

HPLC-DPPH法评价雪松松针抗氧化活性成分^Δ

戴晓雁*, 沈薇, 张燕, 赵艳萍(甘肃省肿瘤医院药学部, 兰州 730050)

中图分类号 R917;R284;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)16-1998-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.16.10



摘要 目的 评价雪松松针抗氧化活性成分。方法 以维生素C(VC)和没食子酸为阳性对照,采用高效液相色谱(HPLC)法测定1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)溶液加入雪松松针抗氧化活性成分后DPPH峰面积的衰减情况,并通过计算DPPH自由基的清除率和半数抑制浓度(IC₅₀),来评价雪松松针3种有效部位及8个单体成分的抗氧化活性。采用Agilent Eclipse Plus-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,乙腈-水(62:38, V/V)为流动相;检测波长为517 nm;流速为1.0 mL/min;柱温为25 °C;进样量为20 μL。结果 雪松松针各有效部位清除DPPH自由基活性的能力大小依次为总黄酮>总多酚>总木脂素, IC₅₀分别为76.10、100.50、115.40 μg/mL。与阳性对照比较,除山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖苷外,7个单体化合物清除DPPH自由基活性的能力大小依次为二氢杨梅素>金丝桃苷>原儿茶酸>没食子酸>阿魏酸>杨梅素>山柰酚-3-O-(6''-O-E-阿魏酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷>VC>异鼠李素, IC₅₀分别为16.50、19.40、23.73、27.24、32.10、32.20、47.60、93.20、297.20 μg/mL。结论 建立了HPLC-DPPH法用于评价雪松松针抗氧化活性;雪松松针具有较强的抗氧化活性,其中有效部位总黄酮、总多酚及单体成分二氢杨梅素、金丝桃苷等是具有开发前景的天然抗氧化剂。

关键词 雪松松针;抗氧化活性;有效部位;化学成分;HPLC-DPPH

Evaluation of antioxidant activity compounds extracted from the pine needle of *Cedrus deodara* by HPLC-DPPH screening method

DAI Xiaoyan, SHEN Wei, ZHANG Yan, ZHAO Yanping (Dept. of Pharmacy, Gansu Provincial Cancer Hospital, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To evaluate the antioxidant activity compounds extracted from the pine needle of *Cedrus deodara*. **METHODS** Using vitamin C (VC) and gallic acid as positive control, HPLC method was employed to determine the changes of the DPPH peak area after antioxidant compounds from pine needle of *C. deodara* were treated with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH). Then, the antioxidant activities of 3 active parts and 8 monomer compositions from pine needle of *C. deodara* were evaluated by calculating the inhibition rate of DPPH free radicals and the half inhibitory concentration (IC₅₀). HPLC conditions were using Agilent Eclipse Plus-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (62:38, V/V) as the mobile phase. The detection wavelength was 517 nm; the flow rate was 1.0 mL/min; the column temperature was 25 °C; the injection volume was 20 μL. **RESULTS** The order of DPPH free radical inhibition activity of active parts from pine needle of *C. deodara* was total flavonoids>total polyphenols>total lignans, with IC₅₀ of 76.10, 100.50 and 115.40 μg/mL, respectively. Compared with positive control, except for kaempferol-3-O-β-D-glucoside, the sequence of seven monomer compounds for DPPH free radical inhibition activity was dihydromyricetin>hypericin>protocatechuic acid>gallic acid>ferulic acid>myricetin>kaempferol-3-O-(6''-O-E-feruloyl)-β-D-glucopyranoside>VC>isohamnin, with IC₅₀ of 16.50, 19.40, 23.73, 27.24, 32.10, 32.20, 47.60, 93.20 and 297.20 μg/mL, respectively. **CONCLUSIONS** HPLC-DPPH method is established to evaluate the antioxidant activity of pine needle of *C. deodara*. The pine needle of *C. deodara* has strong antioxidant activity, among which the effective compounds of total flavonoids, total polyphenols, monomer dihydromyricetin and hypericin are natural antioxidants with development prospects.

KEYWORDS pine needle of *Cedrus deodara*; antioxidant activity; effective fraction; chemical constituent; HPLC-DPPH

雪松 [*Cedrus deodara* (Roxb) G. Don] 是松科 (Pinaceae) 植物雪松属 (*Cedrus* Trew) 树种的泛称, 该属共有 4 种, 包括雪松 (*C. deodara*)、黎巴嫩雪松 (*C. libani*)、短叶雪松 (*C. brevifolia*) 和北非雪松 (*C. atlantica*), 分布在喜马拉雅山、亚洲西部、塞浦路斯及北非等地^[1]。其针叶药用

历史悠久, 主要化学成分为黄酮类、苯丙素类、有机酸类、甾体类、多糖类等, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗禽流感、抗菌及蚊虫毒杀等多种功效^[2]。文献报道, 雪松松针 50% 甲醇提取物分离得到的化合物 3-*p*-反式-香豆酰基-2-羟基奎尼酸、原儿茶酸、2*R*, 3*R*-二氢杨梅素、马尾苷 B、杨梅素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷是潜在的抗氧化剂, 具有对 1, 1-二苯基-2-苦肟基 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH) 自由基和 2, 2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 [2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolo-

^Δ 基金项目 甘肃省中医药重点科研项目 (No. GZKZ-2020-5); 甘肃省省级引导科技创新发展专项资金资助项目 (甘财科[2019]23号)

* 第一作者 副主任中药师。研究方向: 中药制剂研发与生产、抗肿瘤药物合理应用与药物警戒。E-mail: 897044276@qq.com

line-6-sulfonic acid), diammonium salt, ABTS] 自由基的清除能力及抗红细胞氧化的能力; 雪松松针提取物具有恢复抗氧化模型小鼠抗氧化酶活性及降低其肝脏匀浆中脂质过氧化水平的能力^[3], 提示雪松松针可以作为天然抗氧化剂。为了筛选雪松松针的抗氧化活性成分, 本试验采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)-DPPH法, 对从雪松松针中提取纯化得到的总多酚、总黄酮、总木脂素及8个单体成分的抗氧化活性进行评价, 以期对雪松松针的综合利用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), AE260 型万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), UV-240 型紫外分光光度计(日本岛津公司), CP225D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司), KQ2200B 型超声清洗仪器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 主要试剂与药材

DPPH(批号 STBH7099)购自美国 Sigma 公司; 没食子酸对照品(批号 110831-20083, 含量 >95%)购自中国食品药品检定研究院; 维生素 C(vitamin C, VC)(分析纯, 批号 20210818, 含量 >99.8%)购自国药集团化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。雪松松针于 2020 年 5 月采自兰州市市区, 原植物经甘肃省医学科学研究院石晓峰主任医师鉴定为雪松属植物雪松 [*C. deodara* (Roxb.) G. Don]。

2 方法与结果

2.1 供试品的制备

有效部位的制备: 采用课题组前期优选得到的提取、富集、纯化工艺条件^[4-6]制备雪松松针总多酚、总黄酮、总木脂素样品, 经低温干燥后进行含量测定。结果显示, 总多酚纯度为 36%(以没食子酸计), 总黄酮纯度为 54%(以芦丁计), 总木脂素纯度为 57%(以厚朴酚计)。

单体化合物的制备: 阿魏酸、金丝桃苷、杨梅素、二氢杨梅素、原儿茶酸、异鼠李素、山柰酚-3-*O*-(6''-*O*-*E*-阿魏酰基)- β -D-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷均由本课题组前期从雪松松针分离得到并经化学结构表征^[7-9]。

2.2 HPLC-DPPH 法评价雪松松针抗氧化活性的方法建立

2.2.1 DPPH 溶液的配制

精密称取 DPPH 10.0 mg, 用甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶中, 制成质量浓度为 0.4 mg/mL 的 DPPH 溶液(现配现用, 4 °C, 避光保存)。

2.2.2 对照品储备溶液的配制

精密称取 VC 和没食子酸各 10.0 mg, 分别用甲醇溶解后定容至 10 mL 容量瓶中, 制成质量浓度均为 1.0

mg/mL 的 VC 和没食子酸对照品储备溶液, 使用前稀释至适宜浓度。

2.2.3 检测波长的选择

吸取 DPPH 溶液, 采用紫外分光光度计进行全波长扫描。结果显示, 在 517 nm 波长处有最大吸收, 故将其作为测定波长。

2.2.4 色谱条件与系统适用性试验

采用 Agilent Eclipse Plus-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 以乙腈-水(62:38, *V/V*)为流动相; 检测波长为 517 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 进样量为 20 μ L。理论板数以 DPPH 计算不低于 4 000, 分离度不低于 1.5。

精密吸取质量浓度为 0.4 mg/mL 的 DPPH 溶液 200 μ L, 分别加入 200 μ L 甲醇和 200 μ L VC 对照品溶液(质量浓度为 50 μ g/mL)和雪松松针总多酚溶液 200 μ L(浓度为 50 μ g/mL)后混匀, 避光静置 30 min, 按以上色谱条件分别进样 20 μ L, 测定 DPPH 峰面积。结果显示, 加入 VC 对照品溶液后, DPPH 峰面积相应衰减, 而结合了抗氧剂 H 离子的 DPPH-H 峰面积有所增加。结果见图 1。

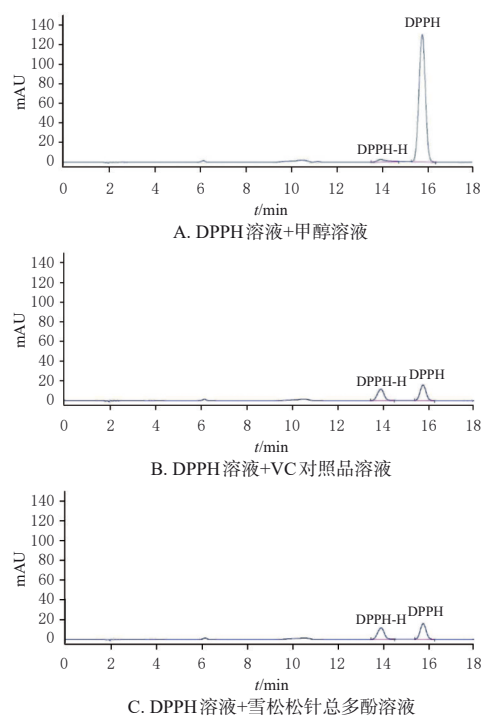


图 1 HPLC 图

2.2.5 线性关系考察

精密吸取 VC、没食子酸对照品储备液适量, 分别用甲醇稀释至系列浓度的 VC 和没食子酸对照品溶液。精密吸取质量浓度为 0.4 mg/mL 的 DPPH 溶液 200 μ L, 分别加入 200 μ L 不同浓度的上述 VC 和没食子酸对照品溶液, 混匀, 避光静置 30 min, 按“2.2.4”项下色谱条件分别进样 20 μ L, 测定 DPPH 峰面积, 计算清除率, 清除率(%) = $(PA_{\text{空白}} - PA_{\text{样品}}) / PA_{\text{空白}} \times 100\%$, 式中 $PA_{\text{空白}}$ 为反应前的 DPPH 峰面积, $PA_{\text{样品}}$ 为反应后的 DPPH 峰面积。以

清除率(Y)对各对照品溶液浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)进行线性回归,拟合得到对照品VC和没食子酸分别在6.25~50.00、25.00~175.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内的线性关系,回归方程及相关系数分别为: $Y=0.580\ 3X-4.081\ 7$ ($r=0.995\ 5$), $Y=1.977\ 4X-3.871\ 8$ ($r=0.997\ 2$)。用回归方程计算半数抑制浓度(IC_{50}),结果显示,对照品VC、没食子酸的 IC_{50} 分别为93.20、27.24 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 精密度试验

准确吸取质量浓度为0.4 mg/mL 的DPPH溶液200 μL ,加入200 μL VC溶液后混匀,避光静置30 min,按照“2.2.4”项下色谱条件进样20 μL ,测定DPPH峰面积;重复上述操作6次。结果显示,DPPH峰面积的RSD值为2.5% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验

准确吸取质量浓度为0.4 mg/mL 的DPPH溶液200 μL ,加入200 μL VC溶液后混匀,室温避光反应,分别于20、40、60、80、100、120 min时按照“2.2.4”项下色谱条件进样20 μL ,测定DPPH峰面积。结果显示,60 min内DPPH峰面积的RSD值为1.2%,120 min内RSD值为2.8%。为保证该实验的准确性,应在60 min内完成测定。

2.3 雪松松针有效部位及单体化合物抗氧化活性的评价

2.3.1 供试品溶液的制备

有效部位供试品溶液:精密称取低温干燥后的雪松总多酚、总黄酮、总木脂素粉末各10.0 mg ,分别用甲醇溶解后定容至10 mL容量瓶中,制成质量浓度为1.0 mg/mL 的总多酚、总黄酮、总木脂素供试品储备溶液。单体化合物供试品溶液:精密称取低温干燥后的8个单体化合物,即阿魏酸、金丝桃苷、杨梅素、二氢杨梅素、原儿茶酸、异鼠李素、山柰酚-3- O -(6"- O - E -阿魏酰基)- β -D-葡萄糖苷、山柰酚-3- O - β -D-葡萄糖苷各10.0 mg ,分别用甲醇溶解后定容至10 mL容量瓶中,制成质量浓度均为1.0 mg/mL 的单体供试品储备溶液。

2.3.2 各有效部位清除DPPH自由基的活性测定

参考预实验结果,将总多酚、总黄酮和总木脂素供试品储备液稀释至相应浓度。准确吸取质量浓度为0.4 mg/mL 的DPPH溶液200 μL ,分别加入200 μL 不同浓度的供试品溶液,混匀,避光静置30 min(准确计时),然后按照“2.2.4”项下色谱条件进样20 μL ,测定DPPH峰面积,计算清除率,每组实验重复3次,结果见图2。以清除率(Y)对供试品溶液浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)进行线性回归,拟合得到回归方程,经计算得到雪松松针总多酚、总黄酮和总木脂素的 IC_{50} 分别为100.50、76.10、115.40 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明,雪松松针各有效部位对DPPH自由基均具有很好的清除能力,清除能力大小依次为总黄酮>总多酚>总木脂素。雪松松针总多酚、总黄酮与VC($\text{IC}_{50}=93.20\ \mu\text{g/mL}$)的抗氧化能力相当,但均弱于没食子酸($\text{IC}_{50}=27.24\ \mu\text{g/mL}$)。

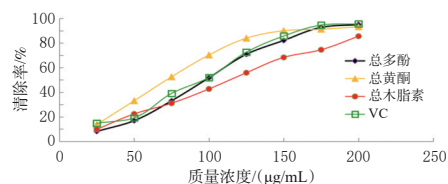


图2 各有效部位对DPPH自由基的清除能力($n=3$)

2.3.3 各单体化合物清除DPPH自由基的活性测定

参考预实验结果,将8个单体化合物供试品储备液稀释至相应浓度。准确量取质量浓度为0.4 mg/mL 的DPPH溶液200 μL ,分别加入200 μL 不同浓度的供试品溶液,混匀,避光静置30 min(准确计时),然后按照“2.2.4”项下色谱条件进样20 μL ,测定DPPH峰面积,计算清除率,结果见图3。以清除率(Y)对供试品溶液浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)进行线性回归,拟合得到回归方程,经计算得到的阿魏酸、金丝桃苷、杨梅素、二氢杨梅素、原儿茶酸、异鼠李素、山柰酚-3- O -(6"- O - E -阿魏酰基)- β -D-葡萄糖苷的 IC_{50} 分别为32.10、19.40、32.20、16.50、23.73、297.20、47.60 $\mu\text{g/mL}$,而山柰酚-3- O - β -D-葡萄糖苷在质量浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时其清除率仅为28.8%,增至1000 $\mu\text{g/mL}$ 时,其清除率也未升高。结果表明,雪松松针中分离得到的8个单体成分,除山柰酚-3- O - β -D-葡萄糖苷外,其余均对DPPH自由基具有良好的清除能力,其中二氢杨梅素、金丝桃苷、原儿茶酸对DPPH自由基的清除能力优于没食子酸($\text{IC}_{50}=27.24\ \mu\text{g/mL}$)和VC($\text{IC}_{50}=93.20\ \mu\text{g/mL}$);阿魏酸、杨梅素及山柰酚-3- O -(6"- O - E -阿魏酰基)- β -D-葡萄糖苷清除DPPH自由基的能力不及没食子酸但优于VC。

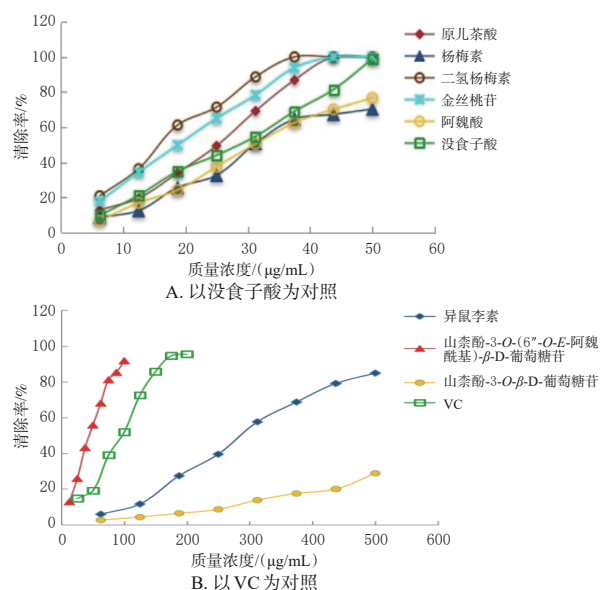


图3 各单体化合物对DPPH自由基的清除能力($n=3$)

3 讨论

DPPH是一种很稳定的以氮为中心的自由基,其醇溶液呈深紫色,在517 nm波长处有强吸收;当自由基清除剂与DPPH醇溶液反应时会与DPPH中的单电子配对而使其紫色逐渐消失,其褪色程度与接受的电子数成定

量关系^[10]。其对实验仪器无特殊要求,适用于提取物和单体成分等自由基清除物的活性检测。

本实验通过选用不同比例的甲醇-水、乙腈-水系统进行等度和梯度洗脱,优选出乙腈-水系统,在乙腈-水(62:38, V/V)的条件下,Agilent Eclipse Plus-C₁₈色谱柱对DPPH-H和DPPH基本达到基线分离。通过考察抗氧化剂与DPPH反应时间,发现随着反应时间的延长,DPPH峰面积持续减少,为减少误差,本实验参考文献方法^[11-13],将反应条件和时间定为避光反应30 min。

本试验发现,雪松松针各有效部位对DPPH自由基均具有很好的清除能力,清除能力大小依次为总黄酮>总多酚>总木脂素;其中雪松松针总多酚、总黄酮与VC的抗氧化能力相当。从雪松松针中分离得到的8个单体成分,与阳性对照比较,除山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖苷外,其余均对DPPH自由基具有良好的清除能力,清除能力大小依次为二氢杨梅素>金丝桃苷>原儿茶酸>没食子酸>阿魏酸>杨梅素>山柰酚-3-O-(6"-O-E-阿魏酰基)-β-D-葡萄糖苷>VC>异鼠李素;其中二氢杨梅素、金丝桃苷、原儿茶酸对DPPH自由基的清除能力优于没食子酸和VC,阿魏酸、杨梅素及山柰酚-3-O-(6"-O-E-阿魏酰基)-β-D-葡萄糖苷清除DPPH自由基的能力不及没食子酸但优于VC。

综上所述,本研究建立了HPLC-DPPH法用于评价雪松松针抗氧化活性;雪松松针具有较强的抗氧化活性,其中有效部位总黄酮、总多酚及单体成分二氢杨梅素、金丝桃苷等是具有开发前景的纯天然抗氧化剂。

参考文献

[1] 郑万钧,傅立国.中国植物志:第七卷[M].北京:科学出版社,1978:167-203.
ZHENG W J, FU L G. Flora of China: volume 7[M]. Beijing: Science Press, 1978:167-203.

[2] 白朝辉,石晓峰,刘东彦,等.雪松松针的化学成分及药理作用研究概述[J].中国药师,2012,15(12):1791-1793.
BAI Z H, SHI X F, LIU D Y, et al. Summary of chemical constituents and pharmacological effects of cedar pine needles[J]. China Pharm, 2012, 15(12):1791-1793.

[3] WU Y P, LIANG X, LIU X Y, et al. *Cedrus deodara* pine needle as a potential source of natural antioxidants: bioactive constituents and antioxidant activities[J]. J Funct Foods, 2015, 14:605-612.

[4] 刘东彦,石晓峰,胡鹏斌,等.大孔吸附树脂富集纯化雪松松针总黄酮工艺的优化[J].中成药,2017,39(2):308-311.
LIU D Y, SHI X F, HU P B, et al. Optimization of enrichment and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* by macroporous adsorption resin[J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(2):308-311.

[5] 石晓峰,沈薇,宁红霞,等.雪松松针总多酚的纯化工艺和抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2016,28(8):1325-1331.

SHI X F, SHEN W, NING H X, et al. Purification and antioxidant activity of polyphenol from pine needles of *Cedrus deodara*[J]. Nat Prod Res Dev, 2016, 28(8):1325-1331.

[6] 李师,雷艳萍,石晓峰,等.雪松松针总皂苷的超声提取工艺优选及体外抗肿瘤活性研究[J].中国药房,2016,27(31):4406-4410.
LI S, LEI Y P, SHI X F, et al. Optimization of the ultrasonic extraction technology of total saponins from pine needle of *Cedrus deodara* and study on its *in vitro* anti-tumor activity[J]. China Pharm, 2016, 27(31):4406-4410.

[7] 张军民,石晓峰,马趣环,等.雪松松针化学成分研究:II[J].中药材,2010,33(7):1084-1086.
ZHANG J M, SHI X F, MA Q H, et al. Studies on the chemical constituents from pine needles of *Cedrus deodara*: II[J]. J Chin Med Mater, 2010, 33(7):1084-1086.

[8] 刘东彦,石晓峰,李冲,等.雪松松针黄酮类化学成分的研究[J].中草药,2011,42(4):631-633.
LIU D Y, SHI X F, LI C, et al. Chemical constituents of flavonoids in pine needles of *Cedrus deodara*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2011, 42(4):631-633.

[9] 石晓峰,白朝辉,刘东彦,等.雪松松针二氯甲烷提取物的化学成分研究[J].中药材,2012,35(3):404-406.
SHI X F, BAIC Z H, LIU D Y, et al. Study on the chemical constituent from the dichloromethane extract of the pine needles of *Cedrus deodara*[J]. J Chin Med Mater, 2012, 35(3):404-406.

[10] 王璐,孙莉琼,苏航,等.联用技术在自由基清除物筛选中的应用[J].中草药,2012,43(5):1032-1036.
WANG L, SUN L Q, SU H, et al. Application of multiple techniques in free radical scavenging material screening[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43(5):1032-1036.

[11] 王小淞,陈波,姚守拙.HPLC-DPPH在线法筛选黄芩提取物中抗氧化活性成分[J].中草药,2009,40(增刊1):224-227.
WANG X S, CHEN B, YAO S Z. HPLC-DPPH online method for screening antioxidant active ingredients in *Scutellaria baicalensis* extract[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2009, 40(Suppl. 1):224-227.

[12] LIU Y W, LI H B, WANG X F, et al. Evaluation of the free radical scavenging activity of *Cynomorium songaricum* Rupr. by a novel DPPH-HPLC method[J]. J Food Sci, 2011, 76(9):C1245-C1249.

[13] 刘明钰,李敏,陈娟娟,等.2,2-二苯基-1-苦肟基-高效液相色谱法快速筛选亚麻籽抗氧化活性成分[J].分析化学,2015,43(2):245-250.
LIU M Y, LI M, CHEN J J, et al. Evaluation of antioxidant activity of flaxseed extracts by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-high performance liquid chromatography assay[J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43(2):245-250.

(收稿日期:2024-04-11 修回日期:2024-07-17)

(编辑:舒安琴)