

宋小蒙,王洪新,马朝阳,等. HPLC-ESI-MS/MS 分析金钗石斛花花色苷组成及其抗氧化活性测定[J]. 江苏农业科学,2018,46(15):151-154. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.041

HPLC-ESI-MS/MS 分析金钗石斛花花色苷组成及其抗氧化活性测定

宋小蒙¹, 王洪新^{1,2}, 马朝阳², 寇兴然², 贾启海³

(1. 江南大学食品学院,江苏无锡 214122; 2. 国家功能食品工程技术研究中心,江苏无锡 214122;

3. 赤水国礼金钗石斛发展有限公司,贵州遵义 564700)

摘要:以金钗石斛花为原料,采用大孔树脂法纯化金钗石斛花花色苷,用高效液相色谱-质谱联用法测定金钗石斛花花色苷的组成,用铁氰化钾法测还原力,用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法和2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)法研究金钗石斛花花色苷的抗氧化能力。色谱柱采用Waters Acquity-BCH C₁₈(柱长100 mm×柱内径2.1 mm,填料的孔径为1.7 μm),流速为0.3 mL/min,柱温为45 ℃,进样量为3 μL,二极管阵列检测器(PDA)检测波长为520 nm。共分析出13种花色苷,主要为矢车菊素类化合物;还原力随着样液浓度的升高呈上升趋势;抗氧化能力显示,样品和Trolox对DPPH·的半抑制浓度(IC₅₀)分别为159.92、33.17 μg/mL,对ABTS⁺·的IC₅₀分别为525.33、55 μg/mL。

关键词:金钗石斛花;花色苷;高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS);抗氧化能力

中图分类号:S567.23⁺9.01;O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)15-0151-03

金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)系兰科石斛属多年生草本植物,别称扁金钗、扁黄草、扁草,是名贵的中药材^[1],具有较高的食用和营养价值,其茎入药,性微寒,味甘,具有益胃生津、滋阴清热等功效^[2],主要生长在贵州、四川、广西、云南等地^[3]。金钗石斛花花形俏丽,颜色鲜艳,有较高的药用价值,能够滋阴润肺、增强免疫力、抗衰老^[4]等。花色苷(Anthocyanin)属于类黄酮类物质,是一种天然水溶性色素,广泛存在于植物的花、果、茎、叶中,具有清除自由基、抗炎症、降血脂等功效,受到国内外学者的广泛关注。目前发现的花色苷有20多种,以天竺葵素、矢车菊素、芍药素、飞燕草素、锦葵素和牵牛花素最为常见^[5]。

当前对花色苷类化合物的研究主要集中在紫薯、蓝莓、甘蓝等物质,对于金钗石斛花花色苷组成的报道很少。本试验以贵州金钗石斛花为原料,对其进行提取纯化并使用高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS/MS)分析其组成,进一步通过还原力测定、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法和2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)法对其抗氧化能力进行研究,从不同方面为贵州金钗石斛花的进一步开发和研究提供科学的依据。

1 材料与方 法

收稿日期:2017-02-21

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(编号:JUSRP51501);

金钗石斛资源精深加工系列产品的研究与开发横向基金(编号:150035)。

作者简介:宋小蒙(1991—),女,江苏徐州人,硕士研究生,研究方向为食品营养与功能。E-mail:song_grace@126.com。

通信作者:王洪新,博士,教授,博士生导师,主要从事营养与功能性食品研究。E-mail:hxwang@jiangnan.edu.cn。

1.1 材料与仪器

金钗石斛花,购自贵州省赤水国礼金钗石斛发展有限公司;AB-8型大孔树脂,购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司;乙醇、甲酸、盐酸、氯化铁、六氰合铁酸钾、三氯乙酸(TCA)、维生素C、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和过硫酸钾均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯,购自美国Tedia公司;DPPH、ABTS、水溶性维生素E(Trolox),均购自美国Sigma公司。

Waters超高效液相色谱-质谱联用仪,购自美国Waters公司,配有可变波长紫外检测器——二极管阵列管检测器(PDA)和数据处理软件Masslynx4.1工作站;DZF-6050型真空干燥箱,购自上海一恒科学仪器有限公司;AR224CN型电子天平,购自奥豪斯仪器(上海)有限公司;SHZ-DIII型循环水真空泵,购自上海羌强实业发展有限公司;Multiskan GO全波长酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 试验方法

1.2.1 花色苷的提取与纯化 将10 g金钗石斛花干粉浸于1 L 50%乙醇(0.1% HCl)中,4 ℃下遮光提取24 h,抽滤得提取液,50 ℃真空浓缩。将浓缩液上样于经过预处理^[6]的AB-8型大孔树脂,用3倍柱体积0.5%甲酸溶液洗脱树脂,去除糖和蛋白质,然后用3倍柱体积70%乙醇溶液(含1%甲酸)洗脱。洗脱液于50 ℃真空浓缩去除乙醇,真空冷冻干燥得干物质^[7]。取一部分溶于水中,其余部分低温保存。

1.2.2 液相色谱条件 色谱柱:Waters Acquity-BCH C₁₈(柱长100 mm×柱内径2.1 mm,填料的孔径为1.7 μm),流速为0.3 mL/min,柱温为45 ℃,进样量为3 μL,检测器:二极管阵列检测器,检测波长为520 nm,梯度洗脱条件见表1。

1.2.3 质谱条件 电喷雾离子源(ESI):正离子扫描模式,毛细管电压为3.2 kV,锥孔电压为30 V,离子源温度为100 ℃,

表1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相	
	A:乙腈(%)	B:2%甲酸(%)
0	2	98
0.1	2	98
20	16	84
28	23	77
35	50	50
37	6	94

脱溶剂温度为400℃,脱溶剂气流量为700 L/h,锥孔气流量为50 L/h,离子扫描范围 m/z 为100~2 000。

1.2.4 还原力测定 用铁氰化钾法测定还原力^[8]。取10 mL离心管,依次加入2.5 mL不同浓度的样品、2.5 mL 2.5 mol/L的磷酸缓冲盐溶液(PBS)(pH值为6.6)和2.5 mL 1%六氰合铁酸钾溶液,50℃水浴20 min;冷水冷却后,再加入2.5 mL 10%三氯乙酸(TCA)溶液,混匀,3 000 r/min下离心10 min,取上清2.5 mL,依次加入2.5 mL蒸馏水、0.5 mL 0.1% FeCl₃溶液,充分混匀,静置10 min,以水为空白、维生素C为阳性对照,于700 nm测定吸光度。

1.2.5 金钗石斛花对DPPH·清除试验 以Trolox为阳性对照,进行DPPH·清除能力测定^[9-10]。在96孔板中加入270 μL 60 μmol/L DPPH和30 μL不同浓度样品,避光反应5 min,放入酶标仪中,于517 nm测定吸光度,并计算清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [1 - (D_1 - D_2) / D_0] \times 100\%$$

式中: D_1 为样品与DPPH反应后在517 nm处的吸光度; D_2 、 D_0 分别为空白样品、DPPH在517 nm处的吸光度。

1.2.6 金钗石斛花对ABTS⁺·的清除试验 以Trolox为阳性对照,进行ABTS清除能力测定^[11]。将3.5 mmol/L ABTS和2.45 mmol/L过硫酸钾以2:1体积比混合,避光,室温下

反应12~16 h,即得ABTS⁺·储备液。在96孔板中加入200 μL ABTS⁺·储备液和10 μL不同浓度样品,反应10 min后放入酶标仪中,于734 nm测定吸光度,并计算清除率:

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除率} = [1 - (D_1 - D_2) / D_0] \times 100\%$$

式中: D_1 为样品与ABTS⁺·反应后在734 nm处的吸光度; D_2 为空白样品在734 nm处的吸光度; D_0 为ABTS⁺·储备液在734 nm处的吸光度。

2 结果与分析

2.1 金钗石斛花花色苷组分分析

图1是金钗石斛花花色苷溶液在520 nm下的HPLC图谱,可以看出,金钗石斛花花色苷含有多种不同的成分,主要有13种。结合保留时间、质谱信息和相关文献^[12-21]对各峰进行推测。图2为峰1的质谱图,保留时间为8.33 min,分子离子 m/z 为611,碎片离子 m/z 为287。其中碎片离子($m/z=287$)是分子离子($m/z=611$)失去1分子槐糖基(相对分子量为324)所得,碎片离子($m/z=287$)为矢车菊素花色苷的特征离子,因此推测峰1为矢车菊素-3-槐糖苷。

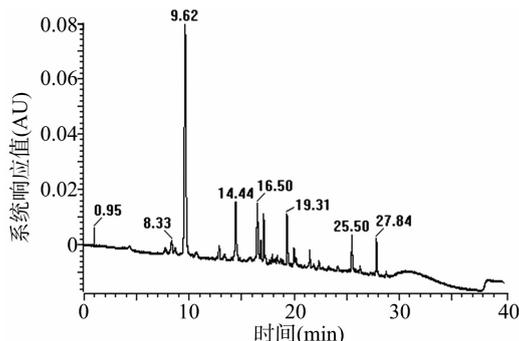


图1 金钗石斛花花色苷 HPLC 图谱(520 nm)

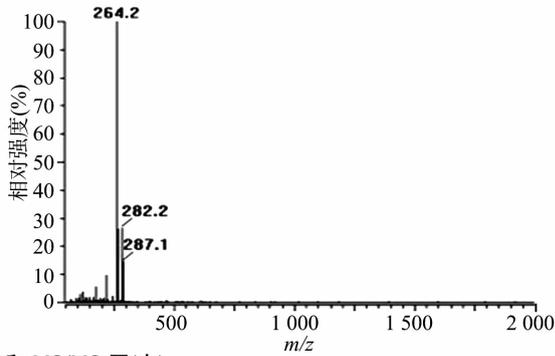
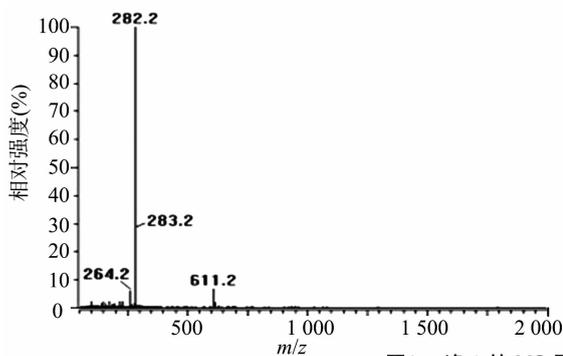


图2 峰1的MS图(左)和MS/MS图(右)

峰2的保留时间为9.62 min,分子离子 m/z 为449,碎片离子 m/z 为287。其中碎片离子($m/z=287$)是分子离子失去1分子葡萄糖基(相对分子量为162)所得,碎片离子($m/z=287$)为矢车菊素花色苷的特征离子,因此推测峰2为矢车菊素-3-葡萄糖苷。峰3的保留时间为12.85 min,分子离子 m/z 为919,碎片离子 m/z 为287、449、757。其中,碎片离子($m/z=757$)是分子离子失去1分子葡萄糖基(相对分子量为162)所得,碎片离子($m/z=449$)是分子离子失去1分子槐糖基和1分子香豆酰(相对分子量为324+146)所得,碎片离子($m/z=287$)是碎片离子($m/z=449$)失去1分子葡萄糖基(相对分子量为162)所得, $m/z=287$ 的碎片离子为矢车菊素花

色苷的特征离子,因此推测峰3为矢车菊素-3-对羟基香豆酰槐糖苷-5-葡萄糖苷。峰4的保留时间为14.44 min,分子离子 m/z 为535,碎片离子 m/z 为287。其中,碎片离子($m/z=287$)是分子离子失去1分子葡萄糖基和1分子丙二酰基(相对分子量为162+86)所得,碎片离子($m/z=287$)为矢车菊素花色苷的特征离子,因此推测峰4为矢车菊素-3-O-丙二酰葡萄糖苷。峰5的保留时间为16.50 min,分子离子 m/z 为757,碎片离子 m/z 为287、449。其中,碎片离子($m/z=449$)是分子离子失去1分子芸香糖基(相对分子量为308)所得,碎片离子($m/z=287$)是 $m/z=449$ 失去1分子葡萄糖基(相对分子量为162)所得,碎片离子($m/z=287$)为矢车

菊素花色苷的特征离子,因此推测峰5为矢车菊素-3-芸香糖苷-5-葡萄糖苷。

其他各峰的推测方法与峰1~峰5相同,其质谱信息和推测化合物见表2,本研究仅给出峰1的MS、MS/MS图。观

察发现经过酰基化的花色苷保留时间基本大于未酰基化花色苷,多酰化花色苷保留时间大于单酰化花色苷,相同种类花色苷糖基不同,保留时间也不一样。

表2 金钗石斛花中主要花色苷组分

峰号	保留时间 (min)	最大吸收波长 (nm)	分子离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	预测化合物
1	8.33	512.2	611	287	矢车菊素-3-槐糖苷
2	9.62	514.2	449	287	矢车菊素-3-葡萄糖苷
3	12.85	548.2	919	287,449,757	矢车菊素-3-对羟基香豆酰槐糖苷-5-葡萄糖苷
4	14.44	526.2	535	287	矢车菊素-3-O-丙二酰葡萄糖苷
5	16.50	519.2	757	449,287	矢车菊素-3-芸香糖苷-5-葡萄糖苷
6	16.81	526.2	757	287,449,595	矢车菊素-3-芸香糖苷-5-葡萄糖苷
7	17.10	527.2	757	287,595	矢车菊素-咖啡酰芸香糖苷
8	17.90	534.2	787	303,625	飞燕草素-阿魏酰芸香糖苷
9	19.31	526.2	1065	287,449,903	矢车菊素-3-p-香豆酰-p-香豆酰-槐糖苷-5-葡萄糖苷
10	19.98	534.2	595	287	矢车菊素-3-芸香糖苷
11	21.49	526.2	903	287,595	矢车菊素-双芸香糖苷
12	25.50	526.2	465	303	飞燕草素-3-半乳糖苷
13	27.84	512.2	882	303,629	飞燕草素衍生物

2.2 金钗石斛花花色苷抗氧化能力测定

2.2.1 还原能力的测定

Fe^{3+} 得到电子后被还原为 Fe^{2+} ,体系颜色发生改变,因此可通过颜色变化观察氧化还原状态的改变,吸光度越大说明还原力越强,利用此原理检测金钗石斛花花色苷的还原能力。从图3可以看出,在试验浓度范围内,随着样液浓度的升高,还原能力呈上升趋势,而在同一浓度下维生素C的还原力高于金钗石斛花花色苷的还原能力。

2.2.2 金钗石斛花花色苷对DPPH·的清除作用

DPPH·是一种稳定的有机自由基,醇溶液呈紫色,517 nm处有强吸收,得到1个电子后吸收消失,溶液变浅,其褪色程度与得到电

子数相关,因此可利用分光光度法快速测定。从图4可以看出,石斛花花色苷与Trolox均具有较强的清除能力,且清除率随浓度增大而提高,当浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时样液的清除率达86%。两者的半抑制浓度(IC_{50})分别为33.17、159.92 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.3 金钗石斛花花色苷对ABTS $^{+}$ ·的清除作用

ABTS $^{+}$ ·与DPPH·类似,均为稳定的有机自由基,抗氧化能力越强,提供电子的能力越强,反应速率越快,因此可以通过测定吸光度判断其抗氧化能力大小。从图5可以看出,样液和Trolox的清除率均随浓度增大而增大,两者的 IC_{50} 分别为33.55、525 $\mu\text{g/mL}$,Trolox的清除能力明显大于样液。

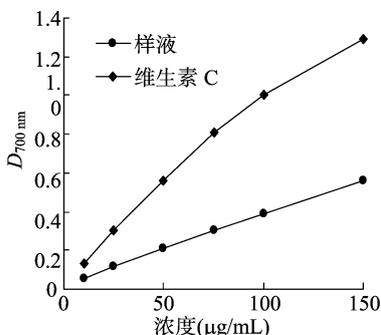


图3 金钗石斛花花色苷的还原能力

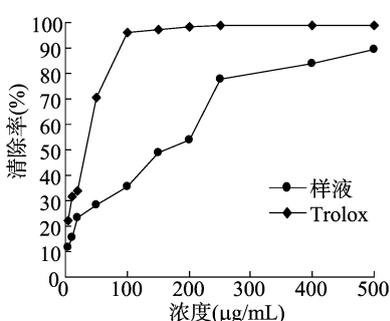


图4 金钗石斛花花色苷对DPPH自由基的清除能力

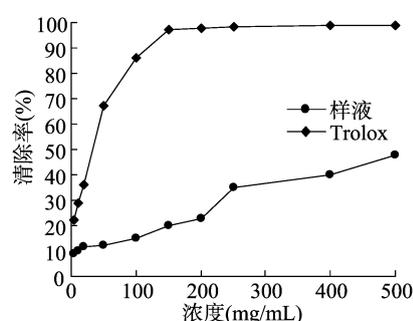


图5 金钗石斛花花色苷对ABTS自由基的清除能力

3 结论

本试验采用HPLC-MS/MS联用法测定金钗石斛花花色苷组分,其中矢车菊素类化合物有10种,飞燕草素类化合物有3种,以矢车菊素类化合物为主。此外发现,酰基化的花色苷保留时间基本大于未酰基化花色苷,多酰化花色苷保留时间大于单酰化花色苷,对于相同种类花色苷,糖基不同,保留时间也不一样。金钗石斛花花色苷的还原力随着样液浓度的升高而升高,且具有较强的DPPH·自由基清除能力,清除率随浓度增大而增大,当浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率达86%。金钗石斛花花色苷对ABTS $^{+}$ ·的清除率随浓度增大而增大,其 IC_{50} 为525 $\mu\text{g/mL}$ 。

参考文献:

- [1] 张晓敏,孙志蓉,陈龙,等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学,2014,31(7):895-899.
- [2] 胡志刚,梁欢,卢金清,等. 金钗石斛茎和花中石斛碱的含量比较研究[J]. 中国药师,2014,17(8):1303-1305.
- [3] 邓银华,徐康平,谭桂山. 石斛属植物化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材,2002,25(9):677-680.
- [4] 宋广青,刘新民,王琼,等. 石斛药理作用研究进展[J]. 中草药,2014,45(17):2576-2580.
- [5] 隋华嵩,杨燕,侯英,等. 紫红豇豆色素组成及体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2014,35(24):34-39.

胡文岩,张应华,潘云兵,等. 溴虫腈在云南 2 种特色辣椒中的安全性评价[J]. 江苏农业科学,2018,46(15):154-157.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.042

溴虫腈在云南 2 种特色辣椒中的安全性评价

胡文岩¹, 张应华², 潘云兵¹, 杨宁¹, 张琳³, 孟金贵¹

(1. 云南农业大学园林园艺学院,昆明 650201;2. 云南农业大学云南省滇台特色农业产业化工程研究中心,昆明 650201;
3. 云南农业大学资源与环境学院,昆明 650201)

摘要:为了探讨溴虫腈在云南 2 种特色辣椒果实上的安全性,通过气相色谱法测定了 10% 溴虫腈悬浮剂在丘北辣椒和小米辣果实上以及空白土壤中的消解动态和最终残留。结果表明,溴虫腈添加水平在 0.05 ~ 0.5 mg/kg 范围内,平均回收率在 84.9% ~ 102.7% 之间,变异系数在 3.5% ~ 8.1% 之间。10% 溴虫腈悬浮剂在丘北辣椒、小米辣和土壤中的消解动态曲线符合一级动力学方程,半衰期分别为 4.2、5.3、7.0 d,属于易降解农药。10% 溴虫腈推荐剂量处理下,辣椒的安全间隔期为 21 d。同等施药情况下,同一农药在辣椒不同品种中的消解速率以及最终残留量不同。溴虫腈在辣椒上的初始沉积量、最终残留量均与施药次数、施药浓度呈正相关,因此控制溴虫腈最终残留的关键在于掌握合理的施药浓度和施药次数。

关键词:溴虫腈;丘北辣椒;小米辣;安全性评价;消解动态;最终残留

中图分类号: TQ450.2⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0154-04

云南省是我国辣椒的主要种植地区之一,具有丰富独特的辣椒种质资源,如丘北辣椒(*Capsicum annuum* L.)、小米辣(*Capsicum frutescens* L.)^[1]。目前辣椒产业已成为云南文山等地区经济发展的重要支柱之一^[2-3]。云南省地处我国西南,与南亚多个国家相邻,具有独特的地理位置以及气候优

势,加之辣椒品种的独特性,促使辣椒成为云南在国际农产品贸易竞争中的优势农作物^[4-5]。随着全球对辣椒的重视和需求不断增长,云南省辣椒主产区文山州等栽培面积逐年增加^[6]。为了增加经济收入,菜农加大辣椒上化学农药的浓度和使用量,农药使用超标超量问题日益严重,影响外贸出口。

收稿日期:2017-03-17

基金项目:云南省科技计划(编号:2014BB002)。

作者简介:胡文岩(1992—),女,河南原阳人,硕士,主要从事蔬菜无公害栽培技术研究。E-mail:huwenyan0619@163.com。

通信作者:孟金贵,硕士,副教授,主要从事设施园艺、蔬菜无公害栽培研究。E-mail:ymskmsm@163.com。

溴虫腈属于新型芳基吡咯类杀虫杀螨剂,是美国氰胺公司 20 世纪 80 年代末以天然芳基吡咯类抗生素为先导化合物进一步研发的低毒、杀虫快速的仿生前体农药^[7-9],其作用机制独特,对蔬菜已产生抗性的害虫小菜蛾、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、蓟马等有特效,广泛用于蔬菜、果树及观赏植物等^[10-16],可防治 5 个昆虫目的害虫害螨^[17-18]。在辣椒上可用于害虫

[6] 顾云,孙虹霞,梁昱,等. 大孔树脂纯化管花肉苁蓉毛蕊花糖苷的工艺研究[J]. 食品工业科技,2015,36(4):269-273,277.

[7] Hu Y, Deng L, Chen J, et al. An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars[J]. Food Chemistry, 2016, 194:46-54.

[8] 罗萍,师莉莎,刘华忠. 乌贼墨多糖的体外抗氧化作用[J]. 食品研究与开发,2013,34(8):1-4.

[9] Sousa A, Araújo P, Azevedo J, et al. Antioxidant and antiproliferative properties of 3-deoxyanthocyanidins[J]. Food Chem, 2016, 192:142-148.

[10] 殷丽琴,韦献雅,钟成,等. 不同品种彩色马铃薯总花色苷含量与总抗氧化活性[J]. 食品科学,2014,35(5):96-100.

[11] 薛红玮,牟德华. 不同品种紫甘薯体外抗氧化活性的比较[J]. 食品与机械,2011,27(1):36-39.

[12] 张杨,谢笔钧,孙智达. 蓝莓酒渣、果、酒中花色苷成分鉴定及酒渣与果中花色苷抗氧化活性比较[J]. 食品科学,2016,37(2):165-171.

[13] 徐学玲,赵岫云,王丹,等. HPLC-ESI-MS 分析紫色小白菜中花色苷组成分析[J]. 食品工业科技,2014,35(11):278-281,294.

[14] 江连洲,王晰锐,张超,等. HPLC-MS 法鉴定不同品种紫甘薯中花色苷组成[J]. 中国食品学报,2011,11(5):176-181.

[15] 李倩,刘延吉. 黑莓果实次生物质及花色苷组分的研究[J]. 北方园艺,2011,16:26-30.

[16] Mi J L, Park J S, Dong S C, et al. Characterization and quantitation of anthocyanins in purple-fleshed sweet potatoes cultivated in Korea by HPLC-DAD and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS[J]. Agric Food Chem, 2013, 61(12):3148-3158.

[17] 赵宇,吕晓玲,王超,等. HPLC-ESI-MS/MS 鉴定几种提取物的主要花色苷成分[J]. 中国食品添加剂,2016(7):181-186.

[18] 邝敏杰,吴闹,齐敏玉,等. 甲基吡喃花色苷的制备优化及 HPLC-MS/MS 分析[J]. 食品工业科技,2014,35(20):257-262.

[19] 罗弦,杨雄,苏跃,等. 彩色马铃薯品种块茎花色苷 HPLC-MS 分析[J]. 种子,2013,32(7):30-34.

[20] 李蕊,王萍,王振宇,等. 野生红树莓花色苷的提取分离及成分鉴定[J]. 食品与发酵工业,2010,36(10):203-207.

[21] 刘玉芹. 六种紫色蔬菜中花色苷的定性定量分析及抗氧化活性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2011.