

LC-MS/MS法同时测定不同产地木瓜中14种酚类成分含量及其抗氧化活性分析

肖欣¹, 龙富², 李志荣¹, 王罗维³, 周恩碟³, 淳泽利^{1*}, 陈荣祥^{1*}

(1. 遵义医科大学生命科学研究院, 遵义市理化分析测试工程技术研究中心, 贵州遵义 563000)

(2. 遵义医科大学公共卫生学院, 贵州遵义 563000) (3. 遵义医科大学药学院, 贵州遵义 563000)

摘要: 建立液相色谱-三重四级杆质谱 (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 测定不同产地木瓜中 14 种酚类化合物的含量, 并通过 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率和铁离子还原能力研究其抗氧化活性, 同时采用灰色关联分析法分析含量与抗氧化活性之间的“量-效”关系, 探究木瓜抗氧化活性的物质基础。结果表明, 18 批不同产地木瓜样品中绿原酸含量最多, 在 1 479.68~4 902.39 $\mu\text{g/g}$ 范围内, 木瓜提取物的总酚含量高达 37.13 mg GAE/g, DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率和铁离子还原能力分别在 10.13%~74.66%、26.37%~79.44%、43.56~132.53 mg TE/g 之间, 总酚含量与抗氧化活性的相关系数大于 0.91。“量-效”关系研究表明绿原酸、原儿茶酸、儿茶素、新绿原酸等 8 种酚类化合物对抗氧化的贡献较大。该研究建立的 LC-MS/MS 可准确测定不同产地木瓜中 14 种酚类化合物含量, 结合相关性分析确定木瓜抗氧化活性的主要活性成分, 明确木瓜的抗氧化活性物质基础, 为木瓜的质量控制与资源开发提供科学依据。

关键词: 木瓜; 液相色谱-串联质谱法; 酚类化合物; 含量; 抗氧化活性; “量-效”关系

文章编号: 1673-9078(2025)08-286-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0760

LC-MS/MS Determination of Contents of 14 Phenolic Compounds and Analysis of Antioxidant Activity of *Chaenomeles fructus* from Different Regions

XIAO Xin¹, LONG Fu², LI Zhirong¹, WANG Luwei³, ZHOU Endie³, CHUN Zeli^{1*}, CHEN Rongxiang^{1*}

(1. Institute of Life Sciences, Zunyi Medical University; Zunyi Engineering Technology Research Center of Physical and Chemical Analysis, Zunyi 563000, China) (2. School of Public Health, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

引文格式:

肖欣, 龙富, 李志荣, 等. LC-MS/MS法同时测定不同产地木瓜中14种酚类成分含量及其抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2025, 41(8): 286-294.

XIAO Xin, LONG Fu, LI Zhirong, et al. LC-MS/MS determination of contents of 14 phenolic compounds and analysis of antioxidant activity of *Chaenomeles fructus* from different regions [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 286-294.

收稿日期: 2024-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760652); 贵州省卫健委科学技术基金项目 (gzwkj2024-275); 遵义医科大学市校联合基金项目 (遵市科合 HZ 字 (2023) 182 号); 遵义医科大学 2021 年度学术新苗培养及创新探索专项项目 (黔科平台人才 [2021]1350-018); 遵义医科大学大学生创新创业项目 (ZYDC202302187; ZYDC202301081)

作者简介: 肖欣 (1990-), 女, 学士, 实验师, 研究方向: 食品药品色谱分析, E-mail: 104321750@qq.com

通讯作者: 淳泽利 (1990-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 药用植物色谱分析, E-mail: chunzeli@163.com; 共同通讯作者: 陈荣祥 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品药品色谱分析, E-mail: chenrongxiang2014@163.com

(3. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract: A triple-quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry (TQ LC-MS/MS) method was established to determine the contents of 14 phenolic compounds in *Chaenomeles fructus* grown in different regions. Its antioxidant activity was subsequently assessed by measuring the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) radical scavenging capacity, and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The content-effect relationships between the contents of various phenolic compounds and antioxidant activity were analyzed by grey relational analysis to explore the substance basis of the antioxidant activity of *Chaenomeles fructus*. The results indicated that the chlorogenic acid content was the highest in all 18 types of samples of *Chaenomeles fructus* grown in different regions, ranging from 1 479.68 to 4 902.39 $\mu\text{g/g}$. A total phenolic content (TPC) of up to 37.13 mg GAE/g was detected in the plant extracts. The DPPH radical scavenging capacities, ABTS⁺ radical scavenging capacities, and FRAPs of the samples were in the ranges of 10.13%~74.66%, 26.37%~79.44%, and 43.56~132.53 mg TE/g, respectively. The correlation coefficient between TPC and antioxidant activity was >0.91 . An analysis of the content-effect relationships revealed that eight phenolic compounds, including chlorogenic acid, protocatechuic acid, catechin, and neochlorogenic acid, contributed most to antioxidant activity. The TQ LC-MS/MS method developed in this study enabled accurate determination of the contents of 14 phenolic compounds in *Chaenomeles fructus* grown in different regions. Through correlation analysis, the primary active components contributing to antioxidant activity were determined, and the substance basis of the antioxidant activity of *Chaenomeles fructus* was elucidated. The results of this study can serve as a scientific reference for quality control and resource development of *Chaenomeles fructus*.

Key words: *Chaenomeles fructus*; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; phenolic compounds; content; antioxidant activity; content-effect relationship

木瓜为蔷薇科木瓜海棠属植物贴梗海棠 (*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai) 的近成熟果实, 在中国具有悠久的种植历史, 主要产于云南、贵州、四川、安徽和重庆等地^[1]。木瓜作为药食两用资源, 具有舒筋活络, 和胃化湿的功效^[2-4]。作为药用资源, 木瓜具有抗病原微生物、抗氧化、抗肿瘤、免疫抑制等多种药理作用^[5-10]; 作为食用资源, 在西南地区, 人们常将木瓜用于生产果汁、膳食纤维和果脯等^[11,12]。

酚类化合物是一类基于苯环的多羟基化合物, 在木瓜中含量非常丰富^[13-15], 常见的酚类化合物有酚酸、黄酮、木质素等^[16], 这类化合物的芳环上连有多个酚羟基, 易与自由基发生抽氢反应而产生较稳定的半醌自由基来终止链式反应, 从而产生抗氧化作用^[17]。酚类化合物作为植物抗氧化的主要来源, 具有较强的还原能力和自由基清除能力^[18]。目前对木瓜中酚类成分与抗氧化活性进一步分析的研究较少, 现阶段对木瓜中酚类化合物的研究主要集中在少数化学成分测定^[19,20]或单独研究木瓜抗氧化^[21,22]等药理活性, 并未将两者联系起来。因木瓜中酚类化合物种类多且复杂, 液相色谱-

串联质谱法 (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 法可准确测定木瓜中各目标化合物的含量, 同时通过“量-效”关系的研究可以进一步分析含量与抗氧化活性之间的关系, 明确木瓜中主要抗氧化活性组分, 为提高木瓜质量控制水平和药效物质基础研究提供数据支持。相较于传统的检测方法, 如液相色谱-紫外检测法或二极管阵列检测法, LC-MS/MS 具有灵敏度高、选择性强、分析时间短等优点, LC-MS/MS 现已被广泛应用于各种复杂化合物的分析, 且定量限可达纳克级^[23-26], 能有效可靠地测定天然产物中的酚酸、黄酮类抗氧化活性成分的含量。

该研究通过建立 LC-MS/MS 法对不同产地木瓜中 14 种酚类化合物的含量进行定量分析, 同时采用 ABTS⁺、DPPH 自由基清除能力和铁离子还原能力对木瓜的体外抗氧化活性进行评价, 并进一步采用多元统计分析 14 种酚类化合物含量测定结果与体外抗氧化作用的“量-效”关系, 明确木瓜抗氧化的主要化学成分, 探究木瓜的抗氧化活性物质基础, 为木瓜的质量控制与资源开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 样品来源

木瓜样品为近成熟的新鲜木瓜果实，分别采集自云南、河南、贵州、四川、安徽等5个省份，经遵义医科大学孟令杰博士鉴定为贴梗海棠（*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai）的近成熟果实，其来源信息见表1。

表 1 18批木瓜样品信息

Table 1 Information of 18 batches of *Chaenomeles fructus*

样品编号	产地	采样时间
S1	河南省南阳市	2022.10
S2	云南省临沧市	2022.11
S3	云南省玉溪市	2022.10
S4	贵州省遵义市	2022.09
S5	云南省德宏州	2022.09
S6	安徽省宣城市	2022.11
S7	云南省临沧市	2022.09
S8	云南省昭通市	2022.10
S9	云南省昆明市	2022.10
S10	云南省临沧市	2022.09
S11	云南省保山市	2022.10
S12	云南省昭通市	2022.11
S13	云南省昆明市	2022.09
S14	贵州省遵义市	2022.10
S15	贵州省遵义市	2022.10
S16	四川省广元市	2022.11
S17	河南省平顶山市	2022.10
S18	云南省昭通市	2022.11

1.1.2 主要试剂

没食子酸、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对香豆酸、芦丁、木犀草苷、对羟基苯甲酸、根皮苷，上海阿拉丁有限公司；异槲皮苷、儿茶素（所有对照品的纯度≥98%），上海普迈公司；2,2'-联氮-双-3-乙基笨并噻唑啉-6-磺酸（ABTS）、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）分析纯，上海阿拉丁公司；乙腈，LC-MS级，霍尼韦尔公司；甲酸，LC-MS级，上海麦克林公司；室

验用水，超纯水，实验室自制；其余试剂为分析纯。

1.1.3 主要仪器设备

ACQUITY UPLC I-Class-Xevo TQ-s 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱仪，配备 MassLynx V4.1 数据处理系统及电喷雾离子源（ESI），美国 Waters 公司；Purelab Chorus 纯水及超纯水系统，英国 ELGA 公司；1510 型酶标仪，美国 Thermo Fisher 公司；Microfuge 20 高速离心机，Beckman 公司；ME104E/02 万分之一电子天平，梅特勒-托利多；SB-800DTD 超声波清洗机，宁波新芝。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备

新鲜木瓜样品切成厚度约为 2.5 mm 的薄片，置 45 ℃电热鼓风干燥箱中烘干，干燥后的样品粉碎后过 60 目筛，得样品粉末。精密称取木瓜样品粉末 0.5 g，加入 20 mL 60%（V/V）乙醇溶液，超声辅助提取 40 min 后，离心（12 000 r/min）10 min，上清液用 0.22 μm 滤膜过滤，得供试品溶液。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、原儿茶酸、没食子酸、新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对香豆酸、芦丁、木犀草苷、槲皮苷、对羟基苯甲酸、根皮苷、异槲皮苷、儿茶素对照品适量，加甲醇溶解并定容，混合均匀，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液，置 -20 ℃冰箱中保存备用。

1.2.3 LC-MS/MS条件

1.2.3.1 色谱条件

色谱柱：以 ACQUITY UPLC BEH_{C18}（2.1×100 mm，1.7 μm）色谱柱为固定相，0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B）为流动相，梯度洗脱（洗脱程序：0~5 min，5%~30% B；5~8 min，30%~90% B；8~9 min，90% B；9~9.5 min，90%~5% B；9.5~12 min，5% B）；流量：0.4 mL/min；柱温：40 ℃；进样量：1 μL。

1.2.3.2 质谱条件

XEVO TQ-s 系统，电喷雾离子源（ESI），负离子模式，多反应监测模式（MRM）检测；毛细管电压 3.0 kV；脱溶剂气的温度 500 ℃；脱溶剂气（N₂）体积流量为 750 L/Hr，离子源的温度 150 ℃，锥孔气（N₂）体积流量为 150 L/Hr。

1.2.4 木瓜抗氧化能力测定

1.2.4.1 DPPH 自由基清除率试验

参考文献^[27], 并稍加修改。称取 DPPH 2.5 mg 溶于 25 mL 甲醇中, 配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的 DPPH 工作溶液。实验组: 按“1.2.1”制备 25 mg/mL 木瓜样品溶液, 样品溶液在 519 nm 波长下测定无吸光度值, 将其稀释 20 倍后取 70 μ L, 加入 430 μ L 60% (V/V) 乙醇和 1 mL 上述 DPPH 工作液, 混匀静置暗反应 30 min 后于 519 nm 波长下测定样品吸光度值, 记为 A_1 ; 空白组: 以 60% (V/V) 的乙醇代替实验组中稀释后的样品溶液并测定空白样品吸光度, 记为 A_0 。自由基清除率的计算:

$$C = (1 - \frac{A_1}{A_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C ——自由基清除率, %;

A_1 ——加入样品溶液后的所测吸光度值 (实验组);

A_0 ——加入 60% 甲醇代替样品溶液所测定的吸光度值 (空白组)。

1.2.4.2 ABTS⁺ 自由基清除率试验

参考文献^[27], ABTS 工作液配制: 取质量浓度分别为 0.67 mg/mL $K_2S_2O_8$ 水溶液与 3.75 mg/mL ABTS 水溶液, 等比例混合均匀, 避光保存 10 h 后采用 60% (V/V) 的甲醇稀释上述混合液, 直至稀释后的混合液在波长 734 nm 处吸光度在 0.702 ± 0.018 范围, 即得。实验组: 将木瓜样品溶液稀释 10 倍后取 30 μ L, 依次加入 60% (V/V) 乙醇 170 μ L、ABTS 工作液 800 μ L, 混匀静置暗反应 30 min 后于 734 nm 波长下测定吸光度, 记为 A_1 ; 空白组: 以 60% (V/V) 的乙醇代替实验组中稀释后的样品溶液并测定空白样品吸光度, 记为 A_0 。按“1.2.4.1”项下公式计算 ABTS⁺ 自由基清除率 C 。

1.2.4.3 铁离子还原能力试验

参考文献^[27], 并稍加修改, 分别配制质量浓度为 5 mg/mL $FeCl_3$ 水溶液、3 mg/mL TPTZ 溶液、40 mg/mL 醋酸钠缓冲液 (pH 值 3.6), 并按 1:1:10 的比例混合均匀, 既得 TPTZ 工作液。实验组: 吸取稀释 100 倍的木瓜样品溶液 10 μ L, 加入 90 μ L 60% (V/V) 乙醇和 TPTZ 工作液 300 μ L, 混匀静置暗反应 30 min 后, 在 595 nm 波长下测定吸光度值 A 。以不同质量浓度 (mg/L) 的 Trolox 标准溶液为横坐标 X , 吸光度值 (A) 为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 线性回归方程和相关系数分别为 $Y=0.1129X+0.0811$

和 $R=0.9999$, 木瓜的铁离子还原能力以 Trolox 当量 (mg TE/g) 折算。

1.2.5 总酚含量 (Total Phenolics Content, TPC) 测定

采用福林酚法测定总酚含量。取木瓜样品溶液 50 μ L, 加 60% (V/V) 的乙醇溶液稀释 15 倍, 加入 0.25 mol/L 的福林酚试剂 500 μ L, 混合均匀, 静置几分钟后加入 15% Na_2CO_3 (m/V) 溶液 500 μ L 混匀, 置暗处静置反应 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液于 760 nm 波长下测定吸光度。以不同质量浓度 (mg/L) 梯度的没食子酸标准溶液为横坐标 X , 以浓度所对应的吸光度值 (A) 为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 线性回归方程和相关系数分别为 $Y=0.0111X-0.03549$ 和 $R=0.9978$, 木瓜的总酚含量以没食子酸当量 (mg GAE/g) 折算。

1.2.6 数据处理

采用 MassLynx V4.1 软件进行数据采集; Excel 软件进行数据统计分析; SPSS 软件对样品含量与 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺ 自由基清除率和铁离子还原能力之间的相关性进行 GRA 分析; Origin 软件进行图谱绘制。

2 结果与讨论

2.1 木瓜中14种酚类化合物质谱条件优化

利用三重四级杆质谱负离子扫描模式采集质谱图, 对木瓜中的主要化合物进行扫描, 以绿原酸为例, 其前体离子为 353.3 m/z , 进一步扫描得到它的碎片离子 191.1、179.1、161.1 m/z , 通过数据库比对, 初步推测为绿原酸或其异构体。经与对照品色谱峰保留时间比对, 最终确定这个化合物是绿原酸。以同样的方法最终确定 14 个特征峰, 分别为 1 号没食子酸、2 号原儿茶酸、3 号新绿原酸、4 号儿茶素、5 号对羟基苯甲酸、6 号绿原酸、7 号隐绿原酸、8 号咖啡酸、9 号对香豆酸、10 号芦丁、11 号异槲皮苷、12 号木犀草苷、13 号槲皮苷、14 号根皮苷, 各标准品的 LC-MS/MS 色谱图见图 1a, 木瓜样品 LC-MS/MS 色谱图见图 1b。MRM 模式可以减少干扰并提高灵敏度, 以各化合物响应最高的两个离子分别作为定量离子和定性离子, 进一步对 14 种酚类化合物的混合对照品溶液进行锥孔电压、碰撞能量等条件的优化, 得到最佳检测参数, 具体优化结果见表 2。

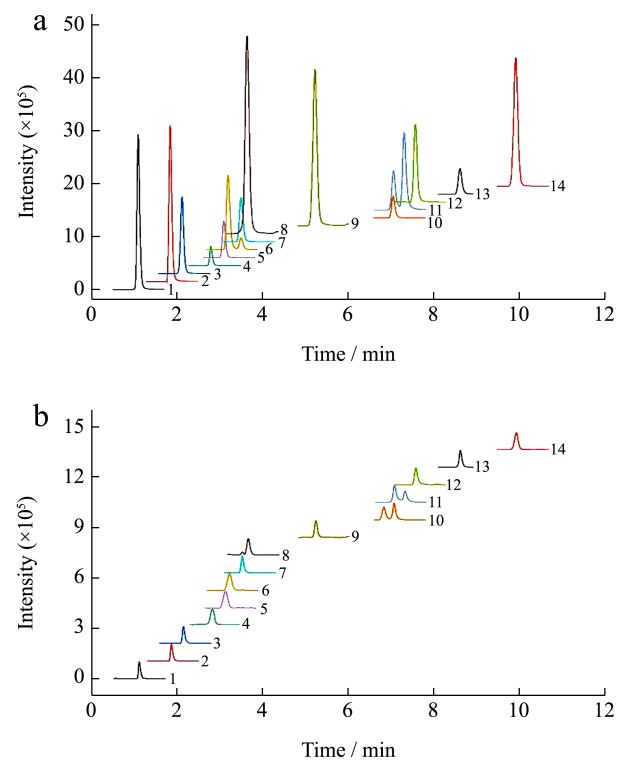


图 1 混合对照品溶液 (a) 和木瓜样品溶液 (b)
提取离子流色谱图

Fig.1 The extract ion chromatograms of mixed reference (a)
and testing sample (b)

注：1：没食子酸；2：原儿茶酸；3：新绿原酸；4：儿茶素；5：对羟基苯甲酸；6：绿原酸；7：隐绿原酸；8：咖啡酸；9：对香豆酸；10：芦丁；11：异槲皮苷；12：木犀草苷；13：槲皮苷；14：根皮苷。

表 2 14种酚类化合物质谱参数					
Table 2 Mass parameters of 14 phenolic compounds					
序号	化合物	母离子	子离子 (m/z)	锥孔电 压/V	碰撞能 量/V
1	没食子酸	168.7	125.1	30	12
2	原儿茶酸	153.1	109.1	30	12
3	新绿原酸	353.3	191.2	30	18
4	儿茶素	289.2	125.1	10	14
5	绿原酸	353.3	191.1	12	15
6	隐绿原酸	353.3	173.2	30	14
7	咖啡酸	179.1	135.1	38	16
8	对香豆酸	163.1	119.1	12	15
9	芦丁	609.6	300.3	30	35
10	异槲皮苷	463.4	300.2	40	20
11	木犀草苷	447.4	285.2	40	25
12	槲皮苷	447.3	301.3	30	20
13	对羟基苯甲酸	137.1	93.0	20	12
14	根皮苷	435.4	273.2	24	16

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系、检测限与定量限

精密吸取对照品储备液适量，逐级稀释，制备为 7 个不同质量浓度的对照品混合溶液，进样分析，以质量浓度 (μg/mL) 为横坐标 (X)，各对照品的峰面积 (A) 为纵坐标 (Y)，计算线性回归方程；以 S/N=3 计算检测限 (LOD)，以 S/N=10 计算定量限 (LOQ)。结果表明，14 种酚类化合物线性关系良好，相关系数 $R \geq 0.99$ ；14 种酚类化合物的 LOD 在 0.31~2.39 ng/mL 之间，LOQ 在 1.02~7.89 ng/mL 之间，结果见表 3。

2.2.2 精密度试验

取同一混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录各化合物峰面积，并计算其 RSD 值，结果见表 3；14 种酚类化合物 $RSD \leq 4.89\%$ ，表明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性试验

取同一产地木瓜样品，平行制备 6 份，进样分析，记录各化合物峰面积，并计算 14 种被测成分含量的 RSD 值，结果见表 3；14 种酚类化合物 $RSD \leq 5.89\%$ ，表明该方法重复性良好。

2.2.4 稳定性试验

取同一份供试品溶液，在 0、2、4、6、8、10、12 h 时进样分析，记录不同时间下各化合物峰面积，并计算其 RSD 值，结果见表 3；14 种酚类化合物 $RSD \leq 5.07\%$ ，表明木瓜样品溶液在 12 h 内的稳定性良好。

2.2.5 加样回收率试验

取同一批已知含量的木瓜样品粉末 3 份，每份约 0.5 g，按照 1:1 比例准确加入 14 种酚类化合物，按“1.2.1”项下方法制备供试品溶液，取供试品溶液进样量一半进样分析，考察回收率，结果见表 3；14 种酚类化合物的平均加样回收率在 90.47%~100.88% 范围内， $RSD \leq 7.97\%$ 。

2.3 样品含量测定

分别称取木瓜样品粉末，按“1.2.1”方法制备供试品溶液，进样分析，记录各化合物的峰面积，计算其含量，结果见表 4。由表 4 可知，18 批木瓜样品中，14 种酚类化合物的含量差异较大，总体来看，绿原酸含量最多，其含量在 1 479.68~4 902.39 μg/g 范围内。

将表 4 结果绘制成箱体图，结果见图 2，由图 2 可知，绿原酸含量最多，儿茶素、隐绿原酸、原儿茶酸、芦丁、异槲皮苷等次之，根皮苷、对香豆酸、咖啡酸等含量较少。不同产地木瓜样品中各酚类化合物的含量差异较大，如 S9 批中绿原酸、原儿茶酸的含量较 S6 批高 3 倍之多；S15 批中儿茶素的含量较 S5 批高 24 倍。不同产地、不同采收时间可影响木瓜样品中酚类化合物的含量。

表 3 方法学考察

Table 3 Method validation of the proposed method

序号	化合物	线性回归方程	线性范围 (μg/mL)	相关系数 R	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	平均加样 回收率/%	RSD/%			
								精密度	重复性	稳定性	回收率
1	没食子酸	Y=282 640.8X+3 431.9	0.1~10	0.999 8	0.47	1.55	95.22	0.83	3.43	3.96	2.90
2	原儿茶酸	Y=217 673.5X-71 098.8	0.5~50	0.998 9	0.72	2.38	97.40	1.95	1.77	3.00	4.38
3	新绿原酸	Y=198 684.5X+13 405.6	0.2~20	0.999 0	0.77	2.54	100.88	4.89	1.86	1.67	4.20
4	儿茶素	Y=98 508.6X-62 314.4	1.5~150	0.999 7	2.39	7.89	100.39	0.61	1.80	3.14	3.51
5	绿原酸	Y=272 888.7X+189 479.7	1.5~150	0.999 6	0.78	2.57	98.91	2.63	2.81	3.39	3.42
6	隐绿原酸	Y=154 049.3X-39 497.7	0.5~50	0.999 4	0.95	3.14	95.80	1.16	2.86	1.94	2.72
7	咖啡酸	Y=587 560.3X-9 828.2	0.05~5	0.998 6	0.31	1.02	97.56	3.23	3.46	5.07	4.90
8	对香豆酸	Y=347 543.1X+4 040	0.05~5	0.999 5	0.41	1.35	93.68	0.84	3.08	2.73	3.77
9	芦丁	Y=193 662.3X-26 617.4	0.5~50	0.999 8	0.85	2.81	92.62	3.29	3.72	4.57	3.03
10	异槲皮苷	Y=193 069.6X-12 987.9	0.5~50	0.999 8	0.67	2.21	90.47	2.96	3.49	2.88	5.28
11	木犀草苷	Y=218 758.7X-455.8	0.02~2	0.999 8	0.74	2.44	91.57	0.81	2.82	2.12	4.59
12	槲皮苷	Y=263 252.6X-1 496.2	0.02~2	0.998 8	0.56	1.85	93.02	0.55	4.75	4.44	2.42
13	对羟基苯甲酸	Y=84 927.7X-958.6	0.05~5	0.999 8	2.15	7.17	97.10	2.89	3.99	4.27	7.97
14	根皮苷	Y=165 709.6X-378.2	0.01~1	0.998 8	1.35	4.46	93.58	2.28	4.06	4.11	5.35

表 4 18批木瓜样品中14种酚类化合物的含量（μg/g）

Table 4 The contents of 14 phenolic compounds in 18 batches of *Chaenomeles fructus* (μg/g)

编号	没食子酸	原儿茶酸	新绿原酸	儿茶素	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	对香豆酸	芦丁	异槲皮苷	木犀草苷	槲皮苷	对羟基苯甲酸	根皮苷
S1	8.71	290.86	154.63	1 209.21	3 500.81	138.72	4.77	2.89	1246.52	124.43	30.52	36.53	6.37	5.35
S2	16.74	352.21	125.62	704.26	2 853.07	978.09	7.89	8.41	37.67	21.89	6.95	2.83	7.94	2.57
S3	30.66	369.97	158.25	561.03	1 855.89	203.12	22.64	6.73	78.09	110.42	10.91	20.02	17.85	28.38
S4	17.87	299.33	16.38	3 287.25	1 826.03	82.34	9.39	10.32	356.72	935.14	15.38	3.16	114.26	3.02
S5	23.72	177.86	140.11	155.89	3 435.65	670.43	62.21	40.07	61.56	36.39	6.44	2.94	101.09	2.36
S6	8.08	174.90	192.93	1 100.84	1 479.68	40.09	7.98	4.15	125.86	36.73	24.57	16.26	14.24	2.17
S7	22.83	495.25	157.17	570.90	2 906.22	1 226.21	10.09	6.93	45.73	32.89	5.34	1.73	5.23	0.74
S8	25.76	368.98	104.78	616.21	3 010.81	919.42	9.88	6.36	128.36	36.82	7.55	31.68	7.74	1.63
S9	23.33	514.14	161.34	1 597.17	4 902.39	1 206.55	7.73	7.99	64.51	24.31	6.37	1.86	4.97	0.64
S10	12.54	265.86	155.57	681.83	2 738.45	1 384.35	9.96	5.23	40.79	15.14	6.35	1.90	6.39	0.66
S11	178.60	721.63	15.83	762.70	4 487.07	54.78	18.58	19.47	885.10	752.95	3.87	1.95	11.72	19.98
S12	8.73	167.09	75.71	349.73	2 686.44	601.07	6.57	3.05	41.12	16.86	2.44	1.93	3.38	2.26
S13	43.56	529.67	178.82	362.38	3 473.21	1 130.86	12.43	5.28	49.76	59.97	8.72	6.15	18.24	1.14
S14	9.50	187.24	15.29	2769.29	1 982.33	46.12	8.22	7.19	172.13	84.73	9.55	1.90	18.64	6.75
S15	30.49	276.47	33.21	3 724.82	4 718.17	44.25	10.19	5.13	136.85	215.77	13.84	15.64	23.36	5.37
S16	150.42	562.93	93.55	1 165.71	4 600.74	1 106.19	12.15	9.65	73.36	30.35	7.53	2.63	6.59	1.39
S17	26.67	348.17	436.16	1 260.65	3 780.25	71.62	7.74	3.09	1 008.42	115.58	33.49	38.46	6.87	3.14
S18	23.42	247.78	36.78	617.06	2526.40	47.91	12.83	7.53	564.55	138.19	15.47	20.64	41.26	2.53

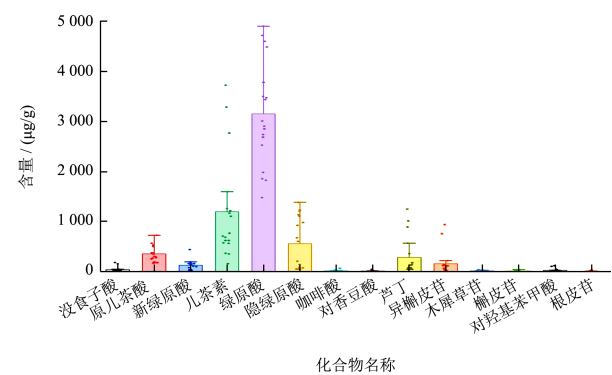


图2 木瓜中 14 种酚类化合物含量分布图

Fig.2 The contents and scattered dots of 14 phenolic compounds in *Chaenomeles fructus*

表 5 18批木瓜样品总酚含量和抗氧化活性结果
Table 5 The total phenolic content and antioxidant activity in 18 batches of *Chaenomeles fructus* (n=3)

编号	总酚 TPC/ (mg GAE/g)	DPPH 自由 基清除率/%	ABTS ⁺ 自由 基清除率/%	FRAP/ (mg TE/g)
S1	33.73 ± 0.78	71.80 ± 3.31	64.42 ± 2.92	94.53 ± 1.93
S2	21.72 ± 0.63	23.31 ± 1.21	38.15 ± 0.05	75.75 ± 1.47
S3	10.37 ± 0.47	10.13 ± 0.39	26.37 ± 1.07	43.56 ± 0.50
S4	29.71 ± 0.68	61.22 ± 1.96	46.39 ± 0.31	96.29 ± 1.17
S5	17.05 ± 1.06	35.83 ± 0.68	39.22 ± 1.15	79.52 ± 2.34
S6	19.68 ± 1.24	20.98 ± 0.81	38.01 ± 0.31	76.53 ± 0.70
S7	18.52 ± 1.30	30.22 ± 0.51	39.43 ± 1.02	63.43 ± 0.91
S8	28.25 ± 0.99	62.82 ± 2.21	52.96 ± 1.47	91.57 ± 1.66
S9	37.13 ± 0.51	74.66 ± 2.71	79.44 ± 2.94	132.53 ± 3.28
S10	24.59 ± 0.78	33.45 ± 0.64	36.22 ± 0.83	76.65 ± 0.96
S11	22.51 ± 1.31	31.40 ± 0.55	36.33 ± 1.24	84.36 ± 1.42
S12	24.34 ± 0.43	38.02 ± 0.88	44.70 ± 1.40	79.52 ± 1.37
S13	33.73 ± 1.66	69.63 ± 3.35	59.56 ± 2.53	100.53 ± 2.88
S14	32.70 ± 0.69	69.91 ± 2.32	60.34 ± 1.97	107.90 ± 1.93
S15	34.56 ± 1.91	69.43 ± 1.39	53.33 ± 0.97	106.57 ± 3.33
S16	30.22 ± 0.51	54.46 ± 1.97	46.03 ± 0.61	90.58 ± 1.58
S17	36.21 ± 1.75	73.48 ± 1.49	64.75 ± 2.33	121.42 ± 3.49
S18	11.14 ± 0.32	12.43 ± 0.39	27.82 ± 0.87	51.77 ± 0.37

2.4 总酚含量及抗氧化活性测定

总酚含量和体外抗氧化活性测定采取平均值±标准偏差代表其含量，每个样品平行测定三次取平均值，结果见表 5。18 批木瓜样品总酚含量在 10.37~37.13 mg GAE/g 范围内，DPPH 自由基清除率为 10.13%~74.66%，ABTS⁺ 自由基清除率为

26.37%~79.44%，FRAP 值在 43.56~132.53 mg TE/g 之间。由表 5 可知，不同批次木瓜样品总酚含量和体外抗氧化活性能力差异较大，其中，总酚含量较多、抗氧化活性能力最好的是 S9 批，总酚含量较少、抗氧化活性能力较差的是 S3 批。

木瓜样品的总酚含量与 FRAP 值、DPPH 自由基清除率、ABTS⁺ 自由基清除率分别进行线性拟合分析，相关系数 (R) 分别为 0.95、0.91、0.94，各参数之间的线性相关系数见表 6，结果表明木瓜样品总酚含量与体外抗氧化活性间有显著的相关性，同时说明本实验所测 14 种酚类化合物是木瓜具有抗氧化作用的重要组成成分。

表 6 木瓜中总酚含量与抗氧化活性之间的相关性
Table 6 Correlation between TPC and antioxidant activity of *Chaenomeles fructus*

指标	总酚 含量 (TPC)	DPPH 自 由基清 除率	ABTS ⁺ 自由基 清除率	FRAP
总酚含量	1.00	0.95	0.91	0.94
DPPH 自由基清除率	—	1.00	0.92	0.91
ABTS ⁺ 自由基清除率	—	—	1.00	0.92
FRAP	—	—	—	1.00

2.5 多元统计分析

2.5.1 聚类分析

以 18 批木瓜中 14 种酚类化合物的含量为变量导入 Origin 软件得聚类热图，见图 3。采集自不同地区的 18 批木瓜样品可分为 2 个大类，3 个小类，其中第一大类样品为 S4、S14 和 S15 共 3 批样品，这 3 批样品均采集自贵州省遵义市，其余 15 批样品分为第二大类。第二大类样品又分为两个小类，第一小类为 S2、S8、S7、S10、S12、S5、S13、S3、S6、S18 共 10 批样品，这 10 批样品除 S6 批采集自安徽宣城外，其余 9 批均采至云南；第二小类为 S1、S7、S11、S9、S16 共 5 批样品，这 5 批样品采集自四川、河南、云南等地，产地较为分散；以成分种类为目标的聚类中 14 种酚类物质含量最高的绿原酸聚为一大类，儿茶素和其他 12 种含量相对较低的酚类物质成分聚为一大类，其中没食子酸、咖啡酸、对香豆酸、根皮苷、木犀草苷、槲皮苷聚为一类。由此可以看出，样品间的相似性与产地有一定相关性，这可能与当地土壤、光照、气候、微生物等息息相关。

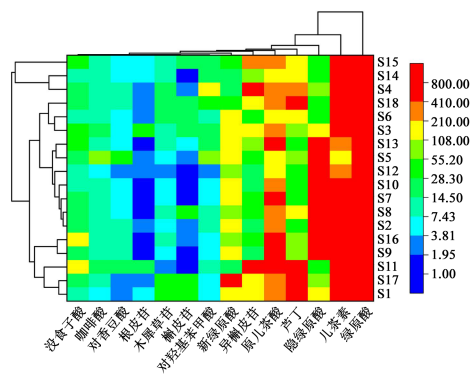


图 3 木瓜中 14 种酚类化合物定量测定结果聚类热图

Fig.3 Heat map of the 14 phenolic components in *Chaenomeles fructus*

2.5.2 灰色关联度分析

将木瓜提取物的抗氧化活性与其 14 种酚类化合物进行灰色关联度分析，抗氧化活性与不同化合物的关联度采用均值法计算，根据绝对差值及最大、最小绝对差值，通过下式计算灰色关联度：

$$\eta(k)=(\min\min|Y_0(k)-Y_i(k)|+\rho\max\max|Y_0(k)-Y_i(k)|)/(|Y_0(k)-Y_i(k)|+\rho\max\max|Y_0(k)-Y_i(k)|)$$

(2)

式中：

- k ——样品编号；
- ρ ——分辨系数，本实验中 ρ 取 0.5；
- $Y_0(k)$ ——不同木瓜样品抗氧化指标；
- $Y_i(k)$ ——不同木瓜样品各特征峰峰面积归一化数值；
- $\min\min|Y_0(k)-Y_i(k)|$ ——绝对差值的最小值；
- $\max\max|Y_0(k)-Y_i(k)|$ ——绝对差值的最大值。

表 7 关联度结果

Table 7 Correlation results

化合物	DPPH 自由基清除率	ABTS ⁺ 自由基清除率	FRAP 值	平均关联度	排名
绿原酸	0.89	0.91	0.93	0.91	1
原儿茶酸	0.86	0.88	0.88	0.87	2
儿茶素	0.85	0.85	0.86	0.85	3
新绿原酸	0.82	0.88	0.83	0.83	4
木犀草苷	0.83	0.83	0.83	0.83	5
对香豆酸	0.83	0.83	0.84	0.83	6
咖啡酸	0.83	0.83	0.83	0.82	7
没食子酸	0.80	0.80	0.80	0.80	8
根皮苷	0.78	0.78	0.78	0.79	9
隐绿原酸	0.78	0.77	0.77	0.77	10
对羟基苯甲酸	0.76	0.77	0.77	0.77	11
异槲皮苷	0.76	0.75	0.76	0.76	12
芦丁	0.76	0.74	0.75	0.75	13
槲皮苷	0.75	0.74	0.74	0.75	14

结果见表 7，通常认为关联度越大，其化学成分的抗氧化活性越强，当关联度值>0.6 时，认为化合物与抗氧化活性之间具有相关性；当关联度值≥0.8 时，认为相关性较强^[28]。由表 7 可知，14 种酚类化合物的平均关联度值均>0.6，与木瓜的抗氧化活性具有一定相关性，其中绿原酸、原儿茶酸、儿茶素、新绿原酸、木犀草苷、对香豆酸、咖啡酸、没食子酸的平均关联度值均≥0.8，提示这 8 种化合物为发挥木瓜抗氧化活性的关键成分。

3 结论

综上所述，本研究通过考察线性关系、精密度、重复性、稳定性、加样回收率等，建立了同时测定木瓜样品中 14 种酚类化合物含量的 LC-MS/MS 检测方法，该方法选择性强、灵敏度高，能快速准确测定木瓜中的绿原酸、儿茶素、新绿原酸、原儿茶酸、芦丁等 14 种酚类化合物的含量。通过测定不同产地 18 批木瓜样品的总酚含量及体外抗氧化活性，表明总酚含量与 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力、FRAP 间呈显著性相关。聚类热图表明，样品间的相似性与产地有一定相关性，这可能与当地土壤、光照、气候、微生物等息息相关；GRA 分析结果表明，14 种酚类化合物与木瓜的抗氧化活性具有一定相关性，其中绿原酸、原儿茶酸、儿茶素、新绿原酸等 8 种化合物为发挥木瓜抗氧化活性的关键成分，本研究可为木瓜的质量控制与资源开发提供科学依据。

参考文献

[1] 陈亚楠,毛运芝,冉慧,等.不同地方品种皱皮木瓜有机酸检测与差异分析[J].果树学报,2019,36(9):1171-1184.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.

[3] 赵志国,井凤,张敏敏,等.西藏木瓜HPLC指纹图谱研究及多成分测定[J].中草药,2018,49(10):2454-2459.

[4] 张玲,李宗金,张亚莉,等.木瓜“酸味”与有机酸成分的相关性研究[J].中成药,2023,45(2):476-482.

[5] WANG Z J, JIN D N, ZHOU Y, et al. Bioactivity ingredients of *Chaenomeles speciosa* against microbes: characterization by LC-MS and activity evaluation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69 (16): 4686-4696.

[6] TURKIEWICZ I P, WOJDYLO A, TKACZ K, et al. ABTS on-line antioxidant, α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase, acetyl and butyrylcholinesterase inhibition activity of *Chaenomeles fruits* determined by polyphenols and other

- chemical compounds [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(1): 60.
- [7] HUANG D D, JIANG S G, DU Z N, et al. Analgesic and anti-arthritic activities of polysaccharides in *Chaenomeles speciosa* [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 744915.
- [8] 李聪,熊海容,彭晓蔓,等.木瓜提取物对小鼠脂肪肝的保护作用[J].现代食品科技,2018,34(7):28-34.
- [9] MIAO J, LI X, ZHAO C C, et al. Solvents effect on active chemicals and activities of antioxidant, anti-alpha-glucosidase and inhibit effect on smooth muscle contraction of isolated rat jejunum of *Chaenomeles speciosa* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40(1): 146-155.
- [10] XIE X F, ZOU G L, LI C H. Antitumor and immunomodulatory activities of a water-soluble polysaccharide from *Chaenomeles speciosa* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132: 323-329.
- [11] TURKIEWICZ I P, WOJDYLO A, LECH K, et al. Influence of different drying methods on the quality of *Japanese* quince fruit [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 114: 108416.
- [12] SITI R R, ONG W L, AINA N Z, et al. Effects of acidified blanching water and pectinase enzyme pretreatments on physicochemical properties and antioxidant capacity of *Carica papaya* juice [J]. *Journal of Food Science*, 2022, 87(4): 1684-1695.
- [13] 邹妍,鄢海燕.中药木瓜的化学成分和药理活性研究进展[J].国际药学研究杂志,2019,46(7):507-515.
- [14] XU R L, KUANG M T, LI N. Hytochemistry and pharmacology of plants in the genus *Chaenomeles* [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2023, 46(11-12): 825-854.
- [15] 张琪,李智,杜俊辉,等.木瓜化学成分、生物活性及其应用研究进展[J].食品研究与开发,2023,44(19):180-188.
- [16] 田富林,黄文晶,王展,等.植物多酚提取研究进展[J].食品与机械,2020,36(9):211-216.
- [17] 裴河欢,张美凤,覃洋琛,等.多酚类化合物药理作用研究进展[J].中国药业,2022,31(23):124-127.
- [18] DI L C, COLOMBO F, BIELLA S, et al. Polyphenols and human health: The role of bioavailability [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 30.
- [19] 何积芬,黄国健,符滇海,等.HPLC法同时测定野木瓜片中木通苯乙醇苷B和绿原酸的含量[J].中国药品标准,2024, 25(1):90-93.
- [20] 胡丹,张亚莉,喻格,等.基于高效液相色谱法结合化学计量学分析宣木瓜和资丘木瓜三萜酸成分的差异[J].中国新药与临床药理,2022,33(12):1694-1700.
- [21] 赵珂,程守前,刘小双,等.番木瓜叶多酚提取工艺的优化及抗氧化活性研究[J].食品与药品,2023,25(2):109-114.
- [22] 谢华松,魏爱红,邹玉冰,等.钝药野木瓜果实的抗氧化及体外降血糖活性研究[J].中国药业,2023,32(6):42-46.
- [23] XIA J X, ZHAO B B, ZAN J F, et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Artemisiae argyi* Folium by HPLC-MS/MS and discovery of antioxidant ingredients based on relevance analysis [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 175: 112734.
- [24] ZHANG G X Z, ZHANG N, DONG L H, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantitative determination of contezolid in human plasma and cerebrospinal fluid [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 16(1): 32.
- [25] KIS S Y, KIS H S, CHEONG J C, et al. LC-MS-MS determination of 25 antipsychotic drugs and metabolites in urine for medication compliance monitoring [J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2020, 44(8): 784-796.
- [26] LU D Y, WANG Z P, GAO S H, et al. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of the active component K6 in serum of patients with depression [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 213: 114691.
- [27] ZHANG P, CHUN Z L, SHAO Q J, et al. Valuation of the phytochemicals and antioxidant activity of *Lophatherum gracile* Brongn based on chemical fingerprinting by HPLC with electro chemical detection [J]. *Journal of Separation Science*, 2021, 44(20): 3777-3788.
- [28] 罗敏,何婷,龚磊,等.夏枯草中16种酚类化合物含量的测定及其与抗氧化活性的相关性分析[J].食品工业科技, 2023,11(1):299-306.