46	282,269	989	659,329,167,123	香草酸己糖苷三倍体
2C	6.64	292,268	659	329,167,123	香草酸己糖苷二倍体

由表 3 可知,2A 的保留时间为 5.79 min,在 269 nm 与 292 nm 下有特征吸收,母离子  $m/z$  为 329,MS/MS 碎片为 167、123,母离子失去 1 个己糖苷 162 得到碎片 167,为香草酸的特征离子碎片,167 碎片失去 1 个  $CO_2$  碎片 44 得到碎片 123,该断裂规律与文献[13]中香草酸己糖苷的断裂规律一致,且特征吸收相近,因此推断出 2A 为香草酸己糖苷。2B 的保留时间为 6.46 min,在 269 nm 与 282 nm 下有特征吸收,母离子  $m/z$  为 989,MS/MS 碎片为 659、329、167、123,由碎片规律以及 2A 的断

裂规律可推断出2B为2A的三倍体,也即2B为香草酸己糖苷三倍体。2C的保留时间为6.64 min,在268 nm与292 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为659,MS/MS碎片为329、167、123,由碎片规律以及2A的断裂规律可推断出2C为2A的二倍体,也即2C为香草酸己糖苷二倍体。

### 2.2.3 3号条带结果分析(见图4)

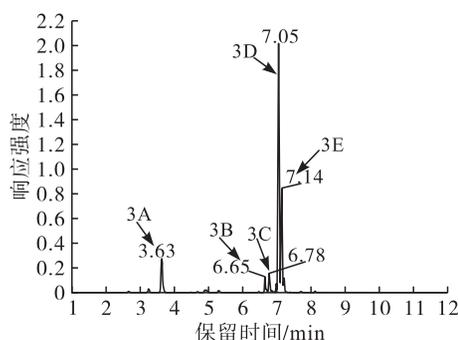


图4 3号条带物质 UPLC-PDA 检测结果

由图4可知,在PDA检测器下出现5个峰,根据这5个峰所对应的质谱及相关碎片以及在PDA下的特征吸收,整理得表4。根据表4中的相关信息并结合相关文献分析这5种物质的结构。

表4 3号条带质谱碎片分析

组分	保留时间/min	$\lambda$ /nm	$[M-H]^-$	MS/MS碎片	物质鉴定
3A	3.63	250	137	93	对羟基苯甲酸
3B	6.65	227,266	836	790	未知
3C	6.78	253	299	137	羟基苯甲酸己糖苷
3D	7.05	233,312	325	163,119	对香豆酸己糖苷
3E	7.14	225,310	655	327,163,119	对香豆酸四倍体

由表4可知,3A的保留时间为3.63 min,在250 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为137,碎片为93,也即母离子失去1个  $CO_2$  碎片44得到碎片93,且137为羟基苯甲酸的母离子,该断裂规律与参考文献[14]中对羟基苯甲酸的断裂规律一致,特征吸收波长与文献[15]中对羟基苯甲酸的吸收波长相近,由此推断出3A物质为对羟基苯甲酸。3B的保留时间为6.65 min,在227 nm与266 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为836,仅有的1个碎片为790,与2.2.1中分析的物质1C的信息一致,即3B为未知物质。3C的保留时间为6.78 min,在253 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为299,碎片为137,母离子失去1个162的糖苷得到137碎片,137碎片为羟基苯甲酸的母离子碎片,参考文献[16]中羟基苯

甲酸的断裂规律以及特征吸收,推断出3C物质为羟基苯甲酸己糖苷。3D的保留时间为7.05 min,在233 nm和312 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为325,碎片为163、119,母离子失去1个162的糖苷得到碎片163,碎片163失去1个  $CO_2$  碎片44得到碎片119,该断裂规律与参考文献[17]中对香豆酸己糖苷的断裂规律一致,且特征吸收波长相近,因此推断出3D物质为对香豆酸己糖苷。3E的保留时间为7.14 min,在225 nm与310 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为655,碎片为327、163、119,根据母离子以及碎片离子的规律可得出3E物质为母离子为163物质的四倍体,碎片163失去1个  $CO_2$  碎片44得到碎片119,根据文献[18-19]中对香豆酸的特征吸收以及断裂规律,可推断出3E物质为对香豆酸四倍体。

### 2.2.4 4号条带结果分析(见图5)

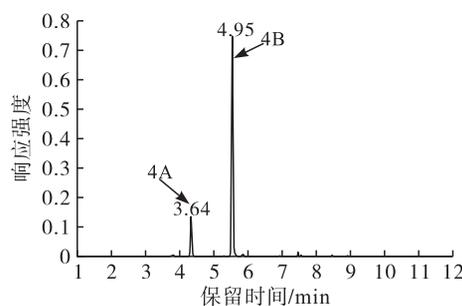


图5 4号条带物质 UPLC-PDA 检测结果

由图5可知,在PDA检测器下出现2个峰。根据这2个峰所对应的质谱及相关碎片以及在PDA下的特征吸收,整理得表5。根据表5中的相关信息并结合相关文献分析这2种物质的结构。

表5 4号条带质谱碎片分析

组分	保留时间/min	$\lambda$ /nm	$[M-H]^-$	MS/MS碎片	物质鉴定
4A	3.64	250	137	93	对羟基苯甲酸
4B	4.95	224,307	163	119	对香豆酸

由表5可知,4A的保留时间为3.64 min,在250 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为137,碎片为93,该信息与2.2.3中分析的3A物质完全匹配,因此4A与3A为同一种物质,因此4A亦为对羟基苯甲酸。4B的保留时间为4.95 min,在224 nm和307 nm下有特征吸收,母离子  $m/z$  为163,碎片为119,母离子失去1个  $CO_2$  碎片44得到119的碎片,该碎片为对香豆酸的特征离子碎片,与文献[20]中对香豆酸的断裂规律一致,且特征吸收相近,由此推断出4B为对香豆酸。

### 3 结论

使用预制硅胶板薄层层析法将经大孔树脂纯化后的美藤果酚类物质进行粗分,使用三氯甲烷-甲醇(体积比 10:1)展开剂分离,得到 4 个条带,对条带上的物质进行萃取富集后使用 UPLC-PDA-MS 分析,参考 UPLC-PDA-MS 结果以及参考文献分析物质的结构分别为:1 号条带 1A(保留时间 5.83 min)为香草酸己糖苷;1B(保留时间 6.41 min)可能为 1,2-芥子酰阿魏酸酰龙胆二糖;1C(保留时间 6.49 min)物质结构尚未鉴定出,为未知化合物;1D(保留时间 6.66 min)为矢车菊素 3-(6"-阿魏酰槐糖苷)-5-葡萄糖苷;1E(保留时间 7.04 min)为锦葵花色素 3-葡萄糖苷;1F(保留时间 7.30 min)为锦葵花色素 3-葡萄糖苷二倍体。2 号条带 2A(保留时间 5.79 min)为香草酸己糖苷;2B(保留时间 6.46 min)为香草酸己糖苷三倍体;2C(保留时间 6.64 min)为香草酸己糖苷二倍体。3 号条带 3A(保留时间 3.63 min)为对羟基苯甲酸;3B(保留时间 6.65 min)为未知物质;3C(保留时间 6.78 min)为羟基苯甲酸己糖苷;3D(保留时间 7.05 min)为对香豆酸己糖苷;3E(保留时间 7.14 min)为对香豆酸四倍体。4 号条带 4A(保留时间 3.64 min)为对羟基苯甲酸;4B(保留时间 4.95 min)为对香豆酸。

#### 参考文献:

- [1] GUTIÉRREZ L F, ROSADA L M, JIMÉNEZ Á. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction [J]. *Grasas Y Aceites*, 2011, 62(1): 76-83.
- [2] CISNEROS F H, PAREDES D, ARANA A, et al. Chemical composition, oxidative stability and antioxidant capacity of oil extracted from roasted seeds of Sacha-Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(22): 5191-5197.
- [3] HAMAKER B, VALLES C, GILMAN R, et al. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca peanut (*Plukenetia volubilis*) [J]. *Cereal Chem*, 1992, 69(4): 461-463.
- [4] 刘瑞营. 提升生活品质 造福人类健康——西双版纳印奇生物资源开发有限公司创新发展美藤果产业 [J]. *中国科技产业*, 2015(10): 78.
- [5] 叶玺. 美藤果,为高原特色产业注入新活力 [J]. *创造*, 2016(1): 64-65.
- [6] 张嘉怡,杜冰,谢蓝华,等. 绿色新资源食品——美藤果油 [J]. *中国油脂*, 2013, 38(7): 1-4.
- [7] 姜红宇,谭捷雄,殷素芳,等. 花生壳中黄酮含量比较及工艺优化 [J]. *食品研究与开发*, 2017(16): 40-45.
- [8] 郑菲. 橡实壳多酚分离纯化、抗氧化及抑菌的研究 [D]. 长沙:中南林业科技大学, 2011.
- [9] 杨婉,葛学惠,赵晨伟,等. 大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的研究 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(2): 120-123.
- [10] WANG L S, LI W L, MA L, et al. Salt stress changes chemical composition in *Limonium bicolor* (Bag.) Kuntze, a medicinal halophytic plant [J]. *Ind Crop Prod*, 2016, 84: 248-253.
- [11] 江连洲,王晰锐,张超,等. HPLC-MS 法鉴定不同品种紫甘薯中花色苷组成 [J]. *中国食品学报*, 2011, 11(5): 176-181.
- [12] LIANG Z C, WU B H, FAN P G, et al. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis germplasm* [J]. *Food Chem*, 2008, 111(4): 837-844.
- [13] FISCHER U A, CARLE R, KAMMERER D R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> [J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 807-821.
- [14] BURSAL E, KÖKSAL E, GÜLÇİN İ, et al. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS [J]. *Food Res Int*, 2013, 51(1): 66-74.
- [15] 张向前,陈宗礼,杨选文,等. 陕北红枣中酚类物质的紫外光谱分析 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(24): 83-88.
- [16] MOCO S, BINO R J, VORST O, et al. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1205-1218.
- [17] SEERAM N P, ADAMS L S, ZHANG Y, et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(25): 9329-9339.
- [18] SWATSITANG P, TUCKER G, ROBARDS K, et al. Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis* [J]. *Anal Chim Acta*, 2000, 417(2): 231-240.
- [19] TAAMALLI A, ARRÁEZ-ROMÁN D, ABAZA L, et al. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana* [J]. *Phytochem Anal*, 2015, 26(5): 320-330.
- [20] GARDANA C, SCAGLIANTI M, PIETTA P, et al. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2007, 45(3): 390-399.