工程师园地

文章编号：1002-1124(2011)10-0070-04

基于 HPLC- ABTS 体系筛选细叶杜香抗氧化活性成分

耿雪飞[1]，郑永杰[2]，赵 明[1]，UM Byunghun[2]

(1.齐齐哈尔大学 化学与化学工程学院，黑龙江 齐齐哈尔 161006；
2.韩国 KIST 江陵分院 天然产物研究中心，韩国 江原道江陵 210-340)

摘 要：细叶杜香(Ledum palustre L. var. Angustum E. Busch)是我国北方常用药用材料，有止咳祛痰、平喘、扩张血管等功效。本文利用 HPLC- ABTS$^+$ 在线筛选体系对细叶杜香茎部的抗氧化活性成分进行了筛选和分析检测，实验结果表明：细叶杜香茎部甲醇提取物中含有大量抗氧化活性成分，其中经二氯甲烷萃取后纯化的一个组分通过核磁共振波普分析鉴定为秦皮素，该研究为细叶杜香中更多抗氧化活性物质的筛选提供了基础性实验依据。

关键词：细叶杜香；高效液相色谱；抗氧化活性；快速筛选

中图分类号：R284.2 **文献标识码**：A

Screening of antioxidant components by HPLC-ABTS system in Ledum palustre L

GENG Xue-fei[2], ZHENG Yong-jie[1], ZHAO Ming[2], UM Byung-hun[3]

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;
2. Natural Product Research Center, KIST Gangneung Institute, Gangwon 210-340, Korea)

Abstract: The plant Ledum palustre L. var. Angustum E. Busch, a well known edible medicinal herb in North China, has been used to relieve a cough, relieved asthma and blood vessel dilatation. In this research, four major antioxidant compounds were screening and detected from this plant stem using an on-line HPLC-ABTS$^+$ screening system. Plant stem have active antioxidant compounds, one of them was isolated by HPLC and identified by NMR. The study gives basic experimental data screening more antioxidant compounds.

Key words: Ledum palustre L.; HPLC; antioxidant; screening

各种森林植物抗氧化活性成分的筛选和鉴定等基础性研究是保障我国森林资源有效开发利用的前提条件之一，考虑到我国森林植物种类的多样性和每种植物抗氧化活性成分的复杂性，有必要构建一个快速分析鉴定抗氧化活性成分的快速检测体系。通常从天然植物中筛选和分析抗氧化活性成分需要经过反复的提取、分离、纯化、体外验证及鉴定等过程，实验过程繁琐，效率低下，而在线HPLC- ABTS筛选和检测抗氧化活性成分的方法是将具有高效分离功能的高效液相色谱法和检测清除自由基的ABTS+ 试剂检测器链接后在高效液相色谱仪分离组分的同时检测和筛选具有抗氧化活性的成分，可提高抗氧化活性成分的筛选效率。

细叶杜香 (Ledum palustre L. var. Angustum E. Busch)是分布于我国大小兴安岭、长白山地区的主要天然植物之一，常用于治疗月经不调，不孕，胃溃疡，咳嗽痰多，气喘，消炎杀菌等症状。由于目前国内对该植物的活性成分研究主要集中在挥发油成分方面，而在抗氧化性成分的分析研究比较缺乏，因此，本实验基于 HPLC- ABTS$^+$ 快速筛选体系对采自大兴安岭地区的细叶杜香茎部的抗氧化活性成分进行了筛选，旨在为充分利用具有丰富资源量的细叶杜香这一药用资源的开发研究提供新的实验数据。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

细叶杜香（大兴安岭）；所有有机溶剂均为色谱纯。Fisher Scientific(美国)；Trifluoroacetic acid（TFA），6- hydroxy- 2,5,7,8- tet ramethylchroman- 2- carboxylic acid（Trolox），2，2'- azinobis（3- ethylbenzothiazoline- 6- sulfonic acid)（ABTS），5- O- caffeoylquinic acid

收稿日期：2011- 09- 02
作者简介：耿雪飞(1986-)，女，在读硕士研究生。
通讯作者：郑永杰(1964-)，男，教授，研究生导师，主要研究方向：环境工程，分析化学。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

were purchased Sigma- Aldrich Chemicals(美国)。

1.2　仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱系统(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA);Waters- Prep LC 4000 系统(美国 Waters 公司);Varian NMR system(500 MHz 美国)。

1.3　方法

1.3.1　样品的处理　将杜香的茎用剪刀剪 2cm 左右,用自来水清洗至无颜色,然后再用蒸馏水清洗,在室温下阴干后用甲醇浸泡 2~3d,过滤回收甲醇浓缩制成浸膏,浸膏用水溶解后,先后用环己烷,二氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇进行萃取后浓缩待用。

1.3.2　HPLC- $ABTS^+$ 条件

HPLC- $ABTS^+$ 系统见图 1。

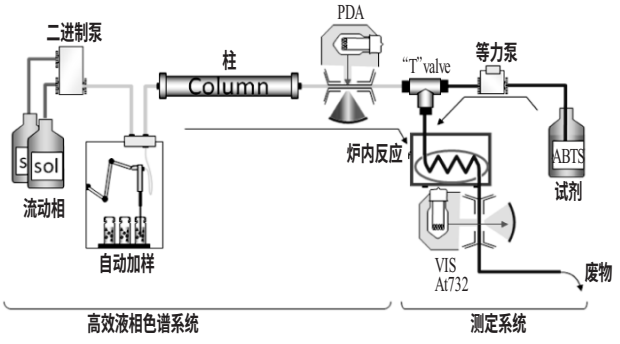

图 1　HPLC–ABTS 在线筛选体系模式图

Fig.1　Schematic diagram of the on–line HPLC–ABTS screening system

系统包括安捷伦 1200 高效液相色谱系统(Primary system)和装有连接泵的 ABTS 自由基试剂供应以及测定系统(Advanced system)。ABTS 自由基试剂配制采用 2 mM 的 ABTS 保存溶液和 3.5 mM 的 K_2SO_4 混合,用 8 倍体积的色谱级纯水稀释,室温避光过夜后加入系统容器中。色谱分析柱为 Alltech C_{18} 色谱柱(250× 4.5mm i.d.,5μm particle size),杜香提取物用甲醇溶解,进样量为 10μL,移动相为乙腈和 0.1%的(TFA)水溶液,流量为 1mL·min^{-1},移动相程序设定为 28min 内乙腈由 15%增加至 40%,然后在 33min 内乙腈增加至 90%,$ABTS^+$ 工作液提供量为 0.5mL·min^{-1}。检测分离组分的色谱波长定为 330nm,为正峰值,检测 ABTS 自由基波长为 734 nm,为负峰值。数据分析采用 ChemStation 分析软件(安捷伦)(Shang Yafang 等 2011)。

1.3.3　HPLC 分离条件　经 HPLC- ABTS 确认的抗氧化活性成分利用 Waters- Prep LC 4000 system 进行了分离纯化,分离柱使用 Hydrophere C_{18}(250× 20mm,S- 5μm),移动相及流速见表 1。

表 1　分离 HPLC 的设定条件

Tab.1　Setting conditions for HPLC seperation

时间 /min	流速 /mL·min^{-1}	A%/ 乙腈	B%/ 水
开始	10	15	85
40	10	40	60
50	10	95	5
60	10	100	0

1.3.4　质谱条件　核磁共振谱分析在 Varian NMR system 500 MHz 上进行,将样品溶于 CD_3OD 溶液中,^1H 和 ^{13}C NMR 谱的 δ values 以 TMS(tetramethylsilane)为内标。

2　结果与分析

2.1　HPLC–ABTS 的抗氧化活性检测

利用 ABTS 自由基体外清除实验可确定待测样品是否具有抗氧化活性,因此,目前国内研究者大多是采用先分离纯化组分后利用 ABTS、DPPH 自由基等体外清除自由基实验对各个组分进行抗氧化活性的验证,由于天然产物中成分的多样性使得抗氧化活性成分的确定就需要对所有组分进行验证后方可筛选出抗氧化活性物质,使得筛选效率低下,而 HPLC- ABTS 方法体系很好的解决了这一难题,该方法是利用具有高效分离功能的高效液相色谱法化合物的同时与 $ABTS^+$ 试剂混合反应,使得高效液相色谱仪分离组分的同时便可确定其是否具有抗氧化活性,确保后期试验中可有目的的选择组分进行分离纯化和结构鉴定,可提高抗氧化活性成分的筛选效率。

本实验利用 HPLC- ABTS 的抗氧化活性物质筛选体系,对细叶杜香茎部甲醇提取物的抗氧化活性进行了分析,其结果见图 2。

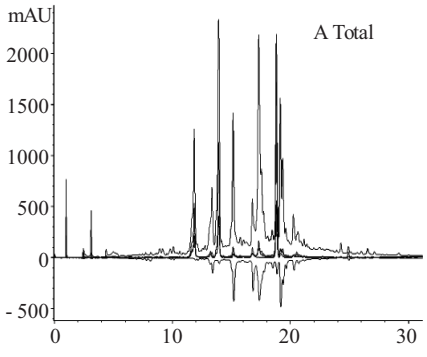

图 2　杜香甲醇总提取物的 HPLC–ABTS 分析图谱

Fig.2　Chromatogram of the Ledum palustre L methanol extract in the on–line HPLC–ABTS assay

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由图 2 可见,提取物的多个分离组分正峰值相对应的 ABTS 自由基检测中可观察到负峰值,该实验结果首次验证了细叶杜香茎部含有丰富的可清除自由基的抗氧化活性物质,在此基础上分别对各组分进行结构鉴定可为细叶杜香这一天然资源的深入开发利用提供有效的科学依据。

2.2 抗氧化活性组分的分离

为了分别对具有抗氧化活性成分进行结构鉴定实验,对杜香茎部的甲醇提取物先后利用环己烷,二氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇进行萃取,选取抗氧化活性多的二氯甲烷层组分,以乙腈和水为流动相利用 Waters- Prep LC 4000 system 进行了组分的分离纯化(图 3),取单一组分后再次利用 HPLC- ABTS 进行了抗氧化活性的验证,其结果如图 4,可观察到分离组分具有较强抗氧化活性。为了对这一组分进行鉴定,反复利用 Waters- Prep LC 4000 system 进行了分离纯化,制备了可用于核磁鉴定的样品。

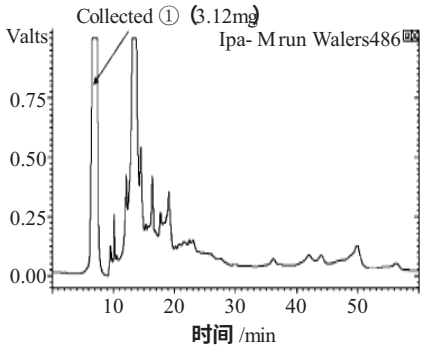

图 3 二氯甲烷层抗氧化活性组分的分离纯化

Fig.3 Isolation and purification of antioxidant components in methylene dichloride

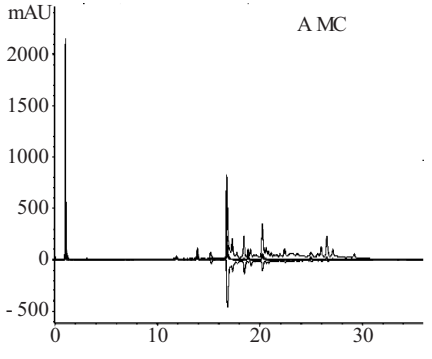

图 4 二氯甲烷层抗氧化活性成分的 HPLC–ABTS 在线检测

Fig.4 The chromatogram of the methylene dichloride extract in the on–line HPLC–ABTS assay

2.3 化合物的结构鉴定

经分离纯化的组分利用 NMR system 500 MHz (Varian, Palo Alto, CA, USA) 进行了结构分析,其中 ^{1}H- NMR (500 MHz,CD3OD) :7.89 (1H,d,J = 9.4 Hz, H- 4),6.80 (1H,s,H- 5),6.22 (1H,d,J = 9.4 Hz, H- 3),3.81 (3H,s,OCH$_3$);^{13}C- NMR (125 MHz, CD$_3$OD) : 160.6 (C,C- 2),145.3 (C,C- 6),145.0 (CH,C- 4),139.6 (C,C- 7),139.3 (C,8a),132.9 (C, C- 8),111.8 (CH,C- 3),110.2 (C,C- 4a),100.2 (CH,C- 5),56.1 (CH$_3$,OCH)。以上数据与文献报道的秦皮素数据基本一致[12],故鉴定分离化合物为秦皮素。

3 讨论

细叶杜香广泛分布于我国大小兴安岭及长白山地区,由于杜香具有独特的香气,因此,对其挥发性成分相关研究较多[11],而对抗氧化活性成分研究较少。在杜香中各类化学成分分析研究报告中在细叶杜香中分离鉴定了秦皮素、5- 羟基 - 4', 7- 二甲氧基黄酮、正二十八烷醇、东莨菪内酯、熊果酸、七叶内酯、对羟基苯甲酸、对苯二酚、槲皮素、金丝桃苷等成分,于景华等[13]对细叶杜香中的秦皮素的质量分数进行了测定,而本实验研究结果也表明细叶杜香茎部含有秦皮素,结合 Marí a F. M (2005) 等对秦皮素抗氧化活性研究结果和本文的 HPLC- ABTS 实验可推断细叶杜香茎部多种抗氧化活性物质中包含有秦皮素。

虽然本文利用 HPLC- ABTS 在线检测体系只筛选和鉴定出细叶杜香茎部的甲醇提取物中二氯甲烷萃取层的一种成分,但是从图 2、4 的检测结果可知细叶杜香茎部中秦皮素以外还含有大量的抗氧化活性物质,这一新发现对后期鉴定出更多细叶杜香抗氧化活性成分提供了实验依据,也为具有丰富资源量的细叶杜香的开发利用提供了可能性。

(致谢:感谢齐齐哈尔大学食品与生物工程学院裴世春教授提供杜香等实验材料及联系在韩国 KIST 进行实验的机会。)

参 考 文 献

[1] He Wenhao, Liu Xuan, Xu Honggao, *et al*. On- line HPLC- ABTS screening and HPLC- DAD- MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (Gardenia jasminoides Ellis) fruit extracts [J]. Food Chemistry, 2010,123 (2) : 521- 528.

[2] Li Hea, XUA Honggao, LIU Xuan. Identification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC- ABTS$^+$ assay [J]. Food Research International, 2011,44 (5) : 1161- 1167.

[3] Marí a F. M., Marí a I.S.Reus., Marí a C. *et al*. Effect of fraxetin on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cell model of rotenone neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N- acetylcysteine [J]. Toxicology and Applied Pharmacology,2005, 209 (3): 214- 225.

[4] Osman A.M.,Wong, K.K.Y.,Fernyhough A. ABTS radical- driven oxidation of polyphenols isolation and structural elucidation of covalent adducts [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2006,346:321- 329.

[5] Shang Yafang, KIM Sangmin Kim and UM ByunghHun Um *et al*. Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from Eisenia bicyclis (Kjellman) Setchell [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011,111 (2) :237- 241.

[6] Takaaki Y., Mai F., Takahiro N., *et al*. Metabolic Fate of Fraxin Administered Orally to Rats [J]. J. Nat. Prod., 2006, 69:755- 757.

[7] 关爽. 杜香提取物的制备及部分毒理药理作用 [D]. 长春:吉林大学,2009.

[8] 韩光亮,李翠梅,Eduardo Cacace,等. 改良的 $ABTS^{+\cdot}$ 法及其在优化抗氧化活性物质提取中的应用 [J]. 卫生研究,2004,33 (5): 620- 623.

[9] 黄莹. 细叶杜香的化学成分研究 [D]. 广州:广东药学院,2008.

[10] 林恋竹,赵谋明. 反应时间对 DPPH·法、$ABTS^{+\cdot}$ 法评价抗氧化性结果的影响 [J]. 食品科学,2010,31 (5) :63- 67.

[11] 马雪梅.资源植物杜香的研究进展 [J]. 安徽农业科学,2010, (6) :2949- 2950.

[12] 许旭东,胡晓茹,袁经权,等. 草珊瑚中香豆素化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 8 (33) : 9002- 9021.

[13] 于景华,赵丹,付玉杰,等.RP- HPLC 法测定细叶杜香叶中 4 种活性成分的质量分数 [J]. 东北林业大学学报,2011,39 (3) : 106- 108.

[14] 于沈晶. 天然挥发性成分降解和减容塑料的研究 [D]. 大连:大连理工大学, 2005.

[15] 张敏. 杜香化学成分及抗炎止痛作用研究 [D]. 上海:华东师范大学,2009.

[16] 王炎,赵敏.大兴安岭地区细叶杜香挥发性成分的研究 [J]. 色谱,2003,2 (6) :631- 631.

(上接第 67 页)

与金属离子作用时，同一三氮唑环上的 N1' 和 N3' 理论上都可以参与配位，但由于 N1' 的空间位阻较大,阻碍了其参与配位。因此,在合成配位聚合物时,化合物中只有 N3' 参与配位。根据对称性原则，化合物形成的是一个柔性双齿配体,已有文献证明了这一点[11]。

3　结论

超声辐射下，苯并三氮唑与二溴烷烃在 NaOH 作用下,生成了 2 个双 (苯并三氮唑) 烷烃,用 IR，1HNMR 确定了其分子结构。通过计算不同温度下 1,4- 双 (苯并三氮唑) 丁烷的产率,找到反应的最佳反应温度为 60℃ ,并通过量子化学计算,发现 2 个双 (苯并三氮唑) 烷烃虽都含有 6 个氮原子,但只能作为柔性双齿配体参与配位。

参　考　文　献

[1] 封霞,唐治炜,冯云龙,等.一维链状配位聚合物 $\{[Cd_2(1,8\text{-nap})_2(H_2O)_2](bpp)_2\}_n$ 的水热合成、晶体结构及荧光性质 [J]. 无机化学学报,2008,24 (10) :1713- 1717.

[2] Huang W, Gou S, Hu D, *et al*. Molecular Ladders with Macrocyclic Platforms [J].Inorg. Chem., 2001, 40: 1712- 1715.

[3] Ge Hai- yan, Wang Li- yan, Yang Yuan, *et al*. Syntheses, structures and luminescent properties of three cadmium coordination polymers with 1,3- bis (1,2,4- triazol- 1- ylmethyl)benzene [J]. J. Mol. Struct., 2008, 876 (1- 3): 288- 293.

[4] Shi W, Ruan C, Li Z, *et al*. Tuning framework formation by flexible ligand elongation and second ligating spacer variation: increasing dimensionality and macrocycle size [J].Cryst.Eng.Comm., 2008, (10) : 778- 783.

[5] Katritzky A R, Jesorka A, Wang J, *et al*.Dimerizations of 2- Alkylbenzotriazoles and Chemical Evidence of Radical intermediates from X- ray Studies [J]. Liebigs Annalen, 1996, (5) : 745- 755.

[6] 谢筱娟,程林,郑爱华,等. α,ω- 二 (1- H- 苯并三唑基) 烷烃的合成和生物活性的研究 [J]. 合成化学,2000,8 (3) :252- 255.

[7] 谢筱娟,杨高升,程林,等. 微波辐射下的相转移催化法合成二 (苯并三唑基) 烷烃 [J]. 化学试剂,2000,22 (4) :222- 223.

[8] Frisch M J,Trucks G W,Schlegel H B,*et al* .Gaussian,Inc.,Pittsburgh, 2003.

[9] 杨频,韩广业,金祥林,等. 异丙氧基 - 异羟肟酸 - 氧钒 (Ⅴ) 配合物的合成、晶体结构和量子化学研究 [J]. 化学学报,2002,60 (6) :1072- 1077.

[10] 孙云,刘晓红,张欣,等. 二苯并咪唑丙烷高氯酸盐的晶体结构和量子化学计算 [J]. 结构化学,2004,27 (7) :803- 807.

[11] Meng X, Li J, Song Y, *et al*. Double helix chain frameworks constructed from bisbenzotriazole building blocks: Syntheses, crystal structures and third- order nonlinear optical properties [J]. J. Mol. Struct.,2008, 891 (1- 3) : 305- 311.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net