

基于干基质点技术的刺梨化学成分分析与指纹图谱建立

杨湘芬, 陈朝鑫, 曹 前, 王子欣, 林一凡, 宋青青*

(北京中医药大学中药学院 北京 102488)

摘要 为建立刺梨快速化学成分分析和质量评价方法,基于干基质点技术建立刺梨干斑,将其置于在线过滤器内,连接高效液相色谱-质谱(HPLC-MS/MS),对刺梨化学成分进行快速分析,并建立刺梨汁干斑指纹图谱。结果表明,从刺梨鲜榨汁中鉴定到 39 个化合物,从刺梨果渣提取物中鉴定到 48 个化合物,刺梨果渣及压榨所得刺梨汁的代谢产物相似度较高。基于干基质点技术的刺梨鲜榨汁 HPLC 指纹图谱有 10 个共有峰。15 批刺梨鲜榨汁相似度均大于 0.97。采用刺梨干斑能有效解决质量分析过程中样品不稳定及运输储存不变的问题,为刺梨产品的快速评价提供参考。

关键词 干基质点; 刺梨; 化学成分分析; 指纹图谱

文章编号 1009-7848(2025)03-0431-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.03.041

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)为蔷薇科蔷薇属落叶灌木植物的果实,是一种药食两用的特色食用植物资源。刺梨含有黄酮、三萜、有机酸、多糖、超氧化物歧化酶、氨基酸等丰富的营养成分和活性物质^[1-2],在食品、保健品以及中成药中应用广泛,已成为贵州省的 12 个农业特色优势产业之一。刺梨鲜果成熟期较短,长时间放置就会腐烂,因此采摘后需在短时间内榨汁并低温贮存。市场上常见的刺梨产品主要是以刺梨原汁为原料^[3]。目前,刺梨及其原汁的储存、运输以及分析需要严格控制温度、湿度、光照等环境条件,增加了分析检验的成本和不确定性。

干血斑(dried blood spot,DBS)、干尿斑(dried urine spot,DUS)、干唾液斑(dried saliva spot,DSS)以及干草药斑(dried spots of herbal medicines,DSHM)等干基质点采样技术^[4-8],通过将液体样品斑点化于滤纸上,携带样品完整的成分信息^[9]。该方法所需样品量小,操作便捷,便于储存和运输,提高了样品稳定性^[10],被广泛用于样品成分的定性和定量分析^[11-12]。目前已有将干斑串联于 LC-MS/MS 实现在线快速分析^[13]的方法,其简化了干斑滤纸的提取过程,减少了人工操作和使用提取溶剂。

本研究基于干基质点采样技术制备刺梨鲜榨汁干基质斑,并将其串联于 LC-MS/MS 系统,快速分析刺梨化学成分,建立刺梨指纹图谱,为刺梨的质量控制提供方法。同时,将所建立的方法用于刺梨果渣的化学成分分析,为刺梨果渣的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇(色谱纯)、甲醇(质谱纯)、甲酸(质谱纯),美国赛默飞世尔公司;超纯水,实验室 Milli-Q 纯水净化系统制备;原花青素 B1 对照品(纯度 98.0%),成都瑞芬思生物科技有限公司;对照品原花青素 B2、原花青素 B3、儿茶素、表儿茶素、异槲皮苷、金丝桃苷、没食子酸、槲皮素、蔷薇酸(纯度 98.0%),上海源叶有限公司。15 批贵龙 5 号刺梨鲜果均采自贵州省黔南布依族苗族自治州龙里县。

1.2 仪器与设备

UFLC-DAD 超快速液相色谱仪(配有 LC-20AD 泵、自动进样器、CTO-20A 柱温箱、DAD 检测器、控制器、真空脱气机、DGU-20A 脱气机),日本岛津公司;UFLC-IT-TOF-MS/MS 液质联用仪,日本岛津公司;Mettler XS105 型分析天平,瑞士 Mettler-Toledo 公司;超声波清洗器,南京垒君达超声电子设备有限公司;Milli-Q 超纯水系统,美国 Millipore 公司;Frit-Type 在线过滤器(2 μm)、替换筛板(4 mm,0.5 μm),迪马科技有限公司。

收稿日期: 2024-03-15

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(82003911)

第一作者: 杨湘芬,女,硕士生

通信作者: 宋青青 E-mail: sqq1991qq@163.com

1.3 方法

1.3.1 样品的制备 将15批刺梨果实(按CL-0X顺序编号)分别切块,压榨,过滤得到刺梨鲜榨汁,装瓶密封,储存于4℃冰箱中;过滤后的果渣置于50℃烘箱中干燥72h,粉碎机粉碎,过4号筛,密封储存。

1.3.2 对照品及供试品溶液的制备 分别精密称取原花青素B1、原花青素B2、原花青素B3、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、异槲皮苷、金丝桃苷、槲皮素、蔷薇酸对照品适量,加入水或甲醇配制成10 mg/mL对照品溶液。精密吸取各对照品溶液混合,用50%甲醇溶液稀释配制成200 μg/mL的混合对照品溶液。

精密称取各批次刺梨粉末约80 mg,加入50%甲醇溶液1 mL,超声提取30 min,于13 000 r/min离心10 min,取上清液,于0.2 μm微孔滤膜过滤,即得刺梨果渣溶液。

1.3.3 刺梨干基质斑的制备 取各批次刺梨鲜榨汁吸取4 μL点样于圆形滤纸片上(直径6 mm),常温干燥,即得刺梨汁干基质斑。将各刺梨鲜榨汁等量混合,照相同方法制备得混合刺梨汁干斑。混合刺梨果渣干斑与对照品干斑的制备方法同上。

1.3.4 UFLC-IT-TOF-MS/MS 分析条件 色谱柱为Waters ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为0.1%甲酸水(A)和甲醇(B);梯度洗脱程序如下:0~1 min,0% B;1~5 min,0~10% B;5~17 min,10%~13% B;17~19 min,13%~20% B;19~28 min,20%~25% B;28~31 min,25%~30% B;31~36 min,30%~40% B;36~41 min,40%~60% B;41~42 min,60%~70% B;42~47 min,70% B;47~49 min,70%~95% B;49~55 min,0% B。流速0.2 mL/min,柱温40℃。干斑在线分析系统连接见图1。阀在1→6位,平衡色谱柱;阀切换至1→2位,通过自动进样2 μL 0.1%甲酸水触发分析程序,进行干斑样品提取以及梯度洗脱(0~55 min);随后切换至1→6位。

采用电喷雾离子源在正、负离子模式下检测,MS1扫描范围: m/z 100~800,MS2扫描范围: m/z 50~800;喷雾室电压为4 kV/-3.5 kV;干燥气电压为100 MPa;曲型脱溶剂管与加热模块温度均为200℃;碰撞诱导解离能量为70%;离子累积时间

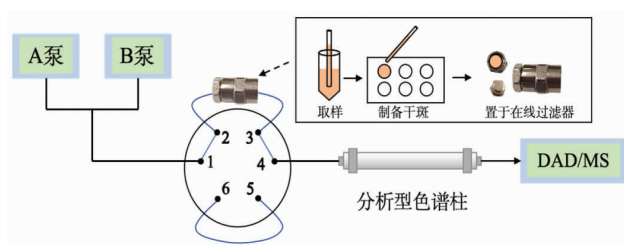


图1 刺梨干斑在线分析系统连接示意图

Fig.1 Schematic of the online analytical system for dried matrix spots of *Rosa roxburghii*

为30 ms;各级质谱的重复次数为3。

1.3.5 指纹图谱的色谱条件 色谱柱、流动相、流速、柱温以及阀切换等条件均与UFLC-IT-TOF-MS/MS分析方法的色谱条件相同。梯度洗脱程序:0~1 min,0% B;1~5 min,0%~10% B;5~10 min,10%~11% B;10~19 min,11% B;19~23 min,11%~21% B;23~31 min,21% B;31~37 min,21%~30% B;37~40 min,30%~40% B;40~45 min,40%~60% B;45~46 min,60%~95% B;46~51 min,95% B;51~55 min,0% B;检测波长254 nm。

1.4 数据处理

质谱数据使用Labsolution软件处理和分析。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)”处理色谱图谱,以对照图谱为参照,进行相似度评价。

2 结果与分析

2.1 刺梨干斑在线分析系统的建立与优化

干斑滤纸置于在线过滤器中,便可通过不锈钢管线连接于色谱系统,同时在线过滤器的筛板也可过滤滤纸样品中杂质,避免堵塞色谱柱。通过六通阀的切换,实现了色谱系统的平衡和洗脱程序,并完成样品更换。当阀在1→6位连接时,系统以流动相的起始梯度比例平衡色谱柱,此时将装有干斑样品的在线过滤器连入系统;随后,阀切换至1→2位连接时开始梯度洗脱,流动相流入装有刺梨干斑的在线过滤器,携带所提取成分进入色谱柱分离。完成单次分析后(55 min),阀再次切换至1→6位,完成系统平衡和样品的更换过程。

为了实现刺梨化学成分从干斑中提取完全,且可以获得较好的色谱峰型和分离度,本试验对

色谱柱 (ACQUITY UPLC HSS T3,CAPCELL CORE ADME、CAPCELL CORE C18)、流动相(水-甲醇、水-乙腈、0.1%甲酸水-甲醇、0.1%甲酸水-乙腈)以及起始提取条件(水、0.1%甲酸水、5%甲醇水、5%乙腈水)进行考察,结果表明刺梨干斑化学成分提取溶剂(流动相起始比例)对基线、色谱峰型和数量的影响最大。最终采用 0.1%甲酸水作为提取溶剂,0.1%甲酸水-甲醇为流动相所得的色谱峰数量多且响应高,选择 HSS T3 色谱柱能够进一步提高色谱峰分离度良好。

2.2 刺梨化学成分分析

通过干基质斑技术,对刺梨鲜榨汁和刺梨果渣的化学成分进行分析。从 15 批混合刺梨汁干斑中鉴定了 39 个化合物,从混合刺梨果渣中鉴定出 48 个化合物。其中,通过对照品的保留时间和质谱信息对比,指认了 9 个化合物,其余利用 HMDB 和 PubChem 等数据库以及报道的各类化合物质谱裂解规律进行分析鉴定^[14-19],主要包括 17 个鞣质、11 个酚酸、8 个黄酮、5 个萜、3 个有机酸等成分,具体结果见表 1。刺梨中大量的鞣质、酚酸等成分是导致其口感酸和涩的物质基础^[20]。从刺梨汁和果渣的化学成分差异可发现鲜榨汁会损失一部分营养物质,而刺梨榨汁后剩余的果渣中有效物质也较为丰富,刺梨果渣作为刺梨鲜榨汁生产过程的副产物,值得进一步被利用开发。

表 1 刺梨汁和刺梨果渣中鉴定的化学成分
Table 1 Identified compounds in juice and pomace of *R. roxburghii*

编号	保留 时间/min	化合物	加合离子	分子式	MS ¹ /(m/z)	误差/ ×10 ⁻⁶	MS/MS (m/z)	化合物 类型	CLX	CLZ
1	1.70	葡萄糖酸	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₂ O ₇	195.0522	6.15	177.0418, 159.0323, 129.0252, 111.0085	有机酸	✓	✓
2	2.18	苹果酸	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₅	133.0149	5.26	115.0102, 71.0204	有机酸	✓	✓
3	3.23	奎宁酸	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ O ₆	191.0583	5.76	173.0493, 129.0255, 111.0136, 87.0143	有机酸	—	✓
4	3.53	六羟基联苯二甲酰基	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	481.0644	4.16	421.0476, 300.9987, 275.0216, 257.0157, 229.0176	鞣质	✓	—
5	6.05	没食子酸 *	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	169.0139	-1.78	125.0269	酚酸	✓	✓
6	6.14	没食子酰葡萄糖或异构体	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.0667	-1.21	271.0659, 241.0324, 211.0267, 193.0148, 169.0170, 151.0054, 125.0282	鞣质	✓	✓
7	7.97	没食子酰葡萄糖或异构体	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.0668	-0.91	271.0454, 241.0324, 211.0259, 193.0193, 175.0278, 169.0176, 151.0085, 125.0276	鞣质	✓	✓
8	8.84	二羟基苯甲酸葡萄糖苷或异构体	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.0710	-1.90	195.0311, 165.0208, 153.0223	酚酸	—	✓
9	8.90	英国标鞣花酸或异构体	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783.0709	3.57	481.0621, 300.9977, 275.0196	鞣质	✓	✓
10	10.16	二羟基苯甲酸葡萄糖苷或异构体	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.0714	-0.8	195.0311, 153.0231	酚酸	—	✓
11	11.63	英国标鞣花酸或异构体	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783.0709	2.94	481.0621, 300.9977, 275.0196	鞣质	✓	✓

(续表 1)

编号	保留 时间/min	化合物	加合离子	分子式	MS ¹ /(m/z)	误差/ ×10 ⁻⁶	MS/MS (m/z)	化合物 类型	CLX	CLZ
12	12.32	水杨梅丁素或异构体	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633.0759	5.05	481.0622, 463.0513, 300.9975, 275.0218, 257.0114	鞣质	✓	—
13	12.50	未知	[M-H] ⁻	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0881	-0.22	345.0605, 327.0496, 287.0614, 175.0262	—	✓	✓
14	14.39	原花青素 B3*	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1370	3.12	451.1019, 425.0869, 407.0768, 289.0715, 245.0502, 203.0538	鞣质	✓	✓
15	14.63	熊果苷	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	271.0812	-4.06	109.0315	酚酸	✓	✓
16	15.32	咖啡酰葡萄糖苷	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.0881	0.88	179.0374, 161.0294, 143.0367, 135.0535	酚酸	✓	✓
17	15.59	原花青素 B1*	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1343	-1.56	451.1026, 425.0864, 407.0759, 289.0703, 245.0648, 203.0509	鞣质	✓	✓
18	18.05	儿茶素 *	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0724	2.08	245.0827, 227.0736, 179.0392, 161.0654, 137.0281	黄酮	✓	✓
19	18.92	水杨梅丁素或异构体	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633.0744	2.68	481.0636, 463.0513, 300.9978, 257.0112, 229.0115	鞣质	✓	✓
20	19.40	非瑟酮醇-(4α,8)-儿茶素	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	561.1378	-4.28	543.1217, 435.1072, 407.0767, 289.0727, 271.0631	鞣质	—	✓
21	19.61	未知	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0887	1.08	355.0432, 345.0594, 327.0499, 323.0391, 289.0733, 175.0279	—	✓	✓
22	21.11	水杨梅丁素或异构体	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633.0761	5.21	465.0725, 300.9982, 275.0209, 257.0105, 229.0143	鞣质	—	✓
23	21.17	对香豆酰 β-D-葡萄糖	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0926	-0.92	265.0745, 235.0587, 205.0515, 187.0414, 163.0432, 145.0335	酚酸	✓	✓
24	22.22	原花青素 B2*	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1347	-0.87	425.0887, 407.0802, 299.0513, 289.0684, 287.0557, 273.0408	鞣质	—	✓
25	23.90	表儿茶素-O-四羟基戊酸 酯或异构体	[M-H] ⁻	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₁	437.1103	3.2	401.0846, 359.0748, 347.0763, 329.0661, 317.0683, 289.0718, 245.0884, 167.0390	黄酮	—	✓
26	24.02	阿魏酰葡萄糖	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	355.1011	-6.76	193.0596, 175.0436, 134.0435	酚酸	✓	✓
27	24.83	短叶苏木酚酸	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₈ O ₈	291.0152	2.06	247.0252, 203.0391, 175.0459	酚酸	✓	✓
28	25.13	原花青素 B2-3'-O-没食子 酸	[M-H] ⁻	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.1485	3.29	577.1322, 559.1240, 451.0981, 433.0891, 425.0862, 407.0756, 289.0711	鞣质	✓	✓
29	25.97	(+)-表儿茶素 *	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0727	3.11	245.0825, 227.0721, 205.0516, 203.0715, 187.0560, 179.0278	黄酮	—	✓

(续表 1)

编号	保留 时间/min	化合物	加合离子	分子式	MS ¹ /(m/z)	误差/ ×10 ⁻⁶	MS/MS (m/z)	化合物 类型	CLX	CLZ
30	26.78	橡碗酸二内酯或异构体	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₀ O ₁₃	469.0049	0.00	450.9894, 425.0135, 391.5304, 300.9981, 299.9850	酚酸	✓	✓
31	27.20	表儿茶素-O-四羟基戊酸 酯或异构体	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₁	437.1098	2.06	401.0888, 359.0726, 347.0765, 317.0677, 291.0136, 289.0713, 247.0253, 203.0410	黄酮	✓	✓
32	27.44	未知	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₈	331.1368	-5.74	271.1095, 201.0421	—	✓	✓
33	27.68	苦苣菜丁烯酮苷	[M+HCOO] ⁻	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	431.0130	2.32	385.1855, 223.1355, 205.1249, 161.0575, 153.0976	萜	✓	✓
34	27.71	曲折斑鸢苷	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₈ O ₈	409.1840	-4.15	289.1382, 247.1288, 229.1187, 203.0514, 185.0442	萜	✓	✓
35	29.18	橡碗酸二内酯或异构体	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₀ O ₁₃	469.0045	-0.85	425.0160, 300.9992, 299.9867	酚酸	✓	✓
36	30.98	未知	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₈	331.1376	-4.83	271.1120, 183.8310	—	✓	✓
37	33.50	槲花酸葡萄糖醛酸	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₄	477.0304	-1.47	300.9972, 257.0114	鞣质	✓	✓
38	36.23	柚皮素-O-葡萄糖苷	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.1171	7.16	271.0631, 151.0100	黄酮	—	✓
39	37.19	甲基槲花酸葡萄糖醛酸或 异构体	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₆ O ₁₄	491.0473	1.83	315.0133, 299.9919, 267.1056	鞣质	✓	✓
40	37.34	槲皮素 7-(6''-没食子酰基 葡萄糖苷)	[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₆	615.0991	-0.16	463.0858, 301.0346	黄酮	—	✓
41	38.15	开环异落叶松树脂酚葡萄 糖苷或异构体	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₁	525.2423	0.57	393.1889, 363.1392, 335.0939, 275.0725, 203.0529	木脂素	✓	✓
42	38.27	甲基槲花酸葡萄糖醛酸或 异构体	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₆ O ₁₄	491.0478	2.24	315.0135, 299.9908	鞣质	✓	✓
43	39.29	异槲皮苷 *	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	463.0883	0.43	343.0538, 301.0338, 271.0269, 179.0027	黄酮	✓	✓
44	39.44	槲花酸戊糖苷	[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433.0417	2.31	300.9979, 299.9911, 271.0471	鞣质	✓	✓
45	39.71	金丝桃苷 *	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	463.0881	-0.22	343.0388, 301.0344, 271.0270, 179.0047	黄酮	✓	✓
46	40.34	槲花酸	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9985	-1.66	283.9951, 257.0100, 229.0149, 201.0210, 185.0261, 173.0219, 145.0322	酚酸	✓	✓
47	40.46	开环异落叶松树脂酚葡萄 糖苷或异构体	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₁	525.2332	0.38	393.1886, 363.1286, 335.0942, 317.0884, 275.0703, 203.0536	木脂素	✓	✓
48	41.48	3-氧代-α-紫罗兰醇葡萄 糖苷	[M+HCOO] ⁻	C ₁₉ H ₃₀ O ₇	415.1966	-1.93	369.1850, 207.1045, 179.0590	萜	✓	✓
49	44.18	苦毒苷 F1	[M+HCOO] ⁻	C ₃₈ H ₅₈ O ₁₁	711.3970	1.27	665.3860, 503.3373	萜	—	✓
50	46.01	蔷薇酸 *	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.3421	-1.64	469.3321, 441.3404, 425.3401, 407.3301	萜	✓	✓

注: CLX: 刺梨鲜榨汁; CLZ: 刺梨果渣; *: 标准品指认。

2.2.1 黄酮类化学成分分析 黄酮类化合物主要发生狄尔斯-阿尔德(RDA)裂解,并丢失 CO_2 、 H_2O 等中性分子,黄酮苷类主要发生糖苷键的断裂。本研究从刺梨样品中共鉴定出 8 种黄酮类成分,以儿茶素(catechin,化合物 18)为例,阐述黄酮类化合物碎裂途径。化合物 18 的保留时间为 18.05 min,准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为 m/z 289.0724 (2.08×10^{-6}),推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 。在二级质谱图中

(图 2a),该化合物会发生中性丢失 CO_2 和 H_2O ,产生碎片 m/z 245.0827 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 与 m/z 227.0736 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}]^-$,C 环可发生 RDA 裂解产生 m/z 137.03 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3]^-$,黄酮 C 环和 B 环间 C-C 键也可断裂,产生 m/z 179.04 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2]^-$,裂解途径如图 2b。根据以上裂解方式以及对照品比对,可确定该化学成分为儿茶素^[21]。

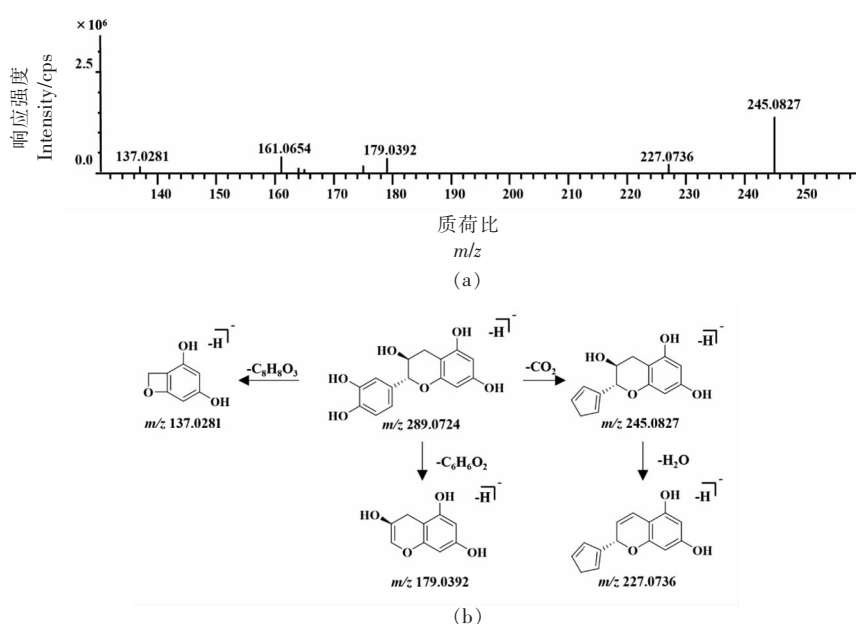


图 2 负离子模式下儿茶素的二级质谱图(a)及裂解途径(b)

Fig.2 MS² spectra (a) and proposed fragmentation pathways (b) of catechin in negative ion mode

2.2.2 鞣质类化学成分分析 从刺梨样品中共鉴定出 8 种鞣质成分。该类化合物质谱裂解途径与黄酮类似。以原花青素 B3(procyanidin B3,化合物 14)为例,阐述鞣质类裂解规律。该化合物保留时间为 14.39 min,准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为 m/z 577.1370 (3.12×10^{-6}),推测其分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ 。在二级质谱图中(图 3a),该化合物首先发生 RDA 裂解与 C-C 键断裂,产生碎片 m/z 451.10 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3]^-$, m/z 425.09 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3]^-$, m/z 289.07 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6]^-$,继续发生中性丢失与 C 环开裂,产生 m/z 407.08 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3-\text{H}_2\text{O}]^-$, m/z 245.05 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6-\text{CO}_2]^-$, m/z 203.07 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6-\text{CO}_2-\text{CH}_2\text{CO}]^-$ 特征碎片,裂解途径如图 3b。根据以上裂解方式并与对照品比对,可确定该化学成分为原花青素 B3^[22-23]。

2.2.3 萜类化学成分分析 本研究从刺梨样品中共鉴定出 5 种萜类化合物,具体包括单萜、倍半萜及三萜类成分,由于该类成分多含有羟基、羧基、酯键等官能团,在质谱中的碎裂规律以中性丢失为主。以蔷薇酸(euscaphic acid,化合物 50)为例,描述其裂解规律。该化合物保留时间为 46.01 min,准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为 m/z 487.3421 (-1.64×10^{-6}),推测其分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$ 。在负离子模式下,该化合物发生中性丢失,失去羟基、羰基与羧基等取代基,产生特征碎片 m/z 469.33 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$, m/z 441.34 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^-$, m/z 425.34 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$, m/z 407.33 $[\text{M}-\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$,二级质谱图及裂解途径如图 4 所示。根据文献数据且与对照品比对,该化学成分为蔷薇酸^[24-26]。

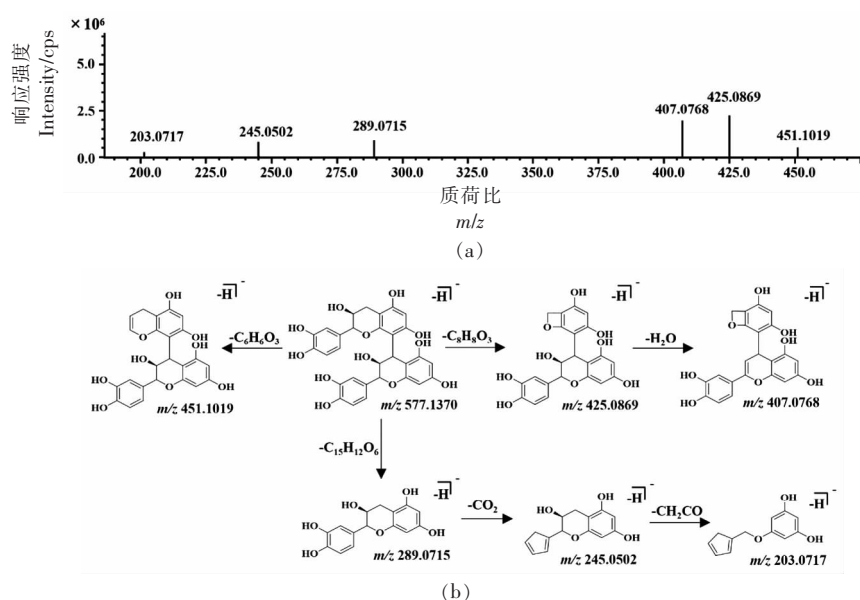


图 3 负离子模式下原花青素 B3 的二级质谱图(a)及裂解途径(b)

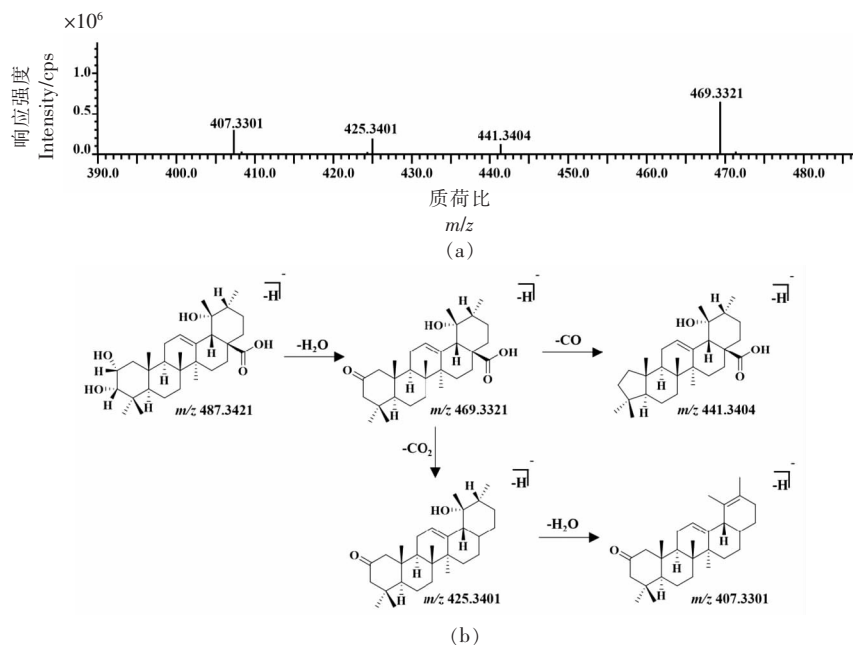
Fig.3 MS² spectra (a) and proposed fragmentation pathways (b) of procyanidin B3 in negative ion mode

图 4 负离子模式下蔷薇酸的二级质谱图(a)及裂解途径(b)

Fig.4 MS² spectra (a) and proposed fragmentation pathways (b) of euscaphic acid in negative ion mode

2.3 刺梨干斑的适用性验证

由于刺梨果渣成分较多,所以在相同的色谱和质谱条件下,对比了刺梨果渣干斑直接进样与传统自动进样器进样分析所得的化学成分表征结果。采用图 1 所示系统,当阀在 1→2 位时,通过自动进样器触发洗脱程序,分析获得刺梨果渣干斑直接进样图谱和数据;当阀在 1→6 位时,利用自

动进样器吸取 2 μ L 刺梨果渣溶液,按相同洗脱程序分析,得到传统自动进样器进样分析所得的刺梨果渣图谱和数据。相比于进样器吸取微量样品通过液相管线输送进色谱柱,干基质斑方法中引入了预柱放置滤纸,造成了流动相在输送过程中的扩散,导致色谱峰一定程度的展宽,但整体表征结果相似,并且通过串联高分辨质谱分析后,在

正、负离子模式下,两种方法所表征出的刺梨果渣化学成分相同。结果表明刺梨干斑能够加载液体样品的所有化学成分,通过色谱分离和质谱检测,能够实现刺梨化学成分解析。

2.4 刺梨汁干斑指纹图谱

2.4.1 方法学考察 由于刺梨鲜榨汁多为食品原料,本研究建立刺梨汁干斑的指纹图谱,实现对刺梨鲜榨汁的快速质量评价。在刺梨汁干斑的制备过程中,未经过提取、富集等复杂的前处理步骤,样品在滤纸上以固体形式存在,且可密封低温保存,此外样品也可以新鲜制备后快速分析,不易被氧化或降解^[27-29],因此本试验未对稳定性进行考察。

精密度:将刺梨汁干斑替换为空白滤纸,通过自动进样器吸取刺梨果实 (CL-01) 的鲜榨汁 2 μL,其余条件不变,按照 1.3.5 节中色谱条件分析,连续进样 6 次。将所得色谱数据用 AIA 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)软件,以色谱峰 10 为参照峰,计算各共有峰的

相对保留时间以及相对峰面积的相对标准偏差 (RSD),结果表明 RSD 均小于 4%,仪器精密度符合指纹图谱分析要求。

重复性:选择刺梨果实 (CL-01) 的鲜榨汁按 1.3.3 节中方法制备 6 个刺梨汁干斑,分别按照 1.3.5 节中色谱条件连续洗脱,并按照精密度试验的数据处理方法对结果进行分析,结果表明各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5%,重复性符合指纹图谱分析要求。

2.4.2 刺梨汁干斑指纹图谱及对照指纹图谱的生成 通过测定精密度和重复性,刺梨汁干斑指纹图谱符合指纹图谱建立的要求。按 1.3.5 节进行测定,并将 15 批图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)软件进行处理。以 CL-01 样品色谱图为参照图谱,经多点校正和色谱峰匹配后,用平均数法生成 15 批刺梨汁干斑指纹图谱和对照指纹图谱 (R),见图 5 与图 6,共标识出 10 个共有峰,其中通过对照品指认出 3 个共

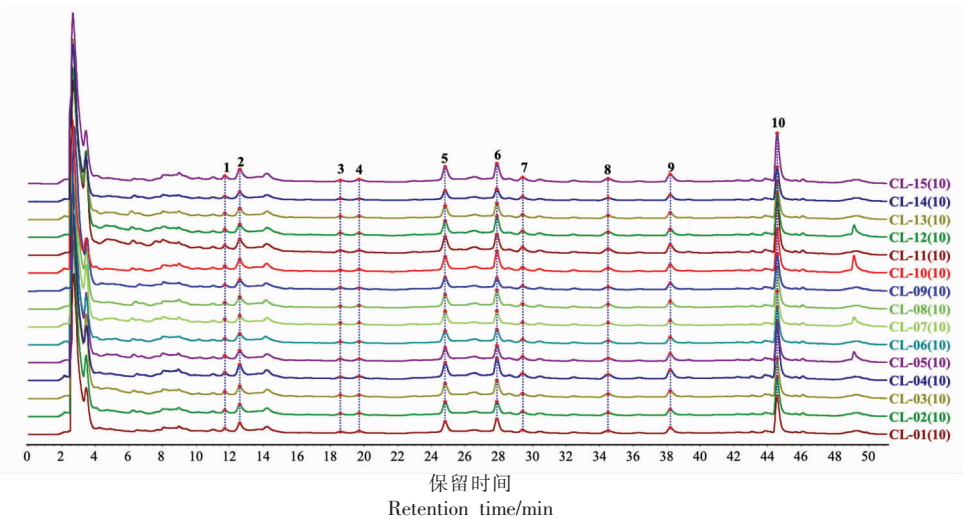
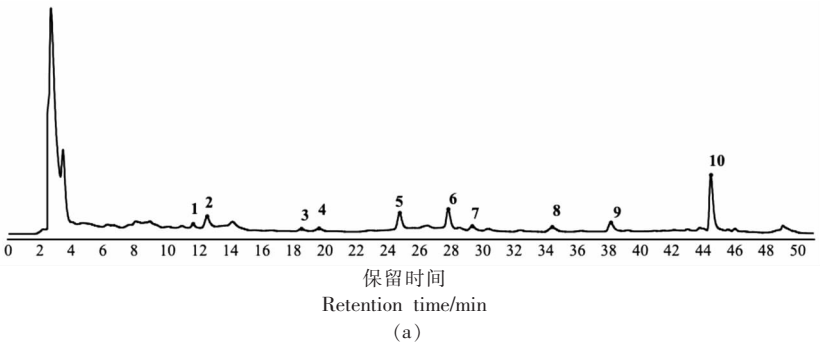
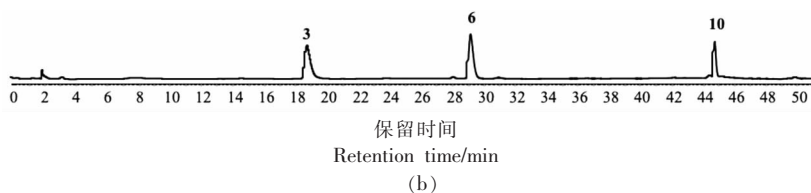


图 5 15 批刺梨汁干斑指纹图谱

Fig.5 HPLC fingerprints of 15 batches of *Rosa roxburghii* juice





注:3.儿茶素;6.表儿茶素;10.异槲皮苷。

图6 刺梨汁干斑对照指纹图谱(a)及混合对照品色谱图(b)

Fig.6 Reference HPLC fingerprint of *Rosa roxburghii* juice (a) and mixed reference chromatogram (b)

有峰,分别为儿茶素(3号峰)、表儿茶素(6号峰)、异槲皮苷(10号峰)。各批次样品指纹图谱和对照图谱的相似度结果分别为0.996,0.989,0.975,0.983,0.993,0.993,0.992,0.997,0.986,0.988,0.988,0.994,0.997,0.979,0.996。相似度结果均大于0.97,表明各批次间质量无明显差异,建立的指纹图谱具有代表性。

3 结论

本研究建立了刺梨干基质斑,并将干斑通过在线过滤器串联于液相系统中,建立刺梨干斑在线快速分析系统。与传统分析方法相比,刺梨干斑不仅制备简便、所需样品量小、便于运输和储存,还能保证样品的稳定性,通过连入液相系统实现样品化学成分的快速分析。采用IT-TOF-MS/MS对不同刺梨样品干斑分析,从刺梨鲜榨汁中鉴定出39个化合物,从刺梨果渣中鉴定出48个化合物,其中有11个化合物为刺梨果渣提取物特有,2个化合物仅存在于刺梨鲜榨汁中,为刺梨不同部位的开发利用提供了数据。利用刺梨干斑在线快速分析系统的分析,建立了刺梨汁干斑的指纹图谱,共标定了10个共有峰,15批刺梨汁样品相似度均大于0.97,为刺梨鲜榨汁的品质评价提供了方法。

参 考 文 献

[1] 徐德昌,胡婕伦,钟亚东,等.刺梨食用菌发酵液对免疫抑制小鼠免疫功能和抗氧化能力的影响[J].中国食品学报,2023,23(1):116-125.
XU D C, HU J L, ZHONG Y D, et al. Effects of *Rosa roxburghii* and edible fungi fermentation broth on immune function and antioxidation capacity of

immunosuppressed mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(1): 116-125.

[2] 罗桃,王玉奇,陈文本.黔南州刺梨产业链分析[J].中国林副特产,2020(5):106-107.

LUO T, WANG Y Q, CHEN W B. Analysis on the industrial chain of Qiannan prefecture *Rosa roxburghii*[J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2020(5): 106-107.

[3] 邝铭晴,李词周,张辉,等.原榨刺梨汁的成分分析及精制刺梨液解酒益肝功能探究[J].饮料工业,2023,26(2):8-14.

KUANG M Q, LI C Z, ZHANG H, et al. Components analysis of raw *Rosa roxburghii* Tratt fruit juice and hepatoprotective effect evaluation of refined *Rosa roxburghii* Tratt fruit juice[J]. Beverage Industry, 2023, 26(2): 8-14.

[4] HAN Y, LI X L, ZHANG M H, et al. Potential use of a dried saliva spot (DSS) in therapeutic drug monitoring and disease diagnosis[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, 12(6): 815-823.

[5] RYŠAVÁ L, DVORÁK M, KUBÁŇ P. Dried blood spot self-sampling with automated capillary electrophoresis processing for clinical analysis [J]. Angewandte Chemie -International Edition, 2021, 60(11): 6068-6075.

[6] MEIKOPOULOS T, BEGOU O, GIKI H, et al. Dried urine spot (DUS) applied for sampling prior to the accurate HILIC-MS/MS determination of 14 amino acids[J]. Talanta, 2023, 269: 125489.

[7] NUMAKO M, TAKAYAMA T, NOGE I, et al. Dried saliva spot (DSS) as a convenient and reliable sampling for bioanalysis: An application for the diagnosis of Diabetes Mellitus[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(1): 635-639.

[8] SONG Q Q, ZHOU Z Z, LI J, et al. Serial hy-

- phenation of dried spot, reversed phase liquid chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography, and tandem mass spectrometry towards direct chemical profiling of herbal medicine-derived liquid matrices, an application in *Cistanche sinensis* [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 174: 34–42.
- [9] MAZZARINO M, DI COSTANZO L, COMUNITÀ F, et al. UHPLC–HRMS method for the simultaneous screening of 235 drugs in capillary blood for doping control purpose: Comparative evaluation of volumetric and non–volumetric dried blood spotting devices[J]. ACS Omega, 2022, 7(36): 31845–31868.
- [10] D’ARIENZO C J, JI Q C, DISCENZA L, et al. DBS sampling can be used to stabilize prodrugs in drug discovery rodent studies without the addition of esterase inhibitors[J]. Bioanalysis, 2010, 2(8): 1415–1422.
- [11] SPOONER N, LAD R, BARFIELD M. Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: Considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(4): 1557–1563.
- [12] JING J, SHAN Y H, LIU Z, et al. Automated on-line dried blood spot sample preparation and detection of anabolic steroid esters for sports drug testing [J]. Drug Testing and Analysis, 2022, 14(6): 1040–1052.
- [13] TRETZEL L, THOMAS A, PIPER T, et al. Fully automated determination of nicotine and its major metabolites in whole blood by means of a DBS on-line–SPE LC–HR–MS/MS approach for sports drug testing[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 123: 132–140.
- [14] 蒋兰兰, 鲁敏, 安华明. 刺梨与无籽刺梨果实中药化学成分及抗氧化物质的比较分析[J]. 果树学报, 2023, 40(1): 111–125.
- JIANG L L, LU M, AN H M. Comparative analysis of chemical components of traditional Chinese medicine and antioxidants between *Rosa roxburghii* and *R. sterilis* fruits[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(1): 111–125.
- [15] 代甜甜, 杨小生. 刺梨化学成分及药理活性研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2015, 37(4): 93–97.
- DAI T T, YANG X S. Advances in the study of chemical components and pharmacological activities of *Rosa roxburghii*[J]. Journal of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 37(4): 93–97.
- [16] JIANG L L, LU M, RAO T Z, et al. Comparative analysis of fruit metabolome using widely targeted metabolomics reveals nutritional characteristics of different *Rosa roxburghii* genotypes[J]. Foods, 2022, 11(6): 850.
- [17] LIU M H, ZHANG Q, ZHANG Y H, et al. Chemical analysis of dietary constituents in *Rosa roxburghii* and *Rosa sterilis* Fruits [J]. Molecules, 2016, 21(9): 1204.
- [18] 徐浩然, 乔溪莹, 张童画, 等. 基于 UPLC–Q–Exactive–Orbitrap–MS 技术的苗族药刺梨叶化学成分分析[J]. 中国现代中药, 2022, 24(10): 1850–1860.
- XU H R, QIAO X Y, ZHANG T H, et al. Analysis of chemical components of Miao medicine *Rosae Roxburghii* Folium based on UPLC–Q–Exactive–Orbitrap–MS[J]. Modern Chinese Medicine, 2022, 24(10): 1850–1860.
- [19] WANG L Q, LI Y L, XIA R, et al. Component analysis and anti–pulmonary fibrosis effects of *Rosa sterilis* juice[J]. Food & Function, 2022, 13(24): 12915–12924.
- [20] 罗昱, 梁芳, 李小鑫, 等. 单宁酶对刺梨果汁单宁的脱除作用[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 41–44.
- LUO Y, LIANG F, LI X X, et al. Application of tannase for the removal of tannin from Roxburgh rose juice[J]. Food Science, 2013, 34(18): 41–44.
- [21] ZERBIB M, MAZAURIC J, MEUDEEC E, et al. New flavanol O–glycosides in grape and wine [J]. Food Chemistry, 2018, 266: 441–448.
- [22] XIAO Y, HU Z Z, YIN Z T, et al. Profiling and distribution of metabolites of procyanidin B2 in mice by UPLC–DAD–ESI–IT–TOF–MSⁿ technique [J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 231.
- [23] LIN L Z, SUN J, CHEN P, et al. UHPLC–PDA–ESI/HRMSⁿ profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(39): 9387–9400.
- [24] NICOLAUS C, SIEVERS–ENGLER A, MURILLO R, et al. Mastering analytical challenges for the characterization of pentacyclic triterpene mono– and diesters of *Calendula officinalis* flowers by non–

- aqueous C30 HPLC and hyphenation with APCI-QTOF-MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 118: 195-205.
- [25] ZHANG W D, JIANG H H, JIN M M, et al. UHPLC-Q-TOF-MS/MS based screening and identification of the metabolites *in vivo* after oral administration of betulin[J]. Fitoterapia, 2018, 127: 29-41.
- [26] JIN M M, ZHANG W D, JIANG H H, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS-guided dereplication of *Pulsatilla chinensis* to identify triterpenoid saponins[J]. Phytochemical Analysis, 2018, 29(5): 516-527.
- [27] 王怡君. 基于质谱的临床干血斑中化学毒物快速检测新方法研究[D]. 北京: 军事科学院, 2018: 5-6.
- WANG Y J. Development of novel rapid mass spectrometric detection methods on chemical toxicants in clinical dried blood spot samples [D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2018: 5-6.
- [28] CHEN S M, WAN Q Q, BADU-TAWIAH A K. Mass spectrometry for paper-based immunoassays: Toward on-demand diagnosis [J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(20): 6356-6359.
- [29] BOWEN C L, HEMBERGER M D, KEHLER J R, et al. Utility of dried blood spot sampling and storage for increased stability of photosensitive compounds[J]. Bioanalysis, 2010, 2(11): 1823-1828.

Chemical Analysis and Fingerprinting of *Rosa roxburghii* by Dried Matrix Spots

YANG Xiangfen, CHEN Zhaoxin, CAO Qian, WANG Zixin, LIN Yifan, SONG Qingqing*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract In order to develop a rapid method for the chemical analysis and quality evaluation of *R. roxburghii*, the dried matrix spot of *R. roxburghii* was prepared. The dried matrix spot of *R. roxburghii* were placed within an online filter, connected to high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for rapid analysis of chemical components, and the fingerprint profile was established. The results showed that 39 compounds were identified in *R. roxburghii* juice, and 48 compounds were identified in the pomace. The metabolic profiles of the juice and pomace showed high similarity. The HPLC fingerprint of *R. roxburghii* juice based on dried matrix spots showed 10 common peaks. The similarity between 15 batches of *R. roxburghii* juice was greater than 0.97. The use of dried matrix spots effectively addresses issues of sample instability during quality analysis, as well as challenges in transportation and storage, providing a reference for the rapid evaluation of *R. roxburghii* products.

Keywords dried matrix spots; *Rosa roxburghii*; chemical analysis; fingerprint