

论著·基础研究

黑果枸杞和宁夏枸杞果实中多酚类物质组成的差异研究

王 琪¹, 唐惠儒²

1. 波谱与原子物理国家重点实验室, 中国科学院武汉物理与数学研究所, 中国科学院大学, 武汉 430071; 2. 复旦大学附属中山医院及生命科学学院, 人类表型组研究院, 国际分子表型组学研究中心, 上海 200438

[摘要] 目的·分析宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 和黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 二者果实中多酚类物质的组成及差异。**方法**·使用超高效液相色谱-电喷雾四级杆串联飞行时间质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry, UHPLC-ESI-Q-TOF-MS) 对黑果枸杞和宁夏枸杞的鲜果与干果中所含多酚类物质进行系统的定性定量。**结果**·2 种枸杞的鲜果和干果中检测并定量酚酸、酚酸酰胺 (酚酸与多胺形成的复合物) 及花青素共 3 类 35 种多酚类物质。2 种枸杞的干果中多酚类物质的种类多于鲜果, 且含量存在物种间差异; 黑果枸杞的干果和鲜果中多酚类物质的种类多于宁夏枸杞的干果和鲜果, 且 2 种枸杞的干果与鲜果中上述物质的含量存在差异。**结论**·黑果枸杞和宁夏枸杞中多酚类物质的种类和含量具有物种依赖性。上述结果为这 2 种枸杞果实的药用及食用生理活性的深入研究提供了基础数据。

[关键词] 黑果枸杞; 宁夏枸杞; 超高效液相色谱-质谱联用技术; 多酚类物质

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.01.008 **[中图分类号]** R284.1; O657.63 **[文献标志码]** A

Composition differences of polyphenolic compounds in fruits of *Lycium ruthenicum* Murr. and *Lycium barbarum* L.WANG Qi¹, TANG Hui-ru²

1. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Zhongshan Hospital and School of Life Science, Human Phenome Institute, Shanghai International Centre for Molecular Phenomics, Fudan University, Shanghai 200438, China

[Abstract] Objective·Both *Lycium barbarum* L. (LB) and *Lycium ruthenicum* Murr. (LR) belong to the *Lycium* genus of Solanaceae family but their fruits have significant phenotypic differences in terms of color and shapes. This study is aimed to investigate the inter-species difference of their fruit polyphenol composition. **Methods**·The polyphenol composition of fresh and dried fruits of two *Lycium* species were comprehensively analyzed using ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UHPLC-ESI-Q-TOF-MS). **Results**·35 polyphenolic compounds were detected and quantified in the fresh and dried *Lycium* fruits including phenolic acids, anthocyanins and phenolamides (*i.e.*, the amide-adducts of polyphenolic acids and polyamines). For both species, the dried fruits had more polyphenolic compounds than their fresh fruits with significant inter-species difference; for both fresh and dried fruits, LR had more polyphenolic compounds than LB. **Conclusion**·There are significant inter-species differences between these two *Lycium* in both fresh and dried fruits. These results offer essential information for further understanding of the biological functions of these two *Lycium* fruits as phytomedicines and functional food.

[Key words] *Lycium ruthenicum* Murr.; *Lycium barbarum* L.; ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UHPLC-ESI-Q-TOF-MS); polyphenolic compounds

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 和黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 同属于茄科枸杞属, 但它们的果实无论是形态还是颜色均存在明显差别, 其干燥果实是重要的中药和功能食品^[1-2]。目前已有报道^[3-8]发现枸杞具有补肾养肝、润肺明目、增强免疫力、抗衰老、抗肿瘤、抗氧化、抗疲劳及协同防癌等多方面生理活性和药理作用。枸杞中的抗氧化活性物质主要是多酚类物质 (polyphenolic compounds), 包括酚酸、花青素^[9]及酚酸与多胺形成的酚

酸酰胺等, 它们均是莽草酸途径介导的植物次生代谢物及其复合物^[10-11]。

迄今为止, 针对枸杞生理活性物质的研究主要集中在枸杞干燥的果实中所含的枸杞多糖及黄酮类物质等成分^[12], 但对其所含酚酸酰胺药用及功能生理活性的研究较少, 其中一个关键问题是缺少枸杞果实中此类物质组成的数据。我们的前期研究^[1]发现 2 种枸杞的新鲜果实中莽草酸介导的多酚类次生代谢物有显著的物种和发育依赖

[作者简介] 王 琪 (1989—), 女, 博士生; 电子信箱: wangqime@126.com。

[通信作者] 唐惠儒, 电子信箱: huiru_tang@fudan.edu.cn。

性。然而,上述2种枸杞果实中多酚类代谢物的组成、干果和鲜果中多酚类物质的组成差异尚无报道。足够多的文献资料表明液相色谱-质谱法(liquid chromatography/mass spectrometry, LC-MS)是定性与定量研究此类物质的可行性技术。为此,本文使用超高效液相色谱-电喷雾四级杆串联飞行时间质谱(ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry, UHPLC-ESI-Q-TOF-MS)技术,系统研究了黑果枸杞和宁夏枸杞的鲜果和干果中多酚类物质的组成及差异,以便为这2种枸杞果实的生理活性研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 化学试剂及仪器

色谱纯甲醇、乙腈和甲酸购于Sigma-Aldrich(中国)试剂有限公司。超纯水(电阻率大于18.2 M Ω /cm)来自Elix Advantage System(德国Merck Millipore有限公司)。绿原酸、咖啡酸、芥子酸、阿魏酸、香草酸和高香草酸等标准品均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

液相色谱-质谱联用系统为Agilent 1290超高效液相系统串联Agilent 6530B Accurate-Mass Q-ToF质谱,其中质谱配置有Jet stream ESI离子源。电热鼓风干燥箱购于上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 样品收集及处理

新鲜的宁夏枸杞和黑果枸杞分别采集于宁夏回族自治区中宁县和平罗县(样品收集工作由中国科学院华南植物园曾少华老师完成)。样品为在枸杞发生颜色突变后3 d的果实,其中宁夏枸杞呈椭圆形、橙黄色,而黑果枸杞呈球形、青紫色^[1]。宁夏枸杞和黑果枸杞的干果均为市售商品。样品经液氮速冻后储存于-80℃待分析。

样品的提取基于文献及我们优化的方法^[1, 13-16]。将约10 mg的枸杞果实样品在液氮保护下研磨成粉后加入200 μ L预冷的(-20℃过夜)80%甲醇水溶液并涡旋10 s。对上述样品以振荡90 s—停90 s—振荡90 s的程序进行组织破碎(20 Hz),再冰浴超声(45 KHz)15个循环(超声1 min—停1 min—超声1 min)进行细胞破碎,随后离心10 min(16 000 \times g, 4℃)取上清。合并重复提取3次的提取液后,用离心浓缩仪除去溶剂并冷冻干燥得到粉末提取物。将该提取物用100 μ L 80%甲醇水溶液复溶,再离心10 min(16 000 \times g, 4℃)取上清,过0.22 μ m孔径的聚四氟乙烯(poly tetra fluoroethylene,

PTFE)膜后上机分析。

1.3 色谱-质谱分析

本研究使用的色谱-质谱联用系统为Agilent 1290超高效液相系统串联Agilent 6530B Accurate-Mass Q-ToF质谱,色谱柱为Agilent Poroshell 120 EC C18(2.1 mm \times 100 mm, 2.7 μ m),柱温为35℃,进样量0.5 μ L。流动相使用A(含有0.1%甲酸的水溶液)与B(含有0.1%甲酸的乙腈溶液),流速为0.6 mL/min,以2% B为初始梯度,15 min时线性升至10% B,17 min时线性升至25% B,20 min时线性升至40% B,22 min时升至90% B并保持4 min。

质谱的采样模式为正离子模式,毛细管电压为4 000 V,碎裂电压为175 V,喷嘴电压为500 V,skimmer电压为65 V,八级杆电压为750 V,喷雾气的压力为50 psi,干燥气的流速和温度分别为10 L/min和350℃,鞘气的流速和温度分别为12 L/min和350℃,采样范围为质荷比 m/z 110~2 000。二级质谱使用All ion MS/MS模式采集用于辅助定性,碰撞能量为0、10、20和40 V,采样频率为每秒4张谱图。

1.4 数据分析

1.4.1 含水量计算 将培养皿(含皿盖)置于130℃电热鼓风干燥箱中干燥1 h,并在干燥器中冷却后称重,重复上述步骤2次,至恒重(2次误差不超过0.002 g),平均值记为 W_1 ;然后,称取一定量的研磨成粉末的样品铺至培养皿中,称重,记为 W_2 ;将培养皿和样品置于130℃烘箱中干燥2 h,在干燥器中冷却后称重,重复上述步骤3次,至恒重(3次误差不超过0.002 g),平均值记为 W_3 ,则含水量(moisture content, MC)的计算公式为 $MC=(W_2-W_3)/(W_2-W_1)\times 100\%$ ^[13, 17]。

1.4.2 化合物定性与定量 通过标准品、公开数据库(Metlin)和文献,根据保留时间、母离子、子离子等数据,使用MassHunter软件包进行定性定量分析,然后将对应的保留时间和积分导出进行后续分析。

2 结果

2.1 MC

我们之前的研究^[1]发现宁夏枸杞的鲜果的MC(77.98% \pm 1.46%)高于黑果枸杞(70.08% \pm 1.55%),本研究发现宁夏枸杞干果中的MC(33.80% \pm 2.11%)也高于黑果枸杞(25.84% \pm 2.42%)(图1)。由于2种枸杞的干果和鲜果中的MC不同,所以为方便比较本研究的定量结果均使用了干重归一化。

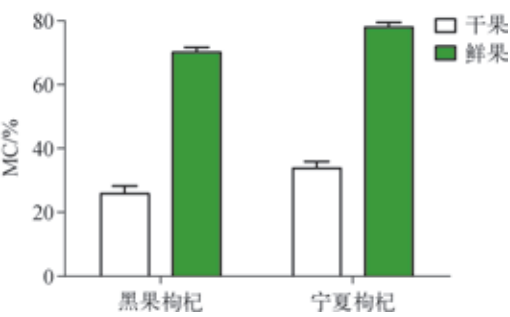


图 1 黑果枸杞和宁夏枸杞的干果和鲜果中的 MC (n=3)
Fig 1 MC of dried and fresh fruit in *Lycium ruthenicum* Murr. and *Lycium barbarum* L. (n=3)

2.2 2 种枸杞中多酚类物质的定性及定量分析

图 2 显示黑果枸杞鲜果和宁夏枸杞鲜果 (图 2A) 以

及黑果枸杞干果和宁夏枸杞干果 (图 2B) 中含有的代谢物种类和含量明显不同。通过对母离子和子离子的分析, 在 2 种枸杞果实中共发现包括 5 种酚酸、19 种酚酸酰胺和 11 种花青素类物质在内的 35 种多酚类物质。其中, 6 种酚酸类物质可通过标准品比对进行准确定性; 其他物质由于不能获得标准品而根据母离子、子离子、裂解规律和文献数据对其结构进行推定。这些多酚类物质均是莽草酸代谢途径介导产生的植物次生代谢物, 其中花青素类物质赋予植物果实颜色, 而酚酸与多胺形成的复合物 (酚酸酰胺) 可能与植物果实成熟有关^[18]。这些植物次生代谢物均有一定的抗氧化活性, 但酚酸酰胺在植物药及功能食品中的具体生理活性及作用机制均不清楚。

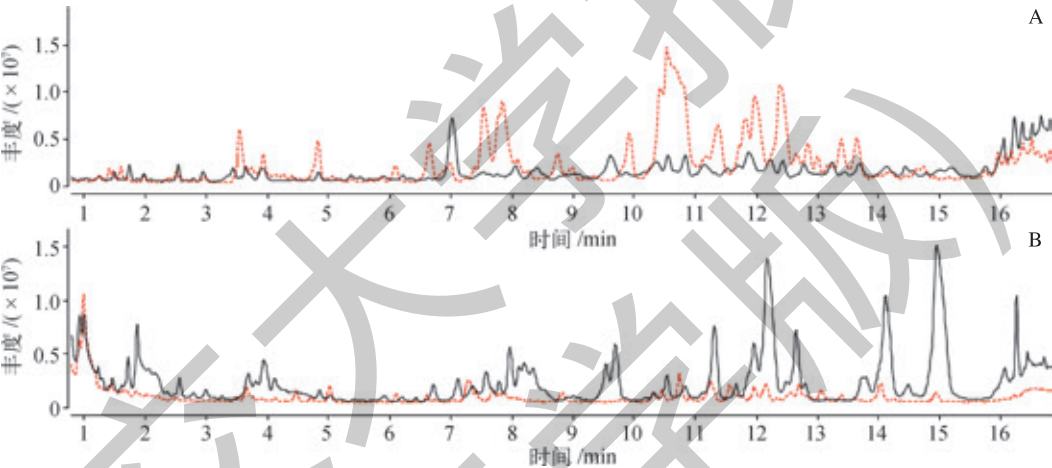


图 2 黑果枸杞 (黑实线) 和宁夏枸杞 (红虚线) 的鲜果 (A) 和干果 (B) 的总离子色谱图 (total ion chromatogram, TIC)
Fig 2 TIC of fresh (A) and dried (B) fruit in *Lycium ruthenicum* Murr. (black solid lines) and *Lycium barbarum* L. (red dashed lines)

2.2.1 多酚类物质的定性分析 首先, 根据 1.3 所述的色谱-质谱方法对咖啡酸、绿原酸、香草酸、高香草酸、芥子酸和阿魏酸等 6 种酚酸标准品进行检测分析。结果表明, 在正离子模式下, 香草酸、高香草酸和绿原酸这 3

种酚酸的 [M+H]⁺ 丰度最高, 而咖啡酸、阿魏酸和芥子酸的 [M+H-H₂O]⁺ 丰度最高 (表 1)。通过与标准品的保留时间和母离子比对发现, 2 种枸杞果实中含有绿原酸和高香草酸, 其他 4 种酚酸含量较低而未得到检测。

表 1 多酚酸标准品的 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 检测结果
Tab 1 Results of polyphenolic acid standards detected by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

化合物	分子式	相对分子量	+ESI [®]	标准品保留时间 /min	样品保留时间 /min
香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	168.049 5	169.049 5	5.90	2.99
咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	180.042 3	163.038 6 [®]	6.59	7.01
高香草酸	C ₉ H ₁₀ O ₄	182.057 4	183.065 2	16.58	16.59 [®]
阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.057 9	177.055 4 [®]	13.10	/
芥子酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.068 5	207.063 6 [®]	15.01	8.88
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	355.102 4	6.98	7.00 [®]

注: [®]使用质谱正离子模式检测; [®]母离子为 [M+H-H₂O]⁺; [®]样品保留时间与标准品一致。

酚酸酰胺是酚酸与多胺形成的复合物,其质谱子离子信息既包括酚酸的子离子信息,也包括多胺相关子离子信息。其中,香豆酰的特征离子为 m/z 147.044 1,失去该碎片所致的离子间 m/z 为 146.033 6;咖啡酰的特征性离子为 m/z 163.038 2,失去该碎片所致的离子间 m/z 为 162.031 7;二氢咖啡酰的特征离子为 m/z 165.056 1;阿魏酰的特征性离子为 m/z 177.055 4;肉桂酰的特征性离子为 m/z 131.048 8。胍丁胺、腐胺和亚精胺类酚酸酰胺的特征子离子分别为 m/z 131.128 4、89.038 5 和 220.096 1/222.112 4^[19]。

花青素类物质根据其黄酮母核的不同分为飞燕草色素、矮牵牛色素和锦葵色素等,其特征离子分别为 m/z 303.050 5、317.067 7 和 331.081 3^[20-21]。多酚类植物代谢物常以糖苷形式存在,其质谱中会有失去该糖而产生的特征离子。例如,失去一个六碳糖会产生 m/z 为 162.052 8 的子离子,而失去一个二糖会产生 m/z 为 308.110 2 的

子离子。根据以上特征离子和裂解规律,可较为便捷地对物质进行定性分析。例如,表 2 中某物质的母离子为 m/z 933.265 1,根据 m/z 317.067 7 子离子推测其可能为花青素类^[19, 22],而花青素类一般带一个正电荷在正离子模式的质谱中形成 $[M]^+$;质谱数据显示该物质有 3 个子离子,其中 m/z 317.067 7 是矮牵牛素的特征性离子, m/z 771.214 0 是母离子失去一个六碳糖的结果 ($[M-162.050\ 8]^+$), m/z 479.121 3 是母离子失去一个二糖和香豆酰碎片的结果 ($[M-308.110\ 2-146.033\ 6]^+$),因此可以推定该物质为矮牵牛色素-二糖-香豆酰-六碳糖。植物次生代谢物所含六碳糖可以是葡萄糖、半乳糖、甘露糖等同分异构体,在没有标准品的情况下,仅用质谱对其进行绝对定性较为困难。在本文中,代谢物的绝对定性与否不影响其研究目的(即探索 2 个物种果实中 3 大类多酚物质的组成)。

表 2 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 鉴定的 2 种枸杞果实中的多酚类物质
Tab 2 Identification of 35 polyphenolic compounds from *Lycium* fruits by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

化合物	分子式	保留时间 /min	母离子		子离子	参考文献			
酚酸类									
高香草酸	C ₉ H ₁₀ O ₄	16.59	183.065 2	139.072 5,	124.083 6				
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	7.02	355.102 1	163.038 4,	145.028 5,	135.044 2,	117.033 5		
咖啡酸异构体 ^①	C ₉ H ₈ O ₄	7.04	181.049 2	163.038 3,	145.028 3,	135.043 8			
香草酸异构体 ^①	C ₈ H ₈ O ₄	2.99	169.049 1	125.060 0,	151.038 5				
芥子酸异构体 ^①	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	8.88	225.076 3	207.075 3,	192.041 3,	175.038 8,	119.049 2		
酚酸酰胺									
香豆酰 - 胍丁胺	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	9.70	277.165 9	218.119 3,	147.043 5,	131.128 4,	114.102 8	[23-24]	
阿魏酰 - 胍丁胺	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O ₃	11.94	307.176 3	177.055 4,	131.129 6,	114.102 5		[23, 25]	
香豆酰 - 腐胺	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂	5.53	235.144 1	218.117 6,	147.043 7,	119.048 5,	89.107 1	[23, 25]	
阿魏酰 - 腐胺	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	7.77	265.155 0	177.055 4,	89.038 5			[23, 25]	
N- 肉桂酰 - 腐胺	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	11.18	219.148 4	131.048 8,	89.037 3			[23]	
N- 咖啡酰 - 亚精胺 -1 ^②	C ₁₆ H ₂₄ N ₃ O ₃	1.71	308.196 3	220.096 1,	163.038 2			[21, 23]	
N- 咖啡酰 - 亚精胺 -2 ^②	C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₃	2.08	308.196 3	222.115 2,	163.038 2			[21, 23]	
N, N- 咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆	15.06	472.244 5	222.112 4,	163.039 0			[21, 23]	
N, N- 二咖啡酰 - 亚精胺	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₆	16.26	470.228 5	308.195 8,	220.096 5			[21, 23]	
N, N- 二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺 -1 ^③	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₅	16.16	456.249 0	308.196 9,	220.096 4,	163.038 8,	147.044 1	[21, 23]	
N, N- 二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺 -2 ^③	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₅	16.42	456.249 0	308.196 9,	220.096 4,	163.038 8,	147.044 1	[21, 23]	
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -1 ^④	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₁₁	15.99	634.297 0	472.244 2,	220.096 6			[21, 23]	
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -2 ^④	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₁₁	16.14	634.296 4	472.244 7,	220.096 1,	163.038 1		[21, 23]	
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -3 ^④	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₁₁	10.70	634.296 4	308.196 9,	220.096 4,	163.038 8,	147.044 1	[21, 23]	
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -4 ^④	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₁₁	12.82	634.296 4	308.196 9,	220.096 4,	163.038 8,	147.044 1	[21, 23]	
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -5 ^④	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₁₁	13.73	634.296 4	308.196 9,	222.096 4,	163.038 8,	147.044 1	[21, 23]	
N, N- 二 - 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖	C ₄₀ H ₅₃ N ₄ O ₁₃	10.54	798.365 5	636.310 9,	474.259 8,	384.165 4,	222.112 0,	165.056 1	[21, 23]

(续表 2)

化合物	分子式	保留时间 /min	母离子	子离子	参考文献
N, N- 咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖	C ₄₀ H ₅₁ N ₄ O ₁₃	10.82	796.349 4	634.296 3, 472.244 1, 382.149 8, 220.096 3	[21, 23]
N, N- 二 - 咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₁₃	12.50	794.334 0	632.281 3, 465.102 8, 220.096 8, 163.041 8	[21, 23]
花青素					
飞燕草色素 - 六碳糖	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	16.38	465.103 3	303.050 5	[19-20, 22, 26]
飞燕草色素 - 香豆酰 - 六碳糖	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	16.90	611.147 9	465.103 3, 303.050 5	[19-20, 22, 26]
飞燕草色素 - 香豆酰 - 二六碳糖	C ₃₆ H ₃₇ O ₁₉	12.46	773.213 1	611.147 9, 465.103 3, 303.050 5	[19-20, 22, 26]
飞燕草色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₃	16.64	919.254 5	757.200 2, 465.110 0, 303.051 4	[19-20, 22, 26]
矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₃	16.90	933.265 1	771.214 0, 479.121 3, 317.067 7	[19-20, 22, 26]
矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖	C ₄₉ H ₅₉ O ₂₈	16.06	1 095.325 0	933.268 7, 771.214 2, 479.120 6, 317.067 7	[19-20, 22, 26]
矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰	C ₃₇ H ₃₉ O ₁₉	15.99	787.226 6	479.117 0, 317.064 5	[19-20, 22, 26]
矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 - 六碳糖	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄	16.62	949.265 8	787.213 3, 479.120 6, 317.067 7	[19-20, 22, 26]
矮牵牛色素 - 二糖 - 阿魏酰	C ₃₅ H ₄₅ O ₂₁	16.83	801.224 1	493.138 1, 317.066 6	[19-20, 22, 26]
锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₃	17.12	947.284 0	785.231 0, 493.135 3, 331.082 7	[19-20, 22, 26]
锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖	C ₅₀ H ₆₁ O ₂₈	16.36	1 109.336 1	947.279 9, 785.231 0, 493.133 6, 331.081 3	[19-20, 22, 26]

注：^①与对应化合物的标准品的母离子、子离子相同，而保留时间不同；^②、^③、^④互为异构体，具有相同的母离子和子离子，但保留时间不同。

2.2.2 多酚类物质的定量分析 2 种枸杞的鲜果和干果所含多酚类物质的种类和含量不尽相同。2 种枸杞的干果和鲜果中多酚类物质的定量结果在表 3 中以每毫克干重枸杞果实中各个物质的色谱峰面积呈现。表 3 显示黑果枸杞鲜果中含有 29 种多酚物质，而干果中含有 35 种；宁夏枸杞鲜果中 28 种多酚物质，而干果中含有 30 种。在黑果枸杞鲜果中，香豆酰 - 胍丁胺、阿维酰 - 胍丁胺、N, N- 二咖啡酰 - 亚精胺和绿原酸的响应最高；在其干果中，N, N- 咖啡酰，二咖啡酰 - 亚精胺、香豆酰 - 胍丁胺、阿维酰 - 胍丁胺的含量最高。在宁夏枸杞鲜果中，N, N- 咖啡酰，二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖、N, N- 二 - 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖、N, N- 二 - 咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖的响应最高；在其干果中 N, N- 咖啡酰，二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖、N, N- 咖啡酰，二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖的响应最高。

表 3 枸杞果实中多酚类物质的相对含量（单位：峰面积 × 10⁴/mg）
Tab 3 Quantitative results of polyphenolic compounds in *Lycium* fruits (peak area×10⁴/mg dried weight)

化合物	鲜果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)		干果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)	
	黑果枸杞	宁夏枸杞	黑果枸杞	宁夏枸杞
酚酸类				
高香草酸	628.0±198.4	53.6±16.2	74.6±11.4	79.4±1.3
绿原酸	22.8±4.5	32.1±11.0	52.2±11.1	78.6±1.5
咖啡酸异构体	557.8±188.7	15±7.8	19.2±0.5	0.8±0.1
香草酸异构体	10.1±3.3	0.7±0.4	0.5±0.1	ND
芥子酸异构体	5.6±1.5	3.7±1.3	0.7±0	ND
芥子酸异构体	31.7±7.1	2.6±1.8	2.0±0.2	ND
酚酸酰胺				
香豆酰 - 胍丁胺	5 468.2±2 981.7	12 047.9±3 181.1	3 837.3±234.2	440.0±11.1
阿魏酰 - 胍丁胺	1 895.2±1 661.6	9.6±2.6	485.8±35.8	4.9±1.0
香豆酰 - 腐胺	1 685.2±1 389.5	9.7±4.3	472.5±35.2	4.2±0.8
阿魏酰 - 腐胺	131.8±97.3	2.6±1.8	9.4±0.7	0.1±0
阿魏酰 - 腐胺	163.5±81.4	21.0±12.7	23.3±1.8	0.6±0.1
N- 肉桂酰 - 腐胺	20.6±12.5	0.6±0.4	0.4±0.1	ND
N- 咖啡酰 - 亚精胺 -1 ^①	21.9±11.4	1.4±0.9	3.5±0.3	0.6±0.1
N- 咖啡酰 - 亚精胺 -2 ^②	34.1±23.4	0.6±0.1	21.0±2.9	0.4±0.2

(续表 3)

化合物	鲜果 ($\bar{x} \pm s, n=10$)		干果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	
	黑果枸杞	宁夏枸杞	黑果枸杞	宁夏枸杞
N, N- 咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺	18.7 ± 13.7	0.7 ± 0.4	1 811.4 ± 99.1	55.5 ± 9.9
N, N- 二咖啡酰 - 亚精胺	1 221.1 ± 508.6	12.0 ± 2.9	317.7 ± 21.2	12.5 ± 0.3
N, N- 二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺 -1 ^①	2.6 ± 1.2	1.0 ± 0.6	18.6 ± 1.6	0.9 ± 0
N, N- 二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺 -2 ^②	8.6 ± 4.9	1.7 ± 0.8	49.5 ± 4.1	0.4 ± 0.1
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -1 ^③	8.9 ± 3.3	270.1 ± 160.8	1.3 ± 0.2	0.1 ± 0
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -2 ^③	4.6 ± 2.0	69.5 ± 41.5	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -3 ^③	5.8 ± 2.2	225.0 ± 88.0	82.6 ± 7.3	96.5 ± 2.7
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -4 ^③	87.0 ± 48.3	114.9 ± 81.8	335.2 ± 14.9	91.1 ± 7.3
N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -5 ^③	91.2 ± 48.4	3.8 ± 2.8	91.0 ± 11.2	6.9 ± 0.3
N, N- 二 - 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖	28.2 ± 14.9	3 027.2 ± 694.3	67.6 ± 6.9	43.8 ± 1.3
N, N- 咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖	77.7 ± 52.2	6 124.9 ± 1 633.6	39.2 ± 3.0	117.5 ± 1.6
N, N- 二 - 咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖	11.7 ± 6.2	2 176.8 ± 1 063.9	6.8 ± 0.9	3.7 ± 0
花青素	95.6 ± 39.5	111.9 ± 60.3	439.3 ± 7.8	10.0 ± 2.2
飞燕草色素 - 六碳糖	2.1 ± 1.1	0.8 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.2 ± 0
飞燕草色素 - 香豆酰 - 六碳糖	48.1 ± 25.9	55.1 ± 35.6	2.0 ± 0.1	3.3 ± 0
飞燕草色素 - 香豆酰 - 二六碳糖	7.7 ± 4.1	23.0 ± 15.7	9.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1
飞燕草色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖	ND	ND	5.9 ± 0.3	0.4 ± 0
矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖	5.2 ± 13.0	ND	330.6 ± 5.3	3.4 ± 1.5
矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖	ND	ND	71.5 ± 2.2	0.7 ± 0.4
矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰	1.8 ± 1.4	9.6 ± 7.0	1.0 ± 0	0.1 ± 0
矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 - 六碳糖	ND	ND	5.7 ± 0.3	ND
矮牵牛色素 - 二糖 - 阿魏酰	ND	ND	3.7 ± 0.4	0.4 ± 0
锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖	ND	ND	6.7 ± 0.3	0.1 ± 0
锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖	ND	ND	1.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1

注：①、②、③具有相同母离子、子离子但不同保留时间的同分异构体；ND为未检测到信号。

2.2.3 枸杞干果与鲜果中酚酸类物质的组成差异 2 种枸杞的鲜果和干果的中的酚酸类物质的组成有显著差异 (表 3 和图 3A、B)。其中, 飞燕草色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖、矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖、矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 - 六碳糖、矮牵牛色素 - 二糖 - 阿魏酰、锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖、锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖 6 种物质只在枸杞干果中发现, 但未在对应鲜果中检测到。

在黑果枸杞中, 干果中的酚酸总量显著低于鲜果 (图 3A), 而其中高香草酸的含量却高于鲜果。干果中酚酸酰胺类代谢物含量低于鲜果, 但其中 N, N- 咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺、N, N- 二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺 -1、N, N- 二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺 -2、N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -3、N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -4、N, N- 二 - 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳

糖 6 种酚酸酰胺的含量却明显高于鲜果。此外, 花青素总含量和飞燕草色素 - 香豆酰 - 二六碳糖和矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖 2 种花青素含量高于鲜果。

宁夏枸杞干果和鲜果中多酚类物质含量也存在明显差异 (图 3B)。其干果中的酚酸总量高于鲜果, 但高香草酸的含量却略高于鲜果, 其他物质的含量均低于鲜果; 其中咖啡酸、香草酸和芥子酸这 3 种酚酸含量低于检测限而未发现。干果中酚酸酰胺代谢物的总含量显著低于鲜果, 而 N, N- 咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺、N, N- 二咖啡酰 - 亚精胺、N, N- 二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺六碳糖 -5 3 种酚酸酰胺的含量却明显高于鲜果。干果中花青素总含量及飞燕草色素 - 六碳糖、飞燕草色素 - 香豆酰 - 六碳糖、飞燕草色素 - 香豆酰 - 二六碳糖、矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 4 种花青素类物质的含量显著低于鲜果。

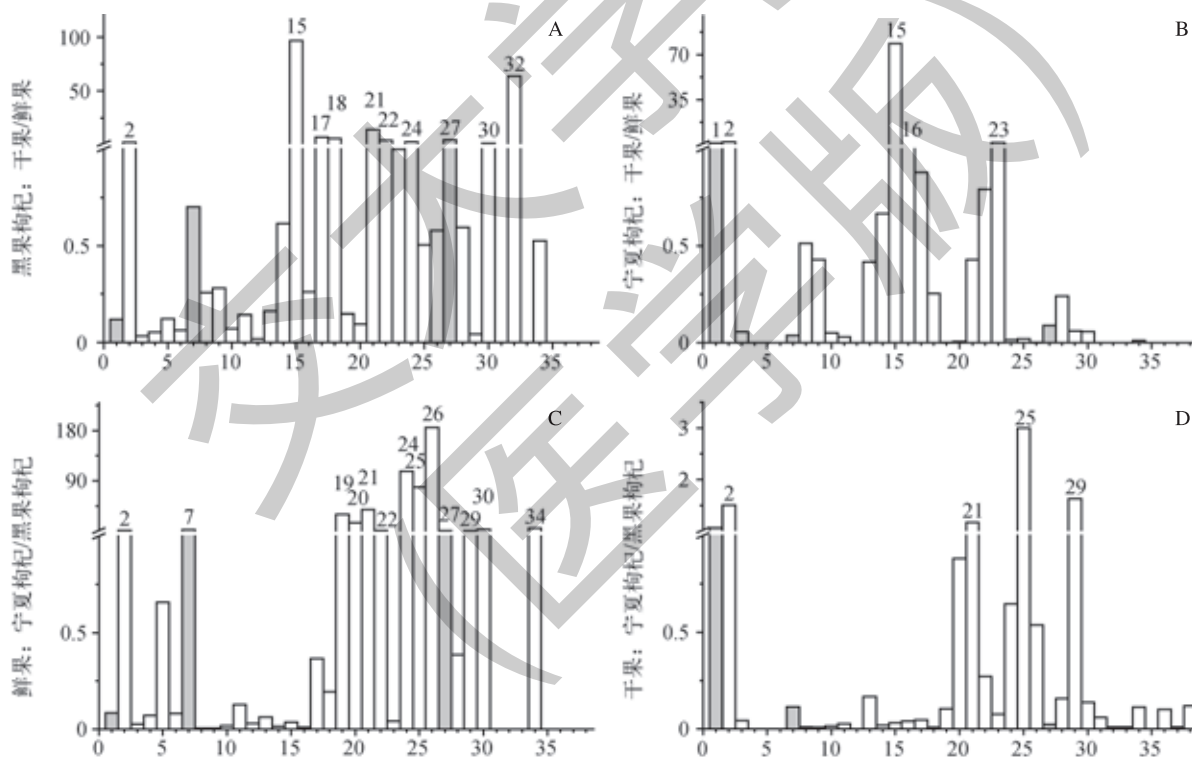
上述结果表明, 2 个枸杞品种的干果与鲜果中酚酸类

代谢物的种类和含量均存在差异 (表 3 和图 3A、B)。与鲜果比较, 2 种枸杞的干果中多酚类物质的种类更多, 其中干果中含有更多种类的花青素类代谢物; 干果中 N, N-二氢咖啡酰与咖啡酰 - 亚精胺的含量远大于鲜果 (黑果枸杞中为 96 倍、宁夏枸杞中为 78 倍)。上述差异既可能来自果实的后熟发育, 也可能源于干燥引起的脱水胁迫所导致的植物细胞的代谢重编程^[27]。上述发现表明植物药及功能食品的采摘后处理会对其所含活性物质有较大影响。

2.2.4 2 种枸杞果实中酚酸类物质的组成差异 2 种枸杞果实中的多酚类物质的种类和含量均存在物种依赖性 (表 3 和图 3C、D)。在鲜果中 (图 3C), 矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖在黑果枸杞中可检测到, 而在宁夏枸杞中未检测到。宁夏枸杞中酚酸的总量低于黑果枸杞, 但其中高香草酸的含量高于黑果枸杞; 酚酸酰胺代谢物的总量高于黑果枸杞, 且 N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺六碳糖 -1、N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺六碳糖 -2、N,

N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺六碳糖 -3、N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺六碳糖 -4、N, N-二 - 二氢咖啡酰 - 亚精胺二六碳糖、N, N-咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺二六碳糖、N, N-二 - 咖啡酰 - 亚精胺二六碳糖 7 种酚酸酰胺类物质的含量均显著高于黑果枸杞; 花青素的总量和飞燕草色素 - 香豆酰 - 六碳糖、飞燕草色素 - 香豆酰 - 二六碳糖和矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 3 种花青素类物质含量显著高于黑果枸杞。

在干果中 (图 3D), 宁夏枸杞的酚酸总含量高于黑果枸杞, 其中高香草酸的含量也高于黑果枸杞。酚酸酰 - 多胺类的总量低于黑果枸杞, 但其中的 N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺六碳糖 -3、N, N-咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖 2 种酚酸酰胺类物质的含量高于黑果枸杞。其次, 花青素的总含量低于黑果枸杞, 但飞燕草色素 - 香豆酰 - 六碳糖含量却高于黑果枸杞; 矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 - 六碳糖只在黑果枸杞中可以得到检测。



注: A. 黑果枸杞干果中多酚物质含量与鲜果中含量之比; B. 宁夏枸杞干果中多酚物质含量与鲜果中含量之比; C. 宁夏枸杞与黑果枸杞鲜果中的多酚物质含量之比; D. 宁夏枸杞与黑果枸杞干果中的多酚物质含量之比。横坐标为物质的编号 (1. 酚酸类, 2. 高香草酸, 3. 绿原酸, 4. 咖啡酸异构体, 5. 香草酸异构体, 6. 芥子酸异构体, 7. 酚酸酰胺, 8. 香豆酰 - 胍丁胺, 9. 阿魏酰 - 胍丁胺, 10. 香豆酰 - 腐胺, 11. 阿魏酰 - 腐胺, 12. N-肉桂酰 - 腐胺, 13. N-咖啡酰 - 亚精胺-1, 14. N-咖啡酰 - 亚精胺-2, 15. N, N-咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺, 16. N, N-二咖啡酰 - 亚精胺, 17. N, N-二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺-1, 18. N, N-二氢咖啡酰, 香豆酰 - 亚精胺-2, 19. N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -1, 20. N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -2, 21. N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -3, 22. N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -4, 23. N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰 - 亚精胺 - 六碳糖 -5, 24. N, N-二 - 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖, 25. N, N-咖啡酰, 二氢咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖, 26. N, N-二 - 咖啡酰 - 亚精胺 - 二六碳糖, 27. 花青素, 28. 飞燕草色素 - 六碳糖, 29. 飞燕草色素 - 香豆酰 - 六碳糖, 30. 飞燕草色素 - 香豆酰 - 二六碳糖, 31. 飞燕草色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖, 32. 矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖, 33. 矮牵牛色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖, 34. 矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 - 六碳糖, 35. 矮牵牛色素 - 二糖 - 咖啡酰 - 六碳糖, 36. 矮牵牛色素 - 二糖 - 阿魏酰, 37. 锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 六碳糖, 38. 锦葵色素 - 二糖 - 香豆酰 - 二六碳糖); 纵坐标为物质含量的比值 (截断在 1.000 ~ 1.002); 图中条形柱有截断者 (条形柱上标注物质编号者), 示前者含量高于后者; 图中条形柱有灰色填充的为该类物质含量总和之比。

图 3 黑果枸杞和宁夏枸杞鲜果与干果中多酚类物质代谢物含量的比值
Fig 3 Compositional characteristics for polyphenolic compounds in the fresh and dried fruits of two kinds of *Lycium*

此外, 咖啡酸、香草酸和芥子酸等酚酸物质的同分异构体, 肉桂酰-腐胺和矮牵牛色素-二糖-咖啡酰-六碳糖只在黑果枸杞干果中可以检测到, 在宁夏枸杞干果中未检测到。宁夏枸杞中的绿原酸、酚酸酰胺类和花青素类等与抗氧化性及颜色^[2]相关的物质含量也显著低于黑果枸杞。宁夏枸杞中含量显著高于黑果枸杞的 N, N-二氢咖啡酰, 咖啡酰-亚精胺-六碳糖和 N, N-咖啡酰, 二氢咖啡酰-亚精胺-二六碳糖等物质的生理活性尚不明确, 有待进一步研究。然而, 上述结果表明, 2 种枸杞中所含多酚类物质存在物种与干燥程度依赖性, 这些依赖性可能与枸杞果实的药用与食用价值密切相关。

3 讨论

本文采用 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术, 系统地对黑果枸杞和宁夏枸杞干果和鲜果中所含多酚类代谢物进行了定性和定量研究, 共发现包括酚酸、酚酸酰胺和花青素共 3 类中的 35 种酚酸类物质。黑果枸杞和宁夏枸杞中多酚类物质的种类和含量具有物种依赖性。其中干果和鲜果中所含多酚类代谢物的种类和含量均有差异; 黑果枸杞和宁夏枸杞中所含多酚类代谢物的种类和含量也均有差异。特别值得指出的是, 酚酸酰胺在鲜果与干果、黑果枸杞与宁夏枸杞的含量有显著差别, 这类物质的药用及食用生理活性有待进一步深入研究。上述结果为深入研究 2 种枸杞中所含多酚类物质的生理活性提供了依据。

参·考·文·献

- [1] Wang Q, Zeng S, Wu X, et al. Interspecies developmental differences in metabolomic phenotypes of *Lycium ruthenicum* and *L. barbarum* fruits[J]. J Proteome Res, 2018, 17(9): 3223-3236.
- [2] Zeng S, Wu M, Zou C, et al. Comparative analysis of anthocyanin biosynthesis during fruit development in two *Lycium* species[J]. Physiol Plant, 2014, 150(4): 505-516.
- [3] Dong JZ, Lu DY, Wang Y. Analysis of flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L.[J]. Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64(3): 199-204.
- [4] 张雅莉, 黄晓旭, 蔡美琴. 枸杞多糖的抗氧化及缓解体力疲劳作用研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(6): 911-923.
- [5] 张雅莉, 黄晓旭, 黄珍茹, 等. 枸杞多糖及其配伍茶多酚缓解小鼠体力疲劳作用的研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(5): 661-665.
- [6] 张士青, 李建涛, 顾欣, 等. 枸杞对大鼠肾草酸钙结石生成的干预效果及其机制[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(12): 1477-1481.
- [7] Wu J, An Y, Yao J, et al. An optimised sample preparation method for NMR-based faecal metabolomic analysis[J]. Analyst, 2010, 135(5): 1023-1030.
- [8] Duan Y, An Y, Li N, et al. Multiple univariate data analysis reveals the insulin effects on the high-fat-diet induced metabolic alterations in rat myocardium and testicles in the preobesity state[J]. J Proteome Res, 2013, 12(7): 3480-3495.
- [9] Ho CT. Phenolic compounds in food [M] //Huang MT, Ho CT, Lee CY. Phenolic compounds in food and their effects on health [J]. Washington DC: American Chemical Society, 1992: 2-7.
- [10] Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses[J]. Food Chem, 2006, 99(1): 191-203.
- [11] Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention[J]. Nutr Cancer, 2010, 62(1): 1-20.
- [12] Qian D, Zhao Y, Yang G, et al. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae)[J]. Molecules, 2017, 22(6): 911.
- [13] Wu X, Li N, Li H, et al. An optimized method for NMR-based plant seed metabolomic analysis with maximized polar metabolite extraction efficiency, signal-to-noise ratio, and chemical shift consistency[J]. Analyst, 2014, 139(7): 1769-1778.
- [14] Liu C, Ding F, Hao F, et al. Reprogramming of seed metabolism facilitates pre-harvest sprouting resistance of wheat[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20593.
- [15] Liu C, Hao F, Hu J, et al. Revealing different systems responses to brown planthopper infestation for pest susceptible and resistant rice plants with the combined metabolomic and gene-expression analysis[J]. J Proteome Res, 2010, 9(12): 6774-6785.
- [16] Liu C, Du B, Hao F, et al. Dynamic metabolic responses of brown planthoppers towards susceptible and resistant rice plants[J]. Plant Biotechnol J, 2017, 15(10): 1346-1357.
- [17] 石东里. 枣品种果实干物质和含水量的测定与比较[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(1): 17-18.
- [18] Mattoo AK, Sobolev AP, Neelam A, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions[J]. Plant Physiol, 2006, 142(4): 1759-1770.
- [19] Wu T, Lv H, Wang F, et al. Characterization of polyphenols from *Lycium ruthenicum* fruit by UPLC-Q-TOF/MS^E and their antioxidant activity in Caco-2 cells[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(11): 2280-2288.
- [20] Jin HL, Liu YF, Yang F, et al. Characterization of anthocyanins in wild *Lycium ruthenicum* Murray by HPLC-DAD/QTOF-MS/MS[J]. Anal Methods-Uk, 2015, 7(12): 4947-4956.
- [21] Yossa Nzeuwa I B, Xia Y, Qiao Z, et al. Comparison of the origin and phenolic contents of *Lycium ruthenicum* Murr. by high-performance liquid chromatography fingerprinting combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and chemometrics[J]. J Sep Sci, 2017, 40(6): 1234-1243.
- [22] Tian Z, Aierken A, Pang H, et al. Constituent analysis and quality control of anthocyanin constituents of dried *Lycium ruthenicum* Murray fruits by HPLC-MS and HPLC-DAD[J]. J Liq Chromatogr Rel Technol, 2016, 39(9): 453-458.
- [23] Dong X, Gao Y, Chen W, et al. Spatiotemporal distribution of phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice[J]. Mol Plant, 2015, 8(1): 111-121.
- [24] Moheb A, Ibrahim RK, Roy R, et al. Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation[J]. Phytochemistry, 2011, 72(18): 2294-2307.
- [25] Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, et al. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*[J]. Planta, 2009, 230(3): 517-527.
- [26] 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.
- [27] Dai H, Xiao C, Liu H, et al. Combined NMR and LC-MS analysis reveals the metabolomic changes in *Salvia miltiorrhiza* Bunge induced by water depletion[J]. J Proteome Res, 2010, 9(3): 1460-1475.

[收稿日期] 2018-09-27

[本文编辑] 张慧俊