

基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap 的 发酵玫瑰茄化学成分筛查和研究

王喻淇¹, 梅晓丹¹, 李 洁¹, 宋 帅², 马 涛², 林 峰^{1,2}, 张加余³

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102400; 2. 江苏柯健生命科技发展有限公司, 北京 100176;

3. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029)

摘要:本研究采用高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap MS)技术,在电喷雾负离子模式下,对玫瑰茄水提液及其发酵液中有有机酸类、黄酮类、花青素类和木质素类化学成分进行分析鉴定。选取 Agilent Zorbax SB C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm),以 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)为流动相,流速 1 mL/min,梯度洗脱分析。根据高分辨质谱提供的精确相对分子质量数据和多级质谱碎片离子,获取目标化合物的相对分子质量和结构信息。结合保留时间、对照品及相关参考文献等信息,共筛选鉴定出 41 种化合物,包括 34 种有机酸类、4 种黄酮类、2 种花青素类以及 1 种木脂素类。结果表明,玫瑰茄发酵前后,其活性成分的种类及含量均呈现不同程度的变化,该方法阐明了玫瑰茄发酵前后化学成分的变化,可为玫瑰茄的进一步研究提供参考。

关键词:玫瑰茄;发酵;活性成分;高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap MS)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2019)01-0050-10

doi:10.7538/zpxb.2018.0078

Identification of Chemical Constituents in Fermented *Hibiscus sabdariffa* L. by UHPLC-LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer

WANG Yu-qi¹, MEI Xiao-dan¹, LI Jie¹, SONG Shuai², MA Tao², LIN Feng^{1,2}, ZHANG Jia-yu³

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China;

2. Jiangsu LiJian Life Science and Technology Development Co., LTD, Beijing 100176, China;

3. Beijing Institution of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Fermented traditional Chinese medicines (TCMs) dated to classic age and its modern research develops more in-depth. Fermentation plays an important role in toxicity reducing and efficacy enhancing for TCMs, but its material basis is inadequate. *Hibiscus sabdariffa* L. is a homology of medicine and food plant that has a good development of medicinal and utilization of value with its rich nutrient. It has too much con-

收稿日期:2018-06-28;修回日期:2018-09-19

基金项目:2017 年北京市科技新星与领军人才培养专项计划(Z171100001117029)资助

作者简介:王喻淇(1994—),女(蒙古族),辽宁人,硕士研究生,从事中药分析工作。E-mail: wyqi1994@163.com

通信作者:张加余(1981—),男(汉族),山东人,副研究员,从事中药质量控制及体内代谢研究。E-mail: zhangjiayu0615@163.com

林 峰(1983—),男(汉族),江苏人,高级工程师,从事中药发酵学研究。E-mail: linfeng_leo@163.com

tent of phenolic acid to taste sour and hard to accept. Studies have shown that fermentation broth from *Hibiscus sabdariffa* L. developed a nutrient-rich, sweet and sour and refreshing, unique flavor, with good stability product. In order to demonstrate which constituent has been changed during fermentation, ultra-high performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-LTQ-Orbitrap MS) equipped with an ESI ion source at negative mode was used for comprehensive study of the chemical constituents of aqueous extracts and fermentation broth from *Hibiscus sabdariffa* L.. Separation was performed with an Agilent Zorbax SB C18 column (250 mm×4.6 mm×5 μ m) with 0.1% formic aqueous solution and methanol as the mobile phase with the speed of 1 mL/min under the gradient condition. Based on the accurate mass measurement (error<5×10⁻⁶), MS/MS fragmentation pathways, different chromatographic behaviors and compared with the standards and references, a total of 41 compounds, including 34 organic acids, 4 flavonoids, 2 anthocyanins and 1 lignan are tentatively identified and characterized. The results showed that the varieties and concentration of *Hibiscus sabdariffa* L. change in different degrees and they provide the scientific basis for the statement for *Hibiscus sabdariffa* L. and the changes of its chemical constituents after fermentation.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L.; fermentation; chemical constituents; UHPLC-LTQ-Orbitrap MS

玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa* L.)又名洛神花、红果梅以及红角葵等,为锦葵科(Malvaceae)木槿属一年生草本植物,原产于西非至南亚,现广泛分布于全球热带和亚热带地区,我国台湾、福建、广东和云南南部等地大规模引入栽培^[1]。作为一种药食两用植物,玫瑰茄含丰富的有机酸,例如木槿酸、柠檬酸和原儿茶酸等^[2-3]。木槿酸是玫瑰茄花萼中的一种特殊物质,对心脏病、高血压、动脉硬化等有较好的疗效。此外,玫瑰茄含有的黄酮类、花色素类、木脂素类、还原糖类成分对肠道具有抑菌作用,并能促进胆汁分泌,预防心血管疾病^[4-8]。因此,玫瑰茄素有“植物红宝石”的美誉。

玫瑰茄特有的营养价值、保健价值及药用价值决定了其具有广阔的应用开发前景。然而,玫瑰茄富含酚酸类成分,口感酸涩,直接食用或饮用对胃肠道具有一定的刺激性,导致相关产品的商品形式较为单一,资源利用不充分^[9-11]。玫瑰茄发酵后口感醇厚、酸甜适宜,已被广泛用于制作发酵饮料和发酵果酒等^[12-13]。鉴于玫瑰茄发酵后的化学物质基础尚不明确,本研究将基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术阐明玫瑰茄发酵过程中主要化学成分的变

化,以期促进玫瑰茄资源的开发和利用,并为其发酵研究提供相关数据。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

DIONEX Ultimate 3000 高效液相色谱仪,LTQ-Orbitrap XL 质谱:美国 Thermo Scientific 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)和 Xcalibur 2.1 工作站;R200D 型电子分析天平(十万分之一):德国 Sartorius 公司产品;Millipore Synergy UV 型超纯水机;美国 Millipore 公司产品;KQ-250 DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品。

1.2 试剂与材料

没食子酸、儿茶素、槲皮素、原儿茶酸和矢车菊-3-O-葡萄糖苷等 5 种对照品:纯度均不低于 98%,成都曼思特生物科技有限公司产品;甲醇、甲酸:均为质谱级,美国 Fisher 公司产品;超纯水:由 Millipore 超纯水机制备。

玫瑰茄药材:购自亳州市华云中药饮片有限公司,经北京中医药大学张媛副教授鉴定为锦葵科木槿属草本植物玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa* L.)的干燥花萼。

1.3 溶液配制

混合对照品溶液的制备:分别取适量上述5种对照品,精密称定,加入甲醇制成浓度约为100 mg/L的储备液,使用时稀释成适宜浓度的混合对照品溶液。

玫瑰茄供试品溶液的制备:取30 g玫瑰茄药材粉末,精密称定,加入300 mL水混合搅拌均匀后,加入一定量的 K_2HPO_4 、 $NaHCO_3$ 等,调至pH 5.8~6.0;然后加入20 g蛋白胨、80 g白砂糖,定容至1 000 mL;在90℃水浴条件下灭菌30 min后,以0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

发酵玫瑰茄供试品溶液的制备:取30 g玫瑰茄药材粉末,精密称定,加入300 mL水混合搅拌均匀后,加入 K_2HPO_4 调至pH 4.5~5.0;然后在混合液中添加1 g纤维素酶、1 g果胶酶,于50℃下酶解90 min;加入 K_2HPO_4 、 $NaHCO_3$ 等,调至pH 5.8~6.0,再加入20 g蛋白胨、80 g白砂糖,定容至1 000 mL;溶液在90℃水浴条件下灭菌30 min,待温度降至室温,接种肠膜明串珠菌肠膜亚种发酵(培养温度25℃,发酵20天);取发酵后溶液过滤,滤液过0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm);流动相:0.1%

甲酸水溶液(A)-甲醇(B);梯度洗脱条件:0~10 min(5%B),10~16 min(5%~11%B),16~66 min(11%~51%B),66~70 min(51%~55%B);流速1 mL/min;柱温25℃;进样量10 μL 。

1.4.2 质谱条件 ESI离子源,负离子检测模式;流动相经柱后分流进入质谱检测器的流速为0.3 mL/min;毛细管温度350℃;鞘气流速9 L/min;辅助气流速3 L/min;喷雾电压3.0 kV;毛细管电压-35 V;管透镜电压-110 V;源内碰撞诱导裂解池碰撞能量(CID)35%。样品采用高分辨FT进行全扫描(full scan, FS),一级扫描分辨率30 000,质量扫描范围 m/z 50~1 000。

1.5 数据处理

利用Xcalibur2.1工作站进行数据处理,采用分子式预测模块预测所有母离子的分子式,相关参数设定为C[0-35]、H[0-50]、O[0-30]、环不饱和和双键数(RDB equivalent value)[0-15],质量精度误差在 5×10^{-6} 以内。

2 结果与讨论

采用HPLC-LTQ-Orbitrap MS法分析鉴定玫瑰茄发酵前后的化学成分。根据所获得的精确分子质量,结合相应的色谱保留行为、质谱裂解规律、特征碎片离子以及与对照品比对,最终鉴定出41种化学成分,其中有5种化学成分被准确鉴定,结果示于图1和表1。

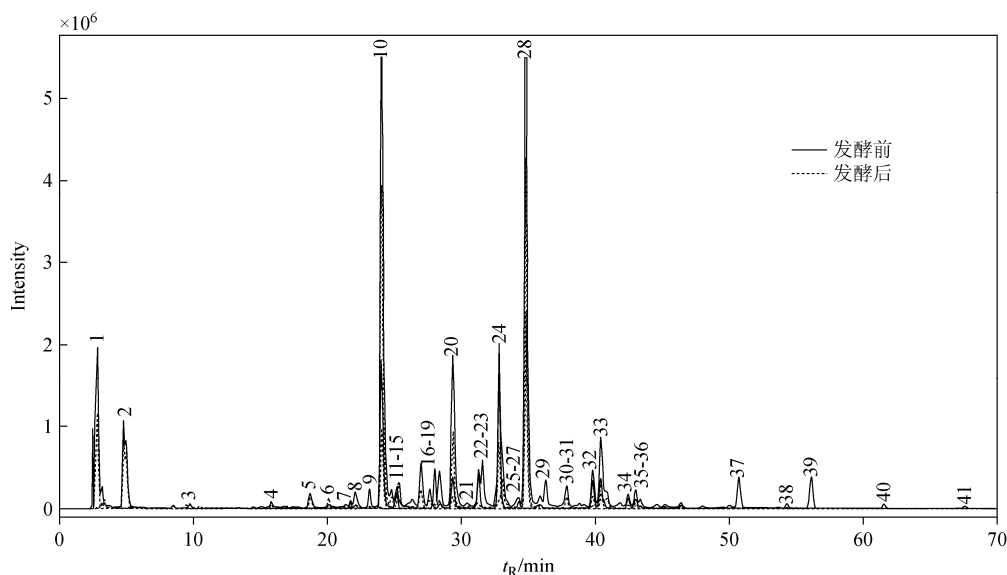


图1 玫瑰茄发酵前后的总离子流图

Fig. 1 TIC of water extract and fermentation broth of *Hibiscus sabdariffa* L.

表 1 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 对玫瑰茄发酵前后化学成分鉴定的鉴定分析

Table 1 Characterization of chemical constituents in water extract and fermentation broth from *Hibiscus sabdariffa* L. by UHPLC-LTQ-Orbitrap MS

序号 Peak	保留 时间 t_R / min	分子式 Formula [M—H] [−]	理论值 Theoretical mass (m/z)	实际值 Experimental mass (m/z)	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	裂解碎片 MS/MS fragment ions	鉴定结果 Identification results	发酵前 Water extract	发酵后 Fermentation broth
M1	2.76	C ₆ H ₇ O ₈	207.01464	207.01453	4.765	MS ² [207]:189(100),127(21),83(1)	木槿酸	+	+
M2	4.83	C ₆ H ₇ O ₇	191.01973	191.01965	4.345	MS ² [191]:111(100),173(20),129(3),131(2),87(1)	柠檬酸	+	+
M3*	9.50	C ₇ H ₅ O ₅	169.01425	169.01447	3.811	MS ² [169]:125(100),135(1),53(0.5)	没食子酸	+	+
M4	15.92	C ₇ H ₅ O ₄	153.01933	153.01967	3.377	MS ² [153]:109(100),125(2)	原儿茶酸/isomer	+	+
M5*	18.7	C ₇ H ₅ O ₄	153.01933	153.01929	3.894	MS ² [153]:109(100),125(2)	原儿茶酸	+	+
M6	20.21	C ₇ H ₅ O ₅	169.01425	169.01440	3.397	MS ² [169]:125(100),141(2),151(1)	没食子酸/isomer	+	+
M7	21.72	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₄	515.14063	515.14087	2.598	MS ² [515]:179(100),341(63),353(57),191(15),173(10)	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+
M8	22.10	C ₉ H ₇ O ₄	179.03498	179.03520	2.344	MS ² [179]:135(100),107(0.5),151(0.4),133(0.4)	咖啡酸/isomer	+	—
M9	23.29	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₄	515.14063	515.14099	2.831	MS ² [515]:341(100),179(21),221(13),353(7),191(1)	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+
M10	24.01	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.08781	353.08731	1.704	MS ² [353]:191(100),179(49),135(9),173(4)	新绿原酸	+	—
M11	24.08	C ₉ H ₇ O ₄	179.03498	179.03511	3.841	MS ² [179]:135(100),107(0.2)	咖啡酸/isomer	+	+
M12	24.77	C ₉ H ₉ O ₅	197.04554	197.04568	4.243	MS ² [197]:153(100),182(11),121(7),138(3)	丁香酸/isomer	+	+
M13	25.34	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₄	515.14063	515.14105	2.947	MS ² [515]:341(100),353(76),179(58),335(26),191(20)	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+
M14	26.06	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₄	515.14063	515.14124	3.316	MS ² [515]:353(100),191(64),341(7),179(5),247(4)	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+
M15	27.10	C ₉ H ₆ O ₅	197.04554	197.04579	3.801	MS ² [197]:182(100),153(19),138(7)	丁香酸/isomer	+	+
M16	28.10	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₄	515.14063	515.14130	3.432	MS ² [515]:353(100),495(95),191(92),323(29),341(28)	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+
M17	28.24	C ₉ H ₇ O ₄	179.03498	179.03519	3.288	MS ² [179]:135(100),179(0.5)	咖啡酸/isomer	+	—
M18	29.31	C ₉ H ₇ O ₃	163.04006	163.04018	3.418	MS ² [163]:119(100),163(0.2)	对香豆酸/isomer	+	+
M19	29.34	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	337.09289	337.09244	1.917	MS ² [337]:163(100),191(8),173(6),119(6)	3-对香豆酰奎尼酸	+	+
M20	29.81	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₄	515.14063	515.14124	3.316	MS ² [515]:341(100),353(63),179(49),173(44)	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+

续表 1

序号 Peak	保留 时间 t_R / min	分子式 Formula $[M-H]^-$	理论值 Theoretical mass (m/z)	实际值 Experimental mass (m/z)	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	裂解碎片 MS/MS fragment ions	鉴定结果 Identification results	发酵前 Water extract	发酵后 Fermentation broth
M21 *	29.98	$C_{15}H_{13}O_8$	289.07176	289.07166	3.443	$MS^2[289]:245(100),205(39),179(13),203(9)$	儿茶素	+	—
M22	31.35	$C_{22}H_{27}O_{14}$	515.14063	515.14111	3.064	$MS^2[515]:341(100),173(19),323(10),353(8),179(7)$	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+
M23	31.7	$C_7H_5O_4$	153.01933	153.01958	3.789	$MS^2[153]:109(100),125(1)$	原儿茶酸/isomer	+	—
M24	32.90	$C_{16}H_{17}O_9$	353.08781	353.08722	1.449	$MS^2[353]:191(100),179(3),135(0.5)$	绿原酸	+	+
M25	33.01	$C_{10}H_9O_4$	193.05063	193.05048	4.894	$MS^2[193]:134(100),149(33),178(4)$	阿魏酸/isomer	+	+
M26	33.1	$C_8H_7O_3$	163.04006	163.04021	3.602	$MS^2[163]:119(100),89(0.2)$	对香豆酸/isomer	+	+
M27	34.3	$C_{22}H_{27}O_{14}$	515.14063	515.14124	3.316	$MS^2[515]:341(100),179(19),353(16),497(7)$	单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷	+	+
M28	34.84	$C_{16}H_{17}O_9$	353.08781	353.08740	1.958	$MS^2[353]:173(100),179(56),191(16),135(7),155(2)$	隐绿原酸	+	+
M29	36.24	$C_6H_7O_8$	207.01464	207.01474	2.779	$MS^2[207]:189(100),191(53),127(18)$	木槿酸/isomer	+	—
M30	37.7	$C_{10}H_9O_4$	193.05063	193.05089	4.017	$MS^2[193]:149(100),178(46),134(17),175(8)$	阿魏酸/isomer	+	+
M31 *	37.90	$C_{21}H_{19}O_{11}$	447.09328	447.09418	4.456	$MS^2[447]:285(100),284(15),299(4),321(4),327(3)$	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	+	—
M32	39.82	$C_{16}H_{17}O_8$	337.09289	337.09271	2.718	$MS^2[337]:191(100),163(6),173(1),179(0.5)$	5-对香豆酰奎尼酸	+	+
M33	40.47	$C_{16}H_{17}O_8$	337.09289	337.09280	2.985	$MS^2[337]:173(100),163(9),191(1)$	4-对香豆酰奎尼酸	+	+
M34	42.45	$C_{17}H_{19}O_9$	367.10346	367.10388	4.144	$MS^2[367]:191(100),193(7),173(1)$	阿魏酰奎尼酸	+	+
M35	43.02	$C_{17}H_{19}O_9$	367.10346	367.10379	3.899	$MS^2[367]:173(100),193(10),161(8),191(2)$	阿魏酰奎尼酸	+	+
M36	43.48	$C_9H_6O_5$	197.04554	197.04590	4.359	$MS^2[197]:153(100),182(93),121(7),138(7)$	丁香酸/isomer	+	+
M37	50.69	$C_{26}H_{27}O_{16}$	595.13046	595.13080	2.418	$MS^2[595]:300(100),301(28),445(17),463(13),255(8)$	飞燕草素-3-O-桑布双糖苷	+	+
M38	54.37	$C_{22}H_{25}O_8$	417.15549	417.15585	3.490	$MS^2[417]:191(100),402(63),166(36),371(14)$	丁香脂素	+	+
M39	56.01	$C_{27}H_{29}O_{15}$	609.14611	609.14642	2.313	$MS^2[609]:301(100),300(34),255(6),273(1),227(1)$	芦丁	+	—
M40	61.56	$C_{27}H_{29}O_{15}$	593.15119	593.15167	2.653	$MS^2[593]:285(100),284(6),255(4),257(3),185(1)$	山奈酚-3-O-芸香糖苷	+	+
M41 *	67.60	$C_{15}H_9O_7$	301.03538	301.03506	2.594	$MS^2[301]:179(100),151(93),273(16),257(16)$	槲皮素	+	+

注:“*”表示与标准品比对鉴定,“+”表示检出,“—”表示未检出

2.1 有机酸类成分的鉴定

有机酸是玫瑰茄中含量最高的一类成分,具有抗氧化、抗癌、抗炎症等作用。本实验从玫瑰茄提取液中鉴定出 34 种有机酸类成分,包括 16 种绿原酸类和 18 种小分子酚酸类;从玫瑰茄发酵液中鉴定出 29 种有机酸类成分,包括 15 种绿原酸类和 14 种小分子酚酸类。

2.1.1 绿原酸类成分的鉴定 绿原酸类成分是由反式肉桂酸,如咖啡酸(caffieic acid)、阿魏酸(ferulic acid)、对香豆酸(*p*-coumaric acid)和奎尼酸(quinic acid)及其衍生物缩合而成的酯类化合物。根据奎尼酸单元羟基成酯的数目,绿原酸类成分可大致分为单酯类、二酯类、三酯类等。

M19、M32 和 M33 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 337.092 44、337.092 71、337.092 80,推断它们可能的分子式为 $C_{16}H_{17}O_8$,误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。在 ESI- MS^2 质谱图中主要的特征碎片离子为 m/z 191 $[quinic\ acid-H]^-$ 、 m/z 173 $[quinic\ acid-H-H_2O]^-$ 和 m/z 163 $[p-$

coumaric acid-H] $^-$ 。研究表明^[14-15],当对香豆酰基的酯化位置在 3、4 或 5 位时,所产生的 ESI- MS^2 基峰离子分别为 m/z 163、173、191。结合该类成分的反相色谱保留行为,分别将 M19、M32 和 M33 鉴定为 3-对香豆酰奎尼酸、5-对香豆酰奎尼酸和 4-对香豆酰奎尼酸。

M10、M24 和 M28 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 均为 m/z 353.087 81,其可能的分子式为 $C_{16}H_{17}O_9$,误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。分析三者的 ESI- MS^2 碎片离子的种类,可知它们均属于单咖啡酰奎尼酸类成分。单咖啡酰奎尼酸类化合物在质谱裂解过程中产生 m/z 191 $[quinic\ acid-H]^-$ 、 m/z 179 $[caffieic\ acid-H]^-$ 、 m/z 173 $[quinic\ acid-H-H_2O]^-$ 和 m/z 135 $[caffieic\ acid-H-CO_2]^-$ 等特征碎片离子,可能的裂解途径示于图 2。当咖啡酰基在奎尼酸母核上的取代位置为 4 位时,ESI- MS^2 基峰离子为 m/z 173,由此将 M28 鉴定为隐绿原酸;当咖啡酰基在奎尼酸母核上的取代位置为 3 位和 5 位时,它们的基峰离子均为 m/z 191,二者的最明

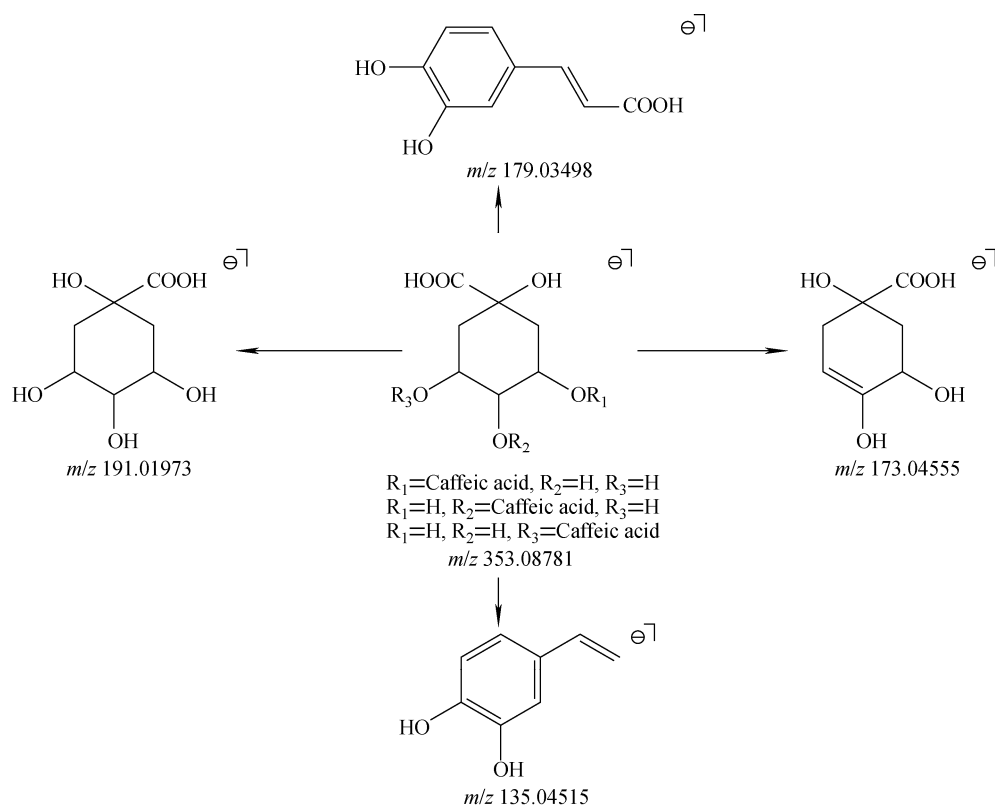


图 2 负离子模式下,单咖啡酰奎尼酸类成分的裂解途径

Fig. 2 Proposed fragmentation pathway for caffeoylquinic acid in negative ion mode

显区别在于 m/z 179 的相对丰度: M10 的 m/z 179 相对丰度 $>40\%$, 为新绿原酸; M24 的 m/z 179 相对丰度 $<5\%$, 为绿原酸^[16]。

M34 和 M35 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 367.103 88、367.103 79, 推断可能的分子式为 $C_{17}H_{19}O_9$, 误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。在 ESI-MS² 谱图的主要特征碎片离子为 m/z 193[ferulic acid- H]⁻、 m/z 191[quinic acid- H]⁻、 m/z 173[quinic acid- $H-H_2O$]⁻, 故推断二者均为阿魏酰奎尼酸类成分。根据参考文献[15], 将 M34 和 M35 分别鉴定为 3-阿魏酰奎尼酸和 4-阿魏酰奎尼酸。

M7、M9、M13、M14、M16、M20、M22 和 M28 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 515.140 87、515.140 99、515.141 05、515.141 24、515.141 30、515.141 24、515.141 11、515.141 24, 推断它们的分子式为 $C_{22}H_{27}O_{14}$, 误差均在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。结合上述化合物, 经 CID 裂解后均产生 m/z 353 $[M-H-\text{caffeoyl/Glu}]^-$ 、 m/z 335 $[M-H-\text{caffeoyl/Glu}-H_2O]^-$ 、 m/z 191[quinic acid- H]⁻ 特征碎片离子, 因此, 将它们鉴定为单咖啡酰奎尼酸葡萄糖苷类成分。

2.1.2 小分子酚酸类成分的鉴定 根据所获得的高分辨质谱数据, M1 和 M29 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 207.014 53、207.014 74, 推断它们的分子式为 $C_6H_7O_8$, 误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。在 ESI-MS² 谱图中均产生 m/z 189 $[M-H-H_2O]^-$ 和 m/z 127 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 特征碎片离子, 因此将 M1 和 M29 鉴定为木槿酸及其同分异构体。

M2 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 191.019 65, 推断其可能的分子式为 $C_6H_7O_7$, 误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。在 ESI-MS² 谱图中产生 m/z 173 $[M-H-H_2O]^-$ 、 m/z 129 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 和 m/z 111 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ 特征碎片离子, 故将其鉴定为柠檬酸。

M3 和 M6 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 169.014 47、169.014 40, 推断其可能的分子式为 $C_7H_5O_5$, 误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。它们的基峰离子均为 m/z 125 $[M-H-CO_2]^-$, 结合对照品比对结果, 将 M3 鉴定为没食子酸, 同时将 M6 鉴定为没食子酸的同分异

构体。

M4、M5 和 M23 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 153.019 67、153.019 29、153.019 58, 推断其可能的分子式为 $C_7H_5O_4$, 误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。三者的 ESI-MS² 谱图均产生 m/z 125 $[M-H-CO]^-$ 和 m/z 109 $[M-H-CO_2]^-$ 特征碎片离子, 结合对照品比对结果, 将 M5 鉴定为原儿茶酸, 将 M4 和 M23 鉴定为原儿茶酸的同分异构体。

M8、M11 和 M17 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 179.035 20、179.035 11、179.035 19, 推断它们可能的分子式为 $C_9H_7O_4$, 且误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。在 ESI-MS² 谱图中均产生 m/z 179 $[M-H]^-$ 、 m/z 135 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 107 $[M-H-CO-CO_2]^-$ 特征碎片离子, 故推断它们为咖啡酸及其同分异构体^[17]。

M12、M15 和 M36 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 197.045 68、197.045 79、197.045 90, 推断其可能的分子式为 $C_9H_9O_5$, 且误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。三者的 ESI-MS² 谱图均产生 m/z 182 $[M-H-CH_3]^-$ 、 m/z 153 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 138 $[M-H-CH_3-CO_2]^-$ 特征碎片离子, 由此鉴定为丁香酸及其同分异构体。

M17 和 M26 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 163.040 18、163.040 21, 推断其可能的分子式为 $C_9H_7O_3$, 且误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。二者的 ESI-MS² 谱图均产生 m/z 119 $[M-H-CO_2]^-$ 的基峰离子, 由此鉴定为对香豆酸及其同分异构体。

M25 和 M30 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 m/z 193.050 48、193.050 89, 推断其可能的分子式为 $C_{10}H_9O_4$, 且误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内。二者的 ESI-MS² 谱图均产生 m/z 178 $[M-H-CH_3]^-$ 、 m/z 149 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 134 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$ 等碎片离子, 由此鉴定 M25 和 M30 为阿魏酸及其同分异构体^[18]。

2.2 黄酮类成分的鉴定

玫瑰茄中的黄酮类化合物主要为黄酮醇和黄烷醇, 多以单体或聚合物的形式存在。本研究从玫瑰茄提取液中鉴定出 4 种黄酮类成分; 从玫瑰茄发酵液中鉴定出 2 种黄酮类成分。

M21 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z

289.071 66,推断其可能的分子式为 $C_{15}H_{13}O_6$, 误差为 3.443×10^{-6} 。在 ESI-MS² 谱图中, m/z 289 首先中性丢失 1 分子 CO_2 , 产生碎片离子 m/z 245 $[M-H-CO_2]^-$, 同时产生 m/z 203 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$ 和 m/z 179 $[M-H-C_2H_2O-C_3O_2]^-$ 等特征离子, 结合对照品对比及相关文献^[19], 将 M21 鉴定为儿茶素。

M39 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 609.146 42, 推断其可能的分子式为 $C_{27}H_{29}O_{16}$, 误差为 2.313×10^{-6} 。由文献^[20]可知, 芸香糖为 1 分子鼠李糖与 1 分子葡萄糖连接, 在 CID 裂解过程中易直接丢失芸香糖残基, 即减少 308 u。M39 经 CID 裂解后产生 m/z 301 $[M-H-Rha-Glu]^-$ 、 m/z 300 $[M-2H-Rha-Glu]^-$ 、 m/z 255 $[M-H-Rha-Glu-H_2O-CO]^-$ 基峰离子。其中, m/z 301 丢失 C 环羰基形成 m/z 273 $[M-H-Rha-Glu-CO]^-$, m/z 255 经重排并丢失 CO 形成 m/z 227 $[M-H-Rha-Glu-H_2O-2CO]^-$ 碎片离子。由此将 M39 鉴定为芦丁。同理, M40 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 593.151 67, 推断其可能的分子式为 $C_{27}H_{29}O_{15}$, 误差为 2.653×10^{-6} 。 m/z 593 经 CID 裂解后产生 m/z 285 $[M-H-Rha-Glu]^-$ 和 m/z 284 $[M-2H-Rha-Glu]^-$ 基峰离子。其中, m/z 285 丢失 C 环羰基形成 m/z 257 $[M-H-Rha-Glu-CO]^-$ 碎片离子或开环重排生成 m/z 185 $[M-H-Rha-Glu-C_4H_4O_3]^-$ 碎片离子, 由此推断 M40 为山奈酚芸香糖苷^[21]。

M41 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 301.035 06, 推断其可能的分子式为 $C_{15}H_9O_7$, 误差为 2.594×10^{-6} 。在 ESI-MS² 谱图中, m/z 301 通过 RDA 重排形成 m/z 151 $[M-H-C_4H_4O_5-H_2O]^-$ 。同时, m/z 301 丢失 C 环羰基形成 m/z 273 $[M-H-CO]^-$, 并继续丢失 1 分子 H_2O 形成 m/z 257 $[M-H-CO-H_2O]^-$ 。结合对照品比对和文献^[22], 可将 M41 鉴定为槲皮素。

2.3 花青素类成分的鉴定

玫瑰茄花青素, 也叫玫瑰茄花色苷、玫瑰茄红色素, 是玫瑰茄花萼中富含的一种生理活性成分, 主要包括飞燕草素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、飞燕草素-3-桑布双糖苷和矢车菊素-3-桑布双糖苷等。本研究从玫瑰茄提取

液中鉴定出 2 种花青素类成分; 从玫瑰茄发酵液中鉴定出 1 种花青素类成分。

M31 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 447.094 18, 推断其可能的分子式为 $C_{21}H_{19}O_{11}$, 误差为 4.456×10^{-6} 。在 ESI-MS² 谱图中, m/z 447 离子中性丢失 1 分子葡萄糖残基, 产生 m/z 285 $[M-H-Glu]^-$ 和 m/z 284 $[M-2H-Glu]^-$ 碎片离子。结合对照品比对, 可将 M31 鉴定为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷。

M37 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 595.130 80, 推断其可能的分子式为 $C_{26}H_{27}O_{16}$, 误差为 2.418×10^{-6} 。在 ESI-MS² 谱图中, m/z 595 易丢失 1 分子桑布双糖(Sam)形成 m/z 301 $[M-H-Sam]^-$ 和 m/z 300 $[M-2H-Sam]^-$, 并生成 m/z 255 $[M-H-Sam-H_2O-CO]^-$ 等碎片离子, 由此可将 M37 鉴定为飞燕草素-3-O-桑布双糖苷。

2.4 木脂素类成分的鉴定

玫瑰茄作为锦葵科植物, 含有一定量的木脂素类成分。本研究从玫瑰茄提取液和玫瑰茄发酵液中均鉴定出 1 种木脂素类成分。

根据所获得的高分辨质谱数据, M38 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 417.155 85, 推断其可能的分子式为 $C_{22}H_{25}O_8$, 误差为 3.490×10^{-6} 。在 ESI-MS² 谱图中, M38 离子产生 m/z 402 $[M-H-CH_3]^-$ 碎片离子, 表明其结构式中含有甲氧基; m/z 191 丢失 1 分子 H_2O 生成 m/z 166, 同时还产生 m/z 371 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 由此可将 M38 鉴定为丁香脂素。

3 结论

本研究应用 UHPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱技术对玫瑰茄发酵前后的有机酸、黄酮、花青素及木脂素类化学成分进行分析检测。根据所获得的精确分子质量, 同时结合色谱保留行为、质谱裂解规律、特征碎片离子、对照品比对以及相关文献报道, 共鉴定出 41 种化学成分, 包括 34 种有机酸类、4 种黄酮类、2 种花青素类及 1 种木脂素类。其中, 从发酵前玫瑰茄提取液中鉴定出 41 种化学成分, 从发酵玫瑰茄提取液中鉴定出 33 种化学成分。研究结果表明, 玫瑰茄发酵前后其中有机酸成分的种类及含量发生不同程度的变化。例如, 玫瑰茄发酵

液中的绿原酸类成分含量发生明显下降甚至消失,但仍保留了其特有的木槿酸、柠檬酸和花青素等有效成分,这可能就是玫瑰茄经发酵后其酸涩感和胃肠刺激性降低的主要原因。

其次,本研究优选肠膜明串株菌肠膜亚种对玫瑰茄进行发酵,该菌种作为可用于食品的菌种之一,自身有较好的发酵特性,且耐酸性佳,其强大的生物转化能力有益于玫瑰茄中活性成分的转化,提高药效。综上,本研究系统地阐明了玫瑰茄发酵前后的活性物质变化,可为多渠道、多途径开发玫瑰茄相关产品,提高相关产品的质量奠定基础。

参考文献:

- [1] 李洪祥,姜保平,肖伟,许利嘉,肖培根. 玫瑰茄近十年的研究进展[J]. 中国现代中药,2017,19(4):587-593.
LI Hongxiang, JIANG Baoping, XIAO Wei, XU Lijia, XIAO Peigen. A comprehensive review on *Hibiscus sabdariffa* L [J]. Modern Chinese Medicine, 2017, 19(4): 587-593(in Chinese).
- [2] 顾关云,蒋昱. 玫瑰茄的化学成分与生物活性[J]. 现代药物与临床,2010,25(2):109-115.
GU Guanyun, JIANG Yu. Study on phytochemistry and bioactivities of *Hibiscus sabdariffa* [J]. Drugs & Clinic, 2010, 25(2): 109-115(in Chinese).
- [3] RIAZ G, CHOPRA R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, (102): 575-586.
- [4] DACOSTARROCHA I, BONNLAENDER B, SIEVERS H, PISCHEL I, HEINRICH M. *Hibiscus sabdariffa* L. a phytochemical and pharmacological review[J]. Food Chemistry, 2014, 165(20): 424-443.
- [5] 李升锋,刘学铭,陈智毅,徐玉娟,张友胜,吴继军. 玫瑰茄花萼营养和药理作用研究进展[J]. 食品研究与开发,2006,27(10):129-133.
LI Shengfeng, LIU Xueming, CHEN Zhiyi, XU Yujuan, ZHANG Yousheng, WU Jijun. Recent advances in the studies on chemical composition and pharmacological functions of *Hibiscus sabdariffa calyx* [J]. Food Research and Development, 2006, 27(10): 129-133(in Chinese).
- [6] 顾关云,蒋昱. 玫瑰茄的药理作用与临床应用[J]. 现代药物与临床,2010,25(3):165-172.
GU Guanyun, JIANG Yu. Study on pharmacological effects and clinical application of *Hibiscus sabdariffa* [J]. Drugs & Clinic, 2010, 25(3): 165-172(in Chinese).
- [7] ALI B H, WABEL N A, BLUNDEN G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review[J]. Phytotherapy Research, 2005, 19(5): 369-375.
- [8] RASHEED D M, PORZEL A, FROLOV A, EI SEEDI H R, WESSJOHANN L A, FARAG M A. Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α -Glucosidase inhibition[J]. Food Chemistry, 2018, (250): 236-244.
- [9] 张赛男. 玫瑰茄的药用价值与利用现状[J]. 现代化农业,2014(12):23-25.
- [10] CID-ORTEGA S, GUERRERO-BELTRÁN J A. Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: a review[J]. Journal of Food Science & Technology, 2015, 52(11): 1-11.
- [11] 李升锋,刘学铭,朱志伟,黄儒强,吴继军,陈智毅. 玫瑰茄资源的开发利用[J]. 食品科技, 2003,(6):86-88.
LI Shengfeng, LIU Xueming, ZHU Zhiwei, HUANG Ruqiang, WU Jijun, CHEN Zhiyi. Development and utilization of the roselle resource [J]. Food Science and Technology, 2003, (6): 86-88(in Chinese).
- [12] 李玉珠,龙谋,汤艳燕,蒋茜,杜木英. 玫瑰茄浸提及其发酵酒工艺优化及发酵前后有机酸和酚酸的比较[J]. 食品科学,2018,39(4):66-75.
LI Yuzhu, LONG Mou, TANG Yanyan, JIANG Qian, DU Muying. Optimization of preparation of water extract from roselle and fermentation of roselle wine and variations in organic acids and phenolic acids concentrations[J]. Food Science, 2018, 39(4): 66-75(in Chinese).
- [13] IFIE I, MARSHALL L J, HO P. *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) extracts and wine: phytochemical profile, physicochemical properties, and carbohydrase inhibition[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(24): 4 921-4 931.
- [14] PARVEEN I, THREADGILL M D, HAUCK B, DONNISON I, WINTERS A. Isolation,

- identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves and stems of *Miscanthus × giganteus*, using LC-ESI-MSⁿ [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(18): 2 376-2 384.
- [15] ZHANG J Y, WANG Z J, LIU Y, LI CH, CAI W, LU J Q, Q Y J. A strategy for comprehensive identification of sequential constituents using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer, application study on chlorogenic acids in *Flos Loniceræ Japonicæ* [J]. *Talanta*, 2016, 147(62): 16-27.
- [16] CLIFFORD M N, JOHNSTON K L, KNIGHT S, KUHNERT N. A hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acid [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51(10): 2 900-2 911.
- [17] 王放, 张加余, 王青, 刘颖, 王子健, 卢建秋. HPLC-HR-MSⁿ 法鉴定苦碟子注射液中酚酸类成分 [J]. *中南药学*, 2013, (8): 561-565.
WANG Fang, ZHANG Jiayu, WANG Qing, LIU Ying, WANG Zijian, LU Jianqiu. Identification of phenolic acids in Kudiezi injection by HPLC-HR-MSⁿ [J]. *Central South Pharmacy*, 2013, (8): 561-565 (in Chinese).
- [18] 刘思焱, 张秀平, 尚展鹏, 王菲, 张晓昕, 张加余, 卢建秋. UHPLC-LTQ-Orbitrap 鉴定苦碟子注射液化学成分及其在大鼠血浆中的移行成分 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(12): 2 235-2 244.
LIU Siyi, ZHANG Xiuping, SHANG Zhanpeng, WANG Fei, ZHANG Xiaoxin, ZHANG Jiayu, LU Jianqiu. Rapid characterization of chemical constituents and rats metabolites of Kudiezi injection by UHPLC-LTQ-Orbitrap [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(12): 2 235-2 244 (in Chinese).
- [19] 刘国强, 董静, 王弘, 万乐人, 端裕树, 陈世忠. 4 种儿茶素类化合物电喷雾质谱裂解规律的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(8): 1 566-1 570.
LIU Guoqiang, DONG Jing, WANG Hong, WAN Leren, DUAN Yushu, CHEN Shizhong. Fragmentation pattern analysis of 4 catechin by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2009, 30(8): 1 566-1 570 (in Chinese).
- [20] 李自红, 魏悦, 范毅, 朱杰, 赵天增. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析 [J]. *分析试验室*, 2015, (2): 186-189.
LI Zihong, WEI Yue, FAN Yi, ZHU Jie, ZHAO Tianzeng. Analysis of rutin by electrospray iontrap mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2015, (2): 186-189 (in Chinese).
- [21] 梁艳, 于世锋, 陈卫军, 曹炜. 山奈酚的电喷雾质谱裂解途径 [J]. *应用化学*, 2009, 26(10): 1 250-1 252.
LIANG Yan, YU Shifeng, CHEN Weijun, CAO Yi. Fragmentation pattern analysis of kaempferol by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2009, 26(10): 1 250-1 252 (in Chinese).
- [22] 李宇航, 戴海学, 汪明明, 李晓蓉, 王丽娟, 薛明. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析 [J]. *质谱学报*, 2009, 30(6): 374-378.
LI Yuhang, DAI Haixue, WANG Mingming, LI Xiaorong, WANG Lijuan, XUE Ming. Elucidation of quercetin by electron spray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2009, 30(6): 374-378 (in Chinese).