

基于 UPLC-Orbitrap-HRMS 技术的苕麻籽乙醇提取物中主要化学成分分析与鉴定

熊莹姿¹, 赵振¹, 成婧², 李佳银¹, 罗磊¹, 李跑¹, 李脉泉¹, 刘霞^{1*}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

(2. 长沙海关技术中心, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410004)

摘要: 应用超高效液相色谱-离子阱-超高分辨率质谱技术对苕麻籽乙醇提取物主要化学成分进行了分析与鉴定。高效液相色谱条件为 Agilent 5TC-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、0.2% 甲酸水溶液-乙腈作为流动相梯度洗脱。质谱条件为电喷雾离子源 (ESI), 离子阱质量分析器 (orbitrap), 喷雾电压 3500 V (正离子模式)。通过 1,1-二苯基-2-吡啶并胍基-高效液相色谱 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-high performance liquid chromatography, DPPH-HPLC) 方法, 发现苕麻籽乙醇提取物中, 存在多种抗氧化活性成分。进一步扫描相应色谱峰的紫外吸收光谱, 结合标准品质谱数据、MsBank、mzCloud 质谱数据库和相关文献等多种方式, 解析其质谱信息, 从苕麻籽乙醇提取物中共鉴别出 20 种化合物, 其中黄酮类化合物 10 种, 分别为原花青素二聚体、芦丁、异槲皮苷/金丝桃苷、山茶酚-3-O-β-D-芸香糖苷、槲皮素-3-O-β-D-木糖苷、山茶酚-3-O-β-D-葡萄糖苷/山茶酚-3-O-β-D-半乳糖苷、槲皮苷、槲皮素、山茶酚、阿福豆苷。其他化合物有糖类物质 1 种, 核苷类 2 种, 氨基酸类 1 种, B 族维生素 3 种。苕麻籽乙醇提取物中存在的黄酮类化合物主要为具有抗氧化活性的黄酮苷元, 表明苕麻籽有潜在的抗氧化活性。该研究为苕麻籽的进一步开发和利用提供科学依据。

关键词: 苕麻籽; 乙醇提取物; 化学成分; 液相质谱联用

文章编号: 1673-9078(2022)02-245-255

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0542

Analysis and Identification of Main Chemical Components in Ethanol Extract of Ramie Seeds Based on UPLC-Orbitrap-HRMS Technology

XIONG Yingzi¹, ZHAO Zhen¹, CHENG Jing², LI Jiayin¹, LUO Lei¹, LI Pao¹, LI Maiquan¹, LIU Xia^{1*}

(1. Hunan Province Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China) (2. China Technology Center of Changsha Customs, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: The main chemical composition of the ethanol extract from ramie seeds were analyzed and identified using ultra performance liquid chromatography-orbitrap-high resolution mass spectrometer (UPLC-Orbitrap-HRMS). UPLC conditions: Agilent 5TC-C18 chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase gradient elution with 0.2% formic acid water solution and acetonitrile. HRMS conditions: electrospray ion source (ESI), ion trap mass analyzer (orbitrap), spray voltage 3500 V (positive ion mode). The mass spectrum information was analyzed by mass spectrometry data of standards, MsBank mzCloud mass spectrometry databases and relevant literature. Twenty compounds were identified from the ethanol extract of ramie seeds. In which, there are ten flavonoids, including

引文格式:

熊莹姿, 赵振, 成婧, 等. 基于 UPLC-Orbitrap-HRMS 技术的苕麻籽乙醇提取物中主要化学成分分析与鉴定[J]. 现代食品科技, 2022, 38(2):245-255

XIONG Yingzi, ZHAO Zhen, CHENG Jing, et al. Analysis and identification of main chemical components in ethanol extract of ramie seeds based on UPLC-Orbitrap-HRMS technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 245-255

收稿日期: 2021-05-21

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目 (2020JJ4354)

作者简介: 熊莹姿 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: 121654154@qq.com

通讯作者: 刘霞 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: liuxiaspr@aliyun.com

proanthocyanidin dimer, rutin, isoquercitrin/hyperioside, kaempferol-3-O- β -D-rutin, quercetin-3-O- β -D-xyloside, kaempferol-3-O- β -D-glucoside/kaempferol-3-O- β -D-galactoside, quercitrin, quercetin, kaempferol and afzelin. The flavonoids in the ethanol extract of ramie seeds are mainly flavonoid aglycones with antioxidant activity, indicating that ramie seeds have potential antioxidant activity. This study provides a scientific basis for the development and utilization of ramie seed.

Key words: ramie seed; ethanol extract; chemical composition; ultra performance liquid chromatography-orbitrap-high resolution mass spectrometer (UPLC-Orbitrap-HRMS)

苧麻为荨麻科苧麻属生宿根性草本植物, 主要分布在亚热带和热带地区, 在我国湖南、云南、四川等省份均有种植^[1]。苧麻茎皮拥有优质植物纤维, 是重要的纺织工业原料, 其根和叶是我国传统中药, 有活血、安胎等功效^[2]。现代研究主要致力于苧麻根、叶中的功能成分分析, 特别是黄酮类化合物具有多种生物活性, 一直是其研究的热点^[3,4]。目前已经从苧麻中分离鉴定出十余种黄酮化合物, 苧麻叶中主要有芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、野漆树苷等, 苧麻根中主要有芦丁、槲皮素、紫杉叶素、紫云英苷、表儿茶素等^[5-7], 且研究表明, 苧麻属黄酮类化合物具有一定抗氧化^[4]、抗炎、抗菌^[8]、抑制乙型肝炎病毒活性^[9]的能力。但是对于苧麻籽的研究较少, 现有的报道也只限于关于苧麻籽油的研究, 研究发现苧麻籽油中含有丰富的不饱和脂肪酸^[10,11]。

超高效液相色谱-离子阱-超高分辨率质谱技术 (Ultra Performance Liquid Chromatography-Orbitrap-High Resolution Mass Spectrometer, UPLC-Orbitrap-HRMS) 技术是近几年发展起来的分离鉴定技术, 具有超高压、超灵敏、超高分离度等诸多优点。该技术在单个分析周期内即可完成对样品高通量、高精度的一级、二级扫描, 并且对复杂的样品也可提供灵敏和可重复的监测, 获得精确质量数, 实现多种物质的定性、定量和确证分析^[12,13]。毛祈萍等^[14]基于超高效液相色谱和飞行时间质谱联用对紫苏化学成分进行鉴定, 总共鉴定出 51 个成分。本研究首先通过 1,1-二苯基-2-吡啶并胍基-高效液相色谱 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-High performance liquid chromatography, DPPH-HPLC) 方法, 发现苧麻籽乙醇提取物中, 存在多种抗氧化活性成分。随后, 通过扫描相应色谱峰的紫外吸收光谱, 初步推断其抗氧化活性成分多为黄酮类化合物。然后采用 UPLC-Orbitrap-HRMS 对苧麻籽的乙醇提取物进行进一步的分析, 结合标准品的质谱数据、相关文献和 MsBank、mzCloud 质谱数据库, 对样品质谱信息进行解析, 推断其可能存在的化合物, 并对其中部分化合物的质谱裂解途径进行了分析, 为苧麻籽的开发利用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苧麻籽 (品种为湘苧三号, 湖南长沙湖南农业大学苧麻研究所“湘苧三号”原种基地) 由湖南农业大学苧麻研究所提供, 于 2019 年 1 月初采收。经清洗、干燥、粉碎、过 60 目筛后制成苧麻籽粉末。

芦丁标准品 (纯度 98%)、槲皮素标准品 (纯度 99.7%), 成都曼斯特生物科技有限公司。

无水乙醇, 郑州派尼化学试剂厂; 石油醚 (沸程 30~60 °C), 国药集团化学试剂有限公司; 1,1-二苯基-2-吡啶并胍基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 日本东京化成工业株式会社; 乙腈 (色谱级), 美国 TEDIA 试剂有限公司; 甲酸 (色谱级), 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

AUY220 电子天平, 日本岛津公司; KQ250DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; BJ-100 高速多功能粉碎机, 德清拜杰电器有限公司; RE-2000B 旋转蒸发器, 巩义市予华仪器有限公司; SH-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限公司; FD-1B 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配有 UV-VIS 检测器, UV-VIS 的型号为 Agilent 1100/1200 VWD), 美国 Agilent 公司; UPLC-Orbitrap fusion 色谱-质谱联用仪 (配有电喷雾离子源 (ESI) 及离子阱质量分析器 (orbitrap)), 美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 苧麻籽乙醇提取物和样品液的制备

根据文献^[15,16], 采用 70% 的乙醇溶液 (V/V) 提取苧麻籽中的化学成分。取一定量苧麻籽粉末, 按照液料比 20:1 (mL/g) 加入 70% 的乙醇溶液 (V/V), 在功率 250 W、温度 60 °C 的超声清洗器中超声提取 90 min 后抽滤。滤液在 50 °C 下减压蒸发, 回收乙醇, 获得浓缩液。浓缩液经石油醚多次萃取, 除去脂溶性物质,

再减压蒸发除去石油醚,在-70℃下冷冻干燥得苕麻籽乙醇提取物。适量称取获得的苕麻籽乙醇提取物固体,以70%乙醇溶液(V/V)为溶剂,适量溶剂使之溶解,获得样品液。

1.3.2 对照品溶液配置

精密称取芦丁和槲皮素标准品各20.0 mg,以70%乙醇溶液(V/V)为溶剂,配制成浓度均为0.2 mg/mL的对照品溶液。

1.3.3 DPPH 溶液配置

精密称取25 mg DPPH,以无水乙醇为溶剂,使用25 mL的容量瓶定容至25 mL,配置成浓度为1 mg/mL DPPH溶液。

1.3.4 苕麻籽乙醇提取物的抗氧化组分分析

采用DPPH-HPLC法,分析苕麻籽乙醇提取物中,是否存在抗氧化组分。取0.2 mL样品液与1 mL 1 mg/mL DPPH溶液混合,避光放置30 min,经0.45 μm滤膜过滤后进行HPLC分析,以1 mL无水乙醇代替DPPH溶液为反应前对照。

HPLC条件:Agilent 5TC-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);在线脱气单元、四元泵、UV检测器、手动进样器;柱温30℃,流速1 mL/min,检测波长360 nm^[17],进样量10 μL,样品液经0.45 μm滤膜过滤。梯度洗脱条件^[18]如表1。

表1 HPLC 梯度洗脱条件

Table 1 HPLC gradient elution conditions

时间/min	流动相/%	
	乙腈	0.2%甲酸(V/V)
0	17	83
15	28	72
20	36	64
24	45	55
33	52	48
35	60	40
37	17	83
38	17	83

1.3.5 苕麻籽乙醇提取物的 UPLC-Orbitrap-HRMS 分析

采用UPLC-Orbitrap-HRMS,对苕麻籽乙醇提取物进行成分分析。

UPLC条件:Agilent 5TC-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、在线脱气单元、四元泵、自动进样器,柱温40℃,流速0.5 mL/min,样品液滤膜过滤后进样5 μL,梯度洗脱条件见表1。

HRMS条件:电喷雾离子源(ESI),离子阱质量分析器(orbitrap),喷雾电压3500 V(正离子模式),

毛细管温度320℃,鞘气40 Arb,辅助气5 Arb。

2 结果与讨论

2.1 苕麻籽乙醇提取物的 DPPH-HPLC 及各色

谱峰的紫外分析

DPPH是一种较为稳定的小分子自由基,常用于天然产物中抗氧化剂的筛选^[19]。抗氧化活性成分与DPPH中的单电子进行配对,使得抗氧化物质结构发生变化,在HPLC谱图上表现为抗氧化物质峰面积的减少或消失。因此比较样品与DPPH反应前后的HPLC谱图,可以初步判断样品中是否含有抗氧化活性组分^[20]。图1为苕麻籽乙醇提取物与DPPH反应前后的HPLC谱图。从图1可以明显看出,苕麻籽乙醇提取物中出现13个峰。当苕麻籽乙醇提取物与DPPH反应后,其中峰1、2、3、4、6的色谱峰峰面积明显减小,峰9的色谱峰已消失,表明苕麻籽提取物中有多种抗氧化活性物质。

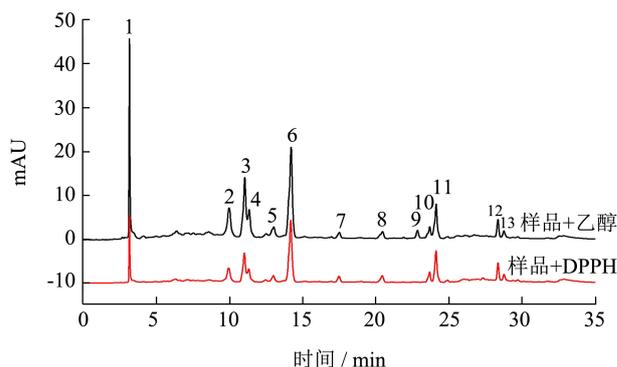


图1 苕麻籽乙醇提取物与DPPH反应前后的HPLC谱图

Fig.1 HPLC spectra for before and after the reaction of the ethanol extract of ramie seeds and DPPH

表2 各色谱峰的紫外吸收带

Table 2 Ultraviolet absorption bands of various peaks

峰号	紫外吸收带 I /nm	紫外吸收带 II /nm
1	-	264
2	347	258
3	350	260
4	345	259
6	352	260
9	291	242

黄酮类化合物的紫外吸收主要分布在300~400 nm(带I)和220~280 nm(带II)两个波段^[21]。为进一步分析上述色谱所分离出的物质(1、2、3、4、6、9)是否属于黄酮类化合物;应用Agilent 1100高相液相色谱仪,采用在线停泵扫描方式,扫描上述各

种物质的紫外吸收光谱。停泵时间为目标色谱峰的出峰到峰顶保留时间的三分之一,扫描波长范围为190~400 nm。结果如表2所示。从表2中可以看出,色谱峰1只在带II中存在紫外吸收,但是色谱峰2、3、4、6、9在带I和带II中都存在紫外吸收,且带I中的最大紫外吸收波长分别为:347、350、245、352、291 nm,带II中的最大紫外吸收波长分别为:258、260、259、260、242 nm。在两个吸收带中都存在紫外吸收的色谱峰2、3、4、6均符合黄酮类物质的紫外吸收特征,因此推断苕麻籽乙醇提取物含有多种抗氧化活性的黄酮类化合物。

2.2 UPLC-Orbitrap-HRMS 分析

为进一步明确苕麻籽乙醇提取物中的化合物,采用UPLC-Orbitrap-HRMS 对其进行分析。图2为样品的总离子流色谱图,将其与对照品质谱数据、MsBank、mzCloud 质谱数据库以及相关文献进行对比,初步鉴别出20种化合物(见表3),其中黄酮类化合物10种,分别为原花青素二聚体、芦丁、异槲皮苷/金丝桃苷、山萘酚-3-O- β -D-芸香糖苷、槲皮素-3-O- β -D-木糖苷、山萘酚-3-O- β -D-葡萄糖苷/山萘酚-3-O- β -D-半乳糖苷、槲皮苷、槲皮素、山萘酚、阿福豆苷。B族维生素3种,分别为维生素B₁、维生素B₆、维生素B₂。核苷类物质2种(鸟苷和腺苷),氨基酸类物质2种(N⁶,N⁶,N⁶-三甲基-L-赖氨酸和酪氨酸),糖类物质2种(麦芽四糖和D-氨基葡萄糖),酸类物质1种(反式-3-吡啶丙烯酸)。

表3 质谱分析结果

Table 3 Mass spectrometry results

编号	保留时间/min	提取离子	测定值	理论值	误差/($\times 10^{-6}$)	分子式	特征碎片离子	可能的化合物名称	参考来源
1	5.09	[M+H] ⁺	189.16	189.16	0.51	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	144、130	N ⁶ ,N ⁶ ,N ⁶ -三甲基-L-赖氨酸	数据库
2	5.21	[M+H] ⁺	689.21	689.21	1.05	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	527、365	麦芽四糖	[23]
3	5.45	[M+H] ⁺	180.09	180.09	0.23	C ₆ H ₁₃ NO ₅	162、144、126	D-氨基葡萄糖	数据库
4	5.87	[M+H] ⁺	284.10	284.10	0.19	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	152	鸟苷	[24]
5	5.92	[M+H] ⁺	182.08	182.08	0.28	C ₉ H ₁₁ NO ₃	165、147、136	酪氨酸	[25]
6	6.04	[M+H] ⁺	265.11	265.11	0.57	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OS	144、122	维生素B ₁	[26]
7	6.43	[M+H] ⁺	268.10	268.10	2.98	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136	腺苷	[24]
8	6.46	[M+H] ⁺	170.08	170.08	1.12	C ₈ H ₁₁ NO ₃	152、134	维生素B ₆	[27]
9	9.93	[M+H] ⁺	579.15	579.15	1.29	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	409、291、167 163、139、127	原花青素二聚体	[28]
10	10.90	[M+H] ⁺	188.07	188.07	1.51	C ₁₁ H ₉ NO ₂	170、146、144	反式-3-吡啶丙烯酸	数据库
11	11.87	[M+H] ⁺	377.15	377.15	1.16	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	243、172	维生素B ₂	[26]
12*	16.09	[M+H] ⁺	611.16	611.16	1.47	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	465、303	芦丁	[29]
13	17.59	[M+H] ⁺	465.10	465.10	1.05	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	303	异槲皮苷/金丝桃苷	[30]
14	18.64	[M+H] ⁺	595.17	595.17	1.79	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	287	山萘酚-3-O- β -D-芸香糖苷	[31]
15	18.93	[M+H] ⁺	435.09	435.09	0.99	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	303	槲皮素-3-O- β -D-木糖苷	[25]
16	19.42	[M+H] ⁺	449.11	449.11	1.12	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	287	山萘酚-3-O- β -D-葡萄糖苷 /山萘酚-3-O- β -D-半乳糖苷	[32]
17	20.57	[M+H] ⁺	449.11	449.11	1.65	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	303	槲皮苷	[33]
18*	20.65	[M+H] ⁺	303.05	303.05	0.79	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	285、275、257 229、165、153	槲皮素	[34]
19	24.01	[M+H] ⁺	287.06	287.06	0.33	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	269、259、241、231、 213、165、153	山萘酚	[35]
20	24.01	[M+H] ⁺	433.11	433.11	0.89	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	287	阿福豆苷	[36]

注: *表示有对照品。

目前对于苕麻中化学成分的研究报道很多,但仅限于苕麻的根茎叶。研究人员发现,苕麻根含有酚类、多糖类、黄酮、萜类及有机酸类物质,并且从根据其

紫外吸收光谱,可初步鉴定出苕麻根中含有黄酮类化合物,同时发现起抗氧化作用的是其中的黄酮苷元^[22]。苕麻叶中含有与根中所含的相同成分绿原酸,此

外还含有原儿茶酸等有机酸和黄酮类化合物野漆树昔, 芦丁等。鲜叶中还含 α -及 β -胡萝卜素、叶黄素和含量较高的维生素 A^[13]。将苧麻根和苧麻叶中所含的化合物与本实验鉴定出来的化合物进行对比, 可以发现苧麻籽其中原花青素二聚体、芦丁、异槲皮昔/金丝桃昔、山萘酚-3-O- β -D-芸香糖昔、槲皮素-3-O- β -D-木糖昔、山萘酚-3-O- β -D-葡萄糖昔/山萘酚-3-O- β -D-半乳糖昔、槲皮昔、槲皮素、山萘酚、阿福豆昔都是属于黄酮苷元, 与苧麻叶和苧麻根中的黄酮类化合物基本一致, 并且具有较强的抗氧化活性。

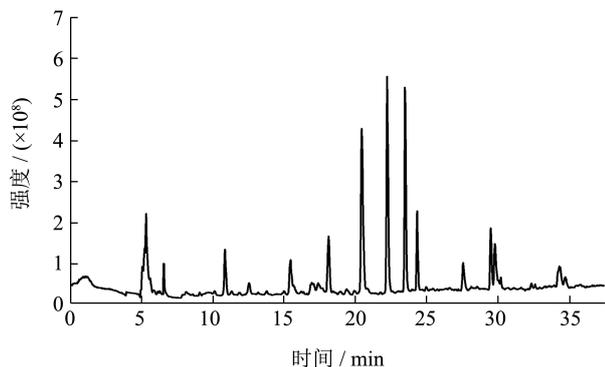


图2 苧麻籽乙醇提取物的总离子流色谱图

Fig.2 Total ion flow chromatogram of ramie seed ethanol extract

2.3 黄酮类化合物的结构及其质谱裂解途径分析

从提取物中鉴定出来的 20 种化合物中, 黄酮类化合物占绝大部分, 进一步表明黄酮类化合物可能是苧麻籽中的主要抗氧化成分。根据初步鉴定的各黄酮类

化合物的结构, 分析其可能的质谱裂解途径。

2.3.1 化合物 9

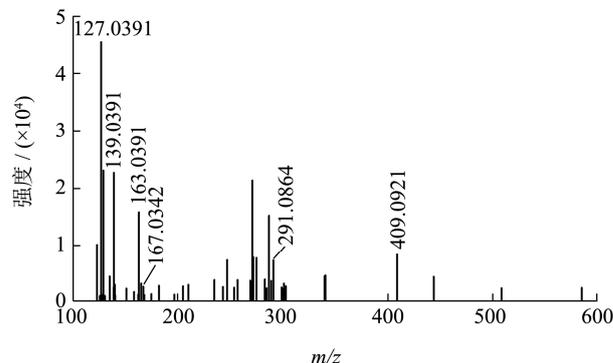


图3 化合物9的MS/MS图

Fig.3 MS/MS diagram of compound 9

化合物9准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的质荷比为 m/z 579, 推测分子质量为 578, 其二级质谱(图3)中观察到关键碎片离子 m/z 409 和 m/z 291, 这与原花青素二聚体的裂解规律一致。有研究表明, 原花青素二聚体的裂解方式主要包括黄烷醇之间连接键的断裂和逆迪尔斯-阿德尔反应(Retro-diels-alder, RDA)^[28]。RDA反应是失去了一个中性结构 $C_8H_8O_3$ 后再失去一个 H_2O 后产生碎片离子 m/z 409; 黄烷醇间的连接键发生断裂产生碎片离子 m/z 291, 即[(表)儿茶素+H]⁺。[(表)儿茶素+H]⁺可以进一步发生RDA裂解, C环1,4键(1,4A)断裂后产生包含A环但失去B环的碎片离子 m/z 127; C环的1,3键(1,3A)断裂后产生包含A环丢失B环的碎片离子 m/z 139 以及C环的1,2键(1,2A)断裂后产生碎片离子 m/z 167^[37]。由此推测化合物9为原花青素二聚体, 分子式为 $C_{30}H_{26}O_{12}$, 其可能的裂解途径为图4。

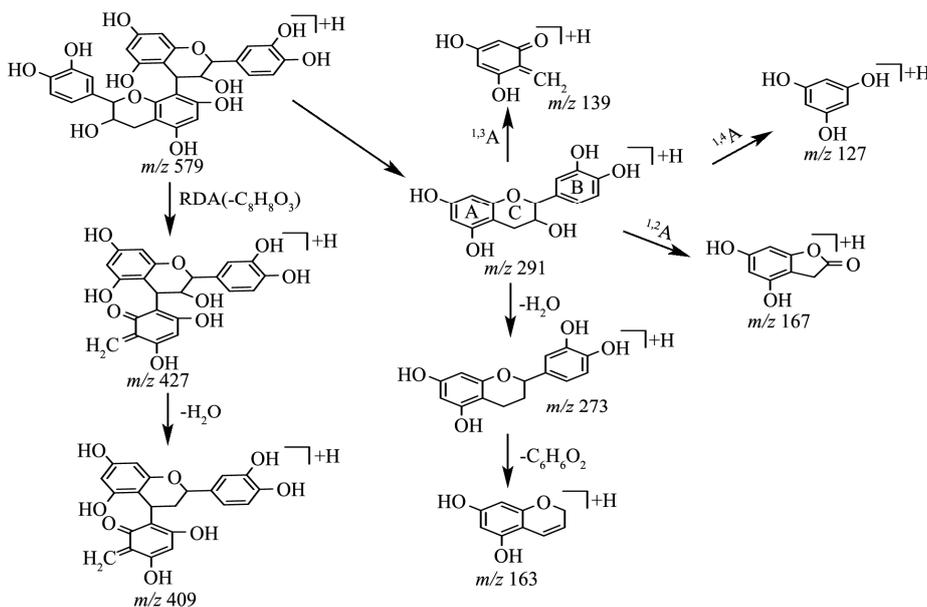


图4 化合物9可能的裂解途径

Fig.4 Possible fragmentation pathways of compound 9

2.3.2 化合物 12

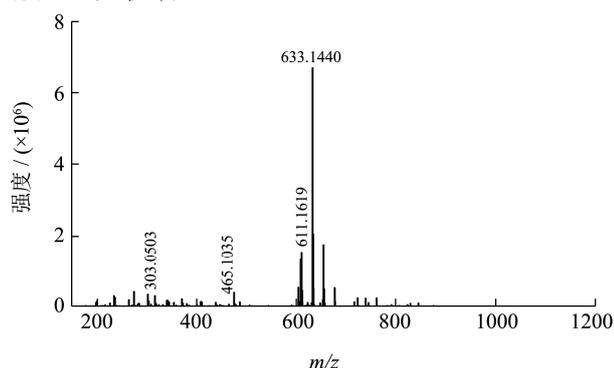


图 5 化合物 12 的 MS 图

Fig.5 MS diagram of compound 12

化合物 12 的质谱信息与芦丁对照品一致,确定为芦丁,分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$,其 MS 图为图 5。准分子离子峰 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 的质荷比分别为 m/z 611 和 m/z 633,碎片离子 m/z 303 为其脱去芸香糖($C_{12}H_{20}O_9$)

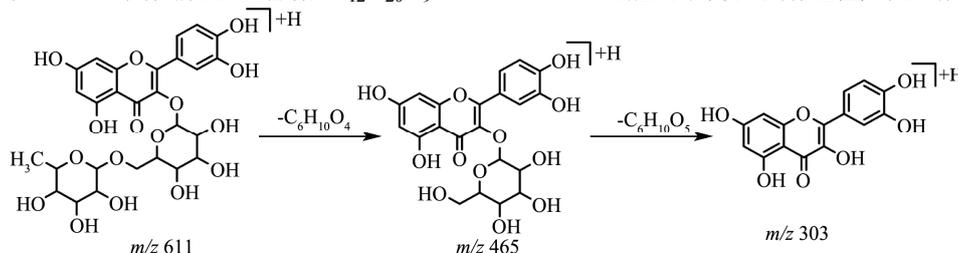


图 6 化合物 12 可能的裂解途径

Fig.6 Possible fragmentation pathways of compound 12

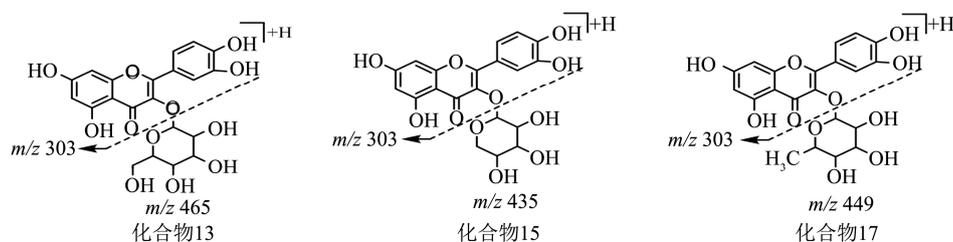


图 7 化合物 13、15、17 可能的裂解途径

Fig.7 Possible fragmentation pathways of compound 13, 15, 17

2.3.4 化合物 18

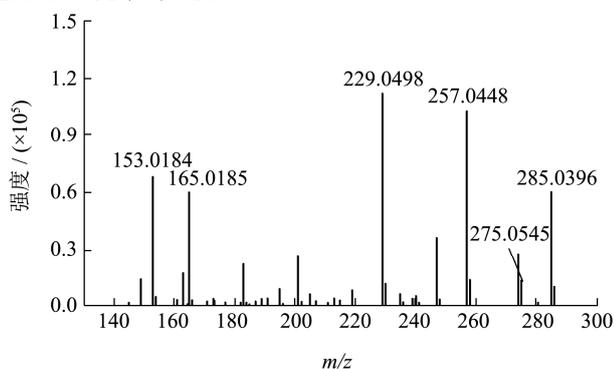


图 8 化合物 18 的 MS/MS 图

Fig.8 MS/MS diagram of compound 18

化合物 18 的质谱信息同槲皮素对照品一致,推测

后的[槲皮素+H]⁺。在一级质谱图中观察到碎片离子 m/z 465, 推测为准分子离子 $[M+H]^+$ 经碰撞失去一分子的鼠李糖形成的 $[M+H - C_6H_{10}O_4]^+$ ^[29]。由此,推导出芦丁可能的裂解途径如图 6 所示。

2.3.3 化合物 13、15、17

化合物 13、15、17 的二级质谱均为 m/z 303 的碎片离子,推测为[槲皮素+H]⁺。化合物 13 的准分子离子 $[M+H]^+$ 质荷比为 m/z 465, 推测其分子质量为 464, 在碰撞过程中失去一个分子质量为 162 的葡萄糖或半乳糖中性片段^[30], 其可能为异槲皮苷或金丝桃苷; 化合物 15 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 质荷比为 m/z 435, 推测其分子质量为 434, 在碰撞过程中失去了一个分子质量为 132 的中性片段^[38], 化合物 15 可能为槲皮素-3-O-β-D-木糖苷; 化合物 17 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 质荷比为 m/z 449, 推测分子质量为 448^[33], 推测其为槲皮苷。化合物 13、15、17 可能的结构和裂解途径如图 7 所示。

为槲皮素,分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的质荷比为 m/z 303, 其二级质谱如图 8 所示。苯环较稳定, 黄酮醇的裂解多为 C 环发生的 RDA 反应, 槲皮素的 C 环 0,2 键 (0,2A) 与 1,3 键 (1,3A) 发生断裂, 分别生成包含 A 环但失去 B 环的碎片离子 m/z 165 和 m/z 153^[34]。此外在裂解中, 羰基由于其较强的电负性较容易失去^[34], 所以推测槲皮素在失去了一个 C 环上的羰基 (CO) 后得到碎片离子 m/z 275, 该碎片再失去一分子 H_2O 得 m/z 257, 或者槲皮素先失去一个 H_2O 得 m/z 285 再失去一个 CO 得 m/z 257。碎片离子 m/z 257 经重排后再失去一个 CO 得 m/z 229^[39]。图 9 为化合物 18 可能的分裂途径。

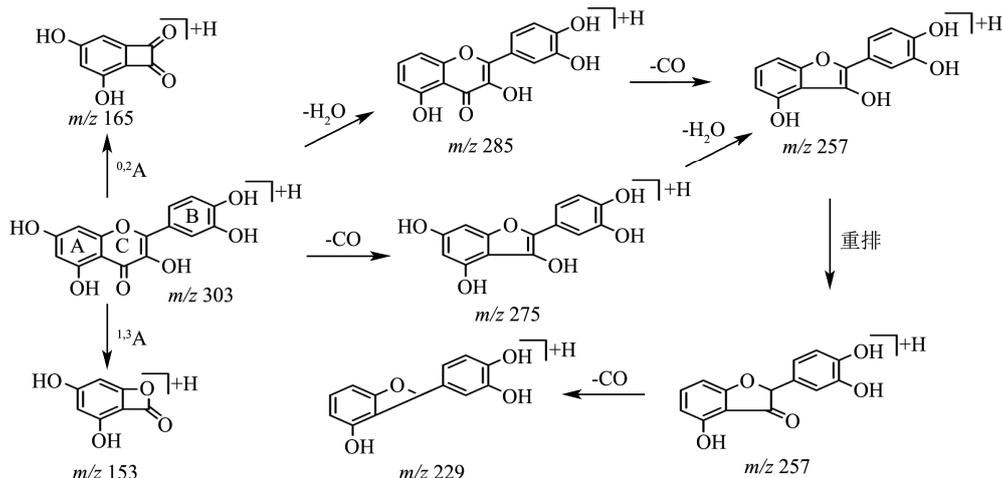


图9 化合物18可能的裂解途径

Fig.9 Possible fragmentation pathways of compound 18

2.3.5 化合物19

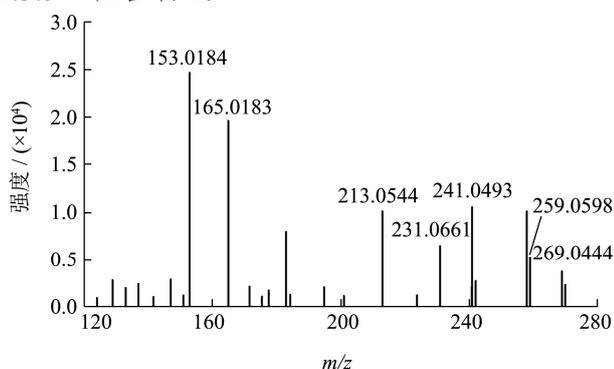


图10 化合物19的MS/MS图

Fig.10 MS/MS diagram of compound 19

化合物19的准分子离子峰[M+H]⁺的质荷比为m/z 287, 二级质谱(图10)中出现与槲皮素质谱中部分相同碎片离子峰m/z 153和m/z 165, 猜测化合物19

与槲皮素具有类似的结构, 且其准分子离子峰[M+H]⁺的质荷比以及部分二级碎片离子的质荷比均比槲皮素少16(如m/z 287与m/z 303、m/z 213与m/z 229、m/z 241与m/z 257、m/z 259与m/z 275、m/z 269与m/z 285), 即一个O原子的相对质量, 从而推测化合物19的分子式为C₁₅H₁₀O₆, 从而推测可能是与槲皮素裂解相似的山柰酚^[35]. 山柰酚的C环0,2键(0,4 A)与C环1,3键(1,3 A)发生断裂, 分别生成包含A环但失去B环的碎片离子m/z 165和m/z 153. 此外, 山柰酚在失去了一个C环上的羰基(CO)后得到碎片离子m/z 259, 该碎片再失去一分子H₂O得m/z 241, 或者山柰酚先失去一个H₂O得m/z 269再失去C环羰基得m/z 241. 碎片离子m/z 259与m/z 241可再失去一分子CO分别得到m/z 231和m/z 213. 图11为化合物19可能的分裂途径.

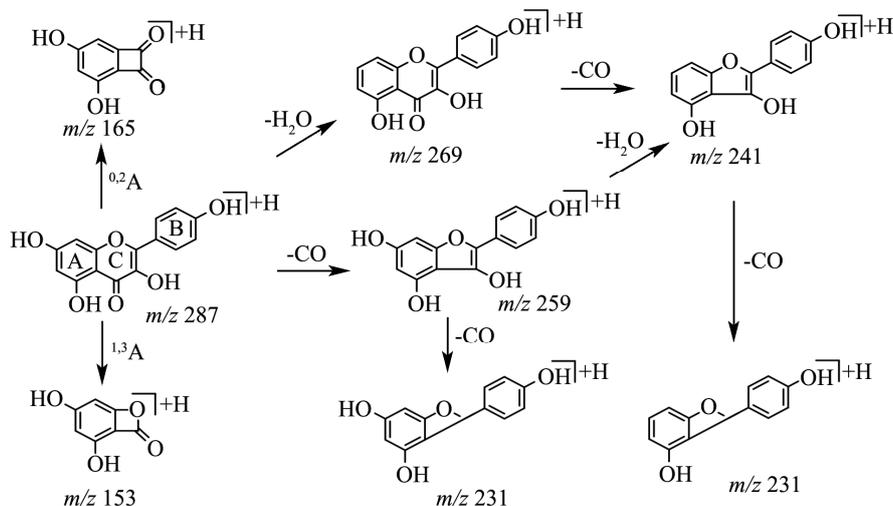


图11 化合物19可能的裂解途径

Fig.11 Possible fragmentation pathways of compound 19

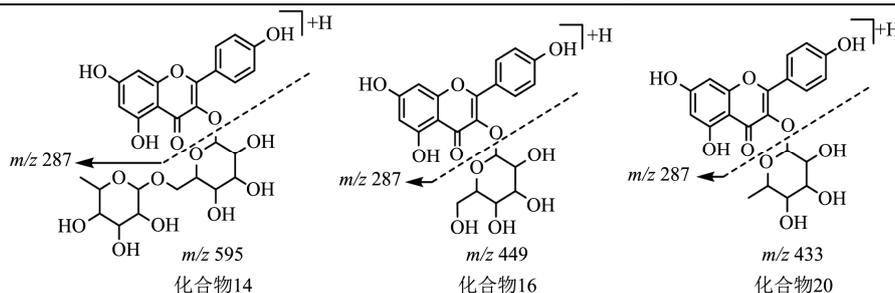


图 12 化合物 14、16、20 可能的裂解途径

Fig.12 Possible fragmentation pathways of compound 14, 16, 20

2.3.6 化合物 14、16、20

化合物 14、16、20 的二级质谱均为 m/z 287 碎片离子, 推测为[山萘酚+H]⁺。化合物 14 准分子离子[M+H]⁺质荷比为 m/z 595, 推测其分子质量为 594, 与芦丁的裂解相似, 在二级质谱中失去了一个相对质量为 308 的分子片段^[31], 推测其为山萘酚-3-O-β-D-芸香糖苷。化合物 16 的准分子离子[M+H]⁺质荷比为 m/z 449, 推测其分子质量为 448, 二级质谱中失去一个分子质量为 162 的分子片段, 猜测该片段为葡萄糖或半乳糖^[32], 其可能为山萘酚-3-O-β-D-葡萄糖苷或山萘酚-3-O-β-D-半乳糖苷。化合物 20 的准分子离子[M+H]⁺质荷比为 m/z 433, 推测其在二级质谱中失去一分子鼠李糖^[36], 可能为山萘酚-3-O-β-D-鼠李糖苷, 即阿福豆苷。图 12 为化合物 14、16、20 可能的化学结构及裂解途径。

2.3.7 非黄酮类化合物

除黄酮类化合物外, 还从苧麻籽提取物中鉴定出糖类、核苷类、氨基酸类和 B 族维生素等化合物。化合物 2 准分子离子峰[M+Na]⁺的质荷比为 m/z 689, 其二级碎片与文献^[23]中麦芽四糖的质谱数据一致, 推测化合物 2 为麦芽四糖, 推测其相对分子质量为 666。参考文献^[24], 推测出化合物 4 和 7 分别为鸟苷和腺苷, 二级碎片中的 m/z 152 与 m/z 136 分别为二者脱去一分子核糖后所得。化合物 5 与文献^[37]中酪氨酸的质谱信息一致, 推测其为酪氨酸。化合物 6、8、11 分别与文献^[26,27]中所描述的维生素 B₁、维生素 B₆、维生素 B₂ 的质谱数据一致, 推测化合物 6 为维生素 B₁, 化合物 8 为维生素 B₆, 化合物 11 为维生素 B₂。

3 结论

本研究首先基于 DPPH-HPLC 技术, 发现苧麻籽乙醇提取物存在多种抗氧化成分。应用 UPLC-Orbitrap-HRMS 技术, 对其主要化学成分进行分析。结合 MsBank、mzCloud 质谱数据库, 相关文献和相关对照品对样品主要化学成分质谱图进行分析。初步鉴定苧麻籽乙醇提取物含有黄酮类化合物 10 种, 分别

为原花青素二聚体、芦丁、异槲皮苷/金丝桃苷、山萘酚-3-O-β-D-芸香糖苷、槲皮素-3-O-β-D-木糖苷、山萘酚-3-O-β-D-葡萄糖苷/山萘酚-3-O-β-D-半乳糖苷、槲皮苷、槲皮素、山萘酚、阿福豆苷。其他物质为维生素 B₁、维生素 B₆、维生素 B₂、鸟苷、腺苷、N⁶,N⁶,N⁶-三甲基-L-赖氨酸、酪氨酸、麦芽四糖、D-氨基葡萄糖和反式-3-吡啶丙烯酸。苧麻籽乙醇提取物中主要是黄酮类化合物, 上述黄酮类化合物是已被证明过有较强抗氧化活性的黄酮糖苷类, 说明苧麻籽具有潜在的抗氧化活性, 这为后续苧麻籽的开发和利用提供了良好的理论基础。

参考文献

- [1] 朱睿,杨飞,周波,等.中国苧麻的起源、分布与栽培利用史[J].中国农学通报,2014,30(12):258-266
ZHU Rui, YANG Fei, ZHOU Bo, et al. Origin, distribution of *Boehmeria nivea* and its history of cultivation and utilization in China [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(12): 258-266
- [2] 陈保锋,陈建华,母波,等.苧麻药用研究进展[J].中国麻业科学,2016,38(5):237-241
CHEN Baofeng, CHEN Jianhua, MU Bo, et al. Advances in medicinal health protection studies of *Boehmeria* Jacq. spp [J]. Plant Fiber Sciences in China, 2016, 38(5): 237-241
- [3] 朱敏.苧麻根中主要有效成分的提取工艺研究[D].长沙:湖南农业大学,2015
ZHU Min. Study extraction process of effective components from root of ramie [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015
- [4] 贺波.苧麻叶黄酮的提取、分离纯化、结构及抗氧化活性的研究[D].武汉:华中农业大学,2010
HE Bo. Studies on extraction, purification, structure and antioxidant activity of flavonoids from ramie leaves [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010
- [5] 张培成.黄酮化学[M].北京:化学工业出版社,2009
ZHANG Peicheng. Flavonoid Chemistry [M]. Beijing:

- Chemical Industry Press, 2009
- [6] WANG Qin, Rehman Muzammal, PENG Dingxiang, et al. Antioxidant capacity and, α -glucosidase inhibitory activity of leaf extracts from ten ramie cultivars [J]. *Industrial Crops & Products*, 2018, 122: 430-437
- [7] 肖呈祥,崔国贤,孙敬钊,等.苧麻属植物黄酮类化合物研究进展[J].作物研究,2014,3:324-327
XIAO Chengxiang, CUI Guoxian, SUN Jingzhao, et al. Research progress of flavonoids in ramie [J]. *Crop Research*, 2014, 3: 324-327
- [8] 臧巩固,赵立宁,陈建华,等.苧麻多功能深度开发利用系列报道之四:苧麻药用保健价值及其开发前景浅析[J].中国麻业,2002,24(1):27-29
ZANG Gonggu, ZHAO Lining, CHEN Jianhua, et al. The fourth of a series of reports on the deep development and utilization of ramie with multi-functions: analysis on the medicinal and health value and development prospect of ramie [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2002, 24(1): 27-29
- [9] 邵立军.中药苧麻根抗乙肝病毒活性及其化学成分研究[D].北京:中国中医科学院,2010
SHAO Lijun. Study on anti-HBV activity and constituents of radix boehmeriae [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2010
- [10] 朱洁文.苧麻属植物瘦果微结构及其籽油理化特性初步研究[D].长沙:湖南农业大学,2008
ZHU Jiewen. Study on achene microstructure and physicochemical properties (*Boehmeria*) seed oil of ramie [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008
- [11] 罗中钦.苧麻籽油提取技术及应用价值研究[D].长沙:湖南农业大学,2006
LUO Zhongqin. Study on extracting technique and utilization value of ramie (*Boehmeria nivea* L) seed oil [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2006
- [12] 韦环,刘珈玲,廖强.超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查及测定蜂蜜中 20 种植物源毒性成分[J].食品工业科技,2021,42(17):285-293
WEI Huan, LIU Jialing, LIAO Qiang. Rapid screening and determination of 20 plant-derived toxins in honey by UPLC-Q-exactive quadrupole-electrostatic field track trap high resolution mass spectrometry [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(17): 285-293
- [13] 宋占腾,樊霞,肖志明,等.超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨率质谱法测定鸡肉中 8 种喹啉类药物及其代谢产物[J].食品安全质量检测学报,2021,12(8):3023-3033
SONG Zhanteng, FAN Xia, XIAO Zhiming, et al. Determination of 8 kinds of quinoxalines and their metabolites in chicken meat by applying high performance liquid chromatography-quadrupole/ electrostatic field orbit trap high resolution mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2021, 12(8): 3023-3033
- [14] 毛祈萍,何明珍,黄小方,等.基于超高效液相色谱和飞行时间质谱联用的紫苏化学成分鉴定[J].现代食品科技,2021, 37(1):282-291,259
MAO Qiping, HE Mingzhen, HUANG Xiaofang, et al. Analysis of chemical components of perilla frutescens based on ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry (UHPLC-Q/TOF MS) [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(1): 282-291, 259
- [15] 贺波,李小定,彭定祥,等.苧麻叶中黄酮类化合物的提取工艺研究[J].食品工业科技,2010,31(10):259-262
HE Bo, LI Xiaoding, PENG Dingxiang, et al. Study on extraction of flavonoids from leaves of remie [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(10): 259-262
- [16] 王宗成,彭延波,盘雪,等.响应面设计优化苧麻叶黄酮提取工艺[J].中国饲料,2016,19:12-15
WANG Zongcheng, PENG Yanbo, PAN Xue, et al. Response surface design to optimize the extraction process of ramie leaf flavonoids [J]. *China Feed*, 2016, 19: 12-15
- [17] 李博艺,谌柄旭,魏志阳,等.高效液相色谱法测定山楂黄酮的研究[J].中国酿造,2018,37(3):157-161
LI Boyi, SHEN Bingxu, WEI Zhiyang, et al. Determination of flavonoids in hawthorn by HPLC [J]. *China Brewing*, 2018, 37(3): 157-161
- [18] 张维冰,王智聪,张凌怡.超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定菊花中的 10 种咖啡酰基奎宁酸和 22 种黄酮类化合物[J].分析化学,2013,40(12):72-82
ZHANG Weibing, WANG Zhicong, ZHANG Lingyi. Determination of 10 caffeylquinic acids and 22 flavonoids in chrysanthemum by ultra performance liquid chromatography-diode array detection tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 40(12): 72-82
- [19] DUAN Wenda, WANG Gaohong, LIU Xiaofeng, et al. Rapid screening and separating two radical scavengers in *Lycium barbarum* L. by DPPH-HPLC analysis-combined dual-mode high-speed countercurrent chromatography [J]. *Separation Science and Technology*, 2019, 54(11): 1787-1794
- [20] WANG Gaohong, HUANG Xingyi, PEI Dong, et al. DPPH-HPLC-DAD analysis combined HSCCC for

- screening and identification of radical scavengers in cynomorium songaricum rupr [J]. New Journal of Chemistry, 2016, 40(4): 3885-3891
- [21] 田燕. 紫外-可见光谱在黄酮类鉴定中的应用[J]. 大连医科大学学报, 2002, 24(3): 213-214
- TIAN Yan. Application of UV-Vis spectroscopy in the identification of flavonoids [J]. Journal of Dalian Medical University, 2002, 24(3): 213-214
- [22] 张贤. 苕麻根黄酮类成分分离纯化及抗氧化活性研究[D]. 武汉: 武汉纺织大学, 2011
- ZHANG Xian. Study on the separation, purification and anti-oxidative activity of flavonoids from *Boehmeria nivea* root [D]. Wuhan: Wuhan Textile University, 2011
- [23] 张睿, 刘芸, 丁涛, 等. 基于高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨率质谱的寡糖轮廓分析用于蜂蜜中淀粉糖浆的掺假鉴别研究[J]. 分析测试学报, 2016, 35(12): 1628-1633
- ZHANG Rui, LIU Yun, DING Tao, et al. Identification of starch syrup in honey adulteration based on oligosaccharide profiling test by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2016, 35(12): 1628-1633
- [24] 王祝伟. 中药红毛五加化学成分的高效液相色谱/电喷雾电离/质谱(HPLC/ESI/MS²)分析[J]. 色谱, 2003, 21(6): 554-557
- WANG Zhuwei. High performance liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry² analysis of *Acanthopanax giraldii* Harms [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(6): 554-557
- [25] 于泓, 胡青, 孙健, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术的黄芪注射液化学成分分析[J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 809-817
- YU Hong, HU Qing, SUN Jian, et al. Comprehensive screening of multi-components in huangqi injection by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. World Chinese Medicine, 2019, 14(4): 809-817
- [26] 韩豪, 李新生, 高玥, 等. UPLC-MS/MS 测定黑小麦中 B 族维生素[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 528-531
- HAN Hao, LI Xinsheng, GAO Yue, et al. Determination of B-vitamins in black wheats by utility of UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals, 2012, 33(5): 528-531
- [27] 刘萍萍, 申娟娟, 卢紫舒, 等. HPLC-MS/MS 法测定烟叶中 9 种 B 族维生素[J]. 烟草科技, 2020, 53(7): 33-39
- LIU Pingping, SHEN Juanjuan, LU Zishu, et al. Determination of nine B vitamins in tobacco leaves by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(7): 33-39
- [28] 王晴, 卢志威, 刘月红, 等. UPLC-Q-TOF/MSE 结合诊断离子过滤方法快速分析大黄中酚类成分[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1922-1931
- WANG Qing, LU Zhiwei, LIU Yuehong, et al. Rapid analysis on phenolic compounds in rheum palmatum based on UPLC-Q-TOF/MSE combined with diagnostic ions filter [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(10): 1922-1931
- [29] 周明月, 霍金海, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的连翘叶化学成分分析[J]. 中药材, 2019, 42(11): 2582-2587
- ZHOU Mingyue, HUO Jinhai, SUN Guodong, et al. Analysis of chemical constituents of forsythia suspensa leaves based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(11): 2582-2587
- [30] 杨云舒, 李荣, 姜子涛, 等. 月桂叶中黄酮类成分的分析鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(7): 270-275
- YANG Yunshu, LI Rong, JIANG Zitao, et al. Identification of flavonoids in the leaves of *Laurus nobilis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(7): 270-275
- [31] Grevsen K, Xavier Fretté, Lars Porskjær Christensen. Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*L.*) are affected by high nitrogen fertilization and by harvest time [J]. European Journal of Horticultural Science, 2008, 73(1): 20-27
- [32] 张语迟, 刘春明, 刘志强, 等. 罗布白麻与罗布红麻的液相色谱-质谱联用分析[J]. 分析测试学报, 2009, 28(10): 1148-1154
- ZHANG Yuchi, LIU Chunming, LIU Zhiqiang, et al. Analysis of major constituents in *Apocynum hendersonii* and *Apocynum venetum* by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2009, 28(10): 1148-1154
- [33] SHAN Chenxiao, GUO Shuchen, YU Sheng, et al. Simultaneous determination of quercitrin, afzelin, amentoflavone, hinokiflavone in rat plasma by UFLC-MS-MS and its application to the pharmacokinetics of *Platycladus orientalis* leaves extract [J]. Journal of Chromatographic Science, 2018, 56(10): 895-902
- [34] 尹智慧, 孙长海, 方洪壮. 槲皮素与桑色素 ESI-MS 裂解行为

- 的比较分析[J].分析测试学报,2017,36(2):205-211
- YIN Zhihui, SUN Changhai, FANG Hongzhuang. Analysis and comparison on fragmentation behavior of quercetin and morin by ESI-MS [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(2): 205-211
- [35] 梁艳,于世锋,陈卫军,等.山奈酚的电喷雾质谱裂解途径[J].应用化学,2009,26(10):128-130
- LIANG Yan, YU Shifeng, CHEN Weijun, et al. Fragmentation pathway of kaempferol in electrospray [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2009, 26(10): 128-130
- [36] 黄勇,何峰,郑林,等.水蓼花药材中 8 个指标成分的 UPLC-MS/MS 法测定[J].中国医药工业杂志,2012,43(8):693-696
- HUANG Yong, HE Feng, ZHENG Lin, et al, Determination of eight marker compounds in flowers of *Polygonum orientale* by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2012, 43(8): 693-696
- [37] 刘国强,董静,王弘,等.EGC/GC 和 EGCG/GCG 的 ESI-IT-TOF 质谱裂解规律研究[J].质谱学报,2009,30(5):33-40
- LIU Guoqiang, DONG Jing, WANG Hong, et al. Study on the fragmentation pathways of EGC/GC and EGCG/GCG using ESI-IT-TOF [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2009, 30(5): 33-40
- [38] 孙冬晓.基于液质联用技术的金钱草与广金钱草化学成分比较及广金钱草的药动学和排泄动力学研究[D].石家庄:河北医科大学,2013
- SUN Dongxiao. Comparison of main constituents in Herba *Lysimachiae* and Herba *Desmodii styracifolii* and studies on pharmacokinetics and biliary excretion of *Desmodii styracifolii* in rats by LC-MS/MS technologies [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2013
- [39] 李宇航,戴海学,汪明明,等.槲皮素的电喷雾离子质谱分析[J].质谱学报,2009,30(6):56-60
- LI Yuhang, DAI Haixue, WANG Mingming, et al. Elucidation of quercetin by electron spray ionization mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2009, 30(6): 56-60

(上接第 339 页)

- [89] Suwandy V, Carne A, Van D V R, et al. Effect of repeated pulsed electric field treatment on the quality of cold-boned beef loins and topsides [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(6): 1218-1228
- [90] Warner R D, McDonnell C K, Bekhit A E D, et al. Systematic review of emerging and innovative technologies for meat tenderisation [J]. Meat Sci, 2017, 132: 72-89
- [91] Kantono K, Hamid N, Oey I, et al. Physicochemical and sensory properties of beef muscles after pulsed electric field processing [J]. Food Res Int, 2019, 121: 1-11
- [92] Mungure T E, Farouk M M, Birch E J, et al. Effect of PEF treatment on meat quality attributes, ultrastructure and metabolite profiles of wet and dry aged venison Longissimus dorsi muscle [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 65: 102457
- [93] 卢珊,王文敏,罗丹,等.探析脉冲电场对食品蛋白质改性作用的研究进展[J].现代食品,2020,21:73-76
- LU Shan, WANG Wenmin, LUO Dan, et al. Research progression effects of pulse electric field on food protein modification [J]. Modern Food, 2020, 21: 73-76
- [94] Eshtiagi M N, Knorr D. High electric field pulse pretreatment: potential for sugar beet processing [J]. Journal of Food Engineering, 2002, 52(3): 265-272
- [95] Genovese J, Tappi S, Luo W, et al. Important factors to consider for acrylamide mitigation in potato crisps using pulsed electric fields [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 55: 18-26
- [96] 郑志超,蔡锦林,曾新安.脉冲电场预处理对冷浸渍发酵葡萄酒品质的影响[J].食品与发酵工业,2020,46(15):72-76
- ZHENG Zhichao, CAI Jinlin, ZENG Xinan. Effect of electric fields pretreatment on the quality of cold soaked fermented wine [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(15): 72-76
- [97] Xu L F, Tang Z S, Wen Q H, et al. Effects of pulsed electric fields pretreatment on the quality of jujube wine [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2019, 54(11): 3109-3117
- [98] 余雅倩,李松南,孙纯锐,等.脉冲电场协同酶解提高多孔淀粉制备效率及吸油率[J].现代食品科技,2021,37(1):157-163,191
- YU Yaqian, LI Songnan, SUN Chunrui, et al. Pulsed electric field combined with enzymatic hydrolysis improves the preparation efficiency and oil absorption of porous starch [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 157-163, 191