

无患子科植物荔枝和龙眼中白坚木皮醇的测定

王惠聪, 吴子辰, 黄旭明, 胡桂兵, 陈厚彬

(华南农业大学 园艺学院 南方果树生理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:利用气-质联用(GCMS)和液-质联用(HPLC-ESI-MS)技术,在我国原产和主栽的无患子科(Sapindaceae)果树荔枝 *Litchi chinensis* 和龙眼 *Dimocarpus longan* 中检测到丰富的白坚木皮醇,在‘黑叶’荔枝的叶片、树皮、果皮、果肉和种子中,其白坚木皮醇质量分数分别达到7.7、4.6、10.8、1.6和9.6 g·kg⁻¹,‘储良’龙眼中其白坚木皮醇质量分数分别达到7.6、7.3、5.6、6.3和5.6 g·kg⁻¹,同时比较了不同荔枝品种假种皮白坚木皮醇含量的差异,并探讨了利用荔枝和龙眼栽培和加工废弃物提取市场价值高的白坚木皮醇的可行性。

关键词:无患子科;荔枝;龙眼;白坚木皮醇

中图分类号:S667.1 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)03-0315-05

Determination of Quebrachitol *Litchi chinensis* and *Dimocarpus longan* in Sapindacea Family

WANG Huicong, WU Zichen, HUANG Xuming, HU Guibing, CHEN Houbin
(Physiological Laboratory of the South China Fruits, College of Horticulture, South China
Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:Quebrachitol is one of the naturally occurring bioactive inositol stereoisomers, which can be used to synthesize nontoxic chiral medicine for cancer, Alzheimer’s disease, diabetes, etc. In the present study, abundant quebrachitol was identified in Sapindaceae fruit crops, *Litchi chinensis* and *Dimocarpus longan* using GCMS and HPLC-ESI-MS. High concentrations of quebrachitol were detected in the leaf, bark, pericarp, aril and seed of the species. In litchi cv. Heiye, their concentrations were 7.7, 4.6, 10.8, 1.6 and 9.6 g·kg⁻¹, respectively. In longan cv. Chuliang, their concentrations were 7.6, 7.3, 5.6, 6.3 and 5.6 g·kg⁻¹, respectively. Quebrachitol concentrations in the aril of twelve litchi cultivars were surveyed. The possible use of the residue from litchi and longan processing for quebrachitol isolation was also discussed.

Key words:Sapindacea; litchi; longan; quebrachitol

白坚木皮醇(Quebrachitol, 2-methyl-L-inositol)起名于白坚木(Quebracho),最早由法国科学家 Tan-ret^[1]从南美洲居民用来治病的白坚木的树皮提取液中分离出来.随后在巴西橡胶 *Hevea brasiliensis* 的胶乳中也发现较高含量的白坚木皮醇^[2].相关研究表明肌醇类化合物在细胞内部信息识别和传输以及控制细胞生长过程等方面有重要作用^[3].白坚木皮醇

因具有独特的手性结构受到生物、药物和医学界的广泛关注.众多研究者利用具有旋光性的天然产物白坚木皮醇为植物药物原料,简单而方便地合成无毒、无害而有特效的手性药物,用于治疗癌症、早老期痴呆症、糖尿病和艾滋病等疾病^[4-6].据邓瑶筠^[7]报道,白坚木皮醇也可作为治疗、保健等药物,如在美容护肤膏、洗发香波、洗澡香皂中加入一定量的白

坚木皮醇,使用后可令人体肌肤滋润、光泽、去皱纹和增加弹性;此外白坚木皮醇还具有清除氧自由基的特殊功效。

目前除在大量经济栽培的巴西橡胶中发现含量较高的白坚木皮醇外,在其他一些植物也发现白坚木皮醇,如无患子科的毛瓣无患子 *Sapindus rarak*^[8] 和拉丁美洲土著树种 *Allophylus edulis* ‘Chal Chal’^[9],夹竹桃科的 *Dipladenia martiana*^[10] 等。据 Kiddle^[5] 的报道,已在 11 个科的植物中发现含有白坚木皮醇。荔枝 *Litchi chinensis* 和龙眼 *Dimocarpus longan* 是原产我国的无患子科亚热带常绿果树,栽培历史悠久,我国是世界第一大生产国,荔枝面积约为 60 万 hm^2 ,产量超过 150 万 t,分别占世界荔枝总面积的 84.5% 和荔枝总产量的 70.5%;龙眼面积约为 46 万 hm^2 ,产量 94 万 t,分别占世界龙眼总面积的 73.6% 和龙眼总产量的 59.7%^[11]。荔枝和龙眼各器官作为中药在我国广泛使用,如荔枝树皮可舒肝解郁、祛风健胃;叶可解暑消滞、收湿敛疮;果壳可治血崩;果核则有行气散结、祛寒止痛之功效^[12];据《滇南草本图说》记载,龙眼核可止血、定痛、理气、化湿,荔枝核则有降血糖的功效^[13-14]。白坚木皮醇带甜味,甜度比蔗糖略低,不会引起血糖升高,荔枝和龙眼各器官中丰富的白坚木皮醇与它们所表现的各功效的关系有待进一步的研究。

本研究采用气相色谱-质谱联用仪(GCMS)和液相色谱-电喷雾离子阱-质谱(HPLC-ESI-MS)技术,确定荔枝和龙眼中含有的肌醇甲醚是白坚木皮醇,并采用普通的 HPLC-RID 技术测定了荔枝和龙眼不同组织器官和不同品种荔枝果肉中白坚木皮醇含量。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料为我国重要的亚热带常绿果树荔枝和龙眼的主栽品种。荔枝品种为‘黑叶’,龙眼品种为‘储良’,在‘黑叶’荔枝(6月15日)和‘储良’龙眼(7月15日)果实成熟时分别取它们的叶片、树皮、果皮、果肉和种子等 5 个不同的器官或组织。另在荔枝果实商品成熟时,分别取‘黑叶’、‘妃子笑’、‘白蜡’、‘白糖罂’、‘桂味’、‘糯米糍’、‘怀枝’、‘灵金香荔’、‘大丁香’、‘紫娘喜’、‘无核荔’和‘库林’12 个品种的果肉。用液氮带回实验室,贮藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 白坚木皮醇的 GCMS 检测

样品的提取和测定条件参照 Lisec 等^[15] 报道的

方法,取液氮研磨的样品粉末(约 100 mg)于 2 mL 离心管,加入体积分数为 75% 的甲醇 1.40 mL 和 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的山梨醇 100 μL 作为内标,70 $^{\circ}\text{C}$ 震荡提取 30 min,提取液在 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min,上清液加入 2 mL 氯仿去杂质,取 5 μL 上层提取液,减压蒸干,先后加入甲酰胺盐酸盐(Methoxyamine hydrochloride, Sigma 226904)和 N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, MSTFA, Sigma 69479)衍生后上机测定。气相色谱-质谱联用仪采用 Agilent 7890A GC/5795C MS (Agilent technology, Palo Alto, CA, USA),毛细管柱为 DB-5MS (20 m $\times$ 0.18 mm $\times$ 0.18 μm) 和 5 m 长的 Duraguard column,在 230 $^{\circ}\text{C}$ 非裂解模式下进样,进样量为 1 μL ,氮载气流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,温度程序为:0~2.471 min 70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,随后按 10.1 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 增加至 330 $^{\circ}\text{C}$,在最后的 12.5 min 保持 330 $^{\circ}\text{C}$,测定结束后尽快降温,下一次进样前,系统在 70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min,质谱以 5.6 scans $\cdot \text{s}^{-1}$ 在 m/z 50~600 范围扫描,运输线温度和离子源的温度分别为 250 和 230 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 白坚木皮醇的 HPLC-ESI-MS 定性检测和 HPLC-RID 定量测定

HPLC-ESI-MS 分析采用 Agilent 1200 HPLC/6410B TripleQuad MS (Waldbronn, Germany),色谱柱为 Agilent NH2 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm),流动相为 V(乙腈):V(水)=7:3,流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。使用 ESI 源,喷雾电压 5.0 kV,加热毛细管温度 250 $^{\circ}\text{C}$,鞘气为 N_2 ,采用负离子模式,扫描范围为 m/z 50~2 000。白坚木皮醇标样购买自 Sigma-aldrich(S404551)。

白坚木皮醇含量的 HPLC-RID 测定使用 Agilent 1200 HPLC system (Agilent technologies, Waldbronn, Germany),配有示差检测器、柱温箱。取 1 g 样品于微波炉杀酶 30 s 后,加入 5 mL 体积分数为 90% 的乙醇,匀浆,重复提取 2 次,合并上清液,上清液减压蒸干后加入纯水,在 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min,上清液过 C_{18} 小柱后上机测定。使用 Coregel 87 C (Transgenomic CHO-99-5860) 色谱柱,流动相为纯水,流速 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 80 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 荔枝果皮和叶片中含有白坚木皮醇

本研究利用气相色谱质谱联用仪(GCMS)分析荔枝果皮、种子和果肉的代谢产物谱时,发现样品的总离子流中 15.609 min 处有荔枝样品的特有峰,在

番茄和苹果叶片样品中均无该峰存在,通过对该峰进行质谱分析,结果显示该物质相对分子质量 194,化学结构上属于肌醇甲醚,谱图与谱库中的 *D*-松醇相似性达 95%,但出峰时间较 *D*-松醇早 0.5 min 左右,初步确定该组分为 *D*-松醇的同分异构体(图 1). 通过查阅资料,推测可能是 *D*-松醇的几何异构体红杉醇或白坚木皮醇,标样比对结果表明,质谱图和出峰时间与白坚木皮醇一致. 由于手性异构体分离的复杂性,随

后进行了 HPLC-ESI-MS 印证,在 *D*-松醇、红杉醇和白坚木皮醇 3 种几何异构体中,只有白坚木皮醇的出峰时间与荔枝样品相吻合,确证了荔枝样品中的肌醇甲醚为白坚木皮醇(图 2). 随后,我们采用本研究室拥有的 Angilent 1200 HPLC system 和 Coregel 87 C (Transgenomic CHO-99-5860) 色谱柱分析了荔枝叶片样品,发现在 11 min 处的出峰与标样的出峰时间相吻合,峰值比 7.8 min 处出峰的蔗糖高(图 3).

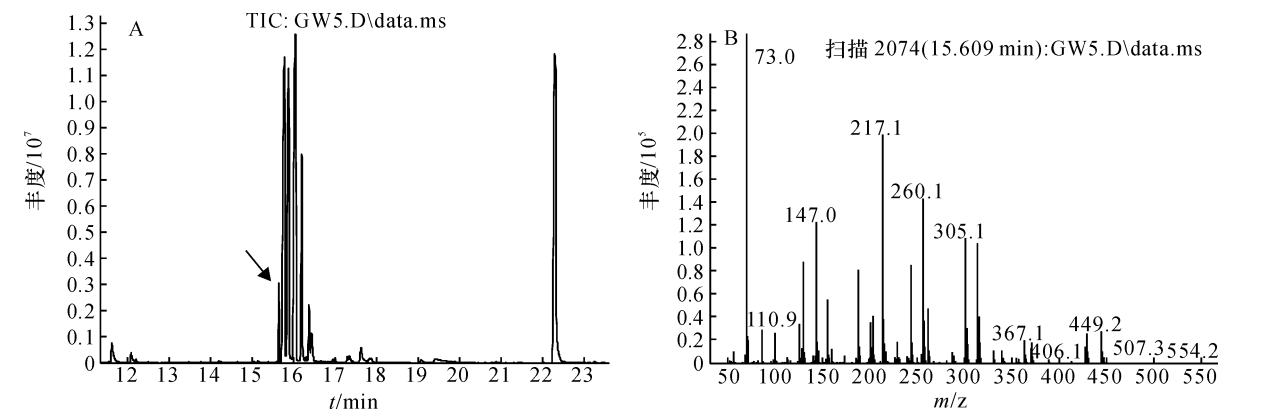


图 1 荔枝果皮提取物 GC-MS 总离子流谱图(A)和 15.609 min 处峰的质谱图(B)

Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram of extract from litchi pericarp (A) and mass spectrum of the peak at 15.609 min (B)

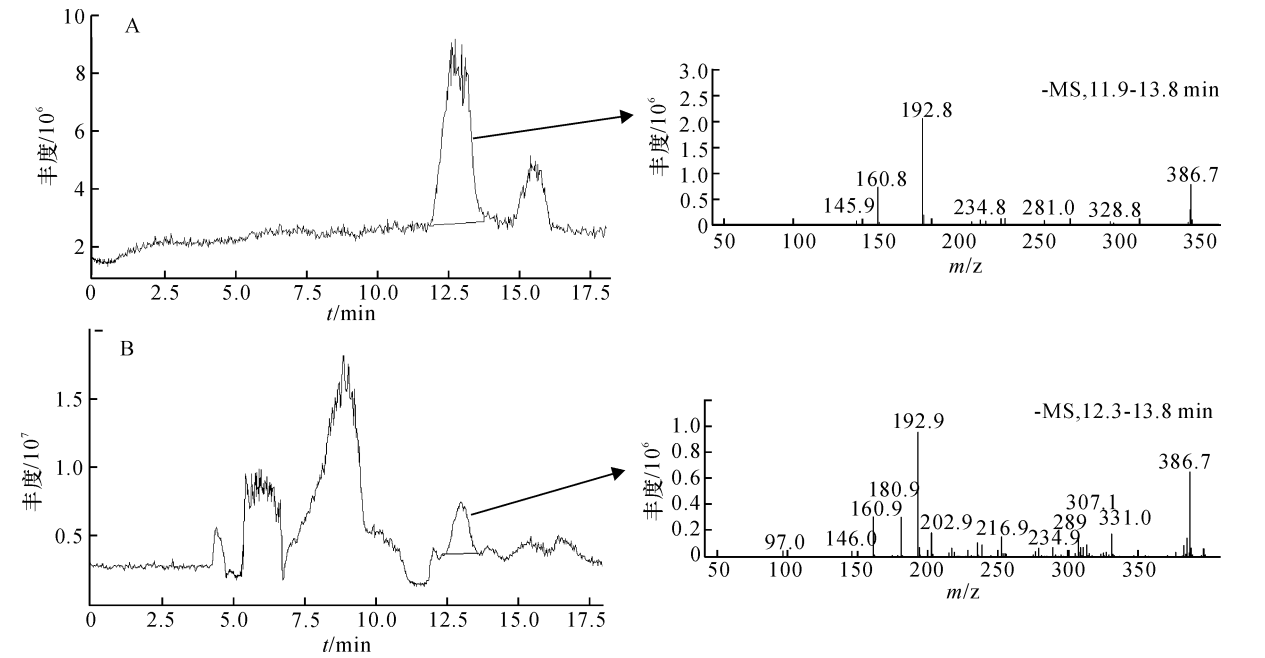


图 2 白坚木皮醇标样(A)和荔枝果皮提取物(B)HPLC-ESI-MS 谱图

Fig. 2 HPLC-ESI-MS spectrogram of quebrachitol (A) and extract from litchi pericarp (B)

2.2 荔枝和龙眼各组织中白坚木皮醇的含量

采用 HPLC-RID 技术在荔枝和龙眼的叶片、树皮和果实的各组织均检测到了丰富的白坚木皮醇,荔枝和龙眼各器官白坚木皮醇质量分数介于 1.6 ~ 10.8 g · kg⁻¹(表 1),不同器官或组织之间白坚木皮醇含量有明显的差异,‘黑叶’荔枝中果皮和种子的白坚木皮醇质量分数分别为(10.8 ± 1.02)和(9.6 ± 0.87)

g · kg⁻¹,明显高于其他器官或组织,‘黑叶’荔枝叶片中的白坚木皮醇也较高,达(7.7 ± 0.68) g · kg⁻¹,而果肉中的白坚木皮醇质量分数最低,仅(1.6 ± 0.14) g · kg⁻¹;‘储良’龙眼各器官白坚木皮醇含量的差异较小,叶片的白坚木皮醇质量分数最高,为(7.6 ± 1.01) g · kg⁻¹,其次是树皮,随后是果肉、果皮和种子.

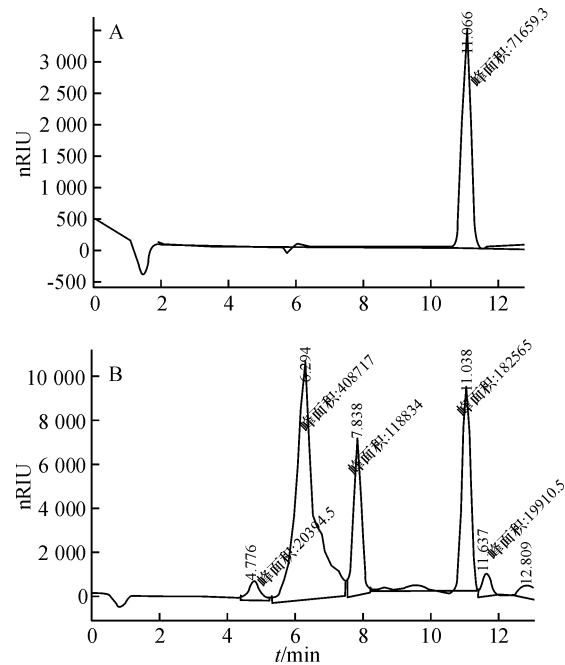


图 3 白坚木皮醇标样(A)和荔枝叶片提取物(B)HPLC-RID 谱图

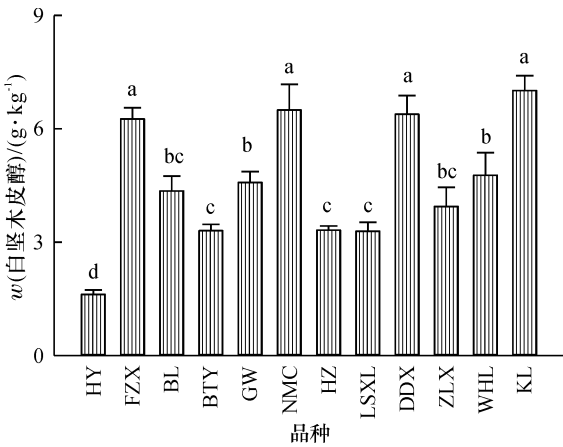
Fig.3 Chromatogram of quebrachitol standard (A) and extract from litchi leaf (B)

表 1 荔枝和龙眼各器官或组织白坚木皮醇含量
Tab.1 Concentrations of qeubrachitol in different organs or tissues of litchi and longan

样品	器官	$w(\text{白坚木皮醇})/(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
‘黑叶’荔枝	叶片	7.7 ± 0.68
	树皮	4.6 ± 0.45
	果皮	10.8 ± 1.02
	果肉	1.6 ± 0.14
	种子	9.6 ± 0.87
‘储良’龙眼	叶片	7.6 ± 1.01
	树皮	7.3 ± 0.94
	果皮	5.6 ± 0.32
	果肉	6.3 ± 0.52
	种子	5.6 ± 0.98

2.3 不同品种荔枝果肉白坚木皮醇含量比较

如图 4 所示,不同品种荔枝果肉(即假种皮)中白坚木皮醇含量有较大的差异,质量分数介于 $1.6 \sim 7.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,‘妃子笑’、‘糯米糍’、‘大丁香’和‘库林’的白坚木皮醇质量分数在 $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上,明显高于‘黑叶’、‘白糖罂’、‘怀枝’、‘灵山香荔’等品种,‘白蜡’、‘桂味’、‘猪母乳’和‘无核荔’果肉白坚木皮醇质量分数中等,在 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右.



HY: ‘黑叶’;FZX: ‘妃子笑’;BL: ‘白蜡’;BTY: ‘白糖罂’;GW: ‘桂味’;NMC: ‘糯米糍’;HZ: ‘怀枝’;LSXL: ‘灵山香荔’;DDX: ‘大丁香’;ZLX: ‘紫娘喜’;WHL: ‘无核荔’;KL: ‘库林’. 柱子上方凡具有一个相同英文字母者,表示差异不显著($P>0.05$,Duncan’s 法, $n=3$).

图 4 12 个不同荔枝品种假种皮中白坚木皮醇含量
Fig.4 Concentrations of quebrachitol in the aril of twelve litchi cultivars

3 讨论与结论

巴西橡胶中的白坚木皮醇约占胶乳质量的 $0.2\% \sim 1.2\%$,目前,从巴西橡胶胶乳提取出来的白坚木皮醇,广泛用于制药工业,合成无毒、无害而有特效的手性肌醇衍生物药物^[5,7]. 由于巴西橡胶胶乳中存在许多干扰物质,如甲氧基右旋肌醇、甲氧基外消旋肌醇、双甲氧基外消旋肌醇和外消旋肌醇等,因此提取难度较大,存在提取工艺繁杂、纯度不高等问题^[16]. 本研究中荔枝和龙眼各器官中的白坚木皮醇质量分数介于 $1.6 \sim 10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,与目前开发利用的橡胶胶乳相近,此外 GCMS 的结果显示,荔枝和龙眼各器官中可检测到少量的肌醇($<0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),肌醇甲醚的种类单一,在提取时不存在同分异构体互相干扰的问题(未发表数据). 目前本课题组已建立一种利用溶剂回流提取并纯化白坚木皮醇的方法,该方法以干燥荔枝果皮和种子为原料,经粉碎、提取、浓缩、回流溶解等过程,获得纯度 $\geq 97\%$ 的白坚木皮醇高纯品(专利申请号为 201110038349.0).

荔枝和龙眼在制汁和酿酒等加工过程中,加工废弃物果皮、果渣和种子的占比达 50% 以上. 果皮和种子中白坚木皮醇含量高,且其他可溶性糖含量较低,干扰物质少,原料容易获得,可作为白坚木皮醇提取的良好材料. 利用这些加工废弃物提取市场价值高的白坚木皮醇,将对荔枝和龙眼加工具有很大的推动作用,有助于解决荔枝和龙眼产业面临的困境,提高荔枝、龙眼产业的经济效益.

肌醇类作为微量成分在植物中广泛存在,其中

的某些成分对人类表现出正面的生理作用^[17-18]。肌醇(Myoinositol)含量和肌醇与果糖的比值是判断橙汁质量的一个重要指标^[19]。Sanz等^[20]分析了18种水果果肉中的肌醇类物质含量,发现除香蕉和红加仑不含肌醇以外,其他水果果肉的肌醇质量分数介于痕量至 $1.53\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。荔枝和龙眼的假种皮是可食部分,假种皮中存在肌醇类物质的多寡也将影响它们的食用品质。经检测发现荔枝、龙眼假种皮中存在的肌醇类主要是2-甲基-L-肌醇(白坚木皮醇),不同荔枝品种假种皮中的白坚木皮醇质量分数介于 $1.6\sim7.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,明显高于其他水果种类。

致谢:感谢美国康奈尔大学园艺系 Lailiang Cheng 教授在样品 GCMS 鉴定过程中提供的帮助!感谢中国广州分析测试中心在 HPLC-ESI-MS 鉴定过程中提供的帮助!

参考文献:

- [1] TANRET C. Sur un nouveau principe immédiat de L'ergot de seigle, l'ergostérine[J]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1889, 109(3): 908.
- [2] MCGAVACK J, BINMORE D B. Method for recovering quebrachitol from rubber latex serum:US, 1758616 [P]. 1930-05-13.
- [3] LAU C M. New materials from natural rubber serum[C]//ALLEN P W. Proc IRRDB Symposium:VII. UK: Brickendonburv, 1993: 70-74.
- [4] TEGGE W, BALLOU C. Chiral syntheses of D- and L-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1989, 86(1): 94-98.
- [5] KIDDLE J J. Quebrachitol: A versatile building block in the construction of naturally occurring bioactive materials[J]. Chem Rev, 1995, 95(6): 2189-2202.
- [6] YAMAGUCHI J, HAYASHI Y. Syntheses of fumagillin and ovalicin[J]. Chem Eur J, 2010, 16(13): 3884-3901.
- [7] 邓瑶筠. 制药工业崭新的原料白坚木皮醇的特性及其利用[J]. 中草药, 1997, 28(8): 500-502.
- [8] CHUNG M S, KIM N C, LONG L, et al. Dereplication of saccharide and polyol constituents of candidate sweet-tasting plants: Isolation of the sesquiterpene glycoside mukurozioside IIb as sweet principle of *Sapindus rarak* [J]. Phytochem Analysis, 1997, 8(2): 49-54.
- [9] DÍAZ M, GONZÁLEZ A, CASTRO-GAMBOAL I, et al. First record of L-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae) [J]. Carbohydr Res, 2008, 343(15): 2699-2700.
- [10] de CARVALHO M G, CRANCHI D C, KINGSTON D G, et al. Proposed active constituents of *Dipladenia martiana* [J]. Phytother Res, 2001, 15(8): 715-717.
- [11] 李建国. 荔枝学[M]. 北京:中国农业出版社, 2008:1-5.
- [12] 杨燕, 义祥辉, 陈全斌, 等. 荔枝核对 HBsAg 和 HBeAg 的体外抑制作用[J]. 化工时刊, 2001, 15(7): 24-26.
- [13] 吴清和, 梁颂名, 李育浩, 等. 中医治疗糖尿病单方验方的筛选研究[J]. 广州中医学院学报, 1991, 8: (2/3): 218-223.
- [14] 潘竞锵, 刘惠纯, 刘广南, 等. 荔枝核降血糖、调血脂和抗氧化的实验研究[J]. 广东药学, 1999, 9(1): 47-50.
- [15] LISEC J, SCHAUER N, KOPKA J, et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants[J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 387-396.
- [16] 敖宁建. 橡胶树高价值副产物资源:白坚木皮醇的开发利用[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(4): 467-473.
- [17] NESTLER J E, JAKUBOWICZ D J, REAMER P, et al. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome[J]. N Engl J Med, 1999, 340(17): 1314 - 1320.
- [18] MCLAURIN J, GOLOMB R, JUREWICZ A, et al. Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of *Alzheimer amyloid* b-peptide and inhibit a b-induced toxicity [J]. J Biol Chem, 2000, 275(24): 18495-18502.
- [19] VILLAMIEL M, MARTÍNEZ-CASTRO I, OLANO A, et al. Quantitative determination of carbohydrates in orange juice by gas chromatography[J]. Z Lebensm Unters Forsch A, 1998, 206(1): 48-51.
- [20] SANZ M L, VILLAMIEL M, MARTINEZ-CASTRO I. Inositol and carbohydrates in different fresh fruit juices[J]. Food Chem, 2004, 87(3): 325-328.

【责任编辑 李晓卉】