

基于标准提取物的欧洲越橘提取物质量控制方法及药效活性关联研究

李 镇^{1,2}, 李 俊², 安若凡², 孙 伟², 岳中宝³, 杨 维^{2*}, 贺瑞坤^{3*}

1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000

2. 中国中医科学院中药研究所 中药鉴定与安全性评估北京市重点实验室, 北京 100007

3. 汤臣倍健股份有限公司营养健康研究院, 广东 广州 510663

摘要: **目的** 建立对照品非依赖性的 20 种花青素类成分定量分析方法, 并利用该法对市售欧洲越橘 *Vaccinium myrtillus* 提取物进行质量控制, 同时筛选出代表性抗氧化活性成分。**方法** 以欧洲越橘标准对照提取物替代对照品, 采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (UPLC-QQQ-MS/MS) 联用技术, 建立一种针对 20 种花青素类成分的定量方法, 并利用该法对 10 批市售欧洲越橘提取物中的花青素类成分含量进行研究。采用 DPPH 自由基清除法和总抗氧化能力测试法评价不同欧洲越橘提取物的抗氧化能力。**结果** 方法学验证结果显示, 20 种花青素类成分线性良好, r 为 0.999 4~1.000 0, 精密性 RSD 为 0.05%~4.23%, 稳定性 RSD 为 0.29%~3.38%, 平均加样回收率为 98.1%~102.1%, RSD 为 0.50%~4.12%。样品分析结果显示, 不同样品中部分花青素类成分含量存在显著差异, 其中锦葵素变化最大, RSD 为 18.23%。欧洲越橘提取物具有较好的 DPPH 自由基清除能力和总抗氧化能力。其中矢车菊素与 DPPH 自由基率相关性为 0.94, 芍药素-3-*O*-半乳糖苷与总抗氧化活性相关性为 0.93。二者有望作为欧洲越橘提取物清除 DPPH 自由基活性和总抗氧化活性的潜在质控成分。**结论** 基于 UPLC-QQQ-MS/MS 所建立的对照品非依赖性的欧洲越橘提取物中 20 种花青素类成分定量分析方法, 灵敏度高, 准确性好, 方法简单, 适用于欧洲越橘提取物中 20 种花青素类成分的含量测定, 为中药对照提取物替代单体对照品在中药质量控制中的应用提供了数据支撑, 为中药材质量控制研究提供新的研究思路。

关键词: 欧洲越橘; 对照提取物; UPLC-QQQ-MS/MS; 抗氧化能力; 质量控制; 花青素; 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷; 芍药素-3-*O*-葡萄糖苷; 飞燕草素 3-*O*-半乳糖苷; 锦葵素; 矢车菊素; 芍药素-3-*O*-半乳糖苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)08-2561-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.007

Quality control method and pharmacological activity correlation study of *Vaccinium myrtillus* extract based on reference extract

LI Zhen^{1,2}, LI Jun², AN Ruofan², SUN Wei², YUE Zhongbao³, YANG Wei², HE Ruikun³

1. College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China

2. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100007, China

3. Institute of Nutrition & Health, BYHEALTH Co., Ltd., Guangzhou 510663, China

Abstract: Objective To establish a method for the quantitative analysis of 20 anthocyanin components based on the reference extract of Ouzhouyueju (*Vaccinium myrtillus*) and to utilize the method for the quality control of commercialized *V. myrtillus* macrocarpon extracts, and screen out a representative antioxidant active ingredient. **Methods** An ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-QQQ-MS/MS) method was developed for the quantification of 20 anthocyanin components using reference extract of *V. myrtillus* macrocarpon as the standard, and the method was utilized to investigate 10 batches of commercially available *V. myrtillus* macrocarpon extracts. The antioxidant capacity of different *V. myrtillus* extracts was evaluated

收稿日期: 2023-09-26

基金项目: 中央级公益性科研院所基本业务费专项资金资助 (ZZ13-YQ-45); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04902); 中央级公益性科研院所基本业务费专项资金资助 (ZXKT18015)

作者简介: 李 镇 (1996—), 男, 彝族, 硕士研究生, 从事药理学研究。E-mail: lizhen77649@126.com

*通信作者: 杨 维, 副研究员, 从事药理学研究。E-mail: wyang@icmm.ac.cn

贺瑞坤, 从事天然产物功效研究及保健食品开发。E-mail: herk@by-health.com

using the DPPH free radical scavenging method and the total antioxidant test. **Results** A UPLC-QQQ-MS/MS method was developed for the quantitative analysis of 20 anthocyanin compounds in the extract of *V. myrtillus* with reference extract. Methodological validation demonstrated good linearity (r : 0.999 4—1.000 0), precision RSD (0.05%—4.23%), stability (0.29%—3.38%), and average recovery rate (98.1%—102.1%) of the 20 anthocyanin components. The results of the sample analysis showed that there were significant differences in the content of some components in different samples, with the greatest variation being malvidin with an RSD of 18.23%. *V. myrtillus* extract has better DPPH radical scavenging and total antioxidant capacity. Cyanidin and peonidin-3-*O*-galactoside could be potential quality control components for assessing the DPPH radical scavenging and total antioxidant activity of *V. myrtillus* extracts, respectively. **Conclusion** A quantitative analysis method of 20 anthocyanin components in *V. myrtillus* extract was established in this study based on UPLC-QQQ-MS/MS. The method is sensitive, accurate, simple, and suitable for the determination of the content of 20 anthocyanin components in the *V. myrtillus* extract, which provides data support for the application of the reference extract of traditional Chinese medicine to replace the single standard in the quality control of traditional Chinese medicine. The method provides a new research idea for the quality control study of traditional Chinese medicine.

Key words: *Vaccinium myrtillus* L.; reference extract; UPLC-QQQ-MS/MS; antioxidant capacity; quality control; anthocyanins; cyanidin-3-*O*-glucoside; peonidin 3-*O*-glucoside; delphinidin-3-*O*-galactoside; malvidin; cyanidin; peonidin-3-*O*-galactoside

欧洲越橘 *Vaccinium myrtillus* L. 是杜鹃花科 (Ericaceae) 的一种落叶灌木, 原产于欧洲北部和中部的山区, 也广泛分布在意大利阿尔卑斯山和亚平宁山脉。越橘提取物含有丰富的花青素, 具有缓解眼疲劳, 保护肝脏、心脑血管, 抗癌等作用, 已被广泛应用于保健食品、药品等领域^[1-2]。

花青素是欧洲越橘提取物的主要活性成分, 其中常见的花青素类成分多达 20 种^[3]。花青素结构中含有多个酚羟基, 这一特点为其提供了强大的抗氧化活性基础。由于花青素性质不稳定, 且部分单体成分的提取分离难度大, 加之储存、运输条件高, 导致部分花青素对照品价格过高。越橘对照提取物是指经过特定工艺制备得到的含有多种主要成分或指标性成分的标准物质, 具有易制备、性质稳定、价格低廉等特点^[3]。同时欧洲药典 (EP 10.0) 中对越橘对照提取物的提取方法、性状、所含花青素种类、含量、干燥失重、总灰分等指标进行了严格控制。因此, 本研究拟以越橘对照提取物替代对照品, 对市售越橘提取物进行定量研究。

目前, 花青素类成分常用的检测方法有紫外分光光度法、薄层色谱法、高效液相-紫外分光光度法 (HPLC-UV) 等^[4-5]。相较于以上方法, 液质联用技术具有选择性强、灵敏度高、分离能力好等优点^[6-7]。因此, 本研究拟以欧洲越橘标准对照提取物代替对照品, 采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (UPLC-QQQ-MS/MS) 联用技术, 建立一种针对 20 种花青素类成分的定量方法, 并利用该法对 10 批市售欧洲越橘提取物中的花青素类成分含量进行研究。对不同欧洲越橘提取物的抗氧化能力进行评价, 并筛选欧洲越橘提取物清除 DPPH 自由基活性和总

抗氧化活性的潜在质控成分。本研究有望为欧洲越橘花青素类成分的质量控制提供新方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Spectra Max I3X 型多功能酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司; Agilent G6470 型三重四极杆质谱仪、Agilent 1290 型超高效液相色谱仪, 美国安捷伦有限公司; 台式 DK-3450 Mini 型高速离心机, 丹麦 Labogene 公司; Mettler Toledo ME155DU 型十万分之一级电子分析天平, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; 移液器, 大龙兴创实验仪器 (北京) 股份有限公司; 舒美 KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Blue Pard 型恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 材料

10 批市售欧洲越橘提取物分别购自汤臣倍健股份有限公司 (批号 20S0303003, 编号 S1)、宁波绿之健药业有限公司 (批号 20221202/10962、20230102/10962、20230202/10962, 编号 S2~S4)、杨凌萃健生物工程技术有限公司 (批号 20221203、20230402、20230701, 编号 S5~S7)、桂林莱茵生物科技股份有限公司 (批号 23021302, 编号 S8) 和诺黛然股份有限公司 (批号 118190120、118181018, 编号 S9、S10)。标准越橘对照提取物, 批号 ZEP-Y0001788-C1A, 购自上海甄准生物科技有限公司。

对照品矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (C11, 批号 CFN92046)、芍药素-3-*O*-葡萄糖苷 (C14, 批号 CFN92046) 和飞燕草素 3-*O*-半乳糖苷 (C15, 批号 CFN92037), Chem Faces[®], 质量分数 $\geq 98\%$, 均购于武汉天植生物技术有限公司。

1,1-二苯基-2-苦苯肼 (DPPH), 批号 300267, 购自 Sigma 公司; 水溶性维生素 E (Trolox), 批号 C14735198, 质量分数 ≥99%, 购自上海麦克林生化科技有限公司; 总抗氧化能力检测试剂盒 (T-AOC), 批号 BC1315, 购自北京索莱宝科技有限公司; 甲醇、甲酸, 质谱级, 均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 屈臣氏蒸馏水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司。

2 方法与结果

2.1 液质联用条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温 35 °C; 流动

相为 0.5% 甲酸水溶液 (A) 和含 0.5% 甲酸的 98% 乙腈水溶液 (B); 洗脱梯度为 0~10 min, 5%~10% B; 10~25 min, 10%~25% B; 25~30 min, 25%~95% B; 30~33 min, 95%~5% B; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 3 μL。

2.1.2 质谱条件 使用电喷雾离子源 (ESI 源), 正离子模式, 鞘气温度 250 °C。鞘气体积流量 11 L/min, 喷嘴电压 500 V, 雾化器压力 310.28 kPa。毛细管电压: 正电压 4 000 V; 干燥气温度 300 °C; 干燥气体积流量 5 L/min; 各路气体均为氮气。数据采集模式为多反应监测模式。各定量成分的质谱参数见表 1。

表 1 20 种花青素类成分的质谱信息

Table 1 Mass spectrometry information of 20 kinds of anthocyanin components

编号	化合物	Q1/Q3 (m/z)	碎裂电压/V	碰撞能量/V	编号	化合物	Q1/Q3 (m/z)	碎裂电压/V	碰撞能量/V
C1	矢车菊素	287.1/137.0	120	30	C11	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	449.1/287.1	100	30
C2	芍药素	301.1/286.1	105	20	C12	锦葵素-3-O-阿拉伯糖苷	463.1/331.1	115	25
C3	飞燕草素	303.1/286.2	120	20	C13	芍药素-3-O-半乳糖苷	463.1/301.1	100	20
C4	矮牵牛素	317.1/302.0	115	20	C14	芍药素-3-O-葡萄糖苷	463.1/301.1	100	20
C5	锦葵素	331.1/314.3	120	40	C15	飞燕草素-3-O-半乳糖苷	465.1/303.1	100	20
C6	矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷	419.1/287.1	110	30	C16	飞燕草素-3-O-葡萄糖苷	465.1/303.1	100	20
C7	芍药素-3-O-阿拉伯糖苷	433.1/301.1	120	20	C17	矮牵牛素-3-O-半乳糖苷	479.1/317.1	135	25
C8	飞燕草素-3-O-阿拉伯糖苷	435.1/303.1	100	20	C18	矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷	479.1/317.1	135	25
C9	矮牵牛素-3-O-阿拉伯糖苷	449.1/317.1	100	30	C19	锦葵素-3-O-半乳糖苷	493.1/331.1	125	25
C10	矢车菊素-3-O-半乳糖苷	449.1/287.1	100	30	C20	锦葵素-3-O-葡萄糖苷	493.1/331.1	125	25

2.2 样品制备

2.2.1 越橘提取物制备 精确称取越橘提取物 1 mg (精确至 0.01 mg), 加入 1 mL 40% 甲醇水溶液, 超声提取 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 40% 甲醇水稀释 10 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 制成 100 μg/mL 的供试品溶液。

2.2.2 标准越橘对照提取物制备 精确称取越橘提取物 1 mg (精确至 0.01 mg), 加入 1 mL 40% 甲醇水溶液 (料液比 1:1), 超声提取 5 min, 12 000 r/min 离心 (离心半径 5 cm) 5 min, 取上清, 制备成 1 mg/mL 的储备液。用 40% 甲醇水稀释将储备溶液依次稀释成 500.0、250.0、125.0、62.5、31.3、15.6 μg/mL 的对照提取物溶液。

2.2.3 混合越橘提取物制备 取 6 种不同来源的越橘提取物, 制成混合越橘提取物, 按照“2.2.1”项下的方法制备混合越橘提取物溶液。

2.2.4 对照品溶液制备 精确称取 C11、C14 和 C15

各 1 mg, 加入 40% 甲醇水溶液, 制备成 1 mg/mL 的对照品储备液。精密吸取 3 种对照品溶液, 混合, 用 40% 甲醇水稀释将储备溶液依次稀释成含 C11 (8 μg/mL)、C14 (8 μg/mL) 和 C15 (8 μg/mL) 的混合对照品溶液, 依次稀释得一系列混合对照品溶液, 分别为 4、2、1、0.5 μg/mL。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”和“2.2.4”项下不同质量浓度的标准越橘对照提取物溶液和对照品溶液, 按“2.1.1”和“2.1.2”项下的方法进行分析, 记录花青素的峰面积响应值。以溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积响应值为纵坐标 (Y), 用最小二乘法进行线性回归, 得回归方程。

基于标准越橘对照提取物的回归方程分别为 C1 $Y=5.8401X-2.569$, $r=0.9999$; C2 $Y=4.9746X+49.224$, $r=0.9998$; C3 $Y=1.873X+5.454$, $r=1.0000$; C4 $Y=3.429X-8.500$, $r=0.9997$; C5 $Y=$

1.063 5 X+0.528 7, $r=0.999 7$; C6 $Y=9 303.8 X+166 970.0$, $r=0.999 6$; C7 $Y=1 912.0 X+23 430.0$, $r=0.999 6$; C8 $Y=7 578.2 X+125 615.0$, $r=0.999 6$; C9 $Y=3 759.6 X+64 990.0$, $r=0.999 7$; C10 $Y=11 182.0 X+44 570.0$, $r=0.999 9$; C11 $Y=11 511.0 X+121 451.0$, $r=0.999 7$; C12 $Y=4 490.3 X-5 913.0$, $r=0.999 7$; C13 $Y=2 691.1 X+26 678.0$, $r=0.999 6$; C14 $Y=7 535.9 X+266 948.0$, $r=0.999 5$; C15 $Y=9 450.3 X+55 708.0$, $r=0.999 6$; C16 $Y=9 618.7 X+49 714.0$, $r=0.999 6$; C17 $Y=5 108.5 X+44 329.0$, $r=0.999 6$; C18 $Y=9 399.1 X+103 213.0$, $r=0.999 5$; C19 $Y=3 767.7 X+47 512.0$, $r=0.999 7$; C20 $Y=12 926.0 X+76 915.0$, $r=0.999 7$; C1~C20的线性范围均为 15.6~500.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

基于对照品溶液的回归方程分别为 C11 $Y=2 280 466.4 X+82 554.0$, $r=0.999 8$; C14 $Y=1 374 443.9 X+74 505.0$, $r=0.999 5$; C15 $Y=1 404 172.2 X+52 319.0$, $r=0.999 5$; C11、C14、

C15的线性范围均为 0.5~8.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 精密度考察 按“2.2.1”项下方法制备标准越橘对照提取物溶液,按照“2.1.1”和“2.1.2”项的色谱条件和质谱条件连续进样6次,详细记录20种花青素的峰面积响应值,并计算各成分峰面积的RSD值。结果(表2)显示20种花青素峰面积的RSD值在0.05%~4.23%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 按“2.2.3”项下的方法制备混合越橘提取物溶液,并将其放置在4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。分别于0、2、4、6、8、12、24h,按“2.1.1”和“2.1.2”项下的方法对20种成分进行测定,详细记录各成分峰面积响应值,计算RSD值,结果(表2)显示RSD值为0.29%~3.38%,表明供试品溶液在24h内稳定。

2.3.4 重复性试验 按“2.2.3”项下的方法平行制备6份混合越橘提取物溶液,按照“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件和质谱条件对6份提取物溶液进行检测,获取20种花青素的峰面积响应值,并计算各成

表2 20种花青素类成分的精密度、稳定性、重复性和加样回收率试验结果(对照提取物法)

Table 2 Results of precision, stability, repeatability, and recovery experiments on 20 anthocyanin components (control extract method)

化合物	RSD/%			平均加样回收率/%			回收率 RSD/%		
	精密度	稳定性	重复性	低质量浓度	中质量浓度	高质量浓度	低质量浓度	中质量浓度	高质量浓度
C1	1.94	1.69	2.74	101.3	99.2	103.6	2.56	3.01	1.79
C2	1.38	1.35	4.03	100.5	100.3	102.4	3.38	3.48	1.08
C3	4.23	2.63	3.61	100.1	101.7	99.3	4.12	3.13	2.77
C4	1.60	1.73	3.89	99.5	100.7	101.5	3.70	3.15	2.10
C5	3.41	3.38	3.61	99.3	99.9	101.6	1.92	3.53	2.65
C6	1.54	0.38	1.42	101.6	103.0	102.0	2.77	1.52	1.15
C7	2.39	3.16	1.34	100.4	99.1	96.3	1.74	3.36	0.50
C8	2.65	1.12	1.02	99.5	101.1	102.1	3.57	3.27	1.06
C9	1.53	1.77	1.24	101.0	98.7	99.6	2.41	3.40	1.70
C10	2.46	0.55	2.51	100.2	100.1	103.1	3.27	2.92	1.52
C11	2.32	0.42	1.39	99.9	102.0	103.3	1.87	1.53	0.99
C12	1.79	2.09	1.20	99.8	99.7	100.0	3.02	1.33	0.83
C13	0.05	2.04	3.86	99.9	102.5	103.4	2.92	2.39	0.85
C14	0.96	0.70	2.40	101.7	101.3	103.0	3.67	3.74	1.16
C15	1.01	0.29	1.34	101.0	102.5	103.3	1.64	2.16	0.65
C16	1.33	0.34	1.71	98.1	102.1	104.7	3.13	2.33	0.56
C17	1.03	0.64	2.99	102.1	101.2	101.6	2.79	2.29	2.88
C18	2.05	0.56	1.13	100.7	100.3	99.8	3.96	2.61	3.85
C19	2.99	1.09	2.58	99.5	99.6	96.2	2.14	2.94	0.73
C20	2.79	0.90	2.37	98.3	99.1	100.7	2.71	3.70	2.94

分质量分数的 RSD 值。结果 (表 2) 显示 RSD 值在 1.02%~4.03%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精确称取“2.2.3”项下越橘提取物 0.5 mg, 分别加入越橘对照提取物约 1.250、0.500、0.156 mg, 加入 1 mL 40% 甲醇水溶液, 超声提取 5 min, 12 000 r/min 离心 (离心半径 5 cm) 5 min, 取上清, 用 40% 甲醇水稀释 10 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜。按照“2.1.1”和“2.1.2”项下的方法测定, 记录花青素峰面积, 计算平均加样回收率和 RSD。结果 (表 2) 显示 RSD 均小于 5.00%, 表明该方法加样回收率良好。

精密吸取 3 种对照品储备液适量, 混合, 用 40% 甲醇水稀释, 配制含 C11 (40 μg/mL)、C14 (40 μg/mL) 和 C15 (40 μg/mL) 的混合对照品溶液 (QC-高), 用甲醇依次稀释, 制备成含 C11 (20 μg/mL)、C14 (20 μg/mL) 和 C15 (20 μg/mL) 的中质量浓度质控溶液 (QC-中), 以及含 C11 (10 μg/mL)、C14 (10 μg/mL) 和 C15 (10 μg/mL) 的低质量浓度质控溶液 (QC-低)。先测定混合越橘提取物中 C11、C14、C15 含量后, 精确称混合越橘提取物 0.5 mg, 分别加入 1 mL QC-高、QC-中和 QC-低 (每组平行 6 份), 超声提取 5 min, 12 000 r/min 离心 (离心半径 5 cm) 5 min, 取上清, 用 40% 甲醇水稀释 10 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜。按照“2.1.1”和“2.1.2”项下的方法测定, 记录花青素峰面积, 计算平均加样回收率和 RSD。结果 (表 3) 显示 RSD 均小于 5.00%, 表明该方法加样回收率良好。

2.4 花青素类成分含量测定

2.4.1 样品中 20 种花青素类成分的含量测定 取待测样品, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”和“2.1.2”项下方法测定。进行 3 次平行实验, 记录峰面积根据随行标准曲线计算供试品溶液中各成分质量浓度, 按照下式计算样品中各成分含量。

表 3 3 种花青素类成分的加样回收率结果 (对照品法)

Table 3 Spiked recoveries results of three kinds of anthocyanin components (reference substance method)

化合物	平均加样回收率/%			RSD/%		
	低质量浓度	中质量浓度	高质量浓度	低质量浓度	中质量浓度	高质量浓度
C11	101.4	98.5	99.6	1.85	1.70	1.86
C14	99.5	96.0	100.3	3.78	3.31	1.62
C15	100.5	98.0	98.6	3.05	3.08	1.87

被测成分相对于对照越橘提取物中该成分的量=(标准曲线上计算出的各化合物浓度×所用提取溶剂体积×稀释倍数)/所取样品质量

采用建立的对照品非依赖性花青素类 UPLC-QQQ-MS/MS 定量方法, 对 10 批市售欧洲越橘提取物中的花青素类成分含量进行研究。正离子模式下的提取离子流色谱图见图 1。按照“2.4”项下公式计算被测成分相对于对照越橘提取物中该成分的量, 结果表明不同产家中化合物 C1、C4、C6、C10、C13、C14、C16~C18 和 C20 含量差异相对较小 (RSD<5.00%), 而其余化合物含量波动较大, 其中化合物 C5 的含量差异最为明显 (RSD 为 18.23%)。结果详见表 4。

2.4.2 20 种花青素类成分的相关性分析 相关性分析是指对 2 个或多个具备相关性的变量元素进行分析, 从而衡量 2 个变量因素的相关性密切程度 (0<|r|≤0.3 为微弱相关, 0.3<|r|≤0.5 为低度相关, 0.5<|r|≤0.8 为显著相关, 0.8<|r|≤1.0 为极显著相关)。为了解花青素之间的相关性密切程度, 用 SPSS 22.0 软件对 20 种花青素类成分含量进行相关性分析, 应用 Graphpad Prism 软件对数据进行绘图展示。结果如图 2 所示。结果表明, 矢车菊素与 C6

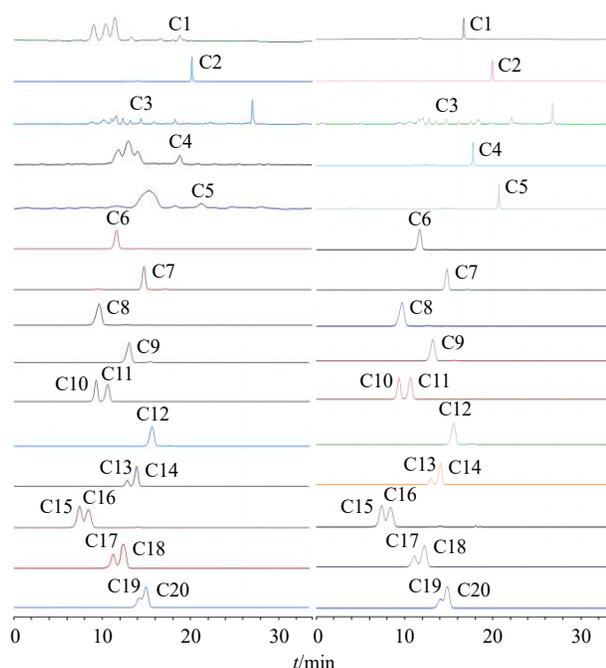


图 1 越橘标准提取物 (A) 和越橘提取物 (S1, B) 中 20 种花青素类成分 (C1~C20) 的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of 20 kinds of anthocyanin components (C1—C20) in *V. myrtillus* reference extract (A) and *V. myrtillus* extract (sample S1, B)

表 4 10 批越橘提取物样品中 20 种花青素类成分相对于对照越橘提取物中该成分的量

Table 4 Relative amount of 20 anthocyanin components in 10 batches of *V. myrtillus* extract samples compared to *V. myrtillus* reference extract

样品	质量分数/%						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
S1	103.40±0.17	119.10±0.42	96.90±0.92	104.10±0.17	110.50±2.49	106.90±0.89	107.50±0.45
S2	99.40±0.68	100.60±1.11	94.60±1.88	100.10±0.45	95.40±1.63	101.70±0.20	96.00±1.37
S3	98.30±0.55	98.70±1.01	85.50±2.63	101.70±1.61	97.90±0.54	103.10±2.14	96.20±1.31
S4	98.80±0.60	97.40±0.42	80.00±2.47	102.30±1.35	48.40±2.49	98.10±0.41	94.20±1.71
S5	100.70±0.60	99.50±0.31	90.20±1.54	100.90±1.02	103.20±1.09	103.30±4.22	97.30±4.00
S6	102.90±0.10	101.80±0.99	96.40±1.41	103.60±1.44	106.70±0.94	106.30±4.13	98.90±1.13
S7	99.50±2.04	99.90±0.42	96.20±1.54	102.40±0.73	101.70±0.54	101.80±0.66	96.80±0.49
S8	100.40±3.56	101.80±0.84	88.90±0.53	103.00±0.34	101.70±1.44	104.00±1.02	98.60±0.63
S9	95.10±4.70	98.30±0.12	77.00±0.62	99.90±0.77	95.10±1.44	98.30±0.88	91.00±0.47
S10	94.30±0.49	96.90±0.20	73.30±0.82	95.60±0.61	92.60±0.94	94.70±3.00	85.90±0.60
样品	质量分数/%						
	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
S1	113.00±8.24	116.30±0.54	105.70±2.19	110.30±0.33	106.50±0.73	107.20±1.28	108.50±1.35
S2	110.20±6.25	114.30±0.25	99.10±0.52	98.00±5.44	102.10±0.41	103.00±0.37	100.50±1.05
S3	100.10±0.60	114.00±0.56	102.10±0.69	94.20±3.48	103.60±1.14	104.40±1.66	97.10±0.27
S4	105.10±0.48	111.30±0.55	97.50±4.66	109.00±1.42	99.10±0.56	107.20±0.96	105.90±0.53
S5	102.50±0.07	110.90±0.41	99.00±4.37	98.20±0.34	100.40±0.72	104.90±2.24	98.50±0.71
S6	105.70±0.19	107.90±1.54	97.10±0.22	95.50±0.16	89.70±0.18	104.10±2.68	104.60±0.81
S7	126.50±1.03	99.90±2.75	102.60±0.99	91.10±0.81	103.70±0.43	102.60±0.74	104.40±1.42
S8	105.80±0.74	111.10±2.06	103.80±0.27	108.30±0.81	93.50±0.78	99.40±1.32	100.00±4.98
S9	98.90±0.85	97.70±1.36	103.50±0.17	108.80±0.83	84.20±1.04	95.40±1.15	96.70±0.28
S10	90.10±0.44	94.10±3.22	96.10±1.99	93.70±0.44	82.80±0.62	94.50±1.69	95.60±0.24
样品	质量分数/%						
	C15	C16	C17	C18	C19	C20	
S1	109.60±0.70	109.60±1.13	105.10±1.55	106.70±5.01	121.30±0.70	108.00±2.86	
S2	109.60±0.79	102.40±0.21	97.70±0.18	103.10±0.68	113.50±2.92	102.90±0.21	
S3	98.10±0.07	100.70±0.32	99.20±1.20	100.70±0.60	100.10±1.90	102.70±0.24	
S4	101.70±0.99	100.40±0.34	101.40±0.89	105.50±5.68	106.30±0.75	103.50±0.12	
S5	106.30±0.87	106.80±0.27	99.70±0.61	102.40±0.50	104.50±0.26	106.00±0.12	
S6	107.50±0.42	107.50±0.33	102.40±0.64	101.10±6.57	98.30±0.45	103.00±0.54	
S7	107.20±0.59	106.30±1.85	102.90±0.38	105.60±0.17	102.30±2.16	107.50±1.09	
S8	106.70±1.04	101.70±1.05	103.40±0.97	102.10±0.26	113.60±0.54	103.70±0.24	
S9	93.90±0.89	96.20±0.87	95.90±0.74	99.90±0.83	96.60±0.70	102.50±0.48	
S10	92.30±1.39	95.10±0.96	95.50±0.80	94.80±0.56	93.10±0.47	101.80±0.86	

($r=0.87, P<0.01$)、芍药素与 C7 ($r=0.86, P<0.01$)、飞燕草素与 C16 ($r=0.95, P<0.01$)、飞燕草素与 C15 ($r=0.91, P<0.01$)、矮牵牛素与 C17 ($r=0.90, P<0.01$) 呈极显著相关。此外, C11 与飞

燕草素 ($r=-0.67, P<0.05$)、C16 ($r=-0.55, P<0.05$)、C8 ($r=-0.68, P<0.05$) 呈显著负相关。此外, C10 与 C13 ($r=-0.62, P<0.05$)、锦葵素与 C18 ($r=-0.60, P<0.05$) 也呈显著负相关。

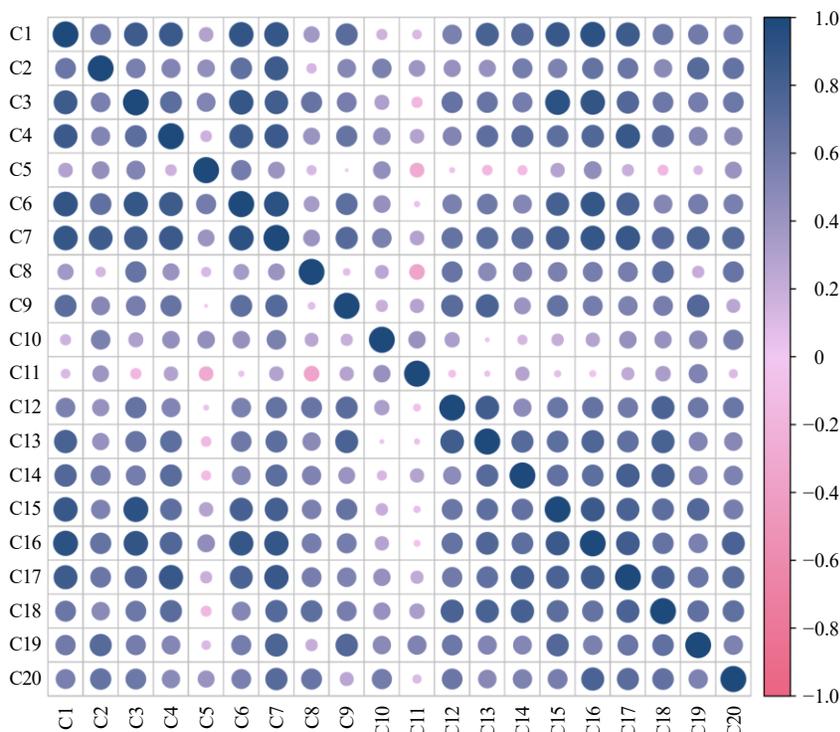


图 2 20 种花青素类成分的相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of 20 kinds of anthocyanin components

2.5 体外抗氧化活性检测

2.5.1 DPPH 自由基清除活性的测定 DPPH 自由基清除能力测定参考文献方法^[8]。

(1) 标准曲线绘制: 精确称取 10.012 mg 的水溶性维生素 E (Trolox) 对照品粉末, 加入无水乙醇溶解 200 mL, 配制成 200 μmol/L 的 Trolox 母液。随后将母液稀释为 20、40、60、100、140、160、180 μmol/L 的 Trolox 标准梯度液。准确吸取 0.9 mL 不同浓度的 Trolox 对照品溶液于不同离心管中, 随后加入 0.9 mL 100 μmol/L 的 DPPH 乙醇溶液, 混匀后在室温下黑暗静置 30 min。在 517 nm 波长下测定吸光度值 (A_1), 同样的方法检测 Trolox 对照品与 25% 甲醇溶剂的吸光度值 (A_2), 以及 25% 甲醇溶剂与 100 μmol/L DPPH 溶液混合后的吸光度值 (A_3), 利用以下公式计算 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_3$$

根据 Trolox 浓度 (X) 和 DPPH 自由基清除率 (Y) 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 0.0056X - 0.0311$, $r = 0.9990$, 线性范围为 20~180 μmol/L。依据上述标准曲线, 得到样品的 DPPH 清除能力, 单位为每克样品干质量的 μmol Trolox 当量 (Trolox μmol/g DW)。

(2) 样品的 DPPH 自由基清除率: 分别取“2.2.1”

项下制备的越橘提取物溶液和 100 μmol/L DPPH 溶液各 0.9 mL, 充分混合, 室温避光静置 30 min 后, 于 517 nm 处测定其吸光度 (A) 值, 每个样品重复 3 次。DPPH 自由基清除率公式同上。

对 10 批越橘提取物清除 DPPH 自由基活性研究, 结果如表 5 所示, 在质量浓度为 0.1 mg/mL 下,

表 5 不同批次越橘提取物的 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 DPPH free radical scavenging rate and total antioxidant capacity test results of different batches of *V. myrtillus* extract ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	DPPH 自由基清除率/%	DPPH 清除能力/ (Trolox μmol·g ⁻¹ DW)	总抗氧化能力/(μmol·g ⁻¹)
S1	96.70±0.27	178.26±1.44	4.92±0.07
S2	96.00±0.88	176.95±4.70	4.83±0.08
S3	93.90±0.75	173.22±1.92	4.80±0.10
S4	95.00±1.85	175.21±3.34	4.76±0.14
S5	96.00±1.91	176.93±4.36	4.65±0.13
S6	96.30±0.06	177.56±0.24	4.85±0.14
S7	94.20±1.00	173.79±3.31	4.34±0.08
S8	95.90±1.29	176.79±3.44	4.36±0.10
S9	92.67±1.16	171.01±2.11	3.81±0.14
S10	91.40±0.15	168.80±0.57	3.65±0.63

所有越橘提取物的 DPPH 自由基清除率均高于 90%。样品 S1 的 DPPH 自由基清除率最高, 为 96.7%, 该样品在质量浓度 0.1 mg/mL 时与 178.26 Trolox $\mu\text{mol/g DW}$ 的清除率相当; 样品 S10 的清除率最低, 为 91.4%, 该样品在质量浓度 0.1 mg/mL 时与 168.80 Trolox $\mu\text{mol/g DW}$ 的清除率相当。

2.5.2 总抗氧化活性测定

(1) 标准曲线绘制: 精确称取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg。加入 0.9 mL 蒸馏水, 20 μL 浓硫酸, 配制成 40 $\mu\text{mol/mL}$ FeSO_4 标准溶液母液。将母液用蒸馏水稀释为 100.0、50.0、25.0、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{mol/L}$ 的标准梯度液。根据总抗氧化能力试剂盒说明书, 分别取 500 μL 标准溶液 (蒸馏水作空白) 加入 500 μL 工作液, 充分混匀, 反应 10 min, 测定 593 nm 下的 A , 计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$, 此时 Fe^{2+} 终浓度为 50.0、25.0、12.5、6.25、3.125、1.562 5 $\mu\text{mol/L}$ 。根据 Fe^{2+} 终浓度 (X , $\mu\text{mol/L}$) 和 $\Delta A_{\text{标准}}$ (Y), 建立标准曲线, 得回归方程为 $Y = 5.118 6 X - 0.000 7$, $r = 0.999 8$, 线性范围为 1.562 5~50.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

(2) 样品总抗氧化活性测定: 根据总抗氧化能力试剂盒说明书, 分别取“2.2.1”项下制备的越橘提取物溶液 30 μL , 蒸馏水 90 μL 及混合工作液 900 μL 充分混匀, 室温准确反应 10 min, 随后于 593 nm 波长处测定 A 值。将 A 值代入标准曲线, 得到达到同样吸光度变化值 (ΔA) 所需的标准液离子浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)。根据以下公式计算样品总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/g}$)。

$$\text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol/g}) = X \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 34 \times X \div W$$

$V_{\text{样总}}$ 为加入提取液体积, 1 mL; $V_{\text{反应}}$ 为反应总体积, 1.02 mL; $V_{\text{样}}$ 为反应中样品体积, 0.03 mL; X 为标准液离子浓度; W 为样品质量

越橘提取物总抗氧化能力的结果如表 5 所示, 其中, 样品 S1 的总抗氧化能力最高, 为 4.92 $\mu\text{mol/g}$, 样品 S10 的总抗氧化能力最低, 为 3.65 $\mu\text{mol/g}$ 。与 DPPH 自由基清除率实验结果一致。

2.5.3 20 种花青素类成分抗氧化活性的相关性分析 20 个花青素类成分与抗氧化活性的相关性见表 6。矢车菊素、C15 与 DPPH 自由基清除率相关性均大于 0.90, 其中矢车菊素最高, 为 0.94。锦葵素、C10 及 C11 相关性 ≤ 0.30 。C9、C13 与总抗氧化能力相关性均大于 0.90, 其中 C13 最高, 为 0.93。锦葵素和 C10 相关性 ≤ 0.30 。

表 6 20 种花青素类成分与 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力的相关性

Table 6 Correlation between 20 anthocyanin components and DPPH free radical scavenging rate and total antioxidant capacity

化合物	相关性		化合物	相关性	
	DPPH 自由基清除率	总抗氧化能力		DPPH 自由基清除率	总抗氧化能力
C1	0.941	0.828	C11	0.253	0.036
C2	0.572	0.446	C12	0.580	0.767
C3	0.817	0.722	C13	0.760	0.929
C4	0.785	0.734	C14	0.653	0.609
C5	0.198	0.000	C15	0.928	0.750
C6	0.841	0.741	C16	0.827	0.729
C7	0.847	0.739	C17	0.761	0.627
C8	0.295	0.333	C18	0.662	0.664
C9	0.821	0.906	C19	0.753	0.581
C10	0.174	0.030	C20	0.473	0.320

3 讨论

3.1 标准对照提取物在含量测定中的优势

对照品在被测物质含量测定过程中能够起到至关重要的作用。但是, 实际操作中常常面临的问题是对照品价格较高或者较难获得, 这些因素无形中增加了科研的难度和阻力^[9]。而利用标准对照提取物进行含量测定, 相较于单体化合物最大的优势在于其能够同时对多个化合物进行含量测定, 且标准对照提取物更稳定、易获取, 价格便宜, 能够解决部分单体化合物稳定性差、制备要求严苛、制备成本高、运输保存难等问题^[10-13]。欧洲越橘的标准对照提取物在《欧洲药典》10.0 中有记载, 从定义、含量、生产过程、特征及鉴别 5 个方面对其进行了限制, 质量可控。目前, 《中国药典》2020 年版收载的对照提取物有 23 种, 集中在挥发油、脂肪酸、皂苷类成分^[14], 且这些对照提取物主要被用于定性鉴别, 而在含量测定项目中应用较少。

3.2 检测方法的选择

目前, 常见的花青素类成分含量测定方法有分光光度法、高效液相色谱紫外分光光度法及薄层色谱法等^[15-16]。分光光度法虽然简单常用, 但不具备分离能力, 不能同时对多个成分进行定量, 且结果受到溶剂选择、样品颜色和杂质的影响, 容易引入误差; 薄层色谱法快速, 较多用于定性研究, 具有分离能力, 但分离能力不佳。综合考虑本研究采用

同时兼具液相色谱的高分离能力和质谱的高灵敏度等优点的 LC-MS 联用法^[6,17]。三重四极杆质谱 (QQQ) 的多反应监测模式 (MRM) 具有极高的灵敏度, 可对样品中的微量成分精确定量, 结果准确可靠, 是中药定量分析中的有效手段^[18-19], 因此, 本实验利用 UPLC-QQQ-MS/MS 建立越橘中 20 种花青素类成分的定量分析方法。

3.3 不同批次越橘提取物中花青素含量测定

通过对 10 批市售提取物含量测定结果可以看出, 化合物 C2、C3、C5、C7~C9、C11、C12、C15 和 C19 在各样品中含量波动较大 (RSD>5.00%), 其中以 C5 差异最为显著, RSD 值为 18.23%, 而 C1、C4、C6、C10、C13、C14、C16~C18 和 C20 的含量波动相对较小 (RSD<5.00%)。此外, 除 S9 和 S10 2 批样品以外, 其余 8 批样品中化合物 C4、C8、C16 和 C18 的含量均高于越橘对照提取物, 造成这种差异的原因可能是由于不同厂家生产工艺差异或材料来源不同等, 导致越橘提取物中花青素含量波动较大。因此对越橘提取物中花青素类成分含量的控制显得尤为重要。

本实验对花青素类成分含量进行相关性分析, 结果显示矢车菊素与 C6、芍药素与 C7、飞燕草素与 C15 及 C16、矮牵牛素与 C17 呈极显著相关, 可能是因为在花青素合成通路中, 花青素是各类花青苷合成的前体, 在类黄酮-3-葡糖基转移酶的作用下花青素实现糖基化变成较为稳定的花青苷, 因此, 它们的含量变化紧密相关。此外, C11 与飞燕草素、C16、C8 呈显著负相关。可能是因为在花青素合成过程中, 二氢黄酮醇在类黄酮 3'-羟化酶、类黄酮 3',5'-羟化酶作用下分别生成二氢槲皮素和二氢杨梅黄酮, 二者在二氢黄酮醇还原酶和花青素合成酶的作用下分别生成矢车菊素和飞燕草素^[20], 矢车菊素、飞燕草素及二者糖苷皆由二氢黄酮醇分化而来, 因此它们可能存在竞争关系, 这一原因可能导致了它们呈负相关。

3.4 抗氧化活性的研究

目前, 关于花青素抗氧化机制的研究已经取得了显著进展。研究者认为花青素的抗氧化活性受到分子结构的影响, 苷元、糖基、甲基和酰化酸的类型、糖基化、甲基化和酰化的位置和程度对其抗氧化能力均有影响。此外, 花青素的质量分数也是影响抗氧化活性的重要因素^[21]。本研究发现, 在 20 种花青素类成分与抗氧化活性相关性研究中矢车菊素

与 DPPH 自由基清除能力呈极显著相关, C13 与总抗氧化能力呈极显著相关, 建议将二者作为抗氧化活性的标志性成分, 便于对后续花青素抗氧化活性的研究。

4 结论

欧洲越橘作为重要的“功能性食品”拥有悠久的食用史, 随着现代科学技术的发展及人民生活水平的提高, 越橘提取物因其丰富的花青素含量而备受关注。本研究以《欧洲药典》中的越橘标准提取物代替对照品, 基于 UPLC-QQQ-MS/MS 建立了同时测定欧洲越橘提取物中 20 种花青素的定量方法, 该方法稳定性高, 精密度好, 重复性强能够准确测定越橘中花青素的含量。

同时定量结果表明, 来自不同产家样品中花青素含量差异, 这可能是由于花青素本身不稳定或者生产工艺、材料来源等原因导致。此外抗氧化活性实验表明, 矢车菊素有望作为欧洲越橘提取物清除 DPPH 自由基活性的质控成分, 而 C13 有望作为总抗氧化活性的质控成分。本研究为欧洲越橘花青素类成分的质量控制提供了新方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Schantz M, Mohn C, Baum M, *et al.* Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29 [J]. *Berry Res*, 2010, 1(1): 25-33.
- [2] Colak N, Torun H, Gruz J, *et al.* Bog bilberry phenolics, antioxidant capacity and nutrient profile [J]. *Food Chem*, 2016, 201: 339-349.
- [3] 毛丹, 冯睿, 程益清, 等. 越橘提取物中花色苷及游离花青素的测定 [J]. *食品与药品*, 2021, 23(4): 306-310.
- [4] Chandra A, Rana J, Li Y. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(8): 3515-3521.
- [5] Flamini R, D T. The anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella [J]. *Vitis*, 2000, 2(39): 79.
- [6] 张黎媛. 液质联用技术在中药质量控制中的应用 [J]. *世界中医药*, 2018, 2(13): 513-516.
- [7] 高渐联, 周霖, 王肖辉, 等. 基于液质联用结合网络药理学的复方伤痛胶囊中 5 种药效成分定量及作用机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(6): 1793-1803.
- [8] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT-*

- Food Sci Technol*, 1995, 28(1): 25-30.
- [9] 吴婉莹, 果德安. 中药整体质量控制标准体系构建的思路与方法 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 351-356.
- [10] 朱星宇, 赵根华, 高倩倩, 等. 对照提取物法测定补骨脂饮片中 7 种成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 85-91.
- [11] 张鑫, 张苗苗, 王云霞, 等. 对照提取物法测定银杏叶制剂中总黄酮醇苷的含量 [J]. 中南药学, 2016, 14(8): 867-870.
- [12] 陈沛, 金红宇, 孙磊, 等. 对照提取物在中药整体质量控制中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 185-195.
- [13] 刘刚, 刘金梅, 穆开朗, 等. 2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苄酯类对照提取物在白及质量控制中的应用研究 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1260-1266.
- [14] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 433.
- [15] 刘芳芳, 向成钢, 张宏, 等. 高效液相色谱法与 pH 示差法测定紫萼豌豆花青素含量的比较 [J]. 食品科技, 2022, 47(1): 298-303.
- [16] 李夏. 葡萄中花青素含量的测定与分析 [J]. 粮食流通技术, 2022, 15(28): 179-182.
- [17] 刘荣霞, 果德安, 叶敏, 等. 液质联用技术(LC/MS)在中药现代研究中的应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(5): 33-40.
- [18] 李俊, 米要磊, 王思嘉, 等. 基于 UPLC-QQQ-MS/MS 的工业大麻中 6 种大麻素类成分定量研究 [J]. 中草药, 2022, 53(4): 1163-1172.
- [19] 刘祥东, 梁琼麟, 罗国安, 等. 液质联用技术在医药领域中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 110-116.
- [20] 贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 等. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1496-1506.
- [21] 李煦, 白雪晴, 刘长霞, 等. 天然花青素的抗氧化机制及功能活性研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8163-8171.

[责任编辑 郑礼胜]