

牡丹籽中苦味成分的分离与鉴定

曹康宁, 彭帮柱*

(华中农业大学食品科学技术学院 武汉 430070)

摘要 牡丹籽中苦味物质成分不清,限制了牡丹籽的综合开发和高效利用。本研究采用有机溶剂萃取与感官评价相结合的方法,利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-HRMS)对牡丹籽中的苦味物质进行分离与鉴定。结果表明:牡丹籽样品先、后经正己烷、柠檬酸水溶液提取、正丁醇萃取,再经 AB-8 大孔树脂纯化后得到 5 个组分:F-II-1-MR1,F-II-1-MR2,F-II-1-MR3,F-II-1-MR4,F-II-1-MR5;经感官评价筛选出 2 个苦味组分:F-II-1-MR2,F-II-1-MR3;用 UPLC-HRMS 对苦味组分进行分析与鉴定,共鉴定出 24 种化合物,包括单萜苷类 7 种,如芍药苷;黄酮类 7 种,如木犀草素;芪类 2 种,如白藜芦醇;脂肪酸类 6 种,如 9,12,13-三羟基-10,15-十八碳二烯酸;有机酸类 1 种,为苯甲酸。其中,芍药苷类是牡丹籽苦味提取物中得率最高的成分,也是牡丹籽中主要苦味化合物。

关键词 牡丹籽;苦味成分;超高效液相色谱;高分辨质谱;溶剂萃取;感官评价

文章编号 1009-7848(2023)06-0294-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.030

牡丹作为中国传统的“药食两用”植物,其花和根具有清热解毒、活血化痰等功效,是药用主体。牡丹籽是药用植物牡丹花的种子,一直作为中药材丹皮的副产物被丢弃,尚未得到合理的利用。近年来,有学者的研究表明,牡丹籽中营养成分较高,含有丰富的不饱和脂肪酸资源,其中 α -亚麻酸的含量高达 43%,约是橄榄油的 80 倍、菜籽油的 5 倍^[1],具有抗衰老、抗真菌、抗发炎及预防心血管疾病的作用^[2-5]。此外,牡丹籽中还含有萜类^[6-7]、芪类^[8-9]、黄酮类^[9]等成分,具有巨大的开发潜力。

自 2011 年牡丹籽油被列为新资源食品后,牡丹籽的开发利用受到广泛关注。目前市场上牡丹籽的产品仍以籽油为主,其它相关食品未见报道。原因可能是牡丹籽具有苦味,易引起牡丹籽油及其产品的苦涩味,因此限制了其加工利用。至今,对牡丹籽的研究主要集中于牡丹籽中营养成分及生理功能研究,对其苦味物质研究较少。鉴于此,本研究采用有机溶剂萃取与感官评价相结合的方法,利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-HRMS)对牡丹籽中的苦味物质进行分离与鉴定,以期对牡丹籽苦味成分解析

和脱苦机制研究与开发利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油用牡丹籽,在 2020 年 10 月上旬采摘于湖北省宜昌市某产业园区,颗粒饱满,成熟充分。

分析级氢氧化钠、正己烷、正丁醇、乙醇、盐酸奎宁,购买于国药集团化学试剂有限公司;色谱级甲酸、乙腈,购于武汉弗顿科技有限公司;食品级柠檬酸,购于商丘耕道电子商务有限公司;AB-8 大孔吸附树脂,购于源叶生物有限公司。

1.2 仪器与设备

SB-400 DTY 超声清洗机,购于宁波新芝生物科技股份有限公司;LGJ-10 真空冷冻干燥机,购于北京松源华兴科技发展有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,购于上海亚荣生化仪器厂;电热鼓风干燥箱,购于上海一恒科学仪器有限公司;Thermo QE PLUS 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱、Ulti-Mate 3000 高效液相色谱仪,购于美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 牡丹籽前处理 将脱壳后的牡丹籽按料液比 1:5(m/V)置于质量浓度为 0.004 g/mL、温度为 100 °C NaOH 溶液中,热烫处理 3 min,玻璃棒搅拌去皮后用清水洗净。将去皮牡丹籽置于 60 °C 热

收稿日期:2022-06-23

基金项目:中央高校科研基础业务费(2662022SPPY001)

第一作者:曹康宁,女,硕士

通信作者:彭帮柱 E-mail: bzpeng@mail.hazu.edu.cn

风干燥至恒重,粉碎后备用。

1.3.2 正己烷和水溶液浸提 称取处理好的牡丹籽粉末 50 g,用 250 mL 正己烷室温浸提 4 次。每次浸提 12 h,合并滤液后真空旋转蒸发获得组分 F-I,残渣放于 60 °C 热风干燥 12 h。

将残渣按照料液比为 1:20(m/V)置于 50 °C、pH 值为 4 的柠檬酸水溶液中,超声处理 6 h,功率为 350 W,频率为 40 kHz。将脱苦处理的上清液真空旋转蒸发浓缩,冷冻干燥后获得组分 F-II;超声处理后残渣经 60 °C 热风干燥 12 h,获得组分 F-III。

1.3.3 正丁醇萃取 将组分 F-II 用蒸馏水溶解至 100 mL 后,用 100 mL 饱和正丁醇溶液萃取 3 次,合并正丁醇萃取部分,70 °C 真空旋转蒸发浓缩后冷冻干燥,获得 F-II-1 组分;水相部分 70 °C 真空旋转蒸发浓缩后冷冻干燥,获得组分 F-II-2。

1.3.4 大孔树脂纯化 AB-8 大孔树脂经预处理^[9]后,采用湿法装柱填充到层析柱(30 mm×200 mm)中,填充量为 50 mL。将 F-II-1 组分溶解于 10 mL 蒸馏水并上样至 AB-8 大孔树脂层析柱中,依次用蒸馏水、30%乙醇、50%乙醇、75%乙醇、100%乙醇进行梯度洗脱,洗脱速度为 4 mL/min,洗脱体积为 10 倍柱体积(500 mL)。收集洗脱液,真空旋转蒸发浓缩后冷冻干燥,获得组分 F-II-1-MR1、F-II-1-MR2、F-II-1-MR3、F-II-1-MR4 和 F-II-1-MR5。

1.3.5 感官评价方法 筛选 7 位(4 女 3 男)经苦味感官训练的人员进行评价,年龄在 20~35 岁之间。以盐酸奎宁溶液为参考评估苦味强度(表 1),将 1 mL 不同浓度的盐酸奎宁溶液呈现给带鼻夹的感官小组成员,并要求在口中短暂旋转样品,然后将其吐出,用蒸馏水漱口。

组分 F-I 和 F-III 直接感官评定外,其余组分用 4%的乙醇溶液溶解并定容至 200 mL,然后用于感官评价。感官小组成员以盐酸奎宁溶液为参照,在 0~10 之间评价苦味^[11]。本次感官分析采用

的溶剂水均为蒸馏水,采用 3 位数随机标注样品编号,试验样品感官评定重复 3 次,每次间隔 10 min。

1.3.6 苦味得率的计算 苦味组分得率按照公式(1)进行计算。

$$\text{苦味组分得率}(\%) = \frac{X}{X_0} \times 100 \quad (1)$$

式中:X——苦味组分质量,g;X₀——牡丹籽粉末质量,g。

1.3.7 液相色谱-质谱分析

1.3.7.1 液相色谱分析条件 将苦味组分 F-II-1-MR2 和 F-II-1-MR3 分别用超纯水和 50%乙醇溶解,过 0.22 μm 滤膜,备用。采用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 nm×100 nm,1.8 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B);流速 0.3 mL/min;进样量 1 μL;柱温 30 °C;洗脱梯度:0~5 min,5%~10%(B);5~25 min,10%~45%(B);25~30 min,45%~75%(B);30~35 min,75%~95%(B);35~36 min,95%~5%(B);36~40 min,5%(B)。

1.3.7.2 质谱分析条件 采用电喷雾离子源(ESI);扫描模式:负离子模式;扫描范围:m/z 80~1 200;毛细管电压:2 500 V;锥孔电压:440 V;干燥气温度:350 °C;干燥气流速:600 L/h;碎裂电压:30 和 50 eV。

1.3.8 数据处理 试验结果用平均值±标准差表示,重复 3 次。用 Origin 2018 软件对数据进行处理绘图。

2 结果与分析

2.1 感官评价及苦味得率结果

各组分物质的苦味分值及得率见表 2。

正己烷提取组分 F-I 为油状层,除去挥发溶剂后经感官品尝无苦味,该提取物为牡丹籽油。正己烷残渣经水提获得的组分 F-II 苦味加重,而水提残渣 F-III 无明显苦味,说明 pH = 4 的水溶液能够有效提取牡丹籽中的苦味物质。用饱和正丁醇进一步萃取组分 F-II,获得正丁醇组分 F-II-1 和水层组分 F-II-2,且组分 F-II-2 显示出甜味,说明牡丹籽苦味物质聚集在正丁醇层 F-II-1 中。通过 AB-8 大孔树脂对正丁醇组分 F-II-1 进

表 1 苦味评分等级及分值

苦味等级	不苦	较苦	苦
奎宁质量浓度/g·L ⁻¹	0.2	6	20
苦味分值	0	5	10

表2 感官评价结果及苦味组分得率
Table 2 Sensory evaluation results and the yield
of bitter components

组分	苦味分值	苦味组分得率/%
F-I	0	-
F-II	5.71 ± 0.24	11.82
F-III	0	-
F-II-2	0	-
F-II-1-MR1	0	-
F-II-1-MR2	7.56 ± 0.08	0.73
F-II-1-MR3	2.71 ± 0.16	0.004
F-II-1-MR4	0	-
F-II-1-MR5	0	-

注：“-”表示苦味分值为0，苦味得率未计算。

一步分离纯化,获得5个组分。组分F-II-1-MR1具有轻微甜味,未显示明显苦味;组分F-II-1-MR2是一种白色粉末状物质,得率最高,苦味程度最高;组分F-II-1-MR3是一种褐色粉末状物质,也具有苦味;F-II-1-MR4和F-II-1-MR5所得冻干量很少,经感官评价未显示出明显苦味。

经感官评价及得率可见,牡丹籽中的苦味物质主要集中在30%和50%乙醇洗脱液中,即组分F-II-1-MR2和组分F-II-1-MR3中,该方法实现了对牡丹籽中苦味组分的有效分离,获得了较高纯度的牡丹籽苦味组分,有利于下一步的分析与鉴定。

2.2 苦味组分鉴定

2.2.1 组分F-II-1-MR2鉴定 F-II-1-MR2为白色粉末,是苦味物质提取率最高的组分。采用UPLC-HRMS对其进行分析,共鉴定出7个化合

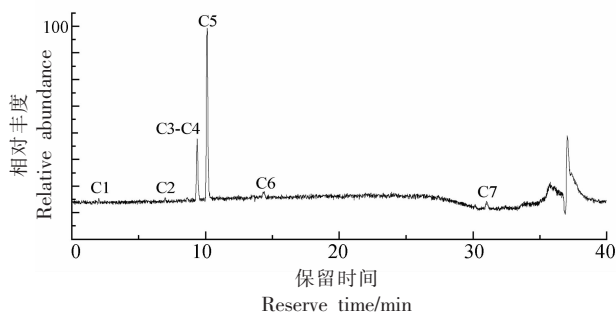


图1 组分F-II-1-MR2的总离子图

Fig.1 Total ion current chromatograms
of F-II-1-MR2

物,其中化合物C1-C6均为单萜类化合物,见表3。

化合物C1,保留时间为1.94 min,在 m/z 405.1396[M-H]⁻处产生分子离子峰,根据元素组成计算其分子式为C₁₆H₂₄O₉,在 m/z 359,197,178处存在3个二级质谱碎片。其中,分子离子 m/z 405.1396[M-H]⁻脱去一分子甲酸(46 u)得到 m/z 359[M-H-HCOO]⁻,碎片 m/z 197.08 [M-H-HCOO-Glu]⁻为去甲酸后再断裂失去1分子葡萄糖基获得,碎片 m/z 179 [M-H-HCOO-Glu-H₂O]⁻对应失去1分子水。经过对比保留时间和文献碎片^[12-13],初步断定化合物C1为牡丹酮1-O-β-D-葡萄糖苷。

化合物C2,保留时间为7.06 min,MS图显示该物质在 m/z 495.1505 [M-H]⁻处有分子离子峰,并在MS2质谱上存在碎片 m/z 495,465,281,165,137,推测其分子式为C₂₃H₂₈O₁₂。碎片 m/z 465 [M-H-CH₂O]⁻与分子离子差30 u,由分子脱去葡萄糖基上的甲氧基(30 u)获得, m/z 333[M-H-Glu]⁻与分子离子脱去一分子葡萄糖基有关,在 m/z 165处的碎片被鉴定为芍药苷类特征碎片——蒽烷基本骨架, m/z 137对应断裂后所剩的对羟基苯甲酸结构,与文献[14],[15]所述氧化芍药苷二级质谱碎片一致,结构式见图3a,故鉴定化合物C2为氧化芍药苷。

化合物C3、C5和C6的出峰时间分别在9.25,10.16和14.45 min,在ESI(-)模式下,出现强度不同的甲酸加和离子峰 m/z 525.1607 [M+HCOO]⁻,即均存在 m/z 479[M-H]⁻分子离子峰,推测为芍药苷及其异构体。其中,化合物C5的MS2质谱碎片分别为 m/z 449,327,165,121(见图2a),碎片 m/z 449[M-H-CH₂O]⁻由去甲酸分子 m/z 479[M-H]⁻失去葡萄糖基中的甲氧基(30 u)形成,继而失去1个苯甲酸(122 u)形成特征碎片 m/z 327[M-H-CH₂O-C₇H₆O₂]⁻; m/z 327[M-H]⁻丢失1分子葡萄糖基获得蒽烷基本骨架结构的碎片(m/z 165)^[15],最后蒽烷基本骨架断裂,脱去1个苯甲酰取代基,产生 m/z 121 [M-H]⁻离子碎片,与文献[16-17]所述芍药苷质谱裂解规律一致,结构式见图3b,确定化合物C5为芍药苷。根据出峰时间顺序,推断化合物C3可能为芍药内酯苷(离子碎片

见图2b, 结构式见图 3c), 化合物 C6 为牡丹皮苷I。

化合物 C4, 保留时间为 9.47 min, MS 图显示该物质具有 m/z 687.2128 [M-H]⁻ 离子碎片, MS2 图中含有特征碎片 m/z 593, 471, 323, 165, 121, 与分子式 $C_{30}H_{40}O_{18}$ 相对应。该物质具有单萜蒽烷骨架特征碎片 m/z 165, 推测其为芍药苷类物质。经与文献[18-19]碎片对比, 初步断定为异麦芽芍药苷(isomaltopaeoniflorin)。

化合物 C7, 保留时间为 31.04 min, MS 质谱图显示高丰度的碎片 m/z 265.16[M-H]⁻, 含有 N 元

素, 经 Xcalibur 软件计算该物质分子式为 $C_5H_{17}O_3N_{10}$ 。具体结构待进一步确定。

萜类化合物中具有内脂、内缩醛、糖苷键等可以形成螯合物而具有苦味。曹焯^[20]通过电子舌仿生技术对白芍药材样品和不同浓度芍药苷单体进行识别, 结果显示其滋味均显示苦味, 该结果与 Zhang 等^[21]报道一致。组分 F-Ⅱ-1-MR2 得率最高, 鉴定出的化合物中以芍药苷类为主, 推测芍药苷类化合物是牡丹籽的主要苦味成分。

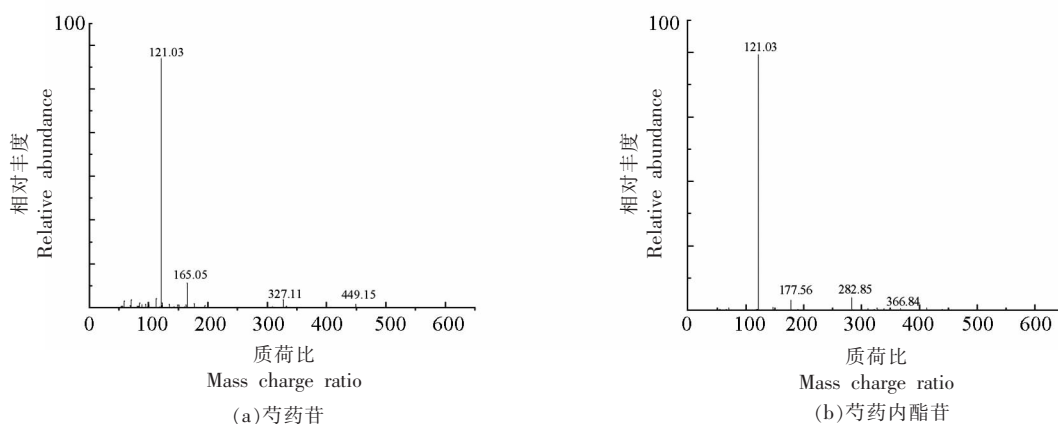


图 2 组分 F-Ⅱ-1-MR2 部分化合物的二级质谱图

Fig.2 MS2 spectra generated from some bitter compounds of F-Ⅱ-1-MR2

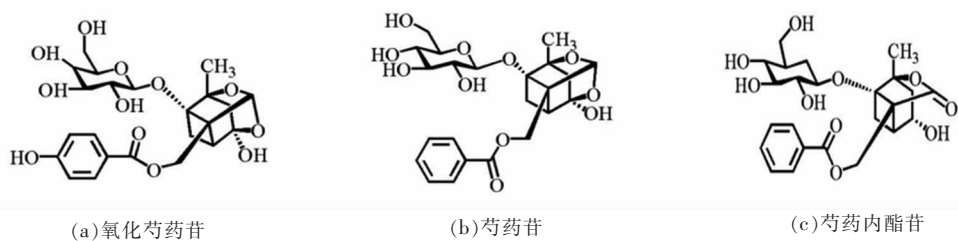


图 3 组分 F-Ⅱ-1-MR2 部分单萜苷类化合物的结构式

Fig.3 Structure of some monoterpenoid glycosides in F-Ⅱ-1-MR2

2.2.2 组分 F-Ⅱ-1-MR3 鉴定 从组分 F-Ⅱ-1-MR3 共鉴定出 21 种化合物, 化合物 C3、C5、C6 和 C7 也存在于 F-Ⅱ-1-MR2 组分中, 化合物中 C13 属于单萜类化合物, C15 为有机酸类, C17、C18 为芪类化合物, C19-C24 为三羟基脂肪酸类化合物, 其余均为黄酮类化合物, 见表 3。

化合物 C8, 保留时间为 11.02 min, MS 图显示该物质具有 m/z 597.1821 [M-H]⁻ 离子碎片, 推测

分子式为 $C_{27}H_{34}O_{15}$, 根据 ChemSpider 数据库匹配, 推测该物质为根皮素 3', 5'-Di-葡萄糖苷。

化合物 C9-C11 的分子质量和保留时间均不同, 但它们都具有木犀草素类特征碎片 m/z 285, 因此被鉴定为木犀草素糖苷类化合物。化合物 C9 的保留时间为 11.77 min, MS 图中存在高丰度碎片 m/z 655.1009 [M-H]⁻, 为该物质准分子峰, 确定分子式为 $C_{28}H_{32}O_{18}$ 。MS² 图中含有特征碎片 m/z

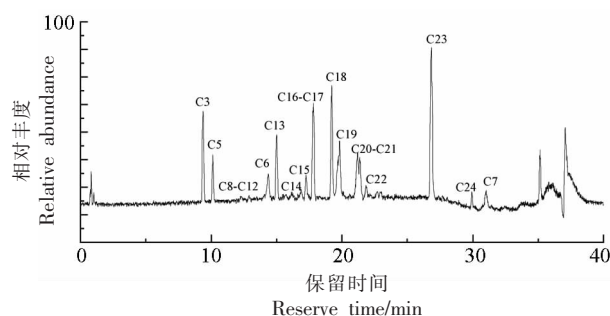


图4 组分 F-II-1-MR3 的总离子图

Fig.4 Total ion current chromatograms of F-II-1-MR3

447, 285, 151, 133, 推测其为木犀草苷类化合物。化合物 C10, 保留时间为 13.89 min, 在 m/z 477.1030 [M-H]⁻ 存在分子离子峰, 与分子式 $C_{22}H_{22}O_{12}$ 对应。基于其它离子片段 m/z 314, 285, 271, 257, 243, 151, 与 ChemSpider 数据库进行比对, 鉴定其为 6-甲氧基木犀草素-7-葡萄糖苷或异鼠李素 3-O-葡萄糖苷^[22]。其中 m/z 285 为苷元离子峰, 比分子离子 m/z 477.1030 [M-H]⁻ 少 192 u, 表明丢失 1 分子葡萄糖和 1 分子甲氧基。化合物 C11 保留时间为 13.93 min, 于 m/z 447.2593 [M-H]⁻ 处存在主离子峰, 经计算其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。其二级质谱出现质荷比为 285 苷元离子碎片, 由 m/z 447 [M-H-Glu]⁻ 失去 1 个葡萄糖基得到, 鉴定化合物 C11 为木犀草苷^[23]。

化合物 C12, 保留时间为 14.30 min, 在 ESI(-) 模式下, 其 MS 图中产生了一个 m/z 449.1082 [M-H]⁻ 的离子碎片, 对其二级质谱图下进行分析, 得到质荷比为 449, 287, 269, 151, 135 等碎片。其中, 碎片 m/z 449 失去 1 分子葡萄糖基得到 m/z 287.06 [M-H-Glu]⁻, 再失去 1 分子水得到 m/z 269.05 [M-H]⁻, 通过 RDA 裂解, 得到碎片 m/z 151.00 [M-H-Glu-H₂O-C₈H₆O]⁻ 和碎片 m/z 135.04 [M-H-Glu-H₂O-C₈H₆O-O]⁻。通过对比文献^[24]和 Pubchem 数据库, 初步鉴定为黄酮类物质马里昔 (marein)。

化合物 C13, 保留时间为 14.99 min, MS 图显示该物质在 m/z 509.1660 [M-H]⁻ 处产生主离子峰, 推测分子式为 $C_{24}H_{30}O_{12}$, 存在 MS² 质谱碎片 m/z 463, 331, 161, 121。通过查阅文献^[18], 推测其为牡丹皮苷 D。

化合物 C14, 保留时间为 16.87 min, 分子式为

$C_{15}H_{12}O_6$, 在 ESI(-) 模式下, 在 m/z 287.0557 [M-H]⁻ 产生分子离子片段, MS² 质谱图中存在 m/z 287, 151, 135, 107 等离子碎片 (见图 5a), 碎片 m/z 287 [M-H]⁻ 失去 1 分子水, 再经 RDA 裂解, 产生碎片 m/z 151 [M-H-H₂O-C₈H₆O]⁻, m/z 135 由 m/z 151 失去 1 分子氧所得。向进乐等^[25]研究表明牡丹中存在圣草酚类化合物, 因此鉴定化合物 C14 为圣草酚。

化合物 C15, 保留时间为 17.27 min, MS 质谱图显示该物质于 m/z 121.0281 [M-H]⁻ 处存在准分子离子峰, 鉴定为苯甲酸。

化合物 C16, 保留时间为 17.46 min, MS 图中于 m/z 285.0401 [M-H]⁻ 存在分子离子, 与分子式 $C_{15}H_{10}O_6$ 匹配, MS² 质谱图存在 m/z 285, 151, 133, 107 等离子碎片 (见图 5b), 其中碎片 m/z 151 [M-H-C₈H₆O]⁻ 是黄酮母核在 A_{1,3} 与 B_{1,3} 处经 RDA 裂解所得, m/z 151 失去 1 分子水得到 m/z 133 [M-H-H₂O]⁻, 与文献所报道一致^[24], 初步鉴定为木犀草素。

化合物 C17, 保留时间为 17.83 min, MS 图显示该物质存在 m/z 227.1281 [M-H]⁻ 分子离子峰, 与分子式 $C_{15}H_{10}O_6$ 对应, 在 MS² 质谱图中产生 m/z 227, 185, 143, 117 等离子碎片 (见图 5c), 其中 m/z 143 为苯环裂解重排后的特征离子碎片, 初步鉴定为白藜芦醇^[26]。

化合物 C18, 保留时间 19.24 min, 存在 m/z 453.0773 [M-H]⁻ 分子离子碎片, 推测其分子式为 $C_{28}H_{22}O_6$, 含有二级质谱碎片 m/z 453, 435, 359, 347, 253, 225 等 (见图 5d), 通过与 Pubchem 信息库进行比对, 初步鉴定为 ϵ -葡萄糖素。

化合物 C19, 保留时间为 19.82 min, MS 图显示该物质于 m/z 327.2171 [M-H]⁻ 存在分子离子峰, MS² 图产生 m/z 327, 291, 229, 211, 171 等特征离子碎片, 与分子式 $C_{18}H_{32}O_5$ 对应。结合参考文献^[27]和 ChemSpider 数据库对比, 初步断定为 9, 12, 13-三羟基-10, 15-十八碳二烯酸。化合物 C22 (保留时间为 21.81 min) 的分子离子峰和二级质谱碎片均与化合物 C19 相同, 推测为其同分异构体——(10E, 15Z)-9, 12, 13-三羟基-10, 15-十八碳二烯酸。

化合物 C20, 保留时间为 21.23 min, 于 m/z

329.2328 [M-H]⁻处存在分子离子峰,基于二级质谱碎片 m/z 329,229,211,171,139,推测分子式为 $C_{18}H_{34}O_5$ 。结合参考文献[27]和 ChemSpider 数据库对比,初步断定为该化合物为(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八碳烯酸。化合物 C21 (保留时间为 21.48 min)具有相同的准分子离子峰,推测其为(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八碳烯酸同分异构体。

化合物 C23,保留时间为 26.83 min,MS 图中存在 m/z 309.3873 [M-H]⁻分子离子峰,MS² 质谱图含有特征碎片 m/z 309,291,221,195,179,与分子式 $C_{18}H_{34}O_4$ 相对应。经 Pubchem 和 ChemSpider 数据库对比,鉴定为 13(S)-HpOTrE。

化合物 C24,保留时间为 30.01 min,MS 质谱图具有 m/z 293.1790 [M-H]⁻分子离子碎片,MS² 质谱图含有特征碎片 m/z 293,275,223,195,179,根据元素组成确定分子式为 $C_{18}H_{34}O_3$ 。经 Pubchem 和 ChemSpider 数据库对比,鉴定为 13(S)-HOTrE。

黄酮类物质是植物苦涩味的重要来源,组分 F-II-1-MR3 含有木犀草素及其糖苷类、圣草酚、根皮素、马里苷等,因此黄酮类物质也是牡丹籽苦味物质成分。此外,组分 F-II-1-MR3 还含有三羟基脂肪酸类物质,有研究发现 9,12,13-三羟基-10,15-十八碳二烯酸是全麦面包屑的苦味成分^[28],主要是由亚油酸氧化而来。据报道,由亚油酸与大豆制剂孵育产生的 9,10,13-和 9,12,13-三羟基十八烯酸的混合物可引出苦味^[29]。Hamberg 等^[30]认为,三羟基酸异构体味觉阈值可能大不相同,推测啤酒中 9,10,13 和 9,12,13-三羟基十八烯酸的异构体可能是导致啤酒苦味的原因,特别是 9(s),12(s),13(s)-三羟基-10(E)-十八烯酸等主要三羟基酸异构体。赵腾飞等^[31]鉴定出化合物 9,10,13-三羟基-11(E)-十八烯酸和 9,12,13-三羟基-(E)-十八烯酸是白酒中呈苦味特征的化合物。因此推测三羟基脂肪酸也可能是牡丹籽的苦味来源之一。

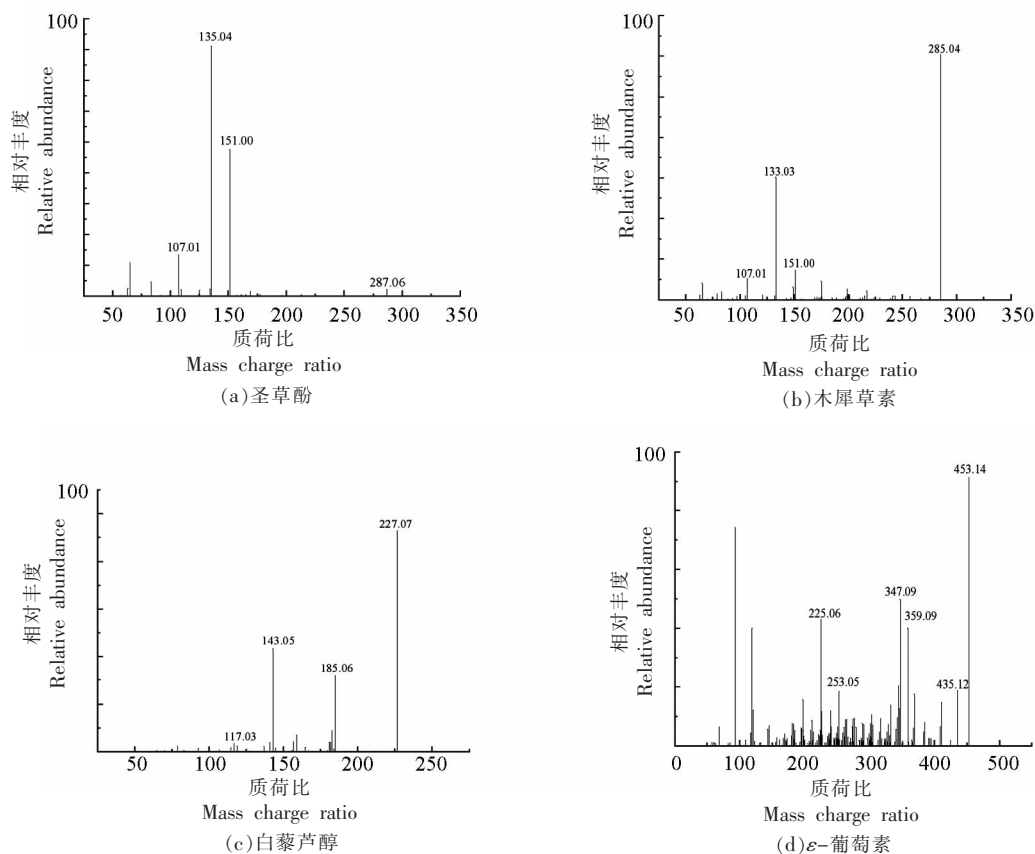


图 5 组分 F-II-1-MR3 部分化合物的二级质谱图

Fig.5 MS² spectra generated from some bitter compounds of F-II-1-MR3

表3 牡丹籽苦味组分UPLC-HRMS分析

编号	保留时间/min	名称	公式	m/z [M-H] ⁻	二级碎片
1	1.94	牡丹酮 1-O-β-D-葡萄糖 ²	C ₁₀ H ₂₄ O ₉	405.1396	359, 197, 178
2	7.06	氧化芍药苷 ²	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	495.1505	495, 465, 281, 165, 137
3	9.25	芍药内酯苷 ^{2,3}	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.1606	366, 282, 177, 121
4	9.47	异麦芽芍药苷 ²	C ₃₀ H ₄₀ O ₁₈	687.2128	593, 471, 323, 165, 121
5	10.16	芍药苷 ^{2,3}	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.1606	449, 327, 165, 121
6	14.45	牡丹皮苷 I ^{2,3}	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.1606	338, 174, 121
7	31.04	未知 ^{2,3}	C ₅ H ₁₈ O ₃ N ₁₀	265.16	265
8	11.02	根皮素 3',5'-Di-C-葡萄糖苷 ³	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₅	597.1821	378, 227
9	11.77	木犀草苷类 ³	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₈	655.1009	447, 285
10	13.89	6-甲氧基木犀草素-7-葡萄糖苷/异鼠李素 3-O-葡萄糖苷 ³	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1030	314, 285, 271, 257, 243, 151
11	13.93	木犀草苷 ³	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.2593	446, 285
12	14.30	马里苷 ³	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.1082	449, 287, 269, 151, 135
13	14.99	牡丹皮苷 D ³	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	509.1660	463, 331, 161, 121
14	16.87	圣草酚 ³	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.0557	287, 151, 135, 107
15	17.27	苯甲酸 ³	C ₇ H ₆ O ₂	121.0281	121
16	17.46	木犀草素 ³	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0401	285, 151, 133, 107
17	17.83	白藜芦醇 ³	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227.1281	227, 185, 143, 117
18	19.24	ε-葡萄糖 ³	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	453.0773	453, 435, 359, 347, 253, 225
19	19.82	9,12,13-三羟基-10,15-十八碳二烯酸 ³	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327.2171	327, 291, 229, 211, 171
20	21.23	(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八碳烯酸 ³	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2328	329, 229, 211, 171, 139
21	21.48	(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八碳烯酸异构体 ³	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2328	329, 229, 211, 171, 139
22	21.81	(10E,15Z)-9,12,13-三羟基-10,15-十八碳二烯酸 ³	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327.2171	327, 291, 229, 211, 171
23	26.83	13(S)-HpOTrE ³	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	309.3873	309, 291, 221, 195, 179
24	30.01	13(S)-HOTrE ³	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	293.1790	293, 275, 223, 195, 179

注:2表示从组分F-II-1-MR2中鉴定出;3表示从组分F-II-1-MR3中鉴定出。

3 结论

本研究通过有机溶剂萃取结合大孔树脂纯化,分离和制备了牡丹籽苦味组分,感官评价结果表明牡丹籽苦味成分主要富集在 30%和 50%乙醇洗脱液中,且 30%乙醇洗脱组分是牡丹籽苦味主要成分的所在相。经 UPLC-HRMS 分析与鉴定,30%乙醇洗脱液中以芍药苷类化合物为主,包括芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、异麦芽芍药苷等组分,芍药苷类化合物是牡丹籽中的主要苦味物质。此外,木犀草素及其糖苷、白藜芦醇、三羟基脂肪酸等也导致了牡丹籽苦味的产生。该研究可为牡丹籽苦味成分解析和脱苦机制研究奠定了物质基础,也可为牡丹籽的进一步开发利用提供技术支持。

参 考 文 献

- [1] 葛云龙, 赵修华, 祖元刚, 等. 压榨法制备牡丹籽油的 α -亚麻酸含量检测与抗氧化研究[J]. 植物研究, 2020, 40(5): 795-800.
GE Y L, ZHAO X H, ZU Y G, et al. Detection of Alpha-linolenic acid content and antioxidant activity in peony seed oil prepared by squeezing method[J]. Plant research, 2020, 40(5): 795-800.
- [2] HAN X M, WU S X, WU M F, et al. Antioxidant effect of peony seed oil on aging mice[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(6): 0-7.
- [3] NIE R, ZHANG Y, ZHANG H, et al. Effect of different processing methods on physicochemical properties, chemical compositions and in vitro antioxidant activities of *Paeonia lactiflora* Pall seed oils [J]. Food Chemistry, 2020, 332: 127408.
- [4] ZHANG Q Y, YU R, XIE L H, et al. Fatty acid and associated gene expression analyses of three tree peony species reveal key genes for alpha-Linolenic acid synthesis in seeds[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 106.
- [5] ZHANG Y, LIU P, GAO Y J, et al. *Paeonia veitchii* seeds as a promising high potential by-product: Proximate composition, phytochemical components, bioactivity evaluation and potential applications[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 125: 248-260.
- [6] 何春年, 肖伟, 李敏, 等. 牡丹种子化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1428-1431.
HE C N, XIAO W, LI M, et al. Chemical constituents from seeds of *Paeonia suffruticosa*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(11): 1428-1431.
- [7] LIU P, ZHANG Y, GAO J Y, et al. HPLC-DAD analysis of 15 monoterpene glycosides in oil peony seed cakes sourced from different cultivation areas in China[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 118: 259-270.
- [8] 刘普, 牛亚琪, 邓瑞雪, 等. 紫斑牡丹籽饼粕低聚芪类成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(12): 1018-1021.
LIU P, NIU Y Q, DENG R X, et al. Oligostilbenes study from seed cakes of *Paeonia rockii*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2014, 49(12): 1018-1021.
- [9] 卢宗元. 牡丹花及牡丹籽饼粕化学成分研究[D]. 郑州: 河南科技大学, 2014.
LU Z Y. Study on chemical constituents from the flower and the seed cake of *Paeonia rockii* [D]. Zhengzhou: Henan University Science and Technology, 2014.
- [10] DONG Y, Z M, SUN-WATERHOUSE D, et al. Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 538-545.
- [11] LU Z, XIE G, WU D, et al. Isolation and identification of the bitter compound from Huangjiu[J]. Food Chemistry, 2021: 129133.
- [12] 刘杰, 陈琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/M 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762.
LIU J, CHEN L, FAN C R, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents of *Paeoniae Radix Alba* and *Paeoniae Radix Rubra* by HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(9): 1762.
- [13] WANG Q, LIANG Z, PENG Y, et al. Whole transverse section and specific-tissue analysis of secondary metabolites in seven different grades of root of *Paeonia lactiflora* using laser microdissection and liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2015, 103: 7-16.

- [14] XIAO C, WU M, CHEN Y, et al. Revealing metabolomic variations in cortex moutan from different root parts using HPLC-MS method[J]. *Phytochemical Analysis*, 2015, 26(1): 86-93.
- [15] 凌霄, 李伟霞, 王晓艳, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析芍药汤水煎液化学成分[J]. *中国现代中药*, 2021, 23(1): 48-56.
- LING X, LI W X, WANG X Y, et al. Analysis of chemical constituents of shaoyao decoction by UPLC-Q-TOF-MS[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2021, 23(1): 48-56.
- [16] 邵怡, 杨玉佩, 李家宇, 等. HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析防风芍药汤水煎液的化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(8): 54-59.
- SHAO Y, YANG Y P, LI J Y, et al. HPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of chemical constituents of Fangfeng Shaoyao Tang[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2018, 24(8): 54-59.
- [17] 周海玲, 许舜军, 周若龙, 等. 白芍、赤芍化学成分的高效液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. *中药材*, 2018, 41(7): 1637-1640.
- ZHOU H L, XU S J, ZHOU R L, et al. Analysis of chemical constituents of radix paeoniae rubra and radix paeoniae rubra by high performance liquid chromatography-time of flight tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2018, 41(7): 1637-1640.
- [18] 谭淑瑜, 肖雪, 补胜华, 等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究[J]. *中药材*, 2017, 40(1): 94-100.
- TAN S Y, XIAO X, BU S H, et al. Analysis and identification of water-soluble components of paeonia lactiflora[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2017, 40(1): 94-100.
- [19] 牛研, 王书芳. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSn 分析当归芍药散中化学成分[J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1056-1062.
- NIU Y, WANG S F. Analysis on chemical constituents in Danggui-Shaoyao-San by LC-Q-TOF-MS and LC-IT-MSn[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [20] 曹煌. 基于仿生技术的药味拆分界定表征的初步研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2016.
- CAO H. Initial study on separation and characterization of Chinese herbal taste based on bionics[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2016.
- [21] ZHANG Y X, WANG X, WANG S F, et al. Traditional Chinese bitter flavor theory: Is there any relation with taste type II receptors? [J]. *European Journal of Integrative Medicine*, 2016, 8(6): 980-990.
- [22] LI J, KUANG G, CHEN X, et al. Identification of chemical composition of leaves and flowers from *Paeonia rockii* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS[J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 947.
- [23] 安欣欣, 李媛媛, 战妍妃, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive 和 HPLC 对蒲公英总黄酮部位成分分析及主成分的含量测定[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(1): 99-105.
- AN X X, LI Y Y, ZHAN Y F, et al. Analysis of the contents of total flavonoids in dandelion and determination of main components based on UPLC-Q-Exactive and HPLC[J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2019, 30(1): 99-105.
- [24] YANG Y, SUN X, LIU J, et al. Quantitative and qualitative analysis of flavonoids and phenolic acids in Snow *Chrysanthemum* (*Coreopsis tinctoria* Nutt.) by HPLC-DAD and UPLC-ESI-QTOF-MS[J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1307.
- [25] 向进乐, 赵胜娟, 马丽苹, 等. 可食牡丹酶法制汁及主 HPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(18): 137-143.
- XIANG J L, ZHAO S J, MA L P, et al. Juice production from fresh tree peony flower by enzyme treatment and its phytochemical identification by HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(18): 137-143.
- [26] WANG L, SANG M, LIU E, et al. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from polygonum multiflorum by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 140: 45-61.
- [27] 张靖, 徐筱杰, 徐文, 等. HPLC-LTQ-Orbitrap-MSn 快速鉴别党参药材中化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(9): 59-63.
- ZHANG J, XU X J, XU W, et al. Rapid identification of chemical constituents from codonopsis radix by HPLC-LTQ-Orbitrap-MSn[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2015, 21(9): 59-63.

- [28] BIN Q, PETERSON D G. Identification of bitter compounds in whole wheat bread[J]. *Food Chemistry*, 2016, 203(15): 8–15.
- [29] BAUR C, GROSCHE W, WIESER H, et al. Enzymatic oxidation of linoleic acid: formation of bitter-tasting fatty acids [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1977, 164(3): 171–176.
- [30] HAMBERG, MATS. Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: qualitative and quantitative analysis[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39(9): 1568–1572.
- [31] 赵腾飞, 陈双, 李华钟, 等. 白酒难挥发组分中呈苦味三羟基十八烯酸的分离与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(9): 225–231.
- ZHAO T F, CHEN S, LI H Z, et al. Isolation and identification of bitter-tasting trihydroxyoctadecenoic acids in Baijiu (Chinese liquor)[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(9): 225–231.

Isolation and Identification of Bitter Components in Peony Seeds

Cao Kangning, Peng Bangzhu*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract The unclear composition of bitter substances in peony seeds limits the comprehensive development and efficient utilization of peony seeds. In this study, a combination of organic solvent extraction and sensory evaluation was used to separate and identify the bitter substances in peony seeds by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC–HRMS). The results of the study showed that the peony seed sample was extracted by n-hexane, citric acid aqueous solution, n-butanol, and purified by AB-8 macroporous resin. 5 components were obtained: F-II-1-MR1, F-II-1-MR2, F-II-1-MR3, F-II-1-MR4, F-II-1-MR5. Two bitter components were screened by sensory evaluation: F-II-1-MR2, F-II-1-MR3. UPLC–HRMS was used to analyze and identify those bitter components. A total of 24 compounds were identified, including 7 monoterpene glycosides, such as paeoniflorin, 7 flavonoids, such as luteolin, 2 stilbene, such as resveratrol, 6 fatty acids, such as 9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid, and 1 kind of organic acids was benzoic acid. Among them, paeoniflorin is the highest yield component in peony seed extract, and it is also the main bitter compound in peony seeds.

Keywords peony seeds; bitter components; ultra-high performance liquid chromatography (UPLC); high-resolution mass spectrometry (HRMS); solvent extraction; sensory evaluation