

引用: 万丹, 史志华, 沈冰冰, 邵怡, 李永祝. 基于 DPPH-UPLC-Q-Exactive-MS 法研究藤茶的体外抗氧化活性[J]. 湖南中医杂志, 2022, 38(11): 192-195.

基于 DPPH-UPLC-Q-Exactive-MS 法 研究藤茶的体外抗氧化活性

万丹¹, 史志华², 沈冰冰¹, 邵怡³, 李永祝²

(1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙, 410013;

2. 怀化市第一人民医院, 湖南 怀化, 418000;

3. 贵港市妇幼保健院, 广西 贵港, 537000)

[摘要] 目的: 运用 DPPH-UPLC-Q-Exactive-MS 法研究藤茶的抗氧化活性成分。方法: 以不同炮制品的藤茶为对象, 考察其清除 DPPH 自由基的能力, 并运用 UPLC-Q-Exactive-MS 技术对藤茶的抗氧化成分进行定性分析。结果: 藤茶提取物对 DPPH 自由基清除能力强, 具有较好的抗氧化活性, UPLC-Q-Exactive-MS 分析共鉴定了 18 个化合物, 其中黄酮类化合物 15 个。结论: 应用 DPPH 抗氧化活性筛选及 UPLC-Q-Exactive-MS 技术能够快速准确地发现藤茶抗氧化活性成分, 本研究结果可为进一步研究藤茶抗氧化的药效物质研究提供参考。

[关键词] 藤茶; 抗氧化活性; UPLC-Q-Exactive-MS

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.11.044

In vitro antioxidant activity of Ampelopsis megalophylla Diels et

Gilg based on DPPH-UPLC-Q-Exactive-MS

WAN Dan¹, SHI Zhihua², SHEN Bingbing¹, SHAO Yi³, LI Yongzhu²

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China;

2. Huaihua First People's Hospital, Huaihua 418000, Hunan, China;

3. Guigang Maternal and Child Health Hospital, Guigang 537000, Guangxi, China)

[Abstract] Objective: To investigate the antioxidant active components of Ampelopsis megalophylla Diels et Gilg based on DPPH-UPLC-Q-Exactive-MS. Methods: The different processed products of Ampelopsis megalophylla Diels et Gilg were observed for the ability to scavenge free radicals, and the UPLC-Q-Exactive-MS technique was used to perform a qualitative analysis of the antioxidant components of Ampelopsis megalophylla Diels et Gilg. Results: The extract of Ampelopsis megalophylla Diels et Gilg had a strong ability to scavenge free radicals and showed a good antioxidant activity. A total of 18 compounds were identified by UPLC-Q-Exactive-MS, among which there were 15 flavonoids. Conclusion: The DPPH screening method for antioxidant activity and the UPLC-Q-Exactive-MS technique can be used to identify the active antioxidant components of Ampelopsis megalophylla Diels et Gilg, which provides a reference for further research on the material basis for the antioxidant effect of Ampelopsis megalophylla Diels et Gilg.

[Keywords] Ampelopsis megalophylla Diels et Gilg; antioxidant activity; UPLC-Q-Exactive-MS

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目(201988); 广西壮族自治区中医药科研计划项目(20210754)

第一作者: 万丹, 女, 中药学硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药制剂及质量标准研究

通信作者: 李永祝, 男, 主任药师, 研究方向: 医院药事管理, E-mail: 253048253@qq.com

藤茶,又称“霉干茶”“白毛猴”等,为葡萄科(Vitaceae)蛇葡萄属 *Ampelopsis Michx.* 的显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand. - Mazz) W. T. Wang 嫩茎叶经传统炮制加工制成的茶。《救荒本草》《全国中草药汇编》等书籍中对其有明确的记载,言其色绿起白霜,饮用后具有明显的保健效果。研究显示,该药可用于治疗咽喉炎、皮肤病、感冒发热、糖尿病及醒酒等^[1-2]。藤茶产地众多,主要分布于我国湖南、湖北、广西壮族自治区、贵州、福建等地区。研究发现藤茶主要活性成分为黄酮类化合物^[3],涉及二氢杨梅素(dihydromyricetin)、杨梅素(myricetin)、杨梅苷(myricitin)、槲皮素(queracetin)等,而此类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗肿瘤等功效^[4-6]。目前 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)体外抗氧化活性检测和超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS)联用技术已越来越多被应用于中药活性成分的快速发现与验证^[7-8]。本研究拟采用体外 DPPH 自由基清除实验筛选藤茶的抗氧化活性,并运用 UPLC-Q-Exactive-MS 对抗氧化活性成分进行定性分析,以进一步研究藤茶的抗氧化药效物质基础。

1 仪器与试剂

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(Q-Exactive,美国 Thermo Scientific 公司);Xcalibur 质谱工作站;KM-500DB 型超声波清洗器(昆山美美超声仪器有限公司);AL204 型万分之一天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司);XPE-105 型十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);离心机(80-2 型离心沉淀机,江苏金坛市中大仪器厂)。

1.2 药物与试剂 维生素 C(中国食品药品检定研究院,100425-201504);DPPH:1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,分析纯,美国 Sigma 公司);样品 1 是藤茶杀青的样品,样品 2 是藤茶杀青后烘干后的样品。均来源于湖南神舟中药饮片公司,经湖南省中医药研究院中药研究所刘浩副研究员鉴定为葡萄科蛇葡萄属的显齿蛇葡萄的嫩茎叶经传统炮制加工制成的茶。样品保存于湖南省中医药研究院中药研究所。无水乙醇(湖南汇虹试剂有限公司,批号:201910112);甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:20191021);丙酮(湖南汇虹试剂有限公司,批号:20171120);纯净水[华润怡宝饮料(中国)

有限公司],其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫外-分光光度计测定藤茶的 DPPH 体外抗氧化活性

2.1.1 溶液制备 1) DPPH 溶液:精密称取 4.31 mg,加 100 ml 80%乙醇,配成 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,避光保存。2) 标准品溶液:精密称取 8.86 mg,加水定容至 50 ml,得到 1.0 mmol/L 的维生素 C 水溶液。3) 供试品溶液:精密称取一定量的藤茶样品,按如下步骤进行操作。①25 mg 样品+5 ml 甲醇-水(50:50 v/v, pH=2),室温下振荡 60 min;②离心 9000 rpm, 10 min;③取上清液 I 备用,沉淀+5 ml 丙酮-水(70:30 v/v)→室温下振荡 60 min→离心 9000 rpm, 10 min→取上清液 II;④取 10 ml 上清液 I+上清液 II,用传统的 DPPH 法进行抗氧化活性测定。

2.1.2 实验操作步骤 1) 空白溶液测定:将 0.2 ml 水及 2.8 ml DPPH 溶液加入到同一试管中,摇匀。室温下暗处静置,30 min 后在 517 nm 测定其吸光度 A_0 。同时记录 750 nm 处的吸光值 A_{750} 。2) 样品测定:将 0.2 ml 样品溶液及 2.8 ml DPPH 溶液加入到同一试管中,摇匀。室温下暗处静置 30 min 后在 517 nm 测定其吸光度 A_1 。同时记录 750 nm 处的吸光值 A_{750} 。3) 标准曲线:配制 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的维生素 C 水溶液,将 0.2 ml 维生素 C 水溶液及 2.8 ml DPPH 溶液加入到同一试管中,摇匀。室温下暗处静置 30 min 后在 517 nm 测定其吸光度 A_1 。同时记录 750 nm 处的吸光值 A_{750} 。用抑制率制作标准曲线。抑制率计算公式: $I = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0$ 。4) 计算:根据标准曲线,计算每克或每毫升样品相当于多少维生素 C。

2.2 DPPH-UPLC-Q-Exactive-MS 法抗氧化活性成分检测

2.2.1 供试品的处理方法 精密称取样品粉末(60℃烘干,粉碎后过 40 目筛)约 0.5 g,置 100 ml 圆底烧瓶中,用 50 ml 80%甲醇回流提取 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,浓缩至 50 ml 后定容。经 0.22 μm 滤膜过滤,备用待测。

2.2.2 液相条件 采用 Hypersil GOLD C₁₈ 反相色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)。流动相为 A:乙腈, B:0.1%(V/V)甲酸水溶液。梯度洗脱条件为 0~2 min:10% A;2~8 min:10% A→28% A;8~14 min:

28%A;14~16 min:28%A→80%A A;16~18 min:80%
A;18~25 min: 80%A→100%A,流速为 0.3 ml/min,
柱温为 30 ℃,波长 280 nm。进样量 5 μl。

2.2.3 质谱条件 离子源为加热电喷雾离子化源
(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(+)和 3.00 kV(-),
毛细管温度为 350℃,辅助器加热温度 200℃,扫描
范围 100~1500 m/z;Full Mass 分辨率为 70000,dd-
ms2 17 500,碰撞能为 20,40,60 eV。

2.3 结果

2.3.1 紫外-分光光度计测定藤茶的抗氧化活性
结果 通过测定藤茶对 DPPH 清除能力来评价其
抗氧化活性。标准曲线公式为: $y=100.83x+1.4529$
($R^2=0.9982$)。藤茶样品 1、2 在 517 nm 下的抗氧
化活性抑制率分别为 95.66%、76.41%。

2.3.2 DPPH-UPLC-Q-Exactive-MS 法分析藤茶
的抗氧化成分 通过液质联用技术,按上述条件对
藤茶不同样品进行化学成分分析,得到 280 nm 下
的液相色谱图及 ESI 负离子模式下总离子流图(见
图 1~4)。进一步对比藤茶 DPPH 反应前后的数
据,研究发现 DPPH 反应后的化学物主要集中在
4~12 min,因此本研究主要对这一时间段的化学成
分进行定性解析。对潜在的各化学成分的保留时
间及质谱裂解信息,通过总离子流图、赛默飞 CD 库
(赛默飞仪器的 Compound Discoverer 数据库)及相
关文献^[9-11]数据对比分析,对藤茶抗氧化的化学成
分进行确认,共鉴定得到 18 种化合物,其中 15 个黄
酮类化合物(见表 1)。

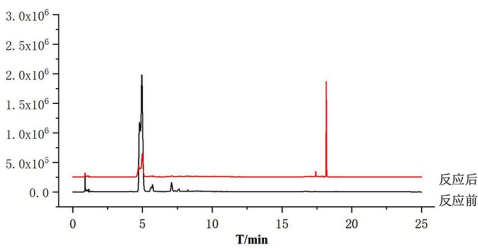


图 1 藤茶样品 1 反应前后的 UV 图

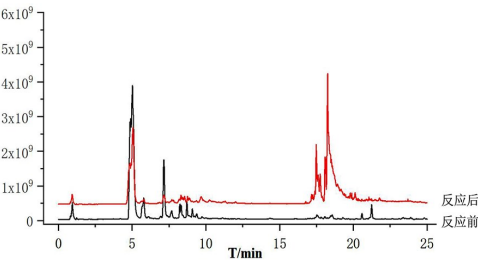


图 2 藤茶样品 1 反应前后的 MS 图

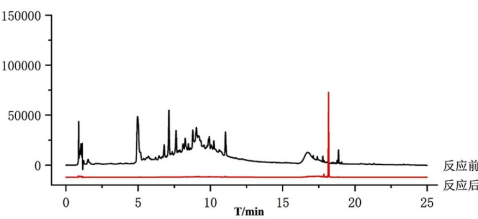


图 3 藤茶样品 2 反应前后的 UV 图

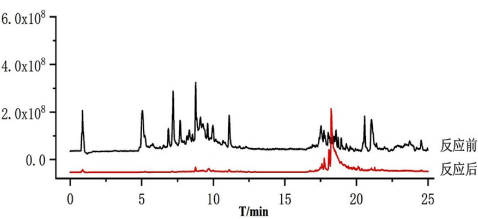


图 4 藤茶样品 2 反应前后的 MS 图

表 1 藤茶抗氧化成分的 UPLC-Q-Exactive-MS 分析

编号	保留时间	分子离子峰	ppm	分子式	MS2	化合物	样品 1	样品 2
1	5.04	319.04506[M-H] ⁻	0.03	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	301,275,257,215,193	二氢杨梅素	+	+
2	5.20	319.04504[M-H] ⁻	-0.44	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	301,275,257,239,215,193	二氢杨梅素异构体	+	+
3	5.76	609.08820[M-H] ⁻	1.15	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₅	409,387,341,319,301,174	Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate	+	+
4	6.12	479.08310[M-H] ⁻	2.26	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	433,387,367,341,319,259,215,193,	杨梅素-3-O-β-D-葡萄糖苷	+	
5	6.72	751.11371[M-H] ⁻	-0.39	C ₃₅ H ₂₈ O ₁₉	697,669,629,607,481,259,215,191	Kaempferol 3-(2'',6''-digalloyl)glucoside)		+
6	6.87	607.07245[M-H] ⁻	0.99	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	271,265,259,215,191	橙皮素		+
7	6.91	449.07233	1.95	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	421,341,319,253,235,191	杨梅素-3'-O-β-D-吡喃木糖苷	+	+
8	7.19	463.08755[M-H] ⁻	0.96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	316,287,271,151	杨梅苷	+	+
9	7.87	637.08258[M-H] ⁻	0.26	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₆	625,581,463,277,191	Acuminatanol	+	+
10	7.93	433.07767[M-H] ⁻	2.61	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	411,347,279,193	槲皮素 3-α-L-阿拉伯呋喃糖苷		+
11	8.17	639.09857[M-H] ⁻	-1.49	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₆	623,607,591,433,301,193	Quercetin 3-(2''-caffeyl)glucuronide)	+	
12	8.28	599.10437[M-H] ⁻	-0.09	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	579,531,447,331,267,191	Isoorientin 2''-o-gallate		+
13	8.32	447.09262[M-H] ⁻	0.96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	421,357,301,259,241,215,193	槲皮素-3-O-α-L-吡喃鼠李糖苷	+	
14	8.77	635.06720[2M-H] ⁻	0.69	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	609,441,378,242,191	杨梅素		+

续上表

编号	保留时间	分子离子峰	ppm	分子式	MS2	化合物	样品 1	样品 2
15	9.05	615.09827[M-H] ⁻	-1.45	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	597,493,471,419,317,241,193	Quercetin 3-(2"-galloyl)galactoside)	+	
16	9.60	657.10931[M-H] ⁻	-0.34	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₇	639,595,579,549,451,211,191	Myricetin 3-O-(4"-o-acetyl-2"-O-galloyl)-alpha-L-rhamnopyranoside	+	+
17	9.86	569.09369[M-H] ⁻	-0.41	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₄	549,451,211,191	Kaempferol 3-(2"-galloyl-alpha-L-arabinopyranoside)		+
18	11.10	551.08295[M-H] ⁻	-0.19	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₃	521,451,525,249,219,191,174	Epitheafalagallin 3-O-gallate		+

3 讨 论

本草古籍和民族专著中记载的藤茶加工方法较为简单,均为经炒制烘干。随着人们对藤茶加工方法的深入研究和对药茶口感要求的提高,其加工方法也在逐渐发展和改良,但仍以手工工艺结合少量机械加工为主。藤茶鲜叶采收时间是在每年的 4~10 月份,但鲜叶含水量高,直接存放易发霉变质,为了保证产品质量,多在产地直接进行加工处理,现代加工过程包括杀青、捻揉、烘干等。目前抗氧化的体外模型主要有 DPPH 自由基清除法、羟基自由基清除法、超氧阴离子清除法、总抗氧化能力测定法。其中,DPPH 自由基是一种人工合成的稳定自由基,其乙醇溶液呈紫色,在波长 517 nm 处有较强吸收,当 DPPH 自由基溶液中加入能清除自由基的样品,波长 517 nm 处吸光度变小时,其减小程度与自由基清除效果相关。有关抗氧化活性物质含量测定方法较多,主要有紫外分光光度法、高效液相色谱法。本实验首先采用紫外可见光光度法对藤茶烘干前后的样品进行抗氧化活性比较实验,结果显示炮制过程中藤茶样品的 DPPH 自由基清除能力强,具有较好的抗氧化活性,但烘干后样品的抗氧化活性有所降低,说明干燥过程会影响藤茶的产品质量^[12]。

近年来,研究者们开发了众多集色谱分析和活性筛选于一体的高效、快速的抗氧化成分发现技术。其中,液质联用结合 DPPH 在线抗氧化筛选的技术具有高效、快速、灵敏、重现性好、集色谱分析和活性筛选于一体等优点,目前已广泛应用于中药中抗氧化成分的快速筛选。本实验通过 UPLC-Q-Exactive-MS 结合 DPPH 法进一步研究藤茶的抗氧化活性成分,通过条件优化后,对比不同藤茶样品 DPPH 反应前后的液相和质谱数据,得到各化合物的离子碎片信息,发现 DPPH 反应后的化学成分主要集中于 4~12 min。通过文献调研发现藤茶的抗氧化成分类型主要有黄酮类、多酚类和多糖类。结合总离子流图、赛默飞 CD 库及相关文献数据对比分析,结果总共鉴定了 18 种化合物(包括 15 种黄酮类化合物),其中样品 1 鉴定了 11 种化合物,样品 2 鉴

定了 14 种化合物。通过建立的 UPLC-MS-DPPH 技术在线快速筛选藤茶中的抗氧化活性成分。研究发现其主要是黄酮类和酚酸类成分,这些成分主要特点是均含有大量的羟基基团,具有显著的抗氧化活性。实验结果显示,烘干后的藤茶样品中二氢杨梅素等的含量显著下降,且 2 种藤茶样品经 DPPH 反应后,杨梅素、二氢杨梅素、杨梅苷等物质含量均减少,说明其抗氧化活性降低,其结果与紫外可见光光度法检测结果一致,同时也表明杨梅素、二氢杨梅素、杨梅苷等物质是藤茶抗氧化活性的物质基础之一,但其具体作用机制仍还需进一步研究。

参考文献

[1] 冉京燕,方建国,谢雪佳,等. 藤茶的本草资源学研究概况[J]. 中草药,2016,47(20):3728-3735.

[2] 范莉. 中药藤茶的质量评价及其活性成分二氢杨梅素的代谢相关研究[D]. 武汉:华中科技大学,2018.

[3] 孔琪. 显齿蛇葡萄提取物与主要黄酮类化合物及衍生物的抗菌抗氧化活性研究[D]. 贵阳:贵州师范大学,2015.

[4] 欧贤红,叶勇,黄秋洁,等. 藤茶抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(2):245-248.

[5] 张云坤,李娟,黄丹,等. 中药藤茶化学成分及抗感染作用研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2021,23(6):2012-2021.

[6] 甘小娜,彭博,李廷钊,等. UPLC-PDA-MS-ABTS 阳离子自由基在线分析藤茶的抗氧化活性成分[J]. 食品科学,2020,41(18):254-259.

[7] 赵玉荣,陆姗姗,朱张新,等. 平卧菊三七提取物抗氧化活性研究与抗氧化特征成分的 HPLC-MS/MS 分析[J]. 中国现代中药,2019,21(3):81-84.

[8] 张敏敏,赵志国,刘倩,等. 基于离线 2D-HPLC-DPPH-ESI-Q-TOF/MS 联用技术的金银花抗氧化成分系统筛选研究[J]. 中草药,2021,52(11):3193-3200.

[9] 吴佳,叶文卉,卢宗元,等. 藤茶不同部位指纹图谱及其差异研究[J]. 天然产物研究与开发,2020,32(9):62-69.

[10] 付明,黎晓英,王登宇,等. 显齿蛇葡萄叶中黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(7):574-578.

[11] 李佳川,李思颖,王优,等. 藤茶化学成分,药理作用及质量标志物(Q-marker)预测分析[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2021,47(3):254-263.

[12] 王丹丹,方建国,施春阳,等. 加工及干燥对藤茶品质成分的影响[J]. 时珍国医国药,2016,27(12):2899-2902.

(收稿日期:2022-03-05)