

粗叶悬钩子叶中多酚类与三萜类化合物的研究

郭依俐¹, 唐铁鑫¹, 杨得坡^{1,2}, 岑山², 朱龙平^{1,2}, 徐新军^{1,2*}

(1. 中山大学药学院天然药物与中药研究所, 广州 510006; 2. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广州 510006)

摘要: 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)联用技术,对中国南方民间用于治疗肝损伤和癌症的药材粗叶悬钩子(*Rubus aleaefolius* Poir.)叶中的多酚类和三萜类成分进行了分析。通过与文献数据和部分对照品的紫外光谱、负离子模式下的一级和二级质谱信息进行比较,从粗叶悬钩子叶中共分析了18个化合物,鉴定了其中2个多酚类化合物,推测了9个多酚类和7个三萜类化合物的可能结构,并对三萜类化合物的质谱裂解途径进行了解析。基于对三萜类化合物裂解规律的研究,推测了1个三萜,即3-对香豆酰氧基-19 α -羟基熊果酸。芦丁、绿原酸和3-对香豆酰氧基-19 α -羟基熊果酸在本植物中属首次报道。

关键词: 粗叶悬钩子叶; 高效液相色谱-串联质谱; 多酚; 三萜

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)02-0191-07

Polyphenols and Triterpenoids in *Rubus aleaefolius* Poir. Leaves

GUO Yi-Li¹, TANG Tie-Xin¹, YANG De-Po^{1,2}, CEN Shan², ZHU Long-Ping^{1,2}, XU Xin-Jun^{1,2*}

(1. Institute of Natural Products and Traditional Chinese Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Rubus aleaefolius* Poir. (Rosaceae), “Cu Ye Xuan Gou Zi”, is used as Chinese medicine to treat liver injury and cancer in the south of China. Polyphenols and triterpenoids in its leaves were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry. Compound structures were tentatively identified by comparing ultraviolet (UV) spectra and mass spectra with those of certain authentic samples and literature. Eighteen compounds were analyzed in the leaves of *R. aleaefolius*, among which two polyphenols were definitely identified, and nine polyphenols and seven triterpenoids were tentatively identified. Additionally, fragmentation patterns of main fragment ions for triterpenoids in negative ion mode were proposed and summarized. According to these patterns, a triterpenoid, 3-O-*p*-coumaroyl-19 α -hydroxyursolic acid was tentatively identified. Rutin, chlorogenic acid and 3-O-*p*-coumaroyl-19 α -hydroxyursolic acid were reported in the *R. aleaefolius* leaves for the first time.

Key words: Leaves of *Rubus aleaefolius* Poir.; HPLC-MS/MS; Polyphenols; Triterpenoids

粗叶悬钩子(*Rubus aleaefolius* Poir.)是蔷薇科悬钩子属植物,主要分布于江西、湖南、江苏、福建、台湾、广东、广西、贵州和云南等地,根和叶均可作为药用,具有治疗肝损伤和癌症的功效^[1,2]。

近年来,粗叶悬钩子叶成分的研究已经取得了一定进展,分离得到的化合物主要为三萜、黄酮、鞣质、甾醇等。甘露等^[3]从粗叶悬钩子叶95%乙醇提取物的正丁醇部位分离得到了3个黄酮苷。甘

收稿日期: 2012-09-25, 修回日期: 2013-02-19。

基金项目: 中华人民共和国科学技术部国际科技合作项目(2009DFA31230); 基于澳大利亚TGA的中药(南药)质量标准与注册研究; 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400533); 中药化学对照品制备关键技术及商业化运营平台的构建。

作者简介: 郭依俐(1987-),女,湖北天门人,硕士研究生,主要研究方向为中药有效成分分析。

* 通讯作者(Author for correspondence): 徐新军,博士,副教授,主要从事中药有效成分及质量评价研究(E-mail: xuxinjun@mail.sysu.edu.cn)。

露、赵玉英等^[4]利用色谱等方法,从粗叶悬钩子叶95%乙醇提取物中分离得到了5个三萜皂苷。赵庆春^[5]采用活性追踪的方法对粗叶悬钩子中活性成分进行了分离鉴定,共鉴定出6个多酚类化合物和13个三萜类化合物。目前,还未见采用HPLC-MS/MS联用技术研究粗叶悬钩子叶活性成分的报道。

本研究利用HPLC-MS/MS联用技术分析了粗叶悬钩子叶甲醇提取物,推测鉴定了18个化合物,包括11个多酚类化合物和7个三萜类化合物。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

液相色谱质谱联用仪由Thermo Finnigan公司的Surveyor液相色谱系统和TSQ Quantum电喷雾三重四级杆质谱仪组成。Surveyor液相色谱系统包括四元低压梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)、柱温箱和自动进样器。仪器控制软件为Xcalibur 1.2工作站。色谱柱为Agilent Zorbax C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

药材粗叶悬钩子叶于2012年4月采自广东省广州市大学城晃山,经中山大学药学院天然药化与生药学实验室杨得坡教授鉴定为蔷薇科悬钩子属植物粗叶悬钩子(*Rubus aleaefolius* Poir.)的干燥叶片,其标本保存于中山大学药学院天然药化与生药学实验室。咖啡酸、绿原酸、槲皮素、芦丁、山奈酚及齐墩果酸对照品购于中国食品药品检定研究院;色谱纯甲醇来自瑞典O & Pudtion公司;纯化水为实验室自制;其余试剂均为分析纯。

1.2 样品处理

取干燥的粗叶悬钩子叶粉末2.0 g,用100 mL甲醇超声提取30 min后,低温减压回收溶剂,得到粗叶悬钩子叶的浸膏。将浸膏再用25 mL 70%甲醇水溶液超声溶解,在15000 r/min的转速下离心5 min后取上清液1 mL,用0.45 μm微孔滤膜过滤后待用。

1.3 HPLC-MS/MS分析条件

液相色谱条件:流动相A为甲醇,流动相B为1%乙酸水溶液;梯度洗脱:0 min(10% A)~80 min(100% A)~90 min(100% A);柱温

25℃;DAD检测波长范围:200~600 nm,记录210 nm和270 nm色谱图;流速1.0 mL/min;进样量10 μL。

质谱条件:分流比3:1,即实际进入质谱的流动相流速为250 μL/min;电喷雾电离(ESI)负离子模式;毛细管温度350℃;喷雾电压4.0 kV;鞘气流速为40 arb;辅助气流速为5 arb;碰撞气压力3.0 torr;离子源裂解(CID)碰撞能量为25 V;质量扫描范围: m/z 50~1500。

2 结果与分析

多酚类和三萜类化合物因具有酚羟基或羧基等酸性基团,易失去质子而产生负离子,因此在用HPLC-MS/MS联用技术分析时,采用了负离子检测方式^[6]。粗叶悬钩子叶中多酚类化合物可以分为两类:奎宁酸咖啡酰衍生物类和黄酮类。

对照品测定数据见表1。粗叶悬钩子叶甲醇提取物在负离子模式下的质谱总离子流(TIC)色谱图、在检测波长270 nm和210 nm处的色谱图见图1,各色谱峰所对应的最大紫外吸收波长($\lambda_{\max}$)、质谱数据列于表2。与对照品数据和相关文献进行比较,推测鉴定出了18个化合物。只有1个双键的三萜类化合物在205~250 nm范围内仅有微弱紫外吸收。奎宁酸咖啡酰衍生物和黄酮类化合物在200~400 nm范围内具有较强紫外吸收。根据紫外吸收规律,我们可以大致区分多酚类和三萜类成分。

表1 对照品质谱测定数据
Table 1 [M-H]⁻ and MS² data of authentic samples

峰号 No.	一级质谱 [M-H] ⁻	二级质谱 MS ²	对照品 Authentic samples
1	301	179, 151	槲皮素(Quercetin)
2	609	301, 300, 271	芦丁(Rutin)
3	285	255, 227	山奈酚(Kaempferol)
4	455	407, 391, 377	齐墩果酸(Oleanolic acid)
5	179	135	咖啡酸(Caffeic acid)
6	353	191, 179	绿原酸(Chlorogenic acid)

2.1 多酚类化合物的鉴定

2.1.1 奎宁酸咖啡酰衍生物类的鉴定

依据参考文献^[7],推测化合物1、3和8为奎宁酸咖啡酰衍生物。其中1和3推测为咖啡酰奎宁

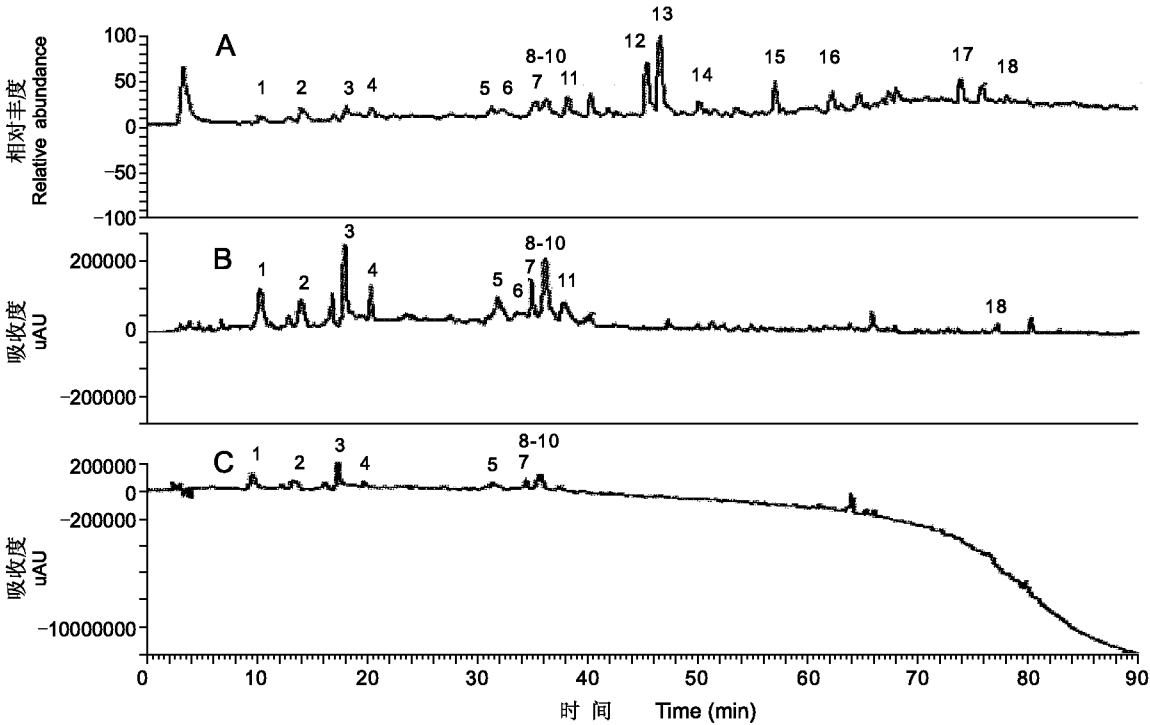


图 1 粗叶悬钩子叶甲醇提取物在负离子模式下的质谱总离子流色谱图 (A)、检测波长 270 nm 下的色谱图 (B) 和检测波长 210 nm 下的色谱图 (C)

Fig. 1 Chromatograms of methanol extracts of the *Rubus aleaefolius* leaves. (A) ESI-MS total ion current chromatogram in negative ion mode, (B) HPLC/UV chromatogram monitored at 270 nm and (C) HPLC/UV chromatogram monitored at 210 nm

表 2 推测鉴定的 18 个化合物

Table 2 Eighteen compounds tentatively identified

峰号 No.	保留时间 t_R (min)	最大紫外吸收波长 λ_{max} (nm)	一级质谱 [M-H] ⁻	二级质谱 MS ²	化合物 Compounds	参考文献 References
1	10.74	245,303sh,325	353	191	1-O-咖啡酰奎宁酸 (1-O-Caffeoylquinic acid)	[7]
2	14.31	280	577	425,407,289	花青色素 (Cyanidin)	[8]
3	18.37	240,303sh,325	353	191,179	绿原酸* (Chlorogenic acid*)	[7]
4	20.51	245,285sh,325	447	301,300,271,179,151	槲皮素-3-O-鼠李糖苷 (Quercetin-3-O-rhamnoside)	[9]
5	32.33	250,330	609	285,255	山奈酚-二葡萄糖苷 (Kaempferol-diglucoside)	-
6	34.70	255,330	461	285,255	山奈酚-3-O-葡萄糖醛酸苷 (Kaempferol-3-O-glucuronide)	[10]
7	35.29	250,340	609	301,300,271,179,151	芦丁* (Rutin*)	[9]
8	36.28	250,303sh,330	515	353,191,179,135	二咖啡酰奎宁酸 (Dicafeoylquinic acid)	[7]
9	36.33	255,340	463	301,300,271,255,179,151	槲皮素-3-O-葡萄糖苷 (Quercetin-3-O-glucoside)	[11]
10	36.49	265,315	593	447,327,285,284,255,227	山奈酚-3-O-半乳糖-鼠李糖苷 (Kaempferol-3-O-galactose-Rhamnoside)	-
11	38.15	265,285sh,330	447	285,284,255,227	椴树苷 (Tiliroside)	[12]
12	45.55	-	679	517,499,455,437,425,411,395,377	悬钩子皂苷或其异构体 (Suavissimoside R1 or its isomer)	[5]
13	46.74	-	679	517,499,455,437,425,411,395,377	悬钩子皂苷或其异构体 (Suavissimoside R1 or its isomer)	[5]
14	50.07	-	485	467,439,423,405,389	未知物 (Unknown)	-
15	56.99	-	517	499,455,437,411,395,377	2 α ,3 β ,19 α -三羟基-乌苏-12-烯-23,28-二酸 (2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-urs-12-en-23,28-diacid)	[5]
16	62.20	-	487	469,441,425,407,391,377	蔷薇酸或委陵菜酸 (Euscaphic acid or tormentic acid)	[5,13]
17	73.67	-	471	453,425,409,393	19 α -羟基熊果酸 (Pomolic acid)	[5,13]
18	78.53	260	617	145	3-对香豆酰氧基-19 α -羟基熊果酸 (3-O- <i>p</i> -coumaroyl-pomolic acid)	[14]

注：“*”表示与对照品对照鉴定；“-”表示未找到。
Note: “*” indicated compounds were identified by comparison with authentic samples; “-” indicated data was not found.

酸,8推测为二咖啡酰奎宁酸。化合物1和3的紫外光谱相似,一级质谱都为 m/z 353,是一对同分异构体。二级碎片 m/z 191为 $[M-H-Caffeoyl]^-$, m/z 179为 $[M-H-Quinic]^-$, m/z 135为 $[M-H-Quinic-CO_2]^-$ 。化合物1的二级碎片只有 m/z 191,查阅文献^[7],1-O-咖啡酰奎宁酸的二级碎片主要为 m/z 191,因此推测化合物1为1-O-咖啡酰奎宁酸。化合物3通过与绿原酸对照品比较,根据保留时间、光谱和质谱确定为绿原酸。化合物8的一级质谱为 m/z 515,二级碎片 m/z 353为 $[M-H-Caffeoyl]^-$,其它碎片裂解信息同化合物1和3。

2.1.2 黄酮类化合物的鉴定

共推测鉴定出8个黄酮类化合物,其中化合物2为类黄酮化合物花青色素,4~7和9~11为黄酮类化合物。花青色素类化合物的最大紫外吸收波长 λ_{max} 为280 nm,特征碎片为丢失儿茶素(Catechin)单元288 u^[15]。化合物2的一级质谱为 m/z 577,二级碎片 m/z 425为逆向Diels-Alder反应所得,碎片 m/z 407为碎片 m/z 425失去1个水所得,碎片 m/z 289为 $[M-H-Catechin]^-$,推测为花青色素。

化合物4、7和9的二级碎片与槲皮素的碎片信息(m/z 301,179和151)一致,推测为槲皮素衍生物。化合物4的二级碎片 m/z 301为 $[M-H-146]^-$,即失去1个鼠李糖残基。叶晓珂等^[9]报道在同属植物树莓叶中发现槲皮素-3-O-鼠李糖苷,因此推测化合物4为槲皮素-3-O-鼠李糖苷。化合物7通过与芦丁对照品对照及查阅文献^[9],鉴定为芦丁。化合物9的二级碎片 m/z 301为 $[M-H-162]^-$,即失去1个葡萄糖残基,推测为槲皮素-3-O-葡萄糖苷^[8]。

化合物5、6、10和11的二级碎片都有 m/z 285,225和227,并且在增大碰撞能量(CID)时, m/z 285丰度降低, m/z 225和227丰度增加。山奈酚(一级质谱为 m/z 285)的二级特征碎片为 m/z 255和227^[11],因此化合物5、6、10和11推测为山奈酚衍生物。化合物5的二级碎片 m/z 285为 $[M-H-324]^-$,即失去2个葡萄糖残基,推测为山奈酚-二葡萄糖苷。化合物6的二级碎片 m/z 285为 $[M-H-176]^-$,即失去1个葡萄糖醛酸残基,Ryan等^[10]报道同属植物树莓叶中发现山奈

酚-3-O-葡萄糖醛酸苷,因此化合物6推测为山奈酚-3-O-葡萄糖醛酸苷。化合物11的二级碎片 m/z 285为 $[M-H-162]^-$,即失去1个六碳糖残基。Tomczyk等^[12]报道在同属植物石生悬钩子中发现山奈酚-3-O- β -D-半乳糖苷(即椴树苷),并且推断椴树苷是悬钩子属植物的化学分类指标,因此推测化合物11为椴树苷。化合物10的分子量比化合物11多了146 u,碎片信息和化合物11一致,推测其比化合物11多了1个鼠李糖。化合物10的二级碎片 m/z 447为 $[M-H-162]^-$,即失去1个半乳糖残基;二级碎片 m/z 285为 $[M-H-162-146]^-$,即失去1个半乳糖残基和1个鼠李糖残基,故化合物10推测为山奈酚-3-O-半乳糖-鼠李糖苷。

2.2 三萜类化合物的鉴定

粗叶悬钩子叶中三萜类成分结构主要是乌苏烷型和齐墩果烷型。根据Chen等^[16]报道的熊果酸和齐墩果酸在负离子模式下的裂解规律,推测了检测到的7种三萜类成分的结构。因为三萜类化合物在270 nm处几乎没有紫外吸收,因此化合物12、13、14、15、16和17这6个三萜类成分,在色谱图上的相应位置未标出来。化合物18因为结构中可能有对香豆酰结构,所以在270 nm处有较强紫外吸收。

化合物12和13的一级质谱均为 m/z 679,二级碎片一致,推测为同分异构体。化合物15的一级质谱为 m/z 517,比化合物12和13的一级质谱少162 u,二级碎片和它们一致。查阅文献^[5],推测化合物12和13可能有一个为悬钩子皂苷,另一个是它的异构体,化合物15可能是它的苷元,可能的裂解途径如图2所示。

化合物14的一级质谱为 m/z 485,推测为熊果酸或齐墩果酸的母核上再连上1个羟甲基或1个甲基和1个羟基,具体结构在已报道的文献中未查到。二级碎片 m/z 467为 $[M-H-H_2O]^-$,439为 $[M-H-HCOOH]^-$,423为 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$,405为 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$,389为 $[M-H-2H_2O-CO_2-CH_4]^-$ 。因在裂解过程中出现失去2个水的碎片 m/z 405和 m/z 389,故推测为熊果酸或齐墩果酸母核上再连上1个甲基和1个羟基。

化合物16的一级质谱为 m/z 487,查阅文献^[5,13]推测为蔷薇酸或委陵菜酸,这2种三萜在粗

叶悬钩子中都已报道过。它们是一对同分异构体,只是3号位上羟基顺序不同。以蔷薇酸为例,可能的裂解途径如图3所示。

化合物17的一级质谱为 m/z 471, 查阅文献^[5,13]推测为19 α -羟基熊果酸。可能的裂解途径如图4所示。

化合物18的一级质谱为 m/z 617, 二级碎片只有 m/z 145 为 $[M-H-472]^-$, 查阅文献^[14]推测为对香豆酰基, 根据化合物17为19 α -羟基熊果酸, 推测化合物18为3-对香豆酰氧基-19 α -羟基熊果酸。这种熊果酸母核上连对香豆酰基的结构在本植物中是首次发现。

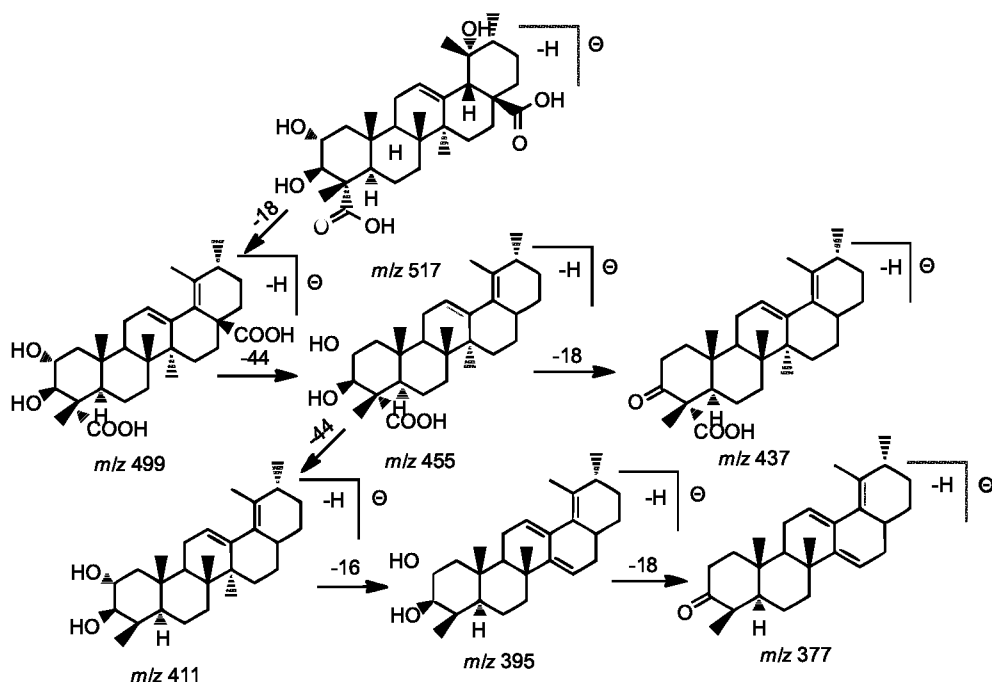


图2 负离子模式下化合物15可能的裂解途径

Fig. 2 Proposed fragmentation patterns for compound fifteen in negative ion mode

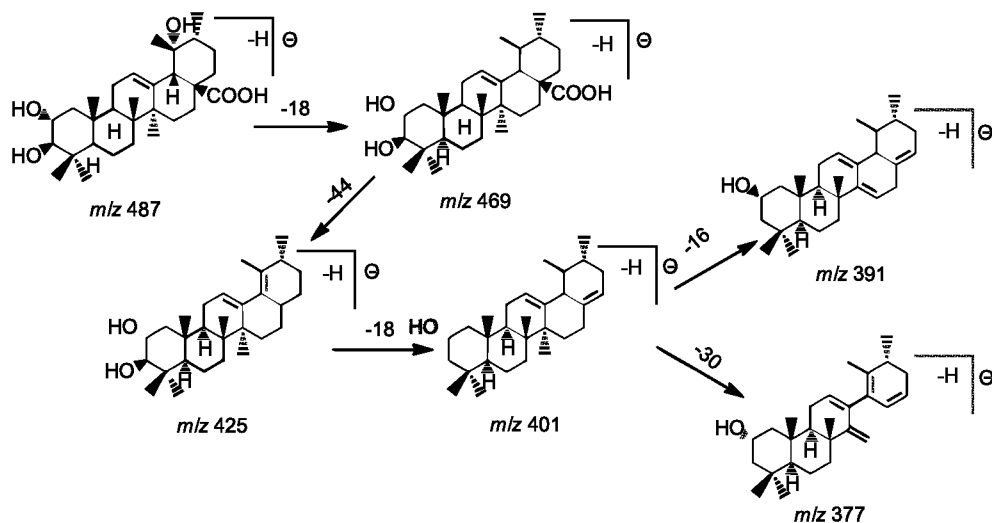


图3 负离子模式下蔷薇酸可能的裂解途径

Fig. 3 Proposed fragmentation patterns for euscapic acid in negative ion mode

- red raspberry, *Rubus idaeus* (Rosaceae) [J]. *Phytochemistry*, 1971, 10(7): 1675–1677.
- [11] Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabaneda F, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Separation and characterization of phenolic compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(12): 3679–3687.
- [12] Tomczyk M, Gudej J. Polyphenolic compounds from *Rubus saxatilis* [J]. *Chem Nat Compd*, 2005, 41(3): 349–351.
- [13] 刘明生, 王利华, 赵力, 李铤. 悬钩子属植物成分研究现状 [J]. *时珍国医国药*, 1999, 10(11): 866–867.
- [14] Plastina P, Bonofiglio D, Vizza D, Fazio A, Rovito D, Giordano C, Barone I, Catalano S, Gabriele B. Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(2): 325–332.
- [15] Soong Y Y, Barlow P J. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1085(2): 270–277.
- [16] Chen Q H, Zhang Y L, Zhang W P, Chen Z L. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(12): 1381–1388.
- [17] He X J, Liu H R. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(11): 4366–4370.
- [18] 杜延兵, 裴爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯化 [J]. *现代食品科技*, 2006, 22(2): 250–252.

(责任编辑: 王豫鄂)