

doi:10.11920/xnmzdk.2025.03.001

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的 柳叶菜化学成分及活性研究

叶建春¹, 赵日杂², 杨 晴², 蒲仁军¹, 邱 雪¹, 张志锋²

(1. 自贡市中医医院, 四川 自贡 643000; 2. 西南民族大学药学与食品学院, 四川 成都 610065)

摘要: 对柳叶菜的化学成分进行分析鉴定及生物活性评价。采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS, 正、负离子模式下采集数据, 对其化学成分进行定性分析, 以 DPPH/ABTs 自由基清除率评价其抗氧化活性, 并在酶和 B16 细胞水平探索其酪氨酸酶抑制活性。通过高分辨质谱分析并结合相关文献, 共鉴定出柳叶菜中 37 种成分, 包含 11 种脂肪酸类、6 种黄酮类、7 种有机酸类及 13 种其他类成分。0.04 mg/mL 以上浓度柳叶菜提取物对 DPPH 自由基、ABTs 自由基的清除率可达 90% 以上。同时, 柳叶菜提取物可在不影响细胞增殖的条件下抑制 B16 细胞内酪氨酸酶活性及黑色素含量, 从而发挥美白作用。本研究可为柳叶菜化学物质基础研究及资源开发利用提供科学依据。

关键词: 柳叶菜; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; 抗氧化活性; 酪氨酸酶抑制; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-4271(2025)03-0237-08

Chemical constituents and biological activities of *Epilobium hirsutum* based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

YE Jianchun¹, ZHAO Riza², YANG Qing², PU Renjun¹, QIU Xue¹, ZHANG Zhifeng²

(1. Zigong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zigong 643000, China;

2. School of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610065, China)

Abstract: To analyze and identify the chemical components of *Epilobium hirsutum* and evaluate its biological activity, UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS was used to collect data in both positive and negative ion modes for qualitative analysis of its chemical constituents. Antioxidant activity was assessed by DPPH and ABTs radical scavenging assays, while tyrosinase inhibitory activity was explored using enzymatic assays and B16 cells. A total of 37 compounds were identified in *e. hirsutum* through high-resolution mass spectrometry combined with relevant literature, including 11 fatty acids, 6 flavonoids, 7 organic acids, and 13 other types of compounds. *e. hirsutum* extract showed over 90% scavenging activity for DPPH and ABTs radicals at a concentration of 0.04 mg/mL. Additionally, the extract inhibited tyrosinase activity and melanin content in B16 cells without affecting cell proliferation, demonstrating its human whitening effect. The findings of this study provided a scientific basis for the chemical foundation study and potential application of *e. hirsutum* in further research.

Keywords: *Epilobium hirsutum*; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; antioxidant activity; tyrosinase inhibition; chemical composition

柳叶菜 (*Epilobium hirsutum* L.), 又名鸡脚参、小通经, 为柳叶菜科柳叶菜属多年生草本植物, 主要生

长于溪流河床沙地、沟湖边向阳湿处及灌丛中, 分布于四川、贵州、云南等地。柳叶菜是藏、羌、彝等多民族

收稿日期: 2024-11-03

作者简介: 叶建春 (1989-), 女, 主管药师, 硕士, 研究方向: 中药物质基础和作用机制. E-mail: 504048056@qq.com

通信作者: 张志锋 (1973-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中药鉴定学. E-mail: zfzhang@swun.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2019YFC1712503); 西藏自治区科技计划重大专项 (XZ202201ZD0001G06)

习用药材。《哀牢本草》记载:柳叶菜根“清热解毒、理气宽中、活血祛瘀,用于寒湿内积、脘腹疼痛、经闭经痛。”《玉龙本草》记载:柳叶菜全草“味苦、淡,性寒;清热解毒、利湿止泻、消食理气、活血接骨”^[1]。柳叶菜作为民族药材“小通经”的基原被收录在《四川省中药材标准》2022 版^[2]。尽管柳叶菜资源丰富,在民间被广泛使用,但目前研究主要集中于栽培技术^[3-4]、生境影响^[4]、育种育苗^[5]等方面,也有文献报道了生药学鉴别研究^[6],但对柳叶菜的化学成分、生物活性研究较少。近年来,分析技术日益先进,具有高灵敏度、高选择性的液相色谱-质谱联用技术被广泛应用于植物化学小分子的快速分析与鉴别中,以四极杆/静电场轨道阱为代表的高分辨质谱可借助高分辨率及高质量精度来提高母离子的选择、传输能力,使复杂基质中低丰度分析物的定性分析更加准确^[7]。前期在柳叶菜的质量标准研究中发现,柳叶菜中含有大量的黄酮类成分,并以槲皮素作为的含量测定指标对其进行质量控制^[2]。先前的研究也表明黄酮类成分具有抗氧化、抗衰等功效^[8],并且同属植物柳兰广泛应用于抗氧化、抗衰和美白等化妆品精华液中^[9],因此,为了研究柳叶菜的物质基础及新功效,本实验采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS),全面获取柳叶菜化学成分信息,并在酶和细胞分子水平研究其生物活性,为柳叶菜资源的深入开发利用提供科学依据。

1 仪器、试剂和材料

1.1 仪器

超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱仪及 Xcalibur 质谱工作站(美国 Thermo Scientific 公司);AL204 型万分之一天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司);Varioskan LUX2 全自动酶标仪(赛默飞世尔科技公司);M152-N 倒置荧光显微镜(广州明美光电科技有限公司)。

1.2 试剂

L-多巴、酪氨酸酶(25 KU)(AR 级,上海源叶生物科技有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DP-PH)(AR 级,批号:2010289,上海伊卡生物科技有限公司);ABTs(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))(≥98%,批号:20112801,成都康邦生

物科技有限公司);PBS(批号:G4202,Servicebio);0.25%胰蛋白酶消化液(批号:G4001,Servicebio);RPMI-1640 培养基(批号:8122665,Gibco);B16 细胞(批号:Cl-0029,Procell);Fetal Bovine Serum(批号:164215-100,Procell);青链霉素混合液(批号:G4003,Servicebio);维生素 C(批号:517J034,Solarbio)。

1.3 材料

柳叶菜样品采自汶川县耿达镇贾家沟(E103°17'38",N31°08'05"),海拔 2 010 m。经张志锋教授鉴定为柳叶菜科植物柳叶菜(*Epilobium hirsutum* L.),标本保存于西南民族大学中药民族药标本室。

2 方法

2.1 柳叶菜的化学成分研究

2.1.1 供试品溶液的配制

取柳叶菜样品若干,切段后粉碎,过三号筛。取粉末约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,于 85 °C 水浴回流 30 分钟,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失重量,摇匀,滤过。取续滤液,作为供试品溶液。

2.1.2 色谱条件

采用 Hypersil GOLD C₁₈ 反相色谱柱(100 mm×2.1 mm,3 μm),以乙腈(A)和 0.1%甲酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱程序为:0~3 min,10%A→20%A;3~8 min,20%A;8~10 min,20%A→46%A;10~15 min,46%A;15~20 min,46%A→70%A;20~25 min,70%A→100%A;流速为 0.3 mL/min,柱温为 30 °C,检测波长为 280,254,210 nm,进样体积 5 μL。

2.1.3 质谱条件

离子源为加热电喷雾离子源(HESI),载气为氮气,鞘气压力 3.5 MPa,辅助气压力 1.0 MPa,喷雾电压 3.80 kV,毛细管温度为 350 °C,辅助器加热温度 200 °C,扫描范围为 m/z 100~1500;扫描模式:Full Ms/dd-Ms²,Full Ms 分辨率 70 000,dd-Ms² 分辨率 17 500,碰撞能量 20,40,60 eV。

2.2 柳叶菜提取物抗氧化活性的测定

2.2.1 溶液的配制

DPPH 溶液:精密称取一定量的 DPPH,加 70%乙醇溶液溶解并定量稀释制成每 1 mL 含 0.01 g DPPH 的溶液。

ABTs 溶液:称取 ABTs 35 mg 定量溶解至 10 mL 量瓶中,称取过二硫酸钾 10 mg 定量溶解至 10 mL 量瓶中,将两溶液混合,暗处静置 12 h,加入适量蒸馏水稀释混合液,使其在波长 734 nm 处吸光度为 0.691。

供试品的配制:取柳叶菜 70% 乙醇提取物适量,加 70% 乙醇溶解并定量稀释制成 0.001、0.002、0.004、0.008、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 mg/mL 的柳叶菜提取液。

V_c 溶液:取 V_c 对照品适量,加 70% 乙醇溶液溶解并定量稀释制成 0.001、0.002、0.004、0.008、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 mg/mL 的 V_c 溶液。

2.2.2 DPPH 自由基清除率的测定

取供试品溶液与各溶剂混合均匀后,在暗室反应 30 min,于 517 nm 波长下测定吸光度。根据以下公式计算清除率:

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{Ad - Ax}{Ac}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:Ac 表示 2 mL DPPH 溶液+2 mL 70% 乙醇溶液的吸光度值;Ad 表示相同体积的供试品溶液替代 70% 乙醇溶液测得的吸光度值;Ax 表示相同体积的供试品溶液替代 DPPH 溶液测得的吸光度值。

2.2.3 ABTs 自由基清除能力测定

取供试品溶液 1 mL,加入 ABTs 溶液 1 mL,混合,黑暗下反应 1 h,于 734 nm 处测量吸光度。根据以下公式计算清除率:

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{Ad - Ax}{Ac}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:Ac 表示 ABT_s 溶液+甲醇的吸光度值;Ad 表示相同体积的供试品/V_c 溶液替代甲醇测得的吸光度值;Ax 表示相同体积的供试品溶液替代 ABT_s 测得的吸光度值。

2.3 柳叶菜提取物对酪氨酸酶抑制率的测定

2.3.1 溶液的配制

酪氨酸酶溶液:精密称取酪氨酸酶 0.01 g,置 100 mL 量瓶中,加 PBS 溶液溶解并定量稀释至刻度,摇匀,即得。

L-多巴溶液:精密称取一定量的 L-多巴,加 PBS 溶液溶解并稀释制成 1.5 mg/mL 的 L-多巴溶液,于 4 °C 下避光保存。

供试品溶液:取柳叶菜 70% 乙醇提取物适量,加

PBS 溶液溶解并定量稀释制成 0.001、0.002、0.004、0.008、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 mg/mL 的柳叶菜提取物溶液。

2.3.2 酪氨酸酶抑制率的测定

按表 1 的反应组分别将 PBS 溶液、样品溶液及酪氨酸酶溶液加入各试管中,混合均匀,在 37 °C 恒温水浴中反应 10 min,分别迅速加入 1 mL L-多巴溶液,混合,放回水浴中继续反应 5 min,立即于 475 nm 下分别测定吸光度 A_{C1}、A_{C2}、A_{T1} 和 A_{T2},重复测定 3 次。其中 C1 为空白组,C2 为空白对照组,T1 为样品组,T2 为样品对照组。按以下公式计算酪氨酸酶抑制率:

$$\text{酪氨酸酶抑制率} = \left(1 - \frac{A_{T1} - A_{T2}}{A_{C1} - A_{C2}}\right) \times 100\% \quad (3)$$

表 1 反应液的组成

Table 1 Composition of reaction solution

反应组	PBS/mL	供试品溶液/mL	酪氨酸酶溶液/mL
C1	13	-	2
C2	15	-	-
T1	11	2	2
T2	13	2	-

2.4 柳叶菜提取物美白活性的细胞实验

2.4.1 供试品溶液的配制

取柳叶菜提取物适量,用 PBS 溶液溶解并稀释为 50、25、12.5、6.25、3.125 μg/mL 的供试品溶液。

2.4.2 细胞的培养与传代

在无菌条件下,将 B16 细胞接种于 RPMI-1640 培养基上(培养基含有 10% 的 FBS、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素),当细胞的汇合率达到 80% 时,对细胞进行传代:

(1) 弃去培养液,用 PBS 溶液洗两遍;

(2) 加入 0.25% 胰蛋白酶 1 mL 消化处理细胞 1~2 min,置显微镜下观察,可看到细胞相互分离变圆,快速弃去胰酶,加入完全培养基(含血清)终止反应;

(3) 不断吹打细胞至形成单细胞悬浮液,按 1:3 的比例传代,于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下扩大培养。将冻存 B16 细胞于 37 °C 水浴融化,1 500 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 DMEM 培养基,吹打充分,将细胞转移至无菌培养瓶中复苏培养。

2.4.3 细胞活力测定

本实验参照文献建立的方法^[10],采用 MTT 法检测柳叶菜醇提液作用后的 B16 细胞活力。以每孔 5 ×

10^3 的细胞密度接种至 96 孔板内,培养 12 h 后分别加入 100 μL 的不同浓度柳叶菜醇提液记为样品组,加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 1% 维生素 C 作为阳性对照,加入等量无血清培养基记为空白组;在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 48 h,加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL ,继续培养 2~4 h,再加入 DMSO 溶液 150 μL ,振动 5 min 后在 490 nm 波长处测定吸光值(OD),根据以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \left(\frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \right) \times 100\%. \quad (4)$$

2.4.4 柳叶菜提取物对 B16 细胞内酪氨酸酶活性的抑制率的测定

参考文献报道^[7,11-12]的相关实验设计方案,采用 L-多巴氧化法测定细胞内酪氨酸酶的活性.将细胞接种于 96 孔板中培养 12 h,分别加入 100 μL 的 12.5、6.25、3.125、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 柳叶菜提取物、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的维生素 C(1%)以及无血清培养基,分别记为样品组、阳性对照组和空白组,培养 48 h.弃去上清液,用 PBS 洗 2 遍,每孔加 100 μL 1% TritonX-100 溶液,快速置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,冻存 30 min 后移至室温融化裂解,37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min 使细胞完全破裂,加入 1% L-多巴溶液 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h.在 475 nm 波长处测定每孔的吸光值(OD),根据以下公式计算酪氨酸酶相对活力:

$$\text{酪氨酸酶相对活力} = \left(\frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \right) \times 100\%. \quad (5)$$

2.4.5 柳叶菜提取物对细胞黑色素含量的影响

采用 NaOH 裂解法测定细胞内黑色素含量^[13-14].将细胞接种于 96 孔板中培养 12 h,分别加入 100 μL 的 12.5、6.25、3.125、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的柳叶菜醇提液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的维生素 C(1%)以及无血清培养基,分别记为样品组、对照组和空白组,同步培养 48 h.弃去培养基,用 PBS 清洗 2 次,使用 PBS 洗涤后加入胰蛋白酶裂解细胞,刮取细胞并收集于离心管中,离心取沉淀,加入含 10% DMSO 的 1 mol/L NaOH 溶液 1 mL,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 1 h,在 475 nm 波长处测定每孔的吸光值(OD),根据以下公式计算相对黑色素含量:

$$\text{黑色素相对含量} = \left(\frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \right) \times 100\%. \quad (6)$$

3 实验结果

3.1 柳叶菜化学成分分析

采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术,在正离子模式下于 30 分钟内实现柳叶菜提取物中 37 个以上色谱峰的高效分离与检测,实验数据显示,柳叶菜提取物在正离子电离模式下的分离效果较优,其检测信号强度与质谱分辨率均优于负离子模式检测结果.图 1 展示了柳叶菜提取物在正、负离子模式下的总离子流色谱图(TIC).

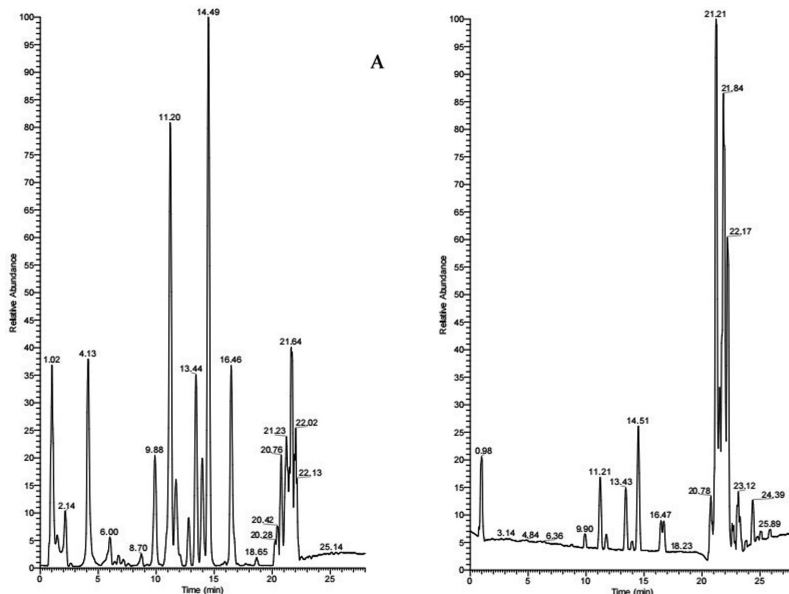


图 1 柳叶菜的负离子(A)和正离子(B)的总离子流图

将其中偏差小于 5×10^{-6} 的化合物利用软件拟合其相对分子质量信息,根据柳叶菜质谱中各化学成分的保留时间、准分子离子峰及其质谱裂解信息,推测其裂解途径,并通过文献对照及数据库对比分析,共

鉴定出柳叶菜中37个化学成分,其中包含11个脂肪酸类、6个黄酮类、7个有机酸类及13个其他类成分,结果见表2。

表2 柳叶菜中化学成分鉴定结果

Table 2 Identification results of components in *Epilobium hirsutum* L.

编号	RT (min)	模式	分子式	中文名称	误差 (ppm)	准分子离子峰	碎片离子	类别
1	1.00	M-H	C ₄ H ₆ O ₆	L(+)-酒石酸	-0.29	149.007 92	149.008 04, 131.997 39, 103.002 47, 87.007 48, 75.007 84, 72.991 82, 71.012 58, 59.012 61	有机酸类[15]
2	1.05	M-H	C ₄ H ₆ O ₅	DL-苹果酸	-1.12	133.013 00	133.013 09, 115.002 48, 89.023 15, 72.991 83, 71.012 58, 59.012 54	氨基酸类
3	1.99	M-H	C ₆ H ₆ O ₃	联苯三酚	-1.14	126.030 43	125.022 29, 107.012 54, 97.028 29, 81.033 32, 69.033 32	其他
4	2.18	M-H	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸	-6.79	170.020 37	169.013 23, 155.002 21, 125.023 28, 107.012 78, 97.028 28, 81.033 32, 69.033 32, 55.017 67	有机酸类
5	3.55	M-H	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	1,6-Bis-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)hexopyranose	-2.32	483.077 27	211.023 93, 193.013 26, 169.013 17, 151.002 24, 125.023 19, 113.023 28, 71.012 47	其他
6	3.99	M-H	C ₇ H ₆ O ₄	龙胆酸	-7.92	153.018 11	153.018 25, 135.043 41, 109.028 29, 91.017 78, 81.033 30, 65.038 41	有机酸类
7	4.05	M-H	C ₉ H ₈ O ₄	咖啡酸	-6.15	179.03	179.033 95, 135.044 04, 117.033 33, 91.054 16	酚酸类[16]
8	4.10	M-H	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	NP-015930	-1.74	311.039 86	179.033 94, 149.008 06, 135.044 04, 103.002 35, 87.007 52, 72.991 83	其他
9	6.75	M-H	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸	-5.44	193.049 58	193.049 76, 178.026 14, 165.018 57, 149.059 72, 137.023 25, 134.036 21, 117.033 38, 106.041 23, 89.038 43	苯丙素类[17-18]
10	8.27	M+H	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	1,1-二苯基胍	-0.28	212.118 10	213.012 08, 170.990 69, 151.000 61, 141.016 08, 128.034 18, 125.023 53, 103.919 08, 87.007 49, 72.991 92, 61.987 11, 59.012 64	其他
11	8.86	M-H	C ₈ H ₈ O ₄	5-甲氧基水杨酸	-6.68	167.033 87	167.033 95, 152.010 42, 139.002 30, 124.015 56, 111.00 757, 95.012 73, 83.012 55, 67.017 62	有机酸类
12	8.97	M-H	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	1 236-四-O-没食子酰-B-D-葡萄糖	-1.9	787.098 45	465.066 62, 211.023 86, 169.013 21, 125.023 25, 95.012 58, 71.012 52	其他
13	9.91	M-H	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	杨梅素-3-O-半乳糖苷	-1.56	479.082 09	242.021 45, 214.026 18, 178.997 53, 151.002 73, 124.015 47, 65.001 93	黄酮类[19]
14	11.22	M-H	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	杨梅苷	-1.34	463.087 46	316.276 21, 229.013 52, 185.023 59, 151.002 82, 125.023 52	黄酮类
15	11.74	M-H	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	槲皮素-3-葡萄糖酸	-1.11	463.087 49	227.033 65, 178.997 68, 151.002 62, 107.012 73, 65.002 07	黄酮类
16	13.43	M-H	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山奈酚-3-O-半乳糖苷	-1.32	447.092 44	447.092 68, 239.033 97, 227.034 21, 211.038 33, 183.044 14, 151.002 49, 107.012 77, 65.002 04	黄酮类
17	14.50	M-H	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	山奈酚-3-O-阿拉伯糖苷	-1.51	417.081 97	417.082 12, 227.034 19, 211.039 28, 183.043 85, 151.002 87, 107.012 63	黄酮类
18	14.80	M-H	C ₉ H ₁₆ O ₄	壬二酸	-5.37	187.096 57	187.096 68, 169.086 00, 143.106 95, 125.096 05, 97.064 67, 83.049 00, 69.033 23, 57.033 34	脂肪酸类
19	16.46	M-H	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	山奈酚-3-鼠李糖苷	-1.81	431.097 44	285.039 58, 227.034 27, 211.039 37, 187.038 86, 163.002 35, 135.007 64, 107.012 79	黄酮类
20	20.72	M-H	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Corchorifatty acid F	-2	327.217 04	327.217 22, 291.196 17, 239.128 04, 229.143 91, 221.117 80, 211.133 27, 201.112 03, 183.138 32, 171.101 68, 155.106 03, 137.096 39, 111.080 37, 97.064 88, 85.028 30, 57.033 35	脂肪酸类[20]
21	21.12	M-H	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	亚细亚酸	-2.24	487.341 83	487.342 44	有机酸类
22	21.28	M-H	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	(9Z,11E)-13-羧基-9,11-十八碳二烯酸	-2.76	295.227 05	295.227 42, 277.216 86, 251.237 66, 195.183 21, 171.101 78, 155.143 10, 137.096 12, 125.095 76, 113.095 82, 83.049 09	脂肪酸类
23	21.28	M+H	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	ALPHA-桐酸	-1.81	279.231 5	279.232 54, 261.220 70, 97.064 61, 83.048 84, 59.012 60	脂肪酸类
24	21.39	M-H	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	NP-021050	-2.31	471.346 95	471.347 72	其他
25	21.43	M-H	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	NP-014287	-2.34	295.227 08	295.227 42, 277.216 86, 251.237 66, 195.138 21, 171.101 78, 155.143 10, 137.096 12, 125.095 76, 113.095 28, 83.049 09, 57.033 29	其他
26	21.67	M-H	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	2,2'-亚甲基双(6-叔丁基-4-甲基苯酚)单丙烯酸酯	-2.64	339.232 06	339.232 33, 163.111 79, 147.080 37, 107.049 00, 59.012 68	其他
27	21.68	M-H	C ₁₁ H ₁₆ O	对叔戊基苯酚	-7.99	163.111 53	163.111 37, 147.080 67, 107.048 81	其他
28	21.76	M-H	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	油酸炔	-2.57	277.212 61	277.216 95, 259.206 67, 233.226 94, 83.048 81, 59.012 65	脂肪酸类
29	21.86	M-H	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	熊果酸	-1.88	455.352 14	455.352 57	有机酸类
30	21.88	M-H	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	(E)-十六碳-7-烯酸	-3.07	253.216 52	253.216 75, 235.206 27, 165.018 89, 83.048 84	脂肪酸类
31	21.95	M-H	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	共轭(9Z,11E)-亚油酸	-2.23	279.232 33	279.232 54, 261.220 70, 97.064 61, 83.048 84, 59.012 60	脂肪酸类
32	22.02	M-H	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	NP-005821	-1.78	453.336 61	453.336 88, 407.331 67, 255.232 68	其他
33	22.13	M-H	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸	-2.79	255.232 24	255.232 54, 237.222 29	有机酸类
34	22.20	M-H	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	油酸	-2.4	281.247 92	281.248 20	脂肪酸类
35	22.51	M-H	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	硬脂酸	-2.26	283.263 61	283.263 89, 265.252 69	脂肪酸类
36	23.00	M-H	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	花生酸	-2.02	311.294 92	311.295 14, 149.095 78	脂肪酸类
37	23.54	M-H	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	二十二酸	-2.9	339.325 90	339.326 17, 321.315 40, 163.111 66	脂肪酸类

3.2 柳叶菜提取物抗氧化活性评价

研究表明,黄酮类^[21]、苯丙素类^[22]、酚酸类^[23-24]等物质具有显著的抗氧化和清除氧自由基的能力.柳叶菜中含有大量的黄酮和酚酸类成分,测定柳叶菜提取物的 DPPH 自由基、ABTs 自由基清除率,评价其抗氧化活性具有重要意义.柳叶菜提取物的自由基清除率结果见图 2、图 3.结果显示,0.02 mg/mL 以上浓度柳叶菜提取物对 DPPH 自由基清除率可达 90% 以上,当浓度达 0.04 mg/mL 以上时,其抑制率接近相同浓度 Vc 抑制率;0.02 mg/mL 以上浓度对 ABTs 自由基清除率可达 80% 以上,当浓度达 0.1 mg/mL 以上时,其抑制率接近相同浓度 Vc 抑制率,表明柳叶菜具有较强的抗氧化活性.

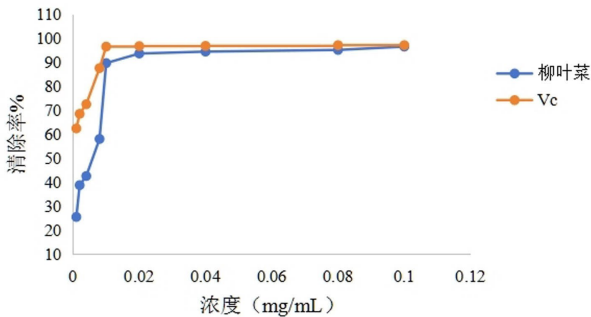


图 2 柳叶菜提取物及 Vc 对 DPPH 自由基的清除

Fig. 2 DPPH scavenging of the *Epilobium hirsutum* extracts and Vc

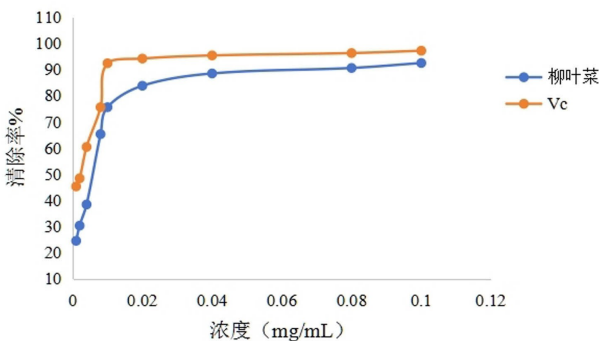


图 3 柳叶菜提取物及 Vc 对 ABTs 自由基的清除

Fig. 3 ABTs scavenging of the *Epilobium hirsutum* extracts and Vc

3.3 柳叶菜提取物对酪氨酸酶活性的影响

酪氨酸酶是黑色素生成过程中不可缺少的酶,具有高抗氧化活性的化合物有望通过抑制酪氨酸酶的生物合成来抑制黑色素生产,以促进美白并延缓衰老^[25-26].通过 L-多巴氧化法,测定柳叶菜提取物对酪氨酸酶活性的影响,结果见图 4.结果显示,当柳叶菜

提取物浓度达 0.10 mg/mL 时,对酪氨酸酶的抑制率可达到 50% 以上.

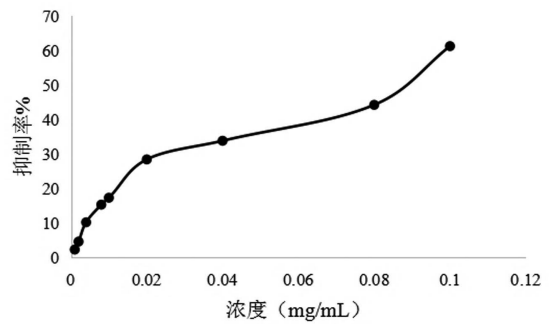


图 4 柳叶菜提取物对酪氨酸酶的抑制

Fig. 4 Inhibitory effect of *Epilobium hirsutum* extracts on tyrosinase activity

3.4 柳叶菜提取物美白活性的细胞验证

3.4.1 柳叶菜提取物对细胞活性的影响

3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 是一种橙色底物,通过活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶转化为蓝紫色结晶甲瓖.与死亡细胞相比,活跃的细胞能产生更多的蓝紫色结晶甲瓖.采用 MTT 法测定不同浓度柳叶菜提取液对体外培养的 B16 细胞活性的影响,结果见图 5.由图 5 可知,对照组及经过 3.125、6.25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 柳叶菜提取液处理组,细胞存活率均大于 50%,对 B16 细胞的增殖没有明显影响.但细胞活力呈剂量依赖性下降,随着提取物浓度升高,细胞活力降低,当浓度高于 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞半数以上死亡,因此选择抑制细胞实验的柳叶菜提取物给药质量浓度不超过 12.5 $\mu\text{g/mL}$.

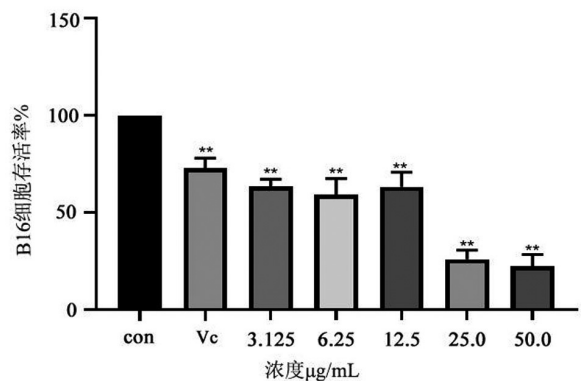


图 5 不同浓度柳叶菜提取物及 Vc 对 B16 细胞存活率的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of *Epilobium hirsutum* extracts and Vc on the survival rate of B16 cells

注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.下同

3.4.2 柳叶菜提取物对B16细胞内酪氨酸酶相对活力的影响

酪氨酸酶是黑色素形成过程中发挥重要作用的关键酶。在黑色素形成过程中,L-酪氨酸在酪氨酸酶催化下被氧化为L-多巴和多巴醌,后者经过酶促反应进行重排生成多巴色素,进而形成黑色素^[27]。前面研究证明了柳叶菜提取物能在体外抑制酪氨酸酶活性,为进一步考察其在细胞水平的抑制效果,我们测定了柳叶菜提取物作用下的B16细胞内酪氨酸酶的相对活力,结果见图6。结果表明,用3.125、6.25和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的柳叶菜提取物处理后,B16细胞酪氨酸酶相对活力的抑制率分别为19.49%、17.79%和20.52%,不同浓度的柳叶菜提取液对酪氨酸酶活性均有一定的抑制作用,与阳性对照组的酪氨酸酶相对活力抑制率(23.25%)相当,表明柳叶菜提取物可抑制B16细胞内酪氨酸酶的活性。

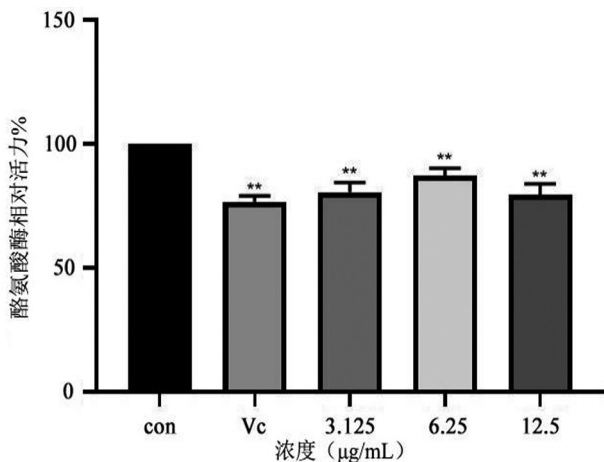


图6 不同浓度柳叶菜提取物及V_c对酪氨酸酶活性的影响
Fig. 6 Effect of different concentrations of *Epilobium hirsutum* extracts and V_c on tyrosinase activity

3.4.3 柳叶菜提取物对B16细胞内黑色素含量的影响

为进一步探索柳叶菜提取物对B16细胞中黑色素生物合成能力的影响,我们测定了柳叶菜提取物作用下的B16细胞内黑色素相对含量,结果见图7。结果表明,3.125、6.26和12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 柳叶菜提取物对黑色素含量的抑制率分别为43.46%、5.56%和23.31%,其中3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的柳叶菜提取物对黑色素的抑制率与阳性对照组的黑色素抑制率(43.63%)相当。

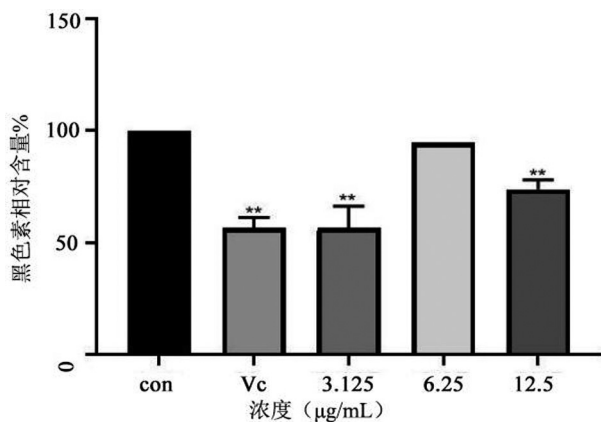


图7 不同浓度柳叶菜提取物及V_c对黑色素含量的影响
Fig. 7 Effect of different concentrations of *Epilobium hirsutum* extracts and V_c on the content of melanin

4 结果与讨论

本研究采用UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS技术快速分离分析柳叶菜中化学成分,为了达到更好的分离分析效果,前期对UPLC色谱条件进行了优化,最终确定以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,以梯度程序进行洗脱。同时,对质谱条件参数进行了优化,建立的分析方法简单易行,分析效率高、准确度高。

通过比较不同的提取方法对柳叶菜化学成分含量的影响,最终采用回流法提取柳叶菜中的提取物,并对提取工艺进行优化,最终确定提取溶剂为70%乙醇溶液、提取温度60 $^{\circ}\text{C}$ 、回流时间60 min。最优提取条件下柳叶菜提取物对自由基的清除率可达90%以上,表现出较强的抗氧化活性。自由基对人体正常细胞的攻击与摧毁,是引起人类衰老和患病的主要原因^[28],抗氧化剂通过清除自由基在保证人体健康中起着至关重要的作用^[25]。目前,抗氧化剂不仅在维持人体健康生活中发挥主要作用,而且在稳定食品成分,防止食品变质中也有巨大贡献。同样,在日化品领域,植物抗氧化剂也更受青睐。

黑色素在黑色素细胞的黑色素小体中产生,并转移到表皮角质形成细胞中,黑色素的形成导致皮肤色素沉着。同时,黑色素的异常积累会引起雀斑、老年斑和黄褐斑等皮肤问题^[29]。为了减少黑色素的异常积累,抑制酪氨酸酶,抑制黑色素从黑色素细胞转移到角质形成细胞是较为有效的途径^[24]。本研究选择与人

体黑色素细胞在生理上比较接近的小鼠 B16 黑色素瘤细胞为研究模型,通过细胞内酪氨酸酶活性及黑色素含量试验评估了柳叶菜提取物在细胞水平的潜在的美白功效。研究显示,柳叶菜提取物可在不影响细胞增殖的条件下抑制 B16 细胞内酪氨酸酶活性及黑色素含量。通常来讲,对黑色素有抑制作用,往往也具有美白功效的潜力。通过对质谱指纹的定性分析和半定量分析,发现没食子酸、5-甲氧基水杨酸、杨梅素-3-O-半乳糖苷、杨梅苷、山柰酚-3-O-半乳糖苷成分的含量较高,他们可能对柳叶菜的活性贡献最大,根据文献有机酸和黄酮类成分也具有美白和抗氧化的功效^[30]。因此,这些成分可能是柳叶菜的活性物质基础。总之,柳叶菜可以作为一种天然的、安全的抗氧化剂和美白剂,在药品、食品或化妆品中具有广泛的应用潜力,本研究可为柳叶菜化学物质基础研究及资源开发利用提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第六卷. 第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 四川省药品监督管理局. 9787572707025 四川省中药材标准[S]. 成都: 四川科学技术出版社, 2022.
- [3] 刘凤琼, 易显荣. 柳叶菜秋季繁殖技术[J]. 中国蔬菜, 2019(5): 111-112.
- [4] 刘凤琼, 贺申魁. 桂林地方特色蔬菜品种柳叶菜花[J]. 长江蔬菜, 2014(19): 20-21.
- [5] 黄柳, 范宣, 刘金平, 等. 苗床类型对川西柳叶菜种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 草业科学, 2019, 36(7): 1819-1825.
- [6] 吴向莉, 丁宁, 孙庆文, 等. 贵州苗药柳叶菜与混淆品粉花月见草的生药鉴别研究[J]. 种子, 2023, 42(9): 137-142.
- [7] 林晨, 洪芳, 陈俊裕, 等. UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 法同时测定牛黄上清片中 18 种胆汁酸的含量[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1065-1072.
- [8] DIAS M C, PINTO D C G A, SILVA AM S. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity[J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5377.
- [9] 韩阳阳, 廖成松, 唐超, 等. 柳兰化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(15): 1-6.
- [10] 颜怡冰, 文培华, 王文君. 虎耳草对小鼠 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响[J]. 食品工业, 2024, 45(6): 136-140.
- [11] 吴依蒙, 吴英良. 水飞蓟宾对 B16 细胞生长、酪氨酸酶活性及黑色素合成等的影响[J]. 中国食品药品监管, 2019(6): 62-67.
- [12] 黄硕, 刘凤. 栀子叶乙醇提取物对 B16 黑色素瘤细胞黑色素生成及酪氨酸酶活性的影响[J]. 中国当代医药, 2020, 27(36): 4-7+12.
- [13] 王昭维, 陈款民, 支旭勃, 等. 三肽 D-Trp-Arg-Leu-NH₂ 抑制 B16 黑色素瘤细胞黑色素合成的机制[J]. 香料香精化妆品, 2023(1): 82-86.
- [14] 安全, 王亚琳, 李魁, 等. 云南白药发酵液的抗衰老及美白功效探究[J]. 日用化学工业, 2018, 48(2): 103-108.
- [15] 孙国东, 霍金海, 潘五九, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的槐角药材化学成分分析[J]. 中草药, 2019, 50(16): 3774-3783.
- [16] 魏文峰, 陈宏昌, 刘焯, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的刺五加叶血清药物化学初步研究[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1306-1313.
- [17] 徐东川, 隋在云. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的地骨皮大鼠体内入血成分研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(09): 2135-2139.
- [18] 秦伟瀚, 冉继春, 叶良红, 等. UPLC-Q/TOF 法同时定性定量分析滇芩药材中主要化学成分[J]. 中草药, 2018, 49(15): 3576-3582.
- [19] 薛莹, 徐先顺, 雍莉, 等. 杨梅功能活性成分的 UPLC-ESI-Q-TOF/MS 分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(15): 123-127+148.
- [20] 刘瑾, 徐东川, 隋在云. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的桑白皮大鼠体内入血成分研究[J]. 中药材, 2022, 45(04): 877-881.
- [21] 田静, 卢永昌, 曾肇毅, 等. 柳兰化学成分与生物活性研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(2): 369-372.
- [22] SHANG H, LIU D, JI H J. The antioxidation activity in vivo and in vitro of flavonoids and chlorogenic acid isolated from *Eucommia ulmoides* leaves[J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 550-553: 1270-1273.
- [23] WANG Q R. Progress of anti-radiation effects of plant polyphenols[J]. *Global Advances in Pharmaceutical Research*, 2014, 1(1): 14.
- [24] LV Q Z, LONG J T, GONG Z F, et al. Current state of knowledge on the antioxidant effects and mechanisms of action of polyphenolic compounds[J]. *Natural Product Communications*, 2021, 16(7): 550-553.
- [25] ASADOLLAHI L, ABBASPOUR-RAVASJANI S, KIM K A, et al. Rice (*Oryza sativa*) stem cells as a novel promising active ingredient with anti-proliferative effects for potential skin cancer prevention and skin whitening activity[J]. *Foods*, 2024, 13(17): 2803.
- [26] 古丽菲热·伊力哈木, 阿塔吾拉·铁木尔, 伊力塔尔·穆哈塔尔, 等. 和田玫瑰精油提取工艺优化及其抗氧化和美白活性研究[J/OL]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(11): 1855-1862+1867.
- [27] ULLAH S, PARK C, IKRAM M, et al. Tyrosinase inhibition and anti-melanin generation effect of cinnamamide analogues[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 87: 43-55.
- [28] 唐文文, 陈垣. 党参地上茎叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(17): 171-177.
- [29] SHIM E, SONG E, CHOI K S, et al. Inhibitory effect of *Gastrodia elata* Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma[J]. *Nutrition Research and Practice*, 2017, 11(3): 173.
- [30] 陈玉娜, 盛小燕, 田海妍, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 方法分析清热祛湿凉茶化学成分[J]. 中南药学, 2023, 21(11): 2907-2912.