

基于 UPLC-Orbitrap-MS/MS 技术联合 GNPS 分子网络快速分析黑果腺肋花楸果实成分

王雷^{1,2}, 董金旭¹, 王一凯¹, 黄鑫¹, 陈长宝¹

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 吉林省吉诺生物工程有限责任公司, 吉林 长春 130600)

摘要: 本研究建立了超高效液相色谱-轨道阱串联质谱(UPLC-Qrbitrap-MS/MS)技术联合 GNPS 分子网络快速分析黑果腺肋花楸果实成分。在正、负离子模式下, 采集黑果腺肋花楸果实提取物的高分辨质谱数据, 总结串联质谱信息和碎裂规律, 依据特征碎裂规律的相似性创建分子网络。根据对照品的保留时间、精确相对分子质量及碎片离子等, 对黑果腺肋花楸果实成分进行归属和鉴定。创建了花色苷类、原花青素类、黄酮类和有机酸类的分子网络, 共鉴定出黑果腺肋花楸果实中 42 个成分, 包括 20 个花色苷类、3 个原花青素类、12 个黄酮类和 7 个有机酸类。该方法能够快速、准确归类并鉴定黑果腺肋花楸果实成分, 为其功效物质基础研究及开发利用提供了依据。

关键词: 超高效液相色谱-轨道阱串联质谱(UPLC-Qrbitrap-MS/MS); 分子网络; 黑果腺肋花楸果实; 快速分析

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0874-10

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0063

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0063

Rapid Identification of Constituents of *Aronia Melanocarpa* (Michx.) Elliott Fruit by UPLC-Qrbitrap-MS/MS and GNPS Molecular Network

WANG Lei^{1,2}, DONG Jin-xu¹, WANG Yi-kai¹, HUANG Xin¹, CHEN Chang-bao¹

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jinuo Biological Engineering Co. Ltd, Changchun 130600, China)

Abstract: The fruits of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot have high nutritional value and medicinal value. This fruit is rich in flavonoids, anthocyanins and anthocyanins and presents good biological activity and pharmacological effects in antioxidant, anti-aging, anti-inflammatory, antibacterial, hypolipidemic, hypoglycemic, anti-cancer, antidepressant, anti-fatigue, etc. It is necessary for the development of this fruit material to explore more chemical constituents. The Global Natural Products Social (GNPS) molecular network based on mass spectrometry technology can establish an association network with the similarity and fingerprint characteristics of similar components, and quickly analyze unknown components in natural products. In this study, ultra-high performance liquid chromatography Orbitrap tandem mass spectrometry (UPLC-Qrbitrap-MS/MS) combined GNPS molecular network was developed for the rapid analysis of constituents in fruits of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. Under the positive and negative ion modes, the high resolution mass

data were acquired. The multiple tandem mass and fragmentation rules were summarized. The molecular network was established based on the similarity of characteristic fragmentation. According to the retention time, accurate molecular mass and fragment ions of references, the constituents in the fruits were identified and deduced. The molecular network of anthocyanins, proanthocyanidins, flavonoids and organic acids were built. Totally 42 compounds are identified in the fruits of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, including 20 anthocyanins, 3 proanthocyanidins, 12 flavonoids and 7 organic acids. It was concluded that UPLC-Qrbitrap-MS/MS combined with GNPS molecular network can be used to rapidly and accurately identify the constituents in fruits of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. This results provides a basis for the research of efficacy substances, and the development and utilization of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot fruits.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography Orbitrap tandem mass spectrometry (UPLC-Qrbitrap-MS/MS); GNPS molecular network; *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot fruits; rapid analysis

黑果腺肋花楸 (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) 是蔷薇科腺肋花楸属落叶灌木, 是以生产果实为主的特用经济树种。黑果腺肋花楸的果实味甜酸且略有涩感, 又名野樱莓、不老莓, 具有较高的营养价值和药用价值^[1-3], 广泛应用于食品、保健品及药品等领域^[2,4-8]。黑果腺肋花楸果实中富含黄酮、花青素和花色苷等化学成分^[9-10], 在抗氧化、抗衰老、抗炎、抑菌、降血脂、降血糖、抗癌、抗抑郁、抗疲劳等方面具有较好的生物活性和药理作用^[11-16]。

超高效液相色谱-轨道阱串联质谱 (UPLC-Qrbitrap-MS/MS) 技术兼具高质量精度、高分辨率和高灵敏度, 在天然产物复杂成分归属鉴别中的优势明显且应用广泛^[17-19], 但对海量复杂成分的数据解析工作流程过于繁冗, 且易造成数据丢失。因此, 进行有效的数据解析流程优化和简化至关重要。基于质谱技术的 Global Natural Products Social (GNPS) 分子网络是将串联质谱碎片的相似性和指纹特征建立关联网络, 选择性地对复杂成分分类过滤, 更加高效地整合处理质谱数据, 充分挖掘同类成分信息, 快速解析未知成分^[20-25]。如陈士林等^[26]应用基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS联合分子网络策略快速分析紫菀中43个肽类成分; 何春娟等^[27]基于HPLC-Q-TOF MS网络化技术发现宁夏枸杞根皮中21个化学成分。

本研究拟采用UPLC-Qrbitrap-MS/MS技术联合GNPS分子网络快速分析黑果腺肋花楸果实成分, 基于不同类成分的特征性碎片离子构建分子网络, 归属鉴定黑果腺肋花楸果实成分, 为其功效物质基础研究及开发利用提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

UltiMate3000 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪: 美国 Thermo Fisher 公司产品, 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Xcalibur4.3 数据处理系统; Hyper Sonic DT-A 超声波清洗器: 昆山超声仪器有限公司产品; XS-204 分析天平: 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司产品; DHG-9246A 电热恒温鼓风干燥器: 上海精宏实验设备有限公司产品; Milli-Q 超纯水制备系统: 德国 Merck Millipore 公司产品。

1.2 材料与试剂

黑果腺肋花楸新鲜果实: 2023年9月28日采自吉林省长春市双阳区, 50℃恒温鼓风干燥3天。

矢车菊-3-O-半乳糖苷 (LOT: J21HB189191)、儿茶素 (LOT: S01HB191501)、槲皮素 (LOT: O29HB199514)、咖啡酸 (SM0425GA14)、绿原酸 (Y20A11K111541)、奎宁酸 (A06N11L130128) 对照品: 纯度 > 98%, 上海源叶生物科技有限公司产品; 甲醇、乙腈: 色谱级, 美国 Tedia 公司产品; 甲酸: 色谱级, 美国 Aladdin 公司产品。

1.3 供试品溶液制备

精密称取各 5 mg 矢车菊-3-O-半乳糖苷、儿茶素、槲皮素、咖啡酸、绿原酸、奎宁酸对照品, 以甲醇为溶剂制成 1 mg/L 溶液, 供 UPLC-Qrbitrap-MS/MS 分析。

将黑果腺肋花楸干燥果实粉碎, 过 60 目筛, 称取 1 g 于具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 甲醇, 超声提取 60 min, 在 4℃ 下, 以 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 减压浓缩, 用甲醇定容至 10 mL 容量瓶

中, 摇匀, 用甲醇将此溶液稀释一定倍数后, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 供 UPLC-Qrbitrap-MS/MS 分析。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 Thermo Scientific Synchronis C18 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm \times 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~10 min (3%~20%B), 10~45 min(20%~90%B), 45~47 min(90%~100%B), 47~50 min(100%B); 流速 0.2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL 。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式; 质量扫描范围 m/z 50~1 000; 喷雾电压 3.5 kV; 鞘气流速 10.5 L/min; 辅助气流速 3 L/min; 离子传输管温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞能量 10、20、30 eV。

1.5 GNPS 分子网络构建

首先应用 MsConvert 软件将对照品及黑果腺肋花楸果实提取物的 UPLC-Qrbitrap-MS/MS 数据转换为 GNPS 分析平台支持的 .mgf 格式。在 GNPS 分子网络分析平台中, 设置余弦分数阈值为 0.7, 最小匹配碎片离子设为 6, topK 设为

10, 离子之间的最大质量偏差设为 0.05 u。将数据上传至 GNPS 分析平台生成分子网络, 应用 Cytoscape 3.9.1 软件将分子网络结果可视化对化合物进行鉴定。

2 结果与讨论

采用 UPLC-Qrbitrap-MS/MS 技术, 在正、负离子模式下对黑果腺肋花楸果实提取物成分进行检测。基于 MS/MS 信息, 联合 GNPS 分子网络分析, 构建各类成分的分子网络, 共归属鉴定出黑果腺肋花楸果实中 42 个成分, 列于表 1。

2.1 花色苷类成分的鉴定

花色苷是以花青素为苷元而形成的糖苷类化合物, 基本结构单元为 2-苯基苯并吡喃型阳离子母核, 属于类黄酮物质, 是黑果腺肋花楸果实中的天然色素。植物中普遍存在的花青素包括矢车菊素、飞燕草素、天竺葵素、芍药素和锦葵色素等, 常与葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖等以糖苷键结合成花色苷。

表 1 黑果腺肋花楸果实中鉴定的成分

Table 1 Identified constituents of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott fruit

| 编号 No. | 类型 Type | 鉴定成分 Identified constituent | 分子式 Molecular formula | 保留时间 Retention time/min | 分子离子 Molecular ion(m/z) | | 特征碎片离子 Fragment ion (m/z) |
|-----------|------------|--------------------------------|---|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| | | | | | $[\text{M}]^+$ | $[\text{M}-\text{H}]^-$ | |
| 1 | 花色苷 | 矢车菊素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 | $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^+$ | 11.75 | 449.1038 | — | 287.0545 |
| 2 | | 矢车菊素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^+$ | 13.28 | 449.1038 | — | 287.0545 |
| 3 | | 矢车菊素-3- <i>O</i> -木糖苷 | $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_{10}^+$ | 14.05 | 419.0987 | — | 287.0545 |
| 4 | | 矢车菊素-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 | $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_{10}^+$ | 15.05 | 419.0987 | — | 287.0545 |
| 5 | | 天竺葵素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 | $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}^+$ | 17.32 | 433.1176 | — | 271.0620 |
| 6 | | 天竺葵素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}^+$ | 17.72 | 433.1176 | — | 271.0620 |
| 7 | | 天竺葵素-3- <i>O</i> -木糖苷 | $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_9^+$ | 19.81 | 403.1081 | — | 271.0620 |
| 8 | | 天竺葵素-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 | $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_9^+$ | 20.97 | 403.1081 | — | 271.0620 |
| 9 | | 飞燕草素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 | $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{18}^+$ | 11.89 | 465.1153 | — | 303.0509 |
| 10 | | 飞燕草素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{18}^+$ | 12.86 | 465.1153 | — | 303.0509 |
| 11 | | 飞燕草素-3- <i>O</i> -木糖苷 | $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{17}^+$ | 13.07 | 435.0916 | — | 303.0509 |
| 12 | | 飞燕草素-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 | $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{17}^+$ | 13.96 | 435.0916 | — | 303.0509 |
| 13 | | 芍药素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 | $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{11}^+$ | 11.66 | 463.1288 | — | 301.0702 |
| 14 | | 芍药素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{11}^+$ | 12.14 | 463.1288 | — | 301.0702 |
| 15 | | 芍药素-3- <i>O</i> -木糖苷 | $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}^+$ | 12.89 | 433.1176 | — | 301.0702 |
| 16 | | 芍药素-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 | $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}^+$ | 13.98 | 433.1176 | — | 301.0702 |
| 17 | | 锦葵色素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 | $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}^+$ | 8.50 | 493.1343 | — | 331.0811 |
| 18 | | 锦葵色素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}^+$ | 9.27 | 493.1343 | — | 331.0811 |
| 19 | | 锦葵色素-3- <i>O</i> -木糖苷 | $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{11}^+$ | 11.59 | 463.1288 | — | 331.0811 |
| 20 | | 锦葵色素-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 | $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_{11}^+$ | 12.09 | 463.1288 | — | 331.0811 |

续表

| 编号 No. | 类型 Type | 鉴定成分 Identified constituent | 分子式 Molecular formula | 保留时间 Retention time/min | 分子离子 Molecular ion(<i>m/z</i>) | | 特征碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>) |
|-----------|------------|--------------------------------|---|----------------------------|----------------------------------|--------------------|---|
| | | | | | [M] ⁺ | [M-H] ⁻ | |
| 21 | 原花青素 | 儿茶素 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 15.34 | — | 289.0732 | 179.0346, 125.0238, 137.0240, 165.0180 |
| 22 | | 表儿茶素 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 17.50 | — | 289.0732 | 179.0346, 125.0238, 137.0240, 165.0180 |
| 23 | | 原花青素B1/B2/B3/B4 | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 13.8 | — | 577.1443 | 289.0732 |
| 24 | 黄酮 | 槲皮素 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 19.88 | — | 301.0369 | 273.0377, 257.0328, 193.0213 |
| 25 | | 槲皮素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 17.26 | — | 463.0892 | 301.0369 |
| 26 | | 槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 17.42 | — | 463.0892 | 301.0369 |
| 27 | | 槲皮素-3- <i>O</i> -木糖苷 | C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁ | 17.73 | — | 433.0688 | 301.0369 |
| 28 | | 槲皮素-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 | C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁ | 17.89 | — | 433.0688 | 301.0369 |
| 29 | | 槲皮素-3- <i>O</i> -洋槐糖苷 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 16.72 | — | 609.1463 | 463.0892, 301.0369 |
| 30 | | 槲皮素-3- <i>O</i> -芸香糖苷 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 16.94 | — | 609.1463 | 463.0892, 301.0369 |
| 31 | | 山奈酚 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 19.77 | — | 285.0367 | 257.0341, 241.0310, 193.0213 |
| 32 | | 山奈酚-3- <i>O</i> -半乳糖苷 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 13.13 | — | 447.1045 | 285.0367 |
| 33 | | 山奈酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 13.67 | — | 447.1045 | 285.0367 |
| 34 | | 山奈酚-3- <i>O</i> -木糖苷 | C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀ | 14.07 | — | 417.0836 | 285.0367 |
| 35 | | 山奈酚-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 | C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀ | 14.45 | — | 417.0836 | 285.0367 |
| 36 | 有机酸 | 对香豆酸 | C ₉ H ₈ O ₃ | 1.07 | — | 163.0286 | 119.0297 |
| 37 | | 咖啡酸 | C ₉ H ₈ O ₄ | 1.24 | — | 179.0334 | 161.0257, 135.0240 |
| 38 | | 奎宁酸 | C ₇ H ₁₂ O ₆ | 1.28 | — | 191.0548 | 173.0301 |
| 39 | | 阿魏酸 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 1.23 | — | 193.0348 | 179.0334, 163.0286, 135.0240 |
| 40 | | 芥子酸 | C ₁₁ H ₁₂ O ₅ | 1.29 | — | 223.0460 | 209.0356, 193.0348, 163.0286 |
| 41 | | 新绿原酸 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 11.29 | — | 353.0891 | 191.0548, 179.0334 |
| 42 | | 绿原酸 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 13.49 | — | 353.0891 | 191.0548, 179.0334 |

2.1.1 花色苷对照品的质谱裂解规律 以对照品矢车菊-3-*O*-半乳糖苷为例, 在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 449.491 0 [M]⁺, 串联质谱得到的 m/z 287.054 5 离子为其失去 1 分子半乳糖残基(162 u), 是矢车菊素类花色苷的特征碎片离子。

2.1.2 花色苷成分的GNPS分子网络分析 将检测到的黑果腺肋花楸果实成分的精确质量数及串联质谱数据与花色苷类成分特征裂解途径进行比对, 依据此类成分形成分子网络簇的相似性, 推测成分结构归属。在花色苷类分子网络中, 检测到 5 种不同花青素结构苷元分子簇, 示于图 1。

化合物 1 的准分子离子峰为 m/z 449.103 8, 碎片离子 m/z 287.054 5 为其失去 162 u 产生的, 经与对照品的相对保留时间比对确认, 鉴定为矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷。化合物 2 的准分子离子峰及碎片离子与对照品矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷

完全一致, 仅相对保留时间不同, 推测其为矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷的同分异构体矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷, 且半乳糖苷的相对保留时间先于葡萄糖苷。化合物 3 和 4 的准分子离子峰均为 m/z 419.098 7, 同样检测到矢车菊素类花色苷特征碎片离子, 为其丢失 132 u 产生的, 推测其为矢车菊素与 1 分子五碳糖形成的花色苷。根据文献^[28]报道, 花色素木糖苷类化合物的相对保留时间先于阿拉伯糖苷类, 鉴定化合物 3 和 4 分别为矢车菊素-3-*O*-木糖苷和矢车菊素-3-*O*-阿拉伯糖苷。

化合物 5 和 6 的准分子离子峰为 m/z 433.117 6, 二者均检测到碎片离子 m/z 271.062 0, 为其丢失 162 u 产生的。碎片离子 m/z 271.062 0 与矢车菊素类特征碎片离子 m/z 287.054 5 相差 16 u, 其为天竺葵素类花色苷的特征碎片, 因此鉴定化合物 5 和 6 分别为天竺葵素-3-*O*-半乳糖苷和天竺

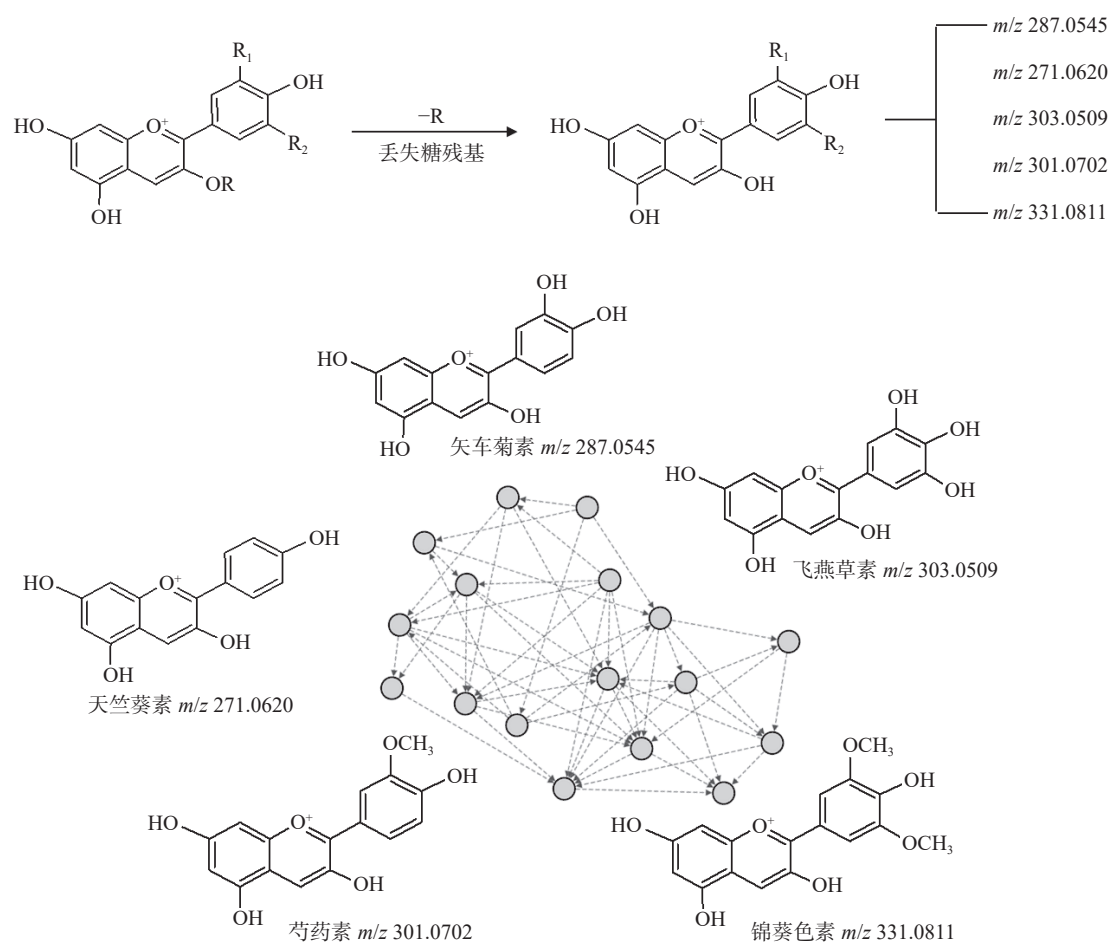


图1 花色苷成分的GNPS分子网络分析图

Fig. 1 GNPS molecular network on the anthocyanins constituents

葵素-3-*O*-葡萄糖苷。化合物7和8的准分子离子峰为 m/z 403.1081, 同样检测到天竺葵素类特征碎片离子, 为其丢失 132 u 产生的, 同理推测其分别为天竺葵素-3-*O*-木糖苷和天竺葵素-3-*O*-阿拉伯糖苷。

化合物9、10、11和12均检测到碎片离子 m/z 303.0509, 为其丢失 132 u 或 162 u 产生的。碎片离子 m/z 303.0509 与矢车菊素类特征碎片离子 m/z 287.0545 相差 16 u, 其为飞燕草素类花色苷的特征碎片, 因此推测化合物9、10、11和12分别为飞燕草素-3-*O*-半乳糖苷、飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷、飞燕草素-3-*O*-木糖苷和飞燕草素-3-*O*-阿拉伯糖苷。

化合物13、14、15和16在分子网络中聚为一簇, 均检测到碎片离子 m/z 301.0702, 为其丢失 162 u 或 132 u 产生的。碎片离子 m/z 301.0702 与矢车菊素类特征碎片离子 m/z 287.0545 相差 14 u, 其为芍药素类花色苷的特征碎片, 因此推

测化合物13、14、15和16分别为芍药素-3-*O*-半乳糖苷、芍药素-3-*O*-葡萄糖苷、芍药素-3-*O*-木糖苷和芍药素-3-*O*-阿拉伯糖苷。

在分子网络中, 化合物17、18、19和20聚为一簇, 均检测到碎片离子 m/z 331.0811, 为其丢失 132 u 或 162 u 产生的。碎片离子 m/z 331.0811 与矢车菊素类特征碎片离子 m/z 287.0545 相差 44 u, 其为锦葵色素类花色苷的特征碎片, 因此推测化合物17、18、19和20分别为锦葵色素-3-*O*-半乳糖苷、锦葵色素-3-*O*-葡萄糖苷、锦葵色素-3-*O*-木糖苷和锦葵色素-3-*O*-阿拉伯糖苷。

2.2 原花青素类成分的鉴定

原花青素属于多酚类化合物, 在酸性条件下可生成花青素。在黑果腺肋花楸果实中检测到的原花青素类成分较少, 示于图2。

以对照品儿茶素为例, 在负离子模式下, 其准分子离子峰为 m/z 289.0732[M-H]⁻, 串联质谱得到碎片离子 m/z 179.0346、125.0238、137.0240、

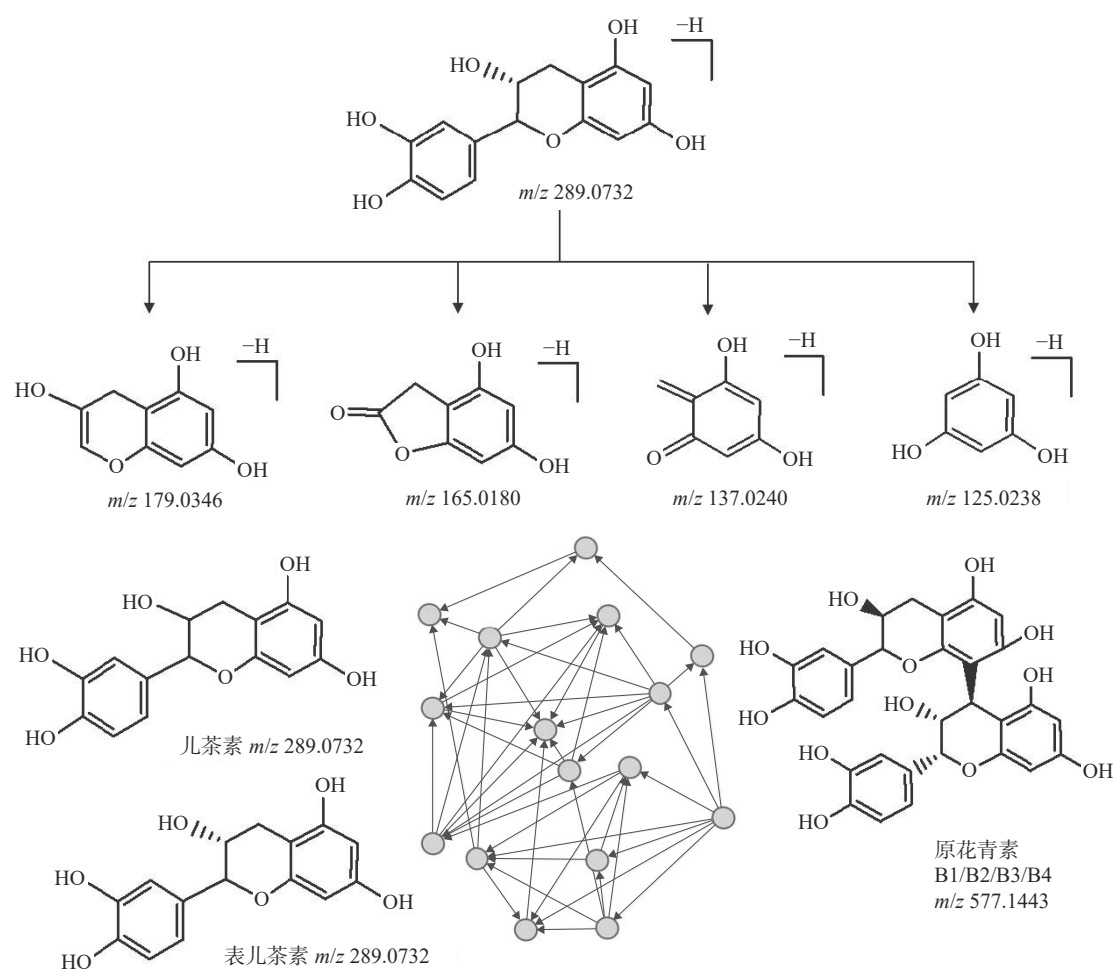


图2 原花青素成分的GNPS分子网络分析图

Fig. 2 GNPS molecular network on the proanthocyanidins constituents

165.0180。化合物21的准分子离子峰、碎片离子和相对保留时间均与对照品儿茶素一致, 鉴定其为儿茶素。化合物22的准分子离子峰和碎片离子与对照品儿茶素一致, 但相对保留时间不同, 鉴定其为儿茶素的空间异构体表儿茶素。化合物23的准分子离子峰为 m/z 577.1443, 检测到特征碎片离子 m/z 289.0732, 其为丢失中性碎片288 u产生的, 推测为儿茶素的二聚体原花青素B1/B2/B3/B4。

2.3 黄酮类成分的鉴定

在黑果腺肋花楸果实中检测到的黄酮类成分是以黄酮醇为苷元形成的黄酮醇苷类化合物。

2.3.1 黄酮醇对照品的质谱裂解规律

以对照品槲皮素为例, 在负离子模式下, 其准分子离子峰为 m/z 301.0369 [M-H]⁻, 串联质谱得到 m/z 273.0377、257.0328、193.0213 离子, 示于图3, 其中 m/z 193.0213 为失去B环的特征碎片离子。

2.3.2 黄酮醇成分的GNPS分子网络分析

在黄酮醇类成分形成的分子簇中, 化合物24的准分子离子峰、碎片离子和相对保留时间均与对照品槲皮素一致, 鉴定其为槲皮素。化合物25、26、27和28均检测到碎片离子 m/z 301.0369, 为丢失162 u或132 u产生的, 其为槲皮素类黄酮醇苷的特征离子, 因此鉴定这4种化合物分别为槲皮素-3-O-半乳糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-木糖苷和槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷。化合物29和30的准分子离子峰均为 m/z 609.1463, 同样检测到槲皮素类特征离子, 为丢失1分子二糖残基(308 u)产生的, 同时检测到碎片离子 m/z 463.0892 为丢失146 u产生的, 因此推测其分别为槲皮素-3-O-洋槐糖苷和槲皮素-3-O-芸香糖苷。

化合物31的准分子离子峰为 m/z 285.0367, 串联质谱得到 m/z 257.0341、241.0310、193.0213 碎片离子。其中, m/z 193.0213 为失去B环的碎

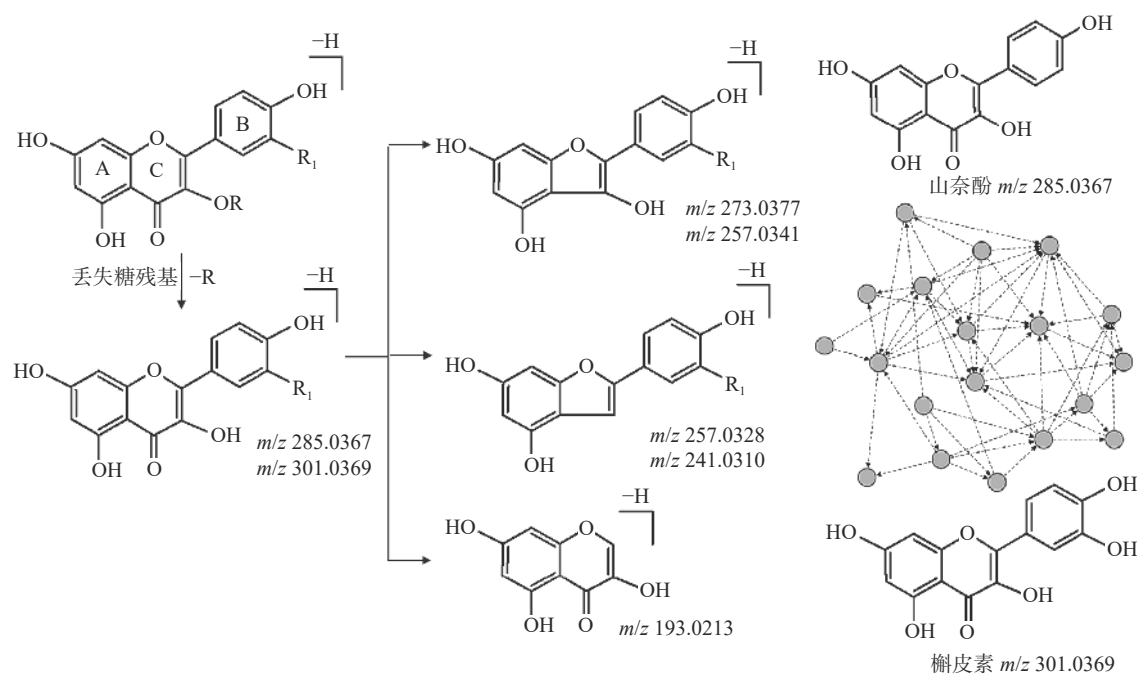


图3 黄酮成分的GNPS分子网络分析图

Fig. 3 GNPS molecular network on the flavonoids constituents

片离子,与槲皮素特征碎片离子一致,表明二者的结构差异在B环的羟基取代,推测其为山奈酚。化合物32、33、34和35均检测到山奈酚类黄酮醇苷的特征离子 m/z 285.0367,为丢失162 u或132 u产生的,推测其分别为山奈酚-3-*O*-半乳糖苷、山奈酚-3-*O*-葡萄糖苷、山奈酚-3-*O*-木糖苷和山奈酚-3-*O*-阿拉伯糖苷。

2.4 有机酸类成分的鉴定

黑果腺肋花楸果实中含有丰富的有机酸类成分,且在结构上具有相似性特征。

2.4.1 有机酸对照品的质谱裂解规律 在负离子模式下,咖啡酸的准分子离子峰为 m/z 179.0334 $[M-H]^-$,串联质谱得到的 m/z 161.0257、135.0240碎片离子分别为丢失1分子 H_2O 和 CO_2 产生的。奎宁酸的准分子离子峰为 m/z 191.0548 $[M-H]^-$,串联质谱得到的 m/z 173.0301碎片离子为丢失1分子 H_2O 产生的。绿原酸的准分子离子峰为 m/z 353.0891 $[M-H]^-$,串联质谱得到 m/z 191.0548和179.0334特征离子,分别为中性丢失咖啡酰基产生的奎宁酸分子离子和丢失脱氧奎宁酸中性碎片产生的咖啡酸分子离子,示于图4。

2.4.2 有机酸成分的GNPS分子网络分析 化合物37和38的准分子离子峰、碎片离子和相对保留时间分别与对照品咖啡酸和奎宁酸一致,鉴

定其分别为咖啡酸和奎宁酸。化合物36的准分子离子峰为 m/z 163.0286,与咖啡酸准分子离子峰相差16 u,其碎片离子 m/z 119.0297为丢失1分子 CO_2 产生的,与咖啡酸产生了相同的中性丢失,推测为对香豆酸。化合物39的准分子离子峰为 m/z 193.0348,与咖啡酸准分子离子峰相差14 u,其碎片离子为 m/z 179.0334、163.0286和135.0240,与咖啡酸相差1个甲基取代,推测为阿魏酸。化合物40的准分子离子峰为 m/z 223.0460,其碎片离子为 m/z 209.0356、193.0348、163.0286,其与化合物39的碎裂规律类似,二者在结构中相差1个甲基取代,推测为芥子酸。化合物41和42的准分子离子峰和碎片离子相同,且均与绿原酸一致,推测二者为1对同分异构体。其中,化合物42的相对保留时间与绿原酸一致,鉴定其为绿原酸,故化合物41为新绿原酸。

综上所述,在黑果腺肋花楸果实提取物中检测到的成分归属为花色苷、原花青素、黄酮类及有机酸类。其中,花色苷类包括矢车菊素、飞燕草素、天竺葵素、芍药素和锦葵色素类;黄酮主要为黄酮醇类化合物;有机酸则以酚酸类为主。这与文献^[2-4]报道的黑果腺肋花楸果实成分组成一致,未发现新的化合物组成。

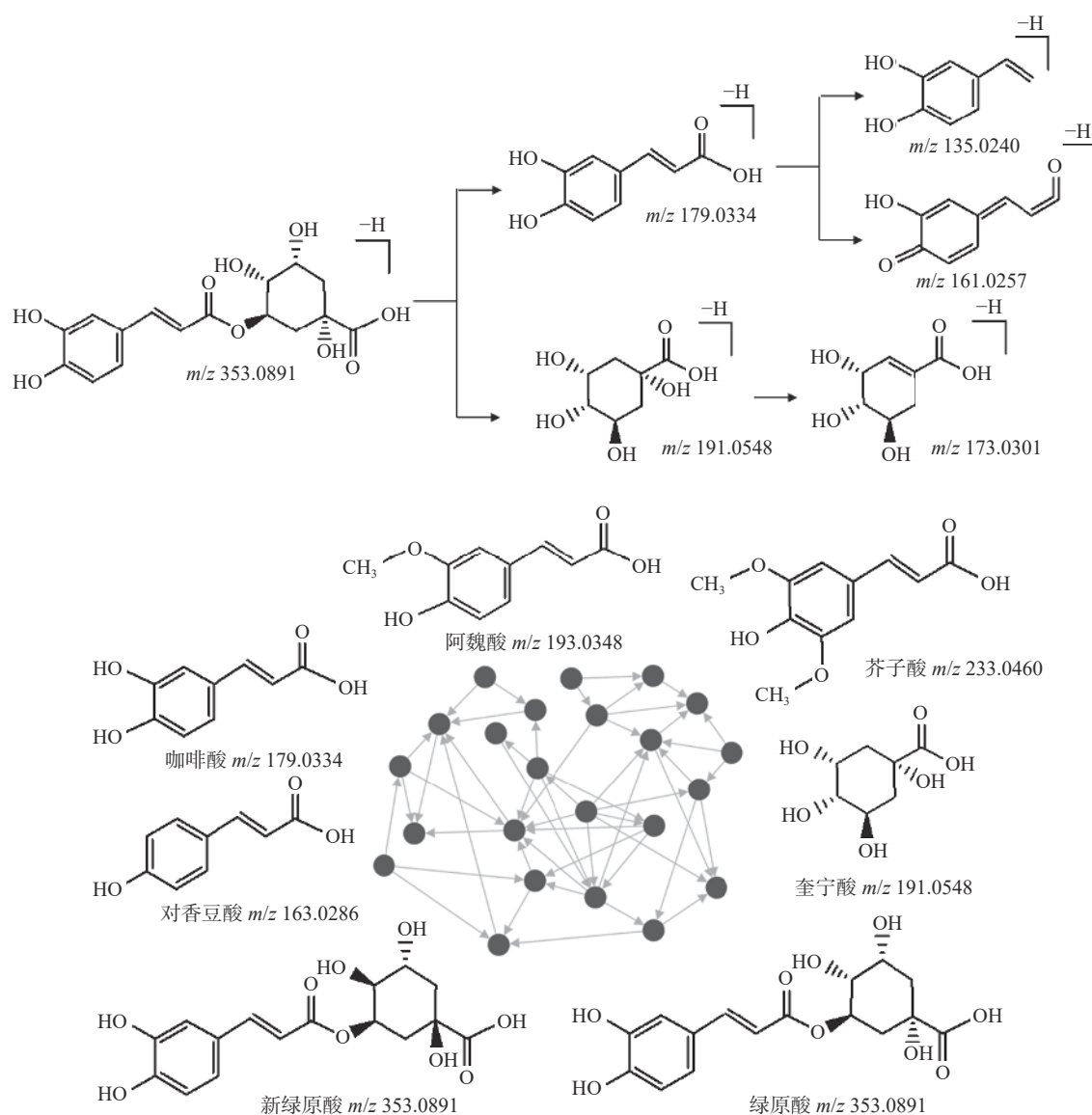


图 4 有机酸成分的 GNPS 分子网络分析图

Fig. 4 GNPS molecular network on the organic acids constituents

3 结论

本研究应用 UPLC-Qrbitrap-MS/MS 技术联合 GNPS 分子网络分析黑果腺肋花楸果实成分, 依据成分特征碎片离子, 共归属出 4 类成分分子网络簇。在此基础上, 根据各类成分网络簇中分子离子和碎片离子的差异及相对保留时间顺序, 结合对照品的精确分子质量及参考文献, 进一步推测并鉴定了 20 个花色苷类、3 个原花青素类、12 个黄酮醇类和 7 个有机酸类成分。该方法能够快速、准确归类并鉴定黑果腺肋花楸果实成分, 为其功效物质基础研究及开发利用提供依据。

参考文献:

- [1] GURČÍK E, BAJUSOVÁ Z, LADVENICOVÁ J, PALKOVIČ J, NOVOTNÁ K. Cultivation and processing of modern superfood-aronia melanocarpa (black chokeberry) in Slovak republic[J]. *Agriculture*, 2023, 13(3): 604.
- [2] SIDOR A, GRAMZA-MICHAŁOWSKA A. Black chokeberry *Aronia melanocarpa* L. -a qualitative composition, phenolic profile and antioxidant potential[J]. *Molecules*, 2019, 24(20): 3 710.
- [3] SLIMESTAD R, TORSKANGERPOLL K, NATELAND H S, JOHANNESSEN T, GISKE N H. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18(1): 61-68.

- [4] REN Y, FRANK T, MEYER G, LEI J, GREBENC J R, SLAUGHTER R, GAO Y G, KINGHORN A D. Potential benefits of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruits and their constituents in improving human health[J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7 823.
- [5] SOSNOWSKA D, KAJSZCZAK D, PODSEDEK A. The effect of different growth stages of black chokeberry fruits on phytonutrients, anti-lipase activity, and antioxidant capacity[J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 8 031.
- [6] EISINAITĖ V, LESKAUSKAITĖ D, PUKALSKIENĖ M, VENSKUTONIS P R. Freeze-drying of black chokeberry pomace extract-loaded double emulsions to obtain dispersible powders[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(3): 628-638.
- [7] CHUNG J W, KIM J E, NAM Y E, KIM W S, LEE I, YIM S V, KWON O. Eight-week supplementation of Aronia berry extract promoted the glutathione defence system against acute aerobic exercise-induced oxidative load immediately and 30 min post-exercise in healthy adults: a double-blind, randomised controlled trial[J]. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2023, 36(4): 1 589-1 599.
- [8] STANKIEWICZ B, CIEŚLICKA M, MIESZKOWSKI J, KOCHANOWICZ A, NIESPODZIŃSKI B, SZWARC A, WALDZIŃSKI T, RECZKOWICZ J, PISKORSKA E, PETR M, SKARPAŃSKA-STEJNBORN A, ANTOSIEWICZ J. Effect of supplementation with black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract on inflammatory status and selected markers of iron metabolism in young football players: a randomized double-blind trial[J]. *Nutrients*, 2023, 15(4): 975.
- [9] GERASIMOV M A, PEROVA I B, ELLER K I, AKIMOV M Y, SUKHANOVA A M, RODIONOVA G M, RAMENSKAYA G V. Investigation of polyphenolic compounds in different varieties of black chokeberry *Aronia melanocarpa*[J]. *Molecules*, 2023, 28(10): 4 101.
- [10] KIM D W, PARK M H, KIM M. Study on antioxidant activity and cytotoxicity of *Aronia melanocarpa* leaf tea extracts[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2023, 32(10): 1 423-1 433.
- [11] KIM D H, SHIN D W, LIM B O. Fermented *Aronia melanocarpa* inhibits melanogenesis through dual mechanisms of the PI3K/AKT/GSK-3 β and PKA/CREB pathways[J]. *Molecules*, 2023, 28(7): 2 981.
- [12] LEE H R, RYU H G, LEE Y, PARK J A, KIM S, LEE C E, JUNG S, LEE K H. Effect of aronia extract on collagen synthesis in human skin cell and dermal equivalent [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 439 225 6.
- [13] BUSHMELEVAK, VYSHTAKALYUKA, TEREZHEV D, BELOV T, PARFENOV A, SHARONOVA N, NIKITIN E, ZOBOV V. Radical scavenging actions and immunomodulatory activity of *Aronia melanocarpa* propylene glycol extracts[J]. *Plants*, 2021, 10(11): 2 458.
- [14] PLATONOVA E Y, SHAPOSHNIKOV M V, LEE H Y, LEE J H, MIN K J, MOSKALEV A. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extracts in terms of geroprotector criteria[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 114: 570-584.
- [15] WEI J, YU W, HAO R, FAN J, GAO J. Anthocyanins from *Aronia melanocarpa* induce apoptosis in caco-2 cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2020, 17(11): e2000654.
- [16] KIM S S, SHIN Y. Antibacterial and *in vitro* antidiabetic effects of aronia (*Aronia melanocarpa*) leaf extracts[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2020, 29(9): 1 295-1 300.
- [17] JIA Z, LIU H, CHEN W, TAO F. Characterization of anthocyanins in *Gynura bicolor* DC using HPLC-Q-Orbitrap MS and its stability during microwave vacuum drying[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2024, 192: 115 721.
- [18] CHEN Y, WU H, WANG L, YUE C, CHEN X, WU T, YANG Y, TANG L, WANG Z. Chemical composition and absorption characteristics of raw and prepared *Cassia Semen* extracts based on ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole Orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2024, 47(1): e2300826.
- [19] LI Y, DONG P, SHANG Z, DAI L, WANG S, ZHANG J. Unveiling the chemical composition of sulfur-fumigated herbs: a triple synthesis approach using UHPLC-LTQ-Orbitrap MS—a case study on steroidal saponins in *ophipogonis radix*[J]. *Molecules*, 2024, 29(3): 702.
- [20] YUAN H, SU W, LIANG L, XIE Q, LYU M, YU H, LI B, WANG W. Targeted offline two-dimensional HPLC and UHPLC-Orbitrap-MS combined with molecular networking reveal the effect of processing on chemical constituents of Xuetong (the stem of *Kadsura heteroclita*)[J]. *Separations*, 2024, 11(3): 87.
- [21] KUO T H, HUANG H C, HSU C C. Mass spectrometry imaging guided molecular networking to expedite discovery and structural analysis of agarwood natural products[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1 080: 95-103.

- [22] SHI D, LIAO N, LIU H, GAO W, ZHONG S, ZHENG C, CHEN H, XIAO L, ZHU Y, HUANG S, ZHANG Y, HU Y, ZHENG Y, JI J, CHENG J. Rapid analysis of compounds from *Piperis herba* and *Piperis kadsurae caulis* and their differences using high-resolution liquid-mass spectrometry and molecular network binding antioxidant activity[J]. *Molecules*, 2024, 29(2): 439.
- [23] BERGER T, ALENFELDER J, STEINMÜLLER S, HEIMANN D, GOHAIN N, PETRAS D, WANG M, BERGER R, KOSTENIS E, REHER R. A MassQL-integrated molecular networking approach for the discovery and substructure annotation of bioactive cyclic peptides[J]. *Journal of Natural Products*, 2024, 87(4): 692-704.
- [24] 黄飞飞, 王荣, 陈玥, 沈爱金, 刘艳芳, 梁鑫森, 金红利, 阎松. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 的分子网络技术快速分析夏天无生物碱[J]. *质谱学报*, 2021, 42(3): 228-240.
HUANG Feifei, WANG Rong, CHEN Yue, SHEN Aijin, LIU Yanfang, LIANG Xinmiao, JIN Hongli, YAN Song. Rapid identification of alkaloids in the Rhizomes of *Corydalis decumbens* by molecular networking base on HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2021, 42(3): 228-240(in Chinese).
- [25] 张雨婷, 王春国, 邓欣祺, 闫兴丽, 刘窈玉, 兰宇, 王宇航, 王家平, 金重先, 石晋丽, 张硕峰. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ 和分子网络技术快速鉴定灯盏细辛注射液的化学成分[J]. *质谱学报*, 2022, 43(3): 287-299.
ZHANG Yuting, WANG Chunguo, DENG Xinqi, YAN Xingli, LIU Yaoyu, LAN Yu, WANG Yuhang, WANG Jiaping, JIN Zhongxian, SHI Jinli, ZHANG Shuofeng. Rapid identification of chemical constituents in *Erigeron breviscapus* injection based on UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ and molecular network technology[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2022, 43(3): 287-299 (in Chinese).
- [26] 陈士林, 刘洁, 冯梦晗, 李月婷, 贾志鑫, 杨颂, 肖红斌. 基于 HPLC-Q-TOF MS 的网络化技术对宁夏枸杞根皮的化学成分研究[J]. *质谱学报*, 2023, 44(3): 397-411.
CHEN Shilin, LIU Jie, FENG Menghan, LI Yueting, JIA Zhixin, YANG Song, XIAO Hongbin. Identification of peptides in *Aster tataricus* by the strategy of UHPLC-Q-TOF-MS/MS combined with molecular network[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2023, 44(3): 397-411(in Chinese).
- [27] 何春娴, 陈靖枝, 杨静玲, 李春龙, 马晓莉, 南泽东, 江志波. 基于 HPLC-Q-TOF MS 的网络化技术对宁夏枸杞根皮的化学成分研究[J]. *质谱学报*, 2022, 43(6): 792-803.
HE Chunxian, CHEN Jingzhi, YANG Jingling, LI Chonglong, MA Xiaoli, NAN Zedong, JIANG Zhibo. Analysis of chemical constituents in the root bark of *Lycium barbarum* L. by HPLC-Q-TOF MS combined with networking[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2022, 43(6): 792-803(in Chinese).
- [28] 胡金祥. 白茶理化成分的分析与花色苷的结构鉴定[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
(收稿日期: 2024-04-28; 修回日期: 2024-05-31)