

基于超高效液相色谱/高分辨飞行时间质谱正模式电喷雾下 6 个花色素裂解规律和特征离子研究*

陈子凡¹, 董莹², 池少铃³, 郑少峰², 罗凌超⁴, 王国胜⁵, 张南峰^{2**}

(1. 河源市食品检验所, 河源 517000; 2. 黄埔海关技术中心, 东莞 523000; 3. 河源市药品检验所, 河源 517000; 4. 浙江大学衢州研究院, 衢州 324000; 5. 广州海关技术中心河源分中心, 河源 517000)

摘要 目的: 分析花葵素、矢车菊素、飞燕草素、芍药素、矮牵牛素和锦葵色素在超高效液相色谱/高分辨飞行时间质谱(UHPLC-Q TOF MS)正模式电喷雾下的裂解规律和途径, 推导出 6 个花色素的特征产物离子, 为建立质谱库以及检测方法提供理论依据。方法: 采用 Fusion-RPC₁₈(50 mm × 2.0 mm, 4 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水(A) - 甲醇(B) 为流动相, 梯度洗脱(0~1 min, 95% A; 1~5 min, 95% A → 10% A; 5~6 min, 10% A; 6~7 min, 95% A), 流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温箱温度 40 °C, 进样体积 10 μL。TOF MS-IDA MS/MS, CUR 帘气 0.20 MPa, 碰撞气 CAD 为 7 MPa, IS 电压 5 500 V / -4 500 V, 离子源温度 500 °C, 雾化气 GAS1 为 0.38 MPa, 辅助气 GAS2 为 0.48 MPa, DP 电压 ±60 V, 裂解电压(35 ± 15) V, 累计时间 0.2 s。在电喷雾正模式条件下, 测得 6 个花色素的质谱数据, 根据花色素的 2-苯基色原烯结构形成的吡喃鎓离子, 结合质谱仪数据库的辅助分析, 推导出可能的产物离子。结果: 6 个花色素主要发生 2 种类型反应, 一种是吡喃鎓环上发生裂解反应, 最终均生成苯三酚和苜醇中间离子; 另一种是发生 α 裂解以及 σ 裂解丢失环上的基团, 最终生成不含基团的链烃。结论: 该研究结果可以作为 6 个花色素的质谱特征离子特征数据的支撑, 用于建立花色素产物离子库数据, 也为检测方法开发研究提供参考。

关键词: 花色素; 正模式电喷雾; 飞行质谱; 裂解规律; 特征离子; 飞行时间质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)12-2051-13

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0243

Study on cleavage regularity and characteristic ions of six anthocyanins under ultra performance liquid chromatography - quadrupole - time of flight - mass spectrometry positive mode electric spray*

CHEN Zi-fan¹, DONG Ying², CHI Shao-ling³, ZHENG Shao-feng²,
LUO Ling-chao⁴, WANG Guo-sheng⁵, ZHANG Nan-feng^{2**}

(1. Heyuan Food Inspection Institute, Heyuan 517000, China; 2. Urumqi Customs District, Dongguan 523000, China; 3. Heyuan Drug Inspection Institute, Heyuan 517000, China; 4. Institute of Zhejiang University - Quzhou, Quzhou 324000, China; 5. Guangzhou Customs Technology Center Heyuan Branch, Heyuan 517000, China)

Abstract Objective: To analyze the fragmentation rule and pathway of pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin and malvinidol under UHPLC-QTOF-MS positive mode electric spray, identify the

* 河源市社会发展科技计划项目(230613111602379); 广东省口岸安全智能化检测重点实验室开放课题资助项目(2023B1212010011); 2017 中央引导地方科技发展专项资金项目(2017245)

** 通信作者 Tel: 13560208500; E-mail: Benzhang713@163.com
第一作者 Tel: 13794730179; E-mail: chenzifan@21cn.com

characteristic product ions of six anthocyanins, and provide a theoretical basis for the establishment of mass spectrometry database and detection methods. **Methods:** The chromatographic conditions were as follows: chromatographic column, Fusion – RPC₁₈ (50 mm × 2.0 mm, 4 μm), mobile phase 0.1% formic acid aqueous solution (A) and methanol (B), gradient elution (0 – 1 min, 95% A; 1 – 5 min, 95% A → 10% A; 5 – 6 min, 1% A; 6 – 7 min, 95% A), flow rate 0.3 mL · min⁻¹, column temperature 40 °C, and injection volume 10 μL. The mass spectrometry conditions were as follows: TOF MS – IDA MS/MS, curtain gas, 0.20 MPa, collision gas CAD 7 MPa, IS voltage, 5 500 V / –4500 V, ion source temperature, 500 °C, nebulizer gas, GAS1, 0.38 MPa, auxiliary, GAS2, 0.48 MPa, DP voltage, ±60 V, fragmentation voltage, (35 ± 15) V, and time 0.2 s. Under the condition of positive mode of electrospray, the mass spectrometry data of six anthocyanins were measured. According to the pyrylium ions formed by the 2 – phenylchromogenic structure of anthocyanins, and combined with the auxiliary analysis of the mass spectrometer database, the possible product ions were deduced. **Results:** The results showed that the six anthocyanins mainly undergo cleavage reactions on the pyranium ring, ultimately generating intermediate ions of pyrogallol and benzyl alcohol. On the other way, it occurred α cracking, σ cracking causes the loss of functional groups on the ring, ultimately resulting in the formation of Chain hydrocarbons without functional groups. **Conclusion:** The research results can provide support for the mass spectrometry characteristic ion data of six anthocyanins, which can be used to establish ion library data for anthocyanin products and also provide reference for the development and research of detection methods.

Keywords: anthocyanin; positive mode electrospray spray; flight mass spectrometry; fragmentation pattern; characteristic ion; time of flight mass spectrometry

花色素具有类黄酮结构,在自然界中可以让天然植物呈现不同颜色。如蒙药玉簪花中化学成分包括了花色苷,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、保肝、镇痛等药理作用^[1]。桑葚作为我国常用的药食同源类中药,主要化学成分也包括了花色苷类,具有保肝、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血压等作用^[2]。黑果枸杞是中国西部特色药用植物,在传统中医药中应用广泛,主要化学成分有矮牵牛素类、飞燕草素类、锦葵素类和芍药素类衍生物等 4 类,具有抗氧化、抗衰老、保护心血管、抗炎及护肝作用等多种药理作用^[3]。传统中药材龙葵主要化学成分也包括了花色素类物质,经研究发现具有抑菌效果^[4]。

在植物体内大部分花色素以花色苷形式存在,极少数以游离态存在^[5-9]。花色苷在经过低浓度酸处理后,会分解成糖和游离花色素,游离花色素 ESI – MS 离子化时质子化后会形成稳定的吡喃酚氧鎓离子,花葵素、矢车菊素、飞燕草素、芍药素、矮牵牛素和锦葵色素结构如图 1 所示^[10-12]。

Q TOF 高分辨质谱系统具有 100 Hz 的扫描速度,可将若干个前体离子进行碰撞,通过仪器去卷积运算进行信号处理,得到对应产物离子的准确碎片信息。

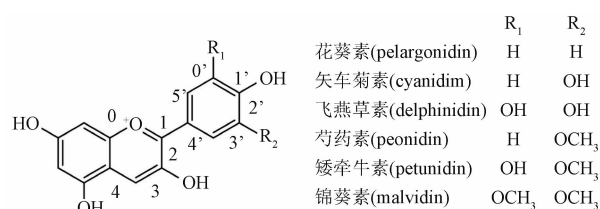


图 1 花葵素等其他花色素结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the structure of pelargonidin and other anthocyanin

该质谱系统灵敏度高,并且可以同时定性和定量,因此可用于花色素的裂解规律和特征离子分析^[13-14]。

本研究以矢车菊素、飞燕草素、矮牵牛素、花葵素、芍药素和锦葵素作为研究对象,使用 UHPLC – Q TOF MS 的 IDA – TOF MS 模式测量以上 6 个花色素的产物离子数据。根据花色素特有的吡喃鎓结构,采用质谱树状图法^[15-16]绘制裂解路径,结合质谱数据库软件的模拟结果,推测出花色素裂解规律,为花色素特征离子库及检测方法开发研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

对照品飞燕草色素(批号 B24337)、矮牵牛色素

(批号 B24338) (色谱纯, 纯度 $\geq 95\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 氯化矢车菊素 (批号 C829983)、氯化芍药素 (批号 P861343) (色谱纯, 纯度 $\geq 95\%$, 上海麦克林生化科技有限公司); 氯化花葵素 (批号 P132376, 色谱纯, 纯度 $> 97\%$, 上海阿拉丁试剂公司); 氯化锦葵色素 (批号 68120, 色谱纯, 纯度 $\geq 95\%$, 西格玛奥德里奇上海贸易有限公司); 甲醇、甲酸 (色谱纯, 霍尼韦尔公司); 蒸馏水 (屈臣氏公司)。

1.2 仪器与设备

X500R QTOF 质谱仪、ExionLC 超高效液相色谱 (AB Sciex 公司), CP225D 型电子天平 (最小称量值 0.01 mg, Sartorius 公司)。

SCIEX OS 质谱分析软件 (版本号 2.2.0, AB SCIEX 公司), OriginPro 2021 软件 (版本号 9.8.0, OriginLab 公司), InDraw 软件 (版本号 6.0.6, 上海鹰谷信息科技有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

采用 Fusion - RP C₁₈ (50 mm × 2.0 mm, 4 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水 (A) - 甲醇 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 95% A; 1 ~ 5 min, 95% A → 10% A; 5 ~ 6 min, 10% A; 6 ~ 7 min, 95% A), 流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温箱温度 40 °C, 进样体积 10 μL。

2.2 质谱条件

TOF MS - IDA MS/MS, CUR 帘气 0.20 MPa, 碰撞气 CAD 为 7 MPa, IS 电压 5 500 V / -4 500 V, 离子源温度 500 °C, 雾化气 GAS1 为 0.38 MPa, 辅助气

GAS2 为 0.48 MPa, DP 电压 ± 60 V, 裂解电压 (35 ± 15) V, 累计时间 0.2 s^[17-18]。

2.3 对照品溶液制备

分别精密称取矢车菊素、飞燕草素、矮牵牛素、花葵素、芍药素和锦葵素对照品适量, 精密称定, 使用流动相 A 溶解, 超声 (40 kHz, 200 W) 混匀, 制成质量浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的各对照品储备液。再分别移取各对照品储备液适量, 放入 50 mL 量瓶中, 用流动相 A 定容, 制成各对照品含量为 1 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4 质谱分析

在 SCIEX OS 软件中创建 IDA + TOF MS 的组合方法, 使用 TOF 区进行质量分析, 信息相关采集 (information dependent acquisition, IDA) 设定研究的 6 个花色素所对应的参考质谱数据, 使用表格工具分析产物离子数据, 根据需要增加断键的数量和类型, 剔除程序生成的不太可能的碎片, 得到合理的碎片离子, 再依据文献 [19] 修改产物离子碎片的结构, 推导花色素的裂解规律和特征离子。

3 结果与分析

3.1 数据结果

根据一级质谱结果, 6 个花色素在正模式电喷雾模式下的前体离子主要为 [M]⁺, 未见有加合离子 [M + H]⁺。在 SCIEX OS 中按前体离子数据查找 6 个花色素前体离子 [M]⁺ 分别在 MS² 结果图的位置, 得到对应的产物离子碎片结果, 得到对应的产物离子碎片结果, 碎片信息见表 1。

表 1 6 个花色素在正离子模式下的二级质谱数据

Tab. 1 MS² data of six anthocyanins in the positive ion mode

化合物 (compound)	一级质谱离子 [M] ⁺ (MS ion) m/z	MS ² 碎片离子 (MS ² fragmentation ion) m/z	计算值 (calculated) m/z	元素组成 (elemental composition)	偏差 (deviation) / × 10 ⁻⁶
花葵素 (pelargonidin)	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ 271.060 3	243.065 7	243.065 2	C ₁₄ H ₁₁ O ₄	2.1
		215.070 5	215.070 3	C ₁₃ H ₁₁ O ₃	0.9
		197.060 0	197.059 7	C ₁₃ H ₉ O ₂	-0.2
		169.065 5	169.064 8	C ₁₂ H ₉ O	4.1
		149.023 6	149.023 3	C ₈ H ₅ O ₃	2.0
		147.043 6	147.044 0	C ₉ H ₇ O ₂	-2.7
		141.069 8	141.069 9	C ₁₁ H ₉	-0.7
		121.028 3	121.028 4	C ₇ H ₅ O ₂	-0.8
		115.054 4	115.054 2	C ₉ H ₇	1.7
		107.049 8	107.049 1	C ₇ H ₇ O	6.5

表 1(续)

化合物 (compound)	一级质谱离子[M] ⁺ (MS ion) m/z	MS ² 碎片离子 (MS ² fragmentation ion) m/z	计算值 (calculated) m/z	元素组成 (elemental composition)	偏差 (deviation)/×10 ⁻⁶		
矢车菊素(cyanidin)	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ 287.055 0	269.045 3	269.044 4	C ₁₅ H ₉ O ₅	3.3		
		259.059 8	259.060 1	C ₁₄ H ₁₁ O ₅	-1.2		
		241.050 8	241.049 5	C ₁₄ H ₉ O ₄	5.4		
		231.065 4	231.065 2	C ₁₃ H ₁₁ O ₄	0.9		
		213.055 0	213.054 6	C ₁₃ H ₉ O ₃	1.9		
		185.060 2	185.059 7	C ₁₂ H ₉ O ₂	2.7		
		177.019 1	177.018 2	C ₉ H ₅ O ₄	5.1		
		157.065 2	157.064 8	C ₁₁ H ₉ O	2.5		
		149.023 4	149.023 3	C ₈ H ₅ O ₃	0.7		
		139.054 0	139.054 2	C ₁₁ H ₇	1.4		
		121.028 5	121.028 4	C ₇ H ₅ O ₂	0.8		
		飞燕草素(delphinidin)	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ 303.050 0	285.040 0	285.039 4	C ₁₅ H ₉ O ₆	2.1
				274.046 2	274.047 2	C ₁₄ H ₁₀ O ₆	-3.6
257.044 3	257.044 4			C ₁₄ H ₉ O ₅	-0.4		
229.050 5	229.049 5			C ₁₃ H ₉ O ₄	4.4		
201.055 3	201.054 6			C ₁₂ H ₉ O ₃	3.5		
165.018 1	165.018 2			C ₈ H ₅ O ₄	-0.6		
155.050 0	155.049 1			C ₁₁ H ₇ O	5.8		
153.017 8	153.018 2			C ₇ H ₅ O ₄	-2.6		
121.028 9	121.028 4			C ₇ H ₅ O ₂	4.1		
111.007 7	111.007 7			C ₅ H ₃ O ₃	0.0		
芍药素(peonidin)	C ₁₆ H ₁₃ O ₆ 301.070 1			286.046 9	286.047 2	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-1.0
		285.037 4	285.039 4	C ₁₅ H ₉ O ₆	-7.0		
		258.053 3	258.052 3	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	3.9		
		229.048 2	229.049 5	C ₁₃ H ₉ O ₄	-5.7		
		213.054 7	213.054 6	C ₁₃ H ₉ O ₃	0.5		
		202.061 8	202.062 4	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	-3.0		
		187.040 2	187.039 0	C ₁₁ H ₇ O ₃	6.4		
		矮牵牛素(petunidin)	C ₁₆ H ₁₃ O ₇ 317.066 1	302.042 5	302.042 1	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1.3
274.048 0	274.047 2			C ₁₄ H ₁₀ O ₆	2.9		
245.044 9	245.044 4			C ₁₃ H ₉ O ₅	2.0		
231.028 9	231.028 8			C ₁₂ H ₇ O ₅	0.4		
228.042 2	228.041 7			C ₁₃ H ₈ O ₄	2.2		
227.035 3	227.033 9			C ₁₃ H ₇ O ₄	6.2		
217.049 5	217.049 5			C ₁₂ H ₉ O ₄	0.0		
203.034 4	203.033 9			C ₁₁ H ₇ O ₄	2.5		
175.039 2	175.039 0			C ₁₀ H ₇ O ₃	1.1		
165.018 6	165.018 2			C ₈ H ₅ O ₄	2.4		
147.043 5	147.044 1			C ₉ H ₇ O ₂	-4.1		
锦葵素(malvidin)	C ₁₇ H ₁₅ O ₇ 331.081 2	121.028 3	121.028 4	C ₇ H ₅ O ₂	-0.8		
		315.050 2	315.049 9	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	1.0		
		299.055 5	299.055 0	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	1.7		
		275.091 8	275.091 4	C ₁₅ H ₁₅ O ₅	1.5		
		271.060 2	271.060 1	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	0.4		

表 1(续)

化合物 (compound)	一级质谱离子[M] ⁺ (MS ion) m/z	MS ² 碎片离子 (MS ² fragmentation ion) m/z	计算值 (calculated) m/z	元素组成 (elemental composition)	偏差 (deviation) / × 10 ⁻⁶
		269.044 4	269.044 5	C ₁₅ H ₉ O ₅	-0.4
		243.065 2	243.065 2	C ₁₄ H ₁₁ O ₄	0.0
		229.049 2	229.049 5	C ₁₃ H ₉ O ₄	-1.3
		228.041 8	228.041 7	C ₁₃ H ₈ O ₄	0.4
		215.070 8	215.070 3	C ₁₃ H ₁₁ O ₃	2.3
		213.055 3	213.054 6	C ₁₃ H ₉ O ₃	3.3
		201.054 4	201.054 6	C ₁₂ H ₉ O ₃	-1.0
		200.047 2	200.046 8	C ₁₂ H ₈ O ₃	2.0
		197.060 0	197.059 7	C ₁₃ H ₉ O ₂	1.5
		165.055 2	165.054 6	C ₉ H ₉ O ₃	3.6
		153.055 2	153.054 6	C ₈ H ₉ O ₃	3.9
		149.023 7	149.023 3	C ₈ H ₅ O ₃	2.7
		123.044 3	123.044 1	C ₇ H ₇ O ₂	1.6
		121.028 8	121.028 4	C ₇ H ₅ O ₂	3.3

3.2 花色素正离子模式下[M]⁺质谱解析

3.2.1 花葵素 图 2 - A m/z 271.060 0 为花葵素的[M]⁺峰, m/z 272.064 2 为花葵素[M]⁺的同位素

峰。图 2 - B 显示花葵素裂解路径, 主要是基团丢失 B 环的裂解^[25-26], 裂解途径如图 3 所示。

花色素的中性丢失以 CO、H₂O 为主, 形成质荷

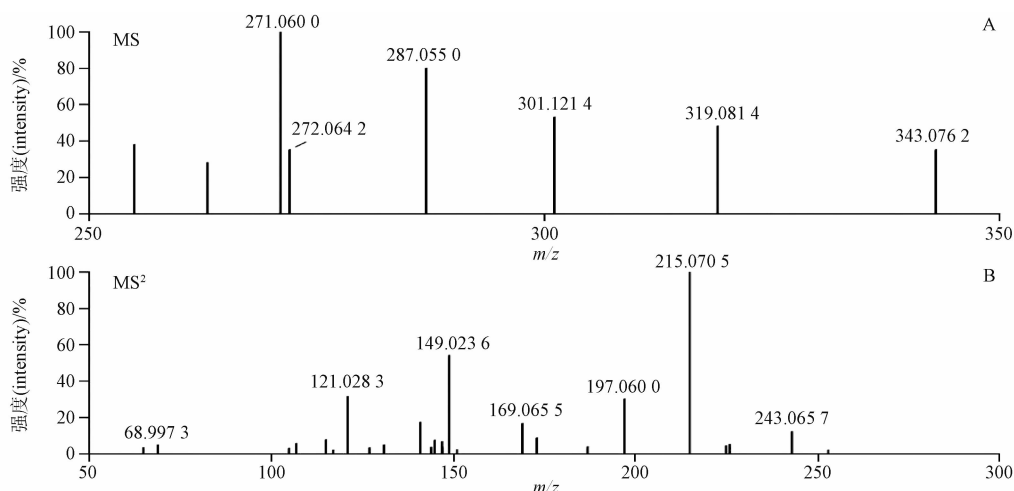


图 2 花葵素在正离子模式下[M]⁺的 MS(A) 和 MS²(B) 图

Fig. 2 The MS(A) and MS²(B) spectra of pelargonidin in the positive ion mode

比有规律递减的离子碎片。这种连续中性丢失裂解规律, 与黄酮等其他黄酮类化合物的裂解特征^[20-24]相符。花色素的苯并吡喃鎓结构化学稳定性与苯、萘类似, 裂解过程也与苯、萘相似, B 环发生逆 Dies - Alder 重排(简称 RDA)裂解, 生成特征离子对^[25]。花色素发生 RDA 反应的位置, 与 Luo 等^[26]研究相符, 起点都是 B 环氧分子与 C 之间。他们基于量子力学计算发现, 花色素 B 环上 O 分子

和 C 之间形成的 C = O 键, 当该键受到亲核攻击时, 吡喃环丢失 1 个质子, 发生分子内消除反应, 产生 1 个 α, β - 不饱和酮, 最终分子内发生反醛醇缩合反应。

3.2.2 矢车菊素 图 4 - A 显示 m/z 287.054 9 为矢车菊素的[M]⁺, 图 4 - B 显示裂解路径主要是基团丢失和 B 环裂解^[23], 裂解途径如图 5 所示。该反应文献中矢车菊糖苷及其衍生物的裂解结果一致^[27]。

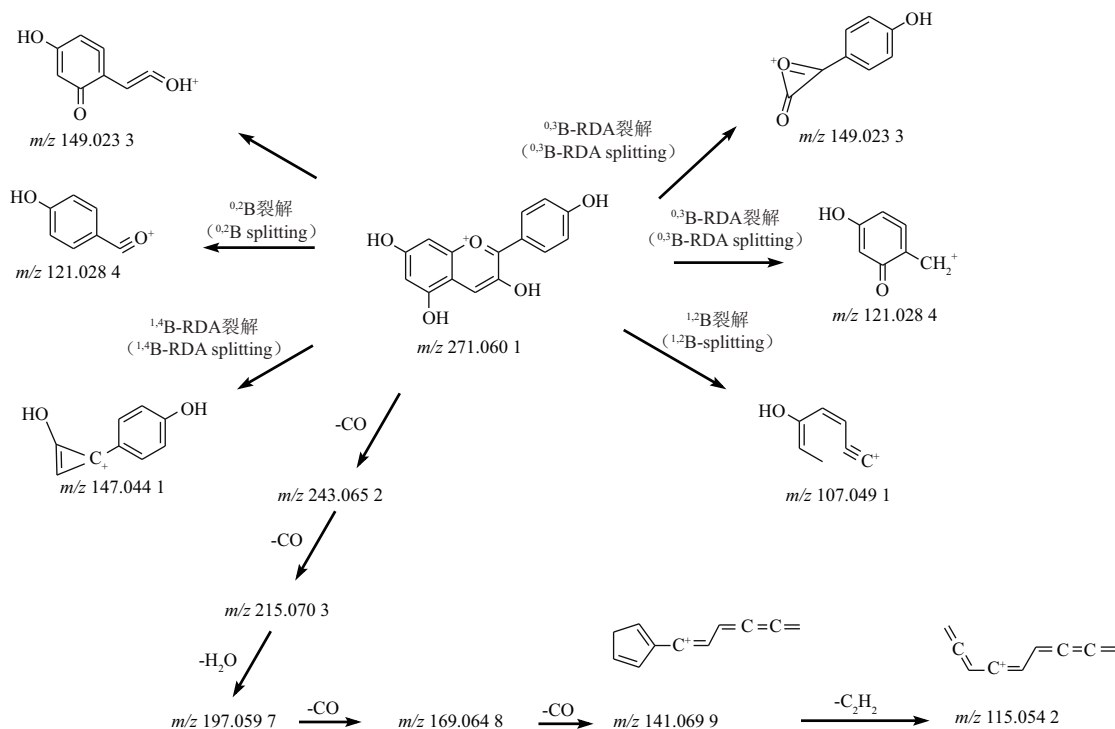


图 3 花葵素在正离子模式下的裂解途径

Fig. 3 Proposed fragmentation pathways of pelargonidin in the positive ion mode

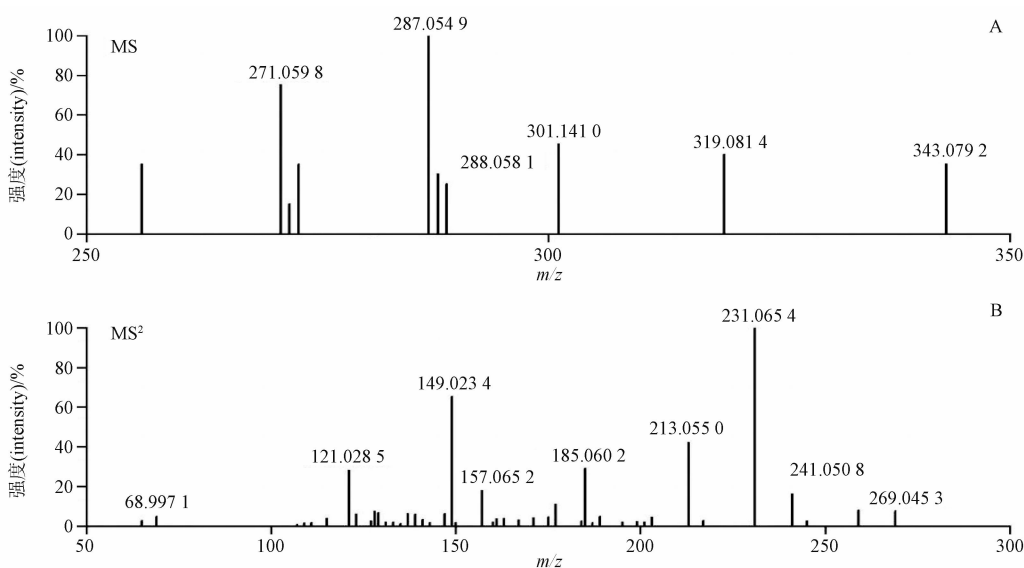


图 4 矢车菊素在正离子模式下 $[M]^+$ 的 MS(A) 和 MS²(B) 图

Fig. 4 The MS(A) and MS²(B) spectra of cyanidin in the positive ion mode

矢车菊生成的 m/z 139.054 2 碎片, SCIEX OS 软件计算为 $C_{11}H_7^+$, 与花葵素生成的 m/z 141.069 9 碎片, 刚好相差 2 个 H 原子的质量, 因为矢车菊 C 环上比花葵素多 1 个 OH 基团, 导致丢失多 2 个 H 原子, 推测 2 种花色素最后都是开环裂解, 形成直

链烃。

3.2.3 飞燕素 图 6-A 显示 m/z 303.050 0 为飞燕草素的 $[M]^+$, 图 6-B 中显示裂解路径主要是基团丢失和 B 环的裂解反应, 裂解途径如图 7 所示。

Phan 等^[28]通过 Cy-3-Glc 模型计算 Hirshfeld-I

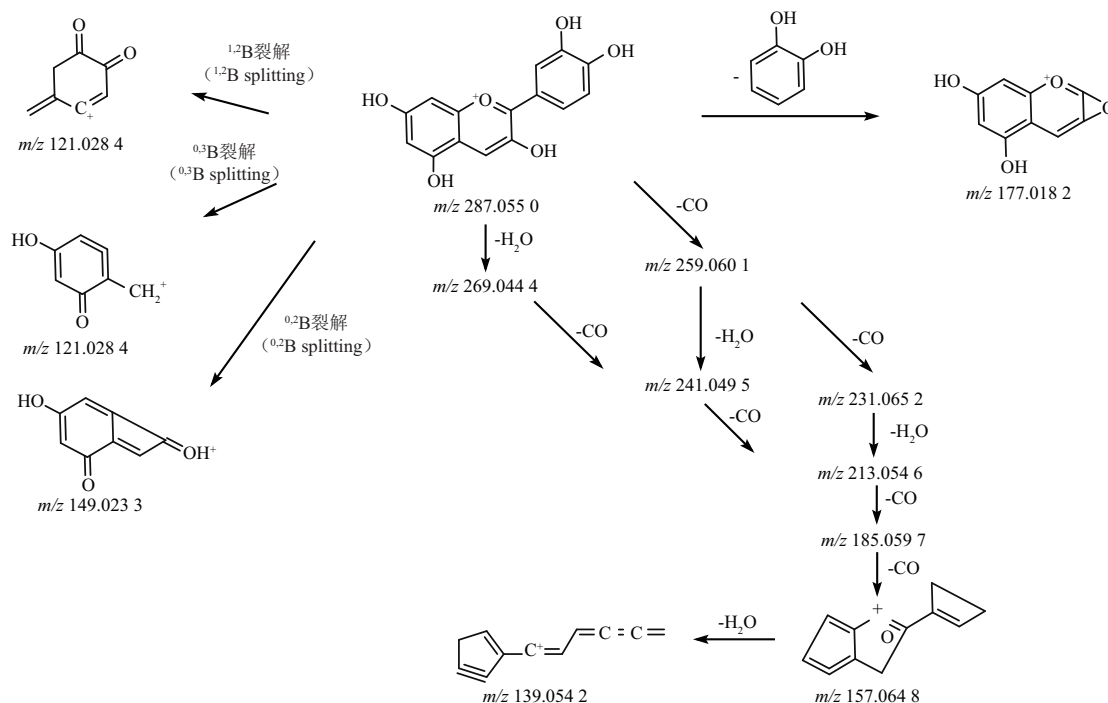


图5 矢车菊素在正离子模式下的裂解途径

Fig. 5 Proposed fragmentation pathways of cyanidin in the positive ion mode

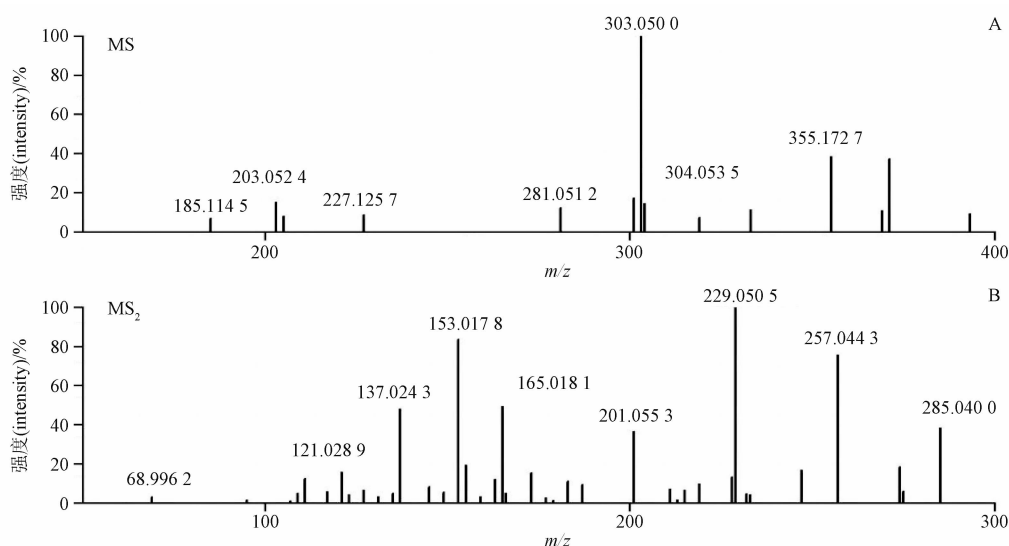


图6 飞燕草素在正离子模式下[M]⁺的MS(A)和MS²(B)图

Fig. 6 The MS(A) and MS²(B) spectra of delphinidin in the positive ion mode

电荷对 HOMO 和 LUMO 的贡献,发现 B 环和 C 环的基团对 HOMO 的贡献最高。因此飞燕草丢失顺序为 B 环 2,3 之间的 C - OH 基团先丢失,再丢失 C 环上的 3 个 R1、R2、OH 基团。MS²图可以发现随着 C 环上基团的增加,飞燕草素开始出现 C 环裂解产物。

3.2.4 芍药素 图 8 - A 显示 m/z 301.070 0 为

[M]⁺,图 8 - B 显示裂解路径主要是基团丢失和 C 环的裂解,裂解途径如图 9 所示。

含有甲氧基的芍药素裂解反应主要为环上的基团发生中性丢失,倾向生成环上基团更少,结构更对称的结构,这与文献[29 - 32]研究发现类似。联苯结构中 2 个苯环假如以单键直接相连,形成更为

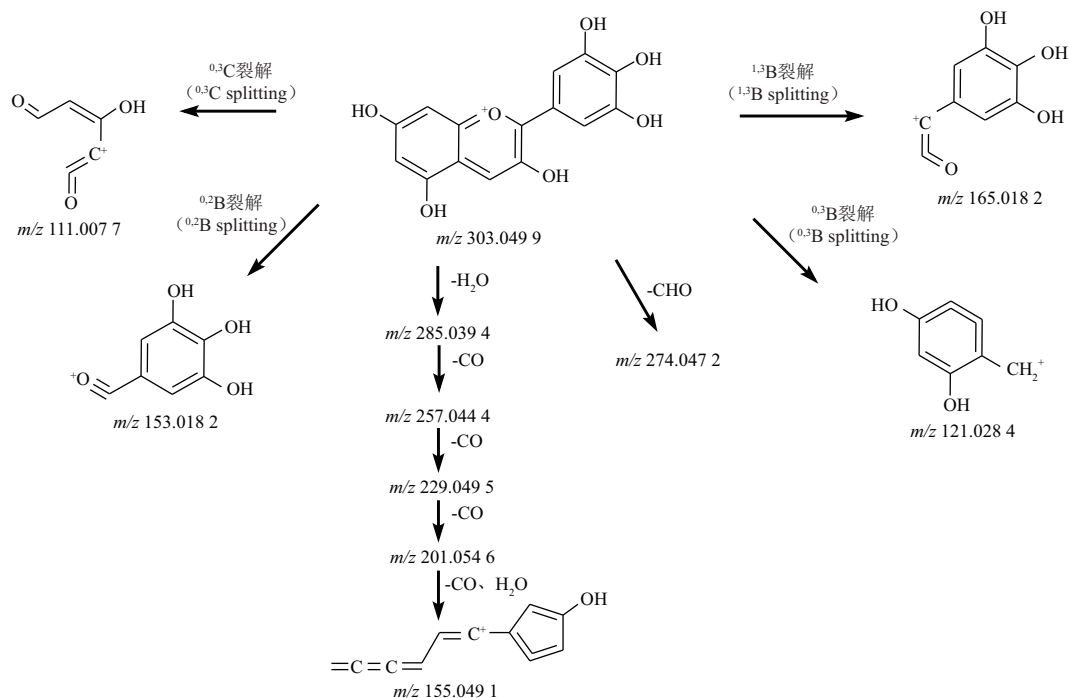


图 7 飞燕草素在正离子模式下的裂解途径

Fig. 7 Proposed fragmentation pathways of delphinidin in the positive ion mode

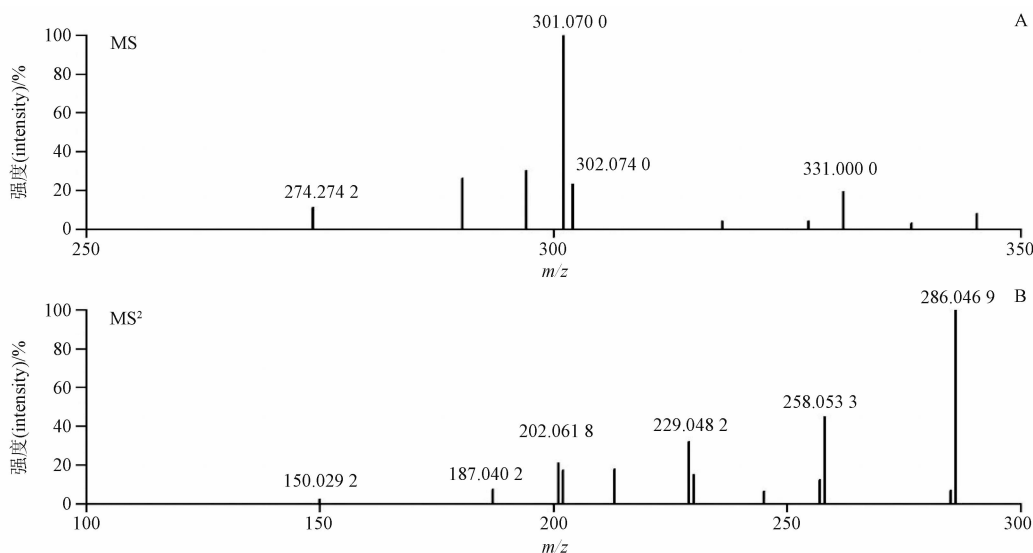


图 8 芍药素在正离子模式下 $[M]^+$ 的 MS(A) 和 MS^2 (B) 图

Fig. 8 The MS(A) and MS^2 (B) spectra of peonidin in the positive ion mode

稳定的共轭体结构,有利于维持其低分子势能的稳定性。3'位含甲氧基使得C环对称性较差,芍药素的裂解过程,会朝向形成稳定的共轭结构的方向反应。花色苷随着C环上的取代基增多,裂解反应主要集中在基团丢失为主,环裂解反应逐渐变少。

3.2.5 矮牵牛素 矮牵牛素 MS 图中显示 m/z 317.0656 为 $[M]^+$, MS^2 图中显示裂解路径主要是基团丢失和 C 环的裂解,裂解途径如图 11 所示。矮牵牛素发生 C 裂解反应的产物比其余 5 个花色苷明显。

3.2.6 锦葵素 图 12 - A 显示 m/z 331.0807 为 $[M]^+$, 图 12 - B 显示裂解路径主要是基团丢失、

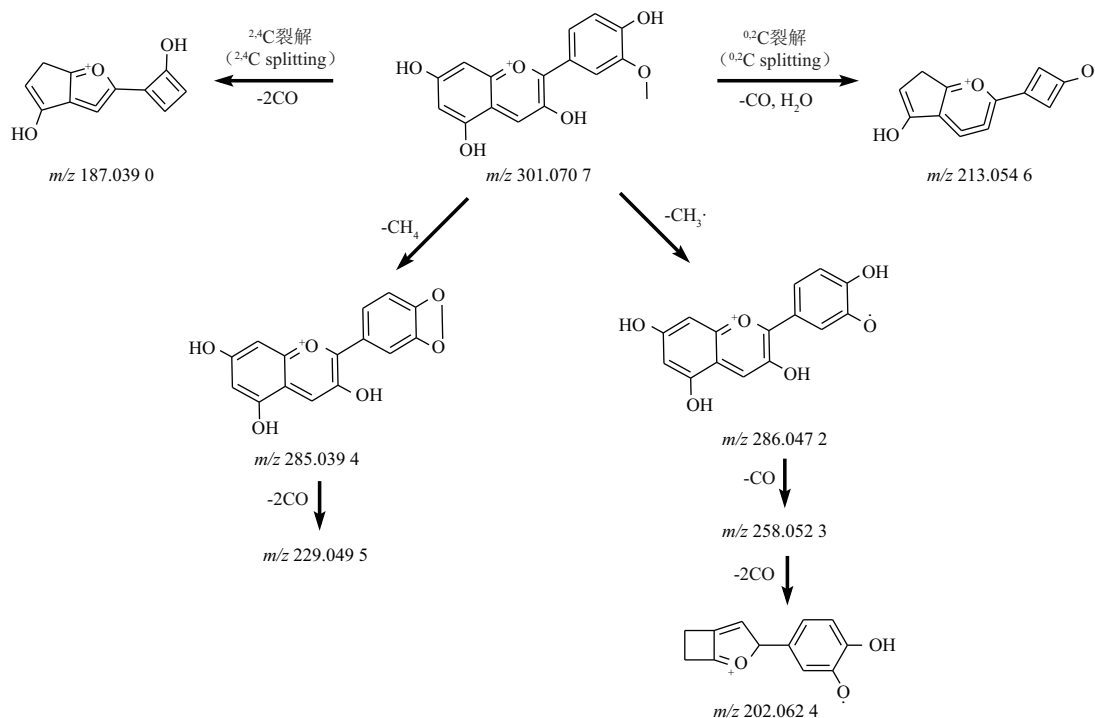


图9 芍药素在正离子模式下的裂解途径

Fig. 9 Proposed fragmentation pathways of peonidin in the positive ion mode

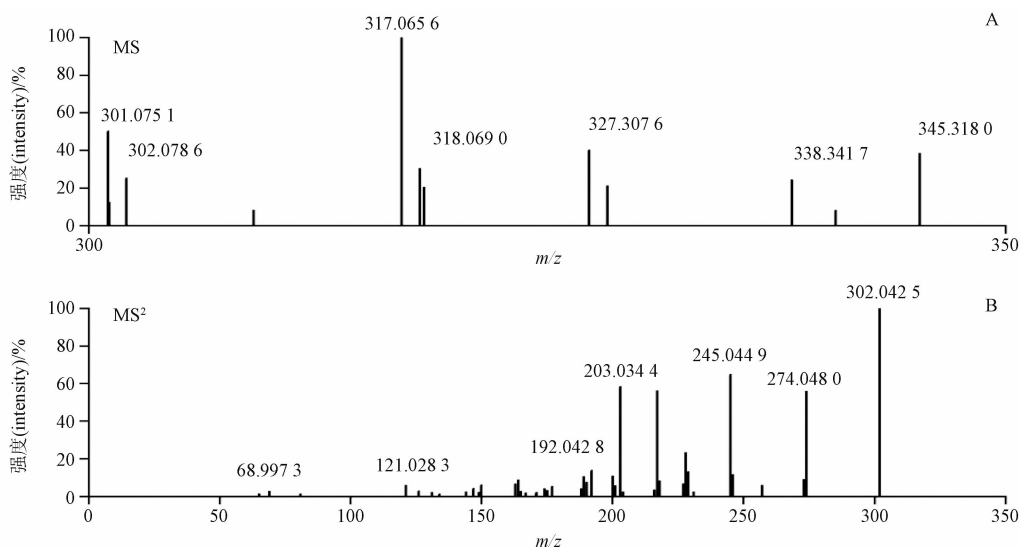


图10 矮牵牛素在正离子模式下[M]⁺的MS(A)和MS²(B)图

Fig. 10 The MS(A) and MS²(B) spectra of petunidin in the positive ion mode

C环的裂解、B环的裂解和BC环上CC键的断裂,裂解途径如图13所示。

锦葵素倾向先丢失甲氧基,再丢失其他基团,丢失2个甲氧基后,还会形成较为稳定的环内键,该结果与Alberts等^[35]研究一致。含有甲氧基的芍药素、矮牵牛素和锦葵素数据中都连续出现质

荷比相差1个H原子质量数的特征碎片,是前体离子丢失CH₄、CH₃·所生成的一系列产物,如锦葵素的m/z 229.0492碎片和m/z 228.0418碎片,m/z 201.0544碎片和m/z 200.0472碎片,该类特征离子在质谱中可以用于鉴别是否含有甲氧基的花色素。

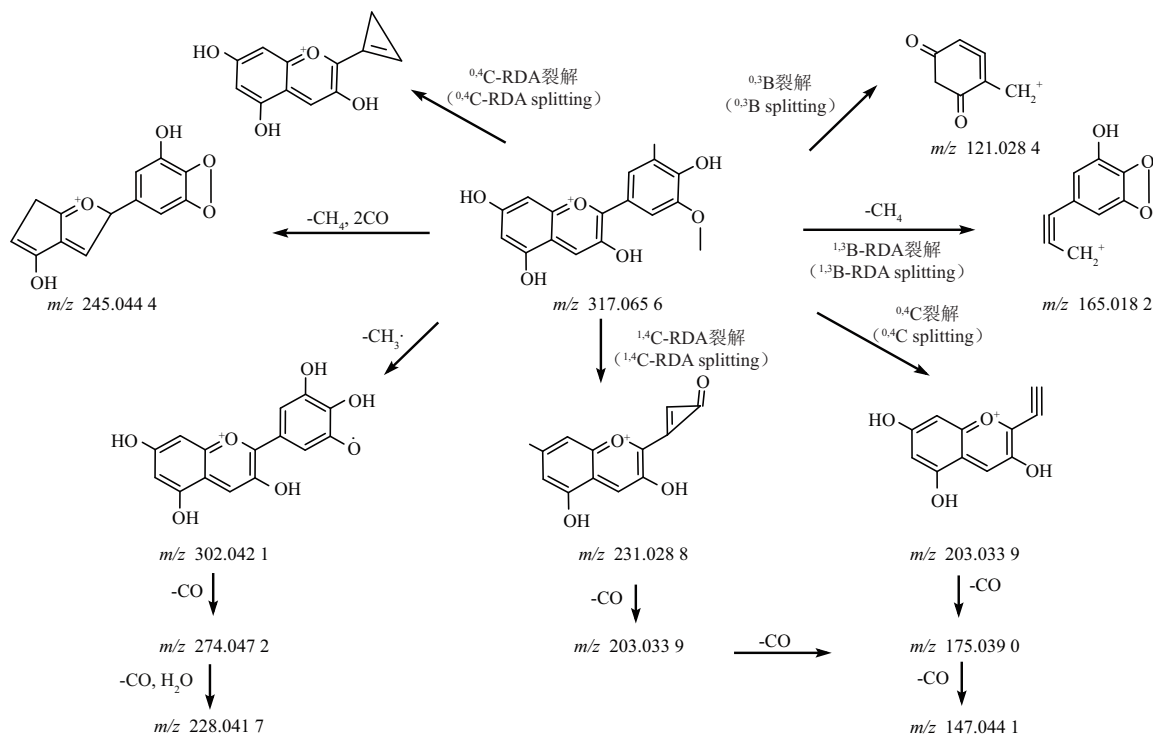


图 11 矮牵牛素在正离子模式下的裂解途径

Fig. 11 Proposed fragmentation pathways of petunidin in the positive ion mode

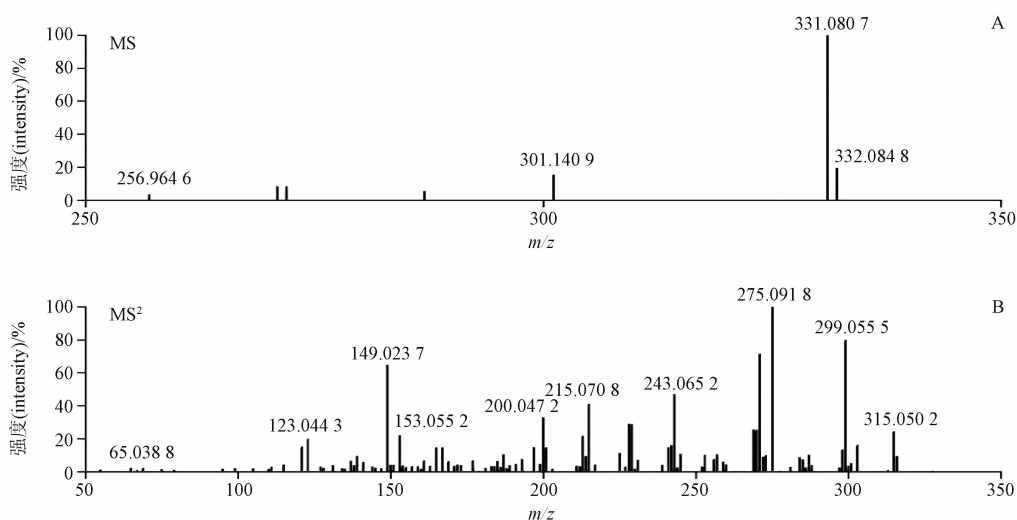


图 12 锦葵素在正离子模式下 $[M]^+$ 的 MS(A) 和 MS^2 (B) 图

Fig. 12 The MS(A) and MS^2 (B) spectra of malvidin in the positive ion mode

4 讨论与结论

本研究使用 UHPLC - Q TOF MS 法, 对矢车菊素、飞燕草素、矮牵牛素、花葵素、芍药素和锦葵色素的质谱裂解路径进行分析, 识别出特征离子, 总结了主要的几种裂解规律, 并按结构异同进行了相互验证。该研究结果对花色素及其加工品的快速鉴别具

有重要意义, 也为后续药物代谢产物研究提供有力的理论支持。

通过查询对照品厂家给出的溶解性资料, 对矢车菊素、飞燕草素、矮牵牛素、花葵素、芍药素和锦葵素的对照品可溶于甲醇、乙醇、DMSO 等有机溶剂, 因此采用了甲醇作为溶剂, 后续研究开发可以考虑

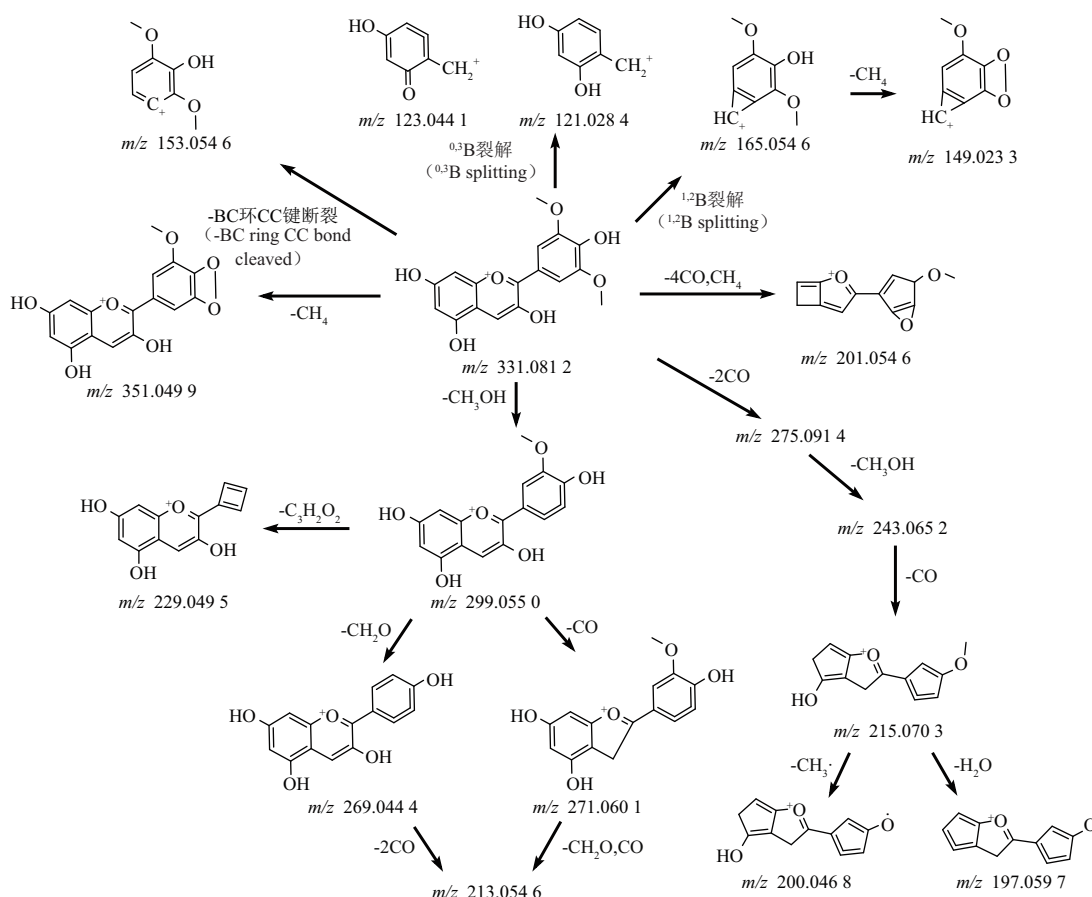


图 13 锦葵素在正离子模式下的裂解途径

Fig. 13 Proposed fragmentation pathways of malvinidol in the positive ion mode

使用更为环保的乙醇。

花色素在分析裂解过程中丢失 CO、CHO、H₂O 环上的基团,但不能确定具体位置,以及哪一个裂解产物含量更高。在后续研究中,可以利用量子力学方法进行密度泛函理论(DFT)计算,得出具有较高的反应活性的位置,从而推导出发生主要反应的基团部位。

参考文献

- [1] 范广文, 马泽宇, 吴铎, 等. 蒙药玉簪花化学成分和药理作用机制研究进展[J]. 自然科学, 2024, 12(1): 185
FAN GW, MA ZY, WU D, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological mechanism of Mongolian Medicine *Hosta plantaginea* Flowers[J]. *Open J Nat Sci*, 2024, 12(1): 185
- [2] 刘莹, 覃骊兰, 蓝毓营. 桑葚化学成分、药理作用及质量标志物研究进展[J]. 重庆医学, 2021, 50(6): 1063
LIU Y, QIN LL, LAN YY. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and quality markers of mulberry[J].

Chongqing Med, 2021, 50(6): 1063

- [3] 李婧, 杨芳, 栾广祥, 等. 黑果枸杞的花青素类成分及其药理作用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2022, 37(3): 331
LI J, YANG F, LUAN GX, *et al.* Research progress on ingredient and pharmacological activities of anthocyanins from *Lycium ruthenicum*[J]. *West China J Pharm Sci*, 2022, 37(3): 331
- [4] 赵长宝. 龙葵花青素的提取纯化及其对几种病原菌的抑菌活性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018
ZHAO CB. Extraction of Anthocyanins from *Solanum nigrum* and Antimicrobial Activity against Common Pathogens [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2018
- [5] 李奕星, 陈娇, 李芬芳, 等. 红毛丹果皮花色素苷鉴定及其稳定性分析[J]. 经济林研究, 2022, 40(3): 200
LI YX, CHEN J, LI FF, *et al.* Identification and stability analysis of anthocyanins from rambutan pericarp [J]. *Non-wood Forest Res*, 2022, 40(3): 200
- [6] 黄露露, 杨志伟, 齐鹏宇, 等. 葡萄酒中花色素类物质鉴别及组成研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(19): 6271
HUANG LL, YANG ZW, QI PY, *et al.* Research progress on identification and composition of anthocyanins in wine[J]. *J Food*

- Saf Qual, 2022, 13(19): 6271
- [7] POLTURAK G, HEINIG U, GROSSMAN N, *et al.* Transcriptome and metabolic profiling provides insights into betalain biosynthesis and evolution in *Mirabilis jalapa* [J]. *Molecul Plant*, 2018, 11: 189
- [8] 张协光, 肖伟敏, 朱丽, 等. 超高效液相色谱-线性离子阱-高分辨质谱同步检测果蔬及饮料中花青素[J]. *分析试验室*, 2019, 38(10): 1199
- ZHANG XG, XIAO WM, ZHU L, *et al.* Simultaneous analysis of anthocyanins in fruit, vegetable and beverage by ultra-high performance liquid chromatography coupled to a linear ion trap-orbitrap high resolution mass spectrometer [J]. *Chin J Anal Lab*, 2019, 38(10): 1199
- [9] 陈子凡, 董莹, 何思东, 等. 蓝莓及其提取物中花青素检测方法的的研究[J]. *粮食与食品工业*, 2021, 28(3): 69
- CHEN ZF, DONG Y, HE SD, *et al.* Research progress on the detection methods of anthocyanins in blueberry [J]. *Cereal Food Ind*, 2021, 28(3): 69
- [10] 韩雪, 袁玮琼, 武艺, 等. 利用 HPLC-DAD-ESI/IT-TOF/MSⁿ 分析不同品种蓝莓果实的花青素结构[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(8): 210
- HAN X, YUAN WQ, WU Y, *et al.* Analysis of anthocyanin structure of different varieties of blueberry fruits by HPLC-DAD-ESI/IT-TOF/MSⁿ [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(8): 210
- [11] 陈碧聪, 陈子凡. 超高效液相色谱-质谱联用法测定蓝莓中六种花色素含量[J]. *粮食与食品工业*, 2023, 30(3): 64
- CHEN BC, CHEN ZF. Determination of six anthocyanins in blueberry by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Cereal Food Ind*, 2023, 30(3): 64
- [12] 陈子凡, 池少铃, 陈碧聪, 等. 5种 α -羟基酸提取蓝莓中花色素的条件选择及分析[J]. *食品工程*, 2023, 6(2): 60
- CHEN ZF, CHI SL, CHEN BC, *et al.* Selection and analysis of conditions for extraction of anthocyanins from blueberry with 5 α -hydroxy acids [J]. *Food Eng*, 2023, 6(2): 60
- [13] 段华健, 武正华, 余史丹, 等. 双环醇-联苯双酯-五味子丙素的UHPLC-ESI-Q-TOF-MS分析及其应用[J]. *中国药房*, 2021, 32(14): 1692
- DUAN HJ, WU ZH, YU SD, *et al.* UHPLC-ESI-Q-TOF-MS analysis of bicyclol, bifendate and schisandrin C and application [J]. *China Pharm*, 2021, 32(14): 1692
- [14] TIOZON RN, SARTAGODA KJD, SERRANO LMN, *et al.* Metabolomics based inferences to unravel phenolic compound diversity in cereals and its implications for human gut health [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2022, 127: 14
- [15] 金滢. 质谱树状图相似度过滤技术进行淫羊藿单体和药材代谢产物发现和鉴定新策略的研究和应用[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014
- JIN Y. Research and Application of a New Strategy for Discovering and Identifying Monomers and Medicinal Metabolites of Epimedium Using Similarity Filtering Technology in Mass Spectrometry Dendrograms [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014
- [16] 张丹, 王彩虹, 金滢, 等. 高效液相色谱-高分辨质谱法研究药物代谢产物的数据处理策略[J]. *质谱学报*, 2017, 38(4): 410
- ZHANG D, WANG CH, JIN Y, *et al.* Identification of drug metabolites using data post-processing strategies based on high performance chromatography coupled with high resolution mass spectrometer [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2017, 38(4): 410
- [17] 李志远, 周爽, 孙小杰, 等. ZenoTOFTM 7600 系统快速鉴定杂色曲霉素代谢产物 [C]//SCIEX 食品科研应用文集. 北京: AB Sciex Pte. Ltd, 2022: 60
- LI ZY, ZHOU S, SUN XJ, *et al.* Rapid identification of sterigmatocystin metabolites using ZenoTOFTM 7600 system [C]//SCIEX Food scientific research and application collection of papers. Beijing: AB Sciex Pte. Ltd, 2022: 60
- [18] 李志远, 李如男, 孙小杰, 等. X500R QTOF 系统对新型杀虫剂乙唑螨腈在水培植物体内的代谢产物研究 [EB/OL]. (2022-11-20) [2024-02-11]. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/tech-notes/cn/environmental/metabolites-in-the-hydroponic-plant-system-of-a-new-insecticide-cyetyprafen-by-using-x500r-qtof-system.pdf>
- LI ZY, LI RN, SUN XJ, *et al.* Metabolites in the Hydroponic-plant System of A New Insecticide Cyetyprafen by Using X500R QTOF System [EB/OL]. (2022-11-20) [2024-02-11]. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/tech-notes/cn/environmental/metabolites-in-the-hydroponic-plant-system-of-a-new-insecticide-cyetyprafen-by-using-x500r-qtof-system.pdf>
- [19] AB SCIEX PTE. LTD. SCIEX OS Software for X500 QTOF and ZenoTOF 7600 Systems-Software User Guide [M]. Singapor: AB Sciex Pte. Ltd, 2022: 300
- [20] 王燕, 李晓波, 李俊杰, 等. 5,6,7,4'-四羟基黄酮和5,6,7,4'-四甲氧基黄酮高分辨电喷雾串联质谱裂解规律对比研究[J]. *质谱学报*, 2016, 37(5): 385
- WANG Y, LI XB, LI JJ, *et al.* Fragmentation pathway comparison of 5,6,7,4'-tetrahydroxy-flavone and 5,6,7,4'-tetramethoxy-flavone by high resolution electrospray ionization tandem mass spectroscopy [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2016, 37(5): 385
- [21] 何玉珏, 邓欣祺, 何元松, 等. 基于UHPLC-Orbitrap MS的5种异戊烯基黄酮醇化合物电喷雾质谱裂解规律研究[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(9): 5595
- HE YJ, DENG XQ, HE YS, *et al.* Study on fragmentation patterns of five prenylated flavonols by applying electrospray ionization mass spectrometry based on UHPLC-Orbitrap MS [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(9): 5595
- [22] AZIZ N, KHAN MN, ALI A, *et al.* Rapid analysis of flavonoids based on spectral library development in positive ionization mode using LC-HR-ESI-MS/MS [J]. *Arabian J Chem*, 2022, 15:

- 103734
- [23] YAMABE S, TSUCHIDA N, YAMAZAKI S. A DFT study on the degradation mechanism of vitamin B₂ [J]. *Food Chem (Oxf)*, 2022(4): 100080
- [24] DAVIDSON JT, PIACENTINO EL, SASIENE ZJ, *et al.* Identification of novel fragmentation pathways and fragment ion structures in the tandem mass spectra of protonated synthetic cathinones[J]. *Forensic Chem*, 2020(19): 100245
- [25] 陈焕文. 分析化学手册: 9A 有机质谱分析[M]. 第3版. 北京: 化学工业出版社, 2016: 1
- CHEN HW. Handbook of Analytical Chemistry: 9A Organic Mass Spectrometry Analysis [M]. 3rd Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 1
- [26] LUO YC, JING P. DFT study of the stabilization effect on anthocyanins via secondary interactions[J]. *Food Chem: Molecule Sci*, 2021, 3: 100057
- [27] MUKHTAR M, SALEEM M, NAZIR M, *et al.* Identification of pyrrolizidine alkaloids and flavonoid glycosides through HR - LC-MS/MS analysis, biological screening, DFT and molecular docking studies on *Heliotropium dasycarpum* Ledeb [J]. *Arabian J Chem*, 2023(16): 104655
- [28] PHAN K, MEESTER SD, RAES K. A comparative study on the photophysical properties of anthocyanins and pyranoanthocyanins [J]. *Chemistry*, 2021, 27(19): 5956
- [29] HOSNY NM, IBRAHIM OA, SYNTHESIS AB, *et al.* Characterization, DFT, cytotoxicity evaluation and molecular docking of a new carbothioamide ligand and its coordination compounds [J]. *Results Chem*, 2023(5): 100776
- [30] 彭颖, 童灿浩, 王彦安, 等. 柚皮苷二氢查尔酮抗氧化活性的构效关系研究[J]. *原子与分子物理学报*, 2017, 34(6): 1003
- PENG Y, TONG CH, WANG YA, *et al.* Study on quantitative structure - activity relationship(QSAR) of naringin dihydrochalcone[J]. *J Atom Mol Phys*, 2017, 34(6): 1003
- [31] KIFAH SM. SALIH. Synthesis, characterization, surface analysis, optical activity and solvent effects on the electronic absorptions of schiff base - functionalized amino thiophene derivatives: experimental and TD - DFT investigations [J]. *J Mol Struct*, 2021(1244): 131267
- [32] FUTAMATA N, RYOSUKE YAMAMURA R, HA DT, *et al.* Fragmentation pathways of methylbenzoate cations following core excitation: theoretical approach using graph theory [J]. *Chem Phys Lett*, 2021(766): 138316
- [33] KANAWATI B, JONIEC S, WINTERHALTER R. Mass spectrometric characterization of small oxocarboxylic acids and gas phase ion fragmentation mechanisms studied by electrospray triple quadrupole - MS/MS - TOF system and DFT theory [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2007, 266(1 - 3): 97
- [34] LEI M, WU SB, LIU C, *et al.* Revealing the pyrolysis behavior of 5 - 5' biphenyl - type lignin fragment. Part I: a mechanistic study on fragmentation via experiments and theoretical calculation [J]. *Fuel Process Technol*, 2021(217): 106812
- [35] ALBERTS P, MA STANDER, VILLIERS ANDRÉ DE. Advanced ultra high pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometric methods for the screening of red wine anthocyanins and derived pigments [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1235: 92

(本文于2024年4月10日收到)