

· 基础研究 ·

HPLC-DPPH 快速测定枳壳抗氧化活性成分[△]何英杰^{1,2,3}, 谢红旗^{1,2,3*}, 伍睿宇^{1,2}, 唐其^{1,3}, 程辟^{1,3}, 周伊昀⁴

(1. 湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128;

2. 国家中医药管理局 亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128;

3. 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410128;

4. 湖南湘众中药材种植贸易有限公司, 湖南 郴州 423600)

[摘要] 目的: 为高效利用枳壳(*Aurantii Fructus*)中活性成分, 建立测定枳壳中活性成分柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的方法, 并同时评价其抗氧化能力。方法: 采用高效液相色谱联用 1, 1-二苯基-2-三硝基苯胍(HPLC-DPPH)技术, Agilent-ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.04% 磷酸水(A)-乙腈(B), 采用梯度洗脱程序, 检测波长: 283 nm, 柱温: 25 °C, 流速: 0.8 mL·min⁻¹。结果: 柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷质量分数分别为 52.64、2.41、34.27 mg·g⁻¹; 抗氧化能力贡献率(AA^{*}): 柚皮苷(58.9%)>新橙皮苷(38.3%)>橙皮苷(2.8%), DPPH 自由基清除率(AA^{**}): 柚皮苷(47.8%)>橙皮苷(38.1%)>新橙皮苷(36.2%)。结论: 本文通过建立 HPLC-DPPH 法对枳壳抗氧化活性成分进行测定和评价, 为开发利用枳壳中抗氧化活性成分提供一种新思路。

[关键词] 枳壳; 柚皮苷; 新橙皮苷; 橙皮苷; HPLC-DPPH 法

Rapid Determination of Antioxidant Constituents in *Aurantii Fructus* by HPLC-DPPH MethodHE Yingjie^{1,2,3}, XIE Hongqi^{1,2,3*}, WU Ruiyu^{1,2}, TANG Qi^{1,3}, CHENG Pi^{1,3}, ZHOU Yiyun⁴

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, China;

3. Hunan Co-innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China;

4. Hunan Xiang Zhong Chinese herbal medicine planting and trade Co., Ltd., Chenzhou 423600, China)

[Abstract] **Objective:** In order to utilize the active ingredients effectively in *Aurantii Fructus*, a method of determination and evaluation the antioxidant capacity of naringin, hesperidin and neohesperidin simultaneously in *Aurantii Fructus* was established with high performance liquid chromatography combined with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (HPLC-DPPH) technique. **Methods:** The determination conditions were as follows: HPLC separation was carried out with an Agilent-ZORBAX SB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) using 0.04% phosphoric acid (A)-acetonitrile(B) [0-5 min, 12%-20% B; 5-15 min, 20%-25% B; 15-25 min, 25%-12% B; 5-30 min, 12% B] as mobile phase at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 283 nm and the column temperature was maintained at 25 °C. **Results:** The content of naringin, hesperidin and neohesperidin in *Aurantii Fructus* was 52.64, 2.41, 34.27 mg·g⁻¹ separately. The contribution rate of total antioxidant capacity(AA^{*}) was naringin (58.9%)>neohesperidin (38.3%)>hesperidin(2.8%), and the DPPH free radical scavenging rate (AA^{**}) was naringin(47.8%)>hesperidin (38.1%)>neohesperidin (36.2%). **Conclusion:** HPLC-DPPH method was efficiently established for the determination and evaluation of the antioxidant compounds of *Aurantii Fructus*, and this method could provide a new idea for the research and utilization of *Aurantii Fructus*.

[Keywords] *Aurantii Fructus*; naringin; hesperidin; neohesperidin; HPLC-DPPH assay

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.8.016

[△] [基金项目] 国家工信部中药材扶持项目(2015); 湖南省科技厅重大专项(2015SK1001); 湖南省研究生科研创新项目(CX2016B311); 湖南省科技项目(2016SK3043)

* [通信作者] 谢红旗, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物分析; Tel: (0731)84617244, E-mail: xiehongqi2006@sohu.com

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的未成熟果实, 其性温, 具有理气宽中、行滞消胀之功效, 主治胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停、脏器下垂^[1]。枳壳中主要含有黄酮^[2]、生物碱^[3]、挥发油^[4]及少量的香豆素^[5-6]等具有生物活性的化合物, 其中含量最高的是二氢黄酮类化合物, 如柚皮苷、新橙皮苷等^[7]。测定物质抗氧化活性的方法有很多, 如清除羟自由基法(OH·)^[8]、超氧阴离子法(O₂⁻)^[9]、DPPH法^[10]等, 这些方法通常用于药用植物和中药提取物抗氧化能力的评价。但这些方法通常测定的是提取物或某一类组分的总抗氧化能力。要想测定药用植物或中药中的某一种化学成分的抗氧化活性, 需要经过大量的分离纯化过程。因此建立一种从复杂混合物中快速、准确筛选和评价抗氧化活性成分的方法在中药现代化研究中非常重要。

高效液相色谱联用 DPPH 技术(HPLC-DPPH)是一种同时分析和评价药用植物功能成分抗氧化活性的方法, 该方法无需分离能够快速评价复杂样品中单一成分的抗氧化活性^[11-12]。DPPH 为小分子化合物, 可以使用 HPLC 进行分离, 而且活性成分与 DPPH 单电子配对使活性成分结构发生改变, 反应后样品在 HPLC 谱图上表现为色谱峰面积降低或消失, 峰面积降低的程度与化合物清除自由基的能力存在一定的关系, 因此通过对比分析原色谱图及与 DPPH 反应后的混合物的色谱图即可确定天然产物中的抗氧化活性成分, 该法快速、直观、简单易操作^[13]。枳壳中抗氧化活性成分主要为黄酮类化合物, 以往文献报道的大多是评价枳壳提取物总黄酮的抗氧化效果^[14], 而对单一黄酮类化合物的抗氧化活性很少报道。本文通过建立 HPLC 联用 DPPH 评价抗氧化活性方法来筛选和测定枳壳中抗氧化活性成分, 该方法将为开发和利用枳壳中抗氧化活性成分提供一种新的思路。

1 材料与仪器

1.1 材料

枳壳(湖南湘众中药材种植与贸易有限公司); 对照品: 柚皮苷(narigin, 批号: B12594)、橙皮苷(hesperidin, 批号: B20182)、新橙皮苷(neohesperidin, 批号: B21390), 均购自源叶生物有限公司, 纯度均≥98%; 试剂: 乙醇、甲醇、乙腈均为分析

纯(上海国药集团试剂有限公司), DPPH(美国 Sigma 公司)。

1.2 仪器

KM5200DV 超声波仪(昆山超声仪器有限公司), 1200 Indinitely series 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), XS205 分析天平(METTLER TOLEDO)。

2 方法

2.1 供试品与对照品溶液的配制

2.1.1 供试品溶液制备 参考文献[15], 稍作修改, 取枳壳样品于烘箱内 50℃ 下烘干 24 h, 打粉, 过 100 目筛, 精密称量 0.20 g 样品, 用 50 mL 60% 乙醇水超声 15 min, 抽滤, 滤渣用 40 mL 60% 乙醇水再次超声 10 min, 合并滤液, 定容至 100 mL 容量瓶, 备用。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称量一定量柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷对照品, 分别用甲醇溶解并定容制成质量浓度为 0.12 mg·mL⁻¹ 的对照品贮备溶液, 对照品 HPLC 图见图 1。

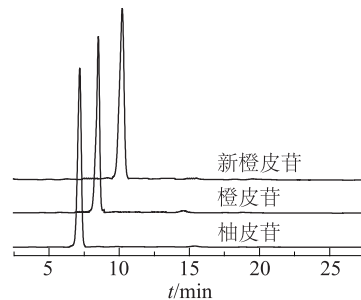


图1 柚皮苷等3种对照品色谱图

2.2 高效液相色谱条件

Agilent-ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.04% 磷酸水(A)-乙腈(B), 采用梯度洗脱程序: 0~5 min, 12%~20% B; 5~15 min, 20%~25% B; 15~25 min, 25%~12% B; 25~30 min, 12% B。检测波长: 283 nm, 柱温: 25℃, 进样量: 10 μL, 流速: 0.8 mL·min⁻¹。

2.3 活性成分测定

取制备好的供试品溶液, 按照 2.2 色谱条件进样, 测定柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量。

2.4 抗氧化能力测定

2.4.1 DPPH 溶液制备 取 2.0 mg DPPH 试剂, 乙醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 制成质量浓度为

20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光备用。

2.4.2 DPPH-HPLC 联用测定抗氧化活性成分 分别取供试品溶液 2.0 mL, 置于 a、b 试管中, 其中 a 试管加入 DPPH 溶液 2.0 mL 作为实验组, b 试管加入乙醇溶液 2.0 mL 作为对照组, 充分混匀, 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下避光静置 30 min; 从 a、b 试管中各取 1.0 mL, 过 0.45 μm 液相膜, 按照高效液相色谱条件进行检测, 实验重复 3 次。

2.4.3 抗氧化能力贡献率 通过 HPLC-DPPH 联用技术, 初步分析枳壳提取物中抗氧化活性成分, 实验设计如图 2 所示, 以柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷为特征成分指标, 对化合物的抗氧化能力贡献率 (AA^*) 进行测定, 按公式(1)计算。

$$AA^* = \frac{\text{化合物含量}(b) - \text{化合物含量}(a)}{\text{总含量}(b) - \text{总含量}(a)} \times 100\% \quad (1)$$

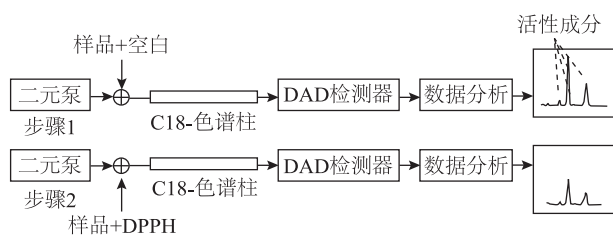


图2 DPPH-HPLC 联用测定抗氧化活性成分

2.4.4 DPPH 自由基清除率 分别取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品贮备溶液 2.0 mL, 各加入 2.0 mL DPPH 溶液, 充分混匀, 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下避光静置 30 min, 利用紫外分光光度计在 517 nm 下检测吸光度(A)变化, 测定各化合物对 DPPH 自由基清除率 (AA^{**}), 按公式(2)计算。

$$AA^{**} = 1 - \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{化合物}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100\% \quad (2)$$

3 结果与分析

3.1 色谱系统适用性优化

参考《中华人民共和国药典》中枳壳黄酮检测方法, 加以改进。流动相选择上, 在水相中加入 0.04% 的磷酸即可达良好的峰型效果; 柚皮苷与橙皮苷出峰时间过于接近, 未能达到完全分离的效果, 故而对流动相洗脱程序进行优化, 流速降低至 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 并采用梯度洗脱模式(见表 1), 能将各化合物之间完全分开, 橙皮苷与相邻化合物分离度大于 1.5, 各化合物峰型窄而对称, 表明色谱程

序专属性较高。

表1 流动相梯度洗脱程序

t/min	A相(0.04%磷酸水)	B相(乙腈)
0~5	88%~80%, 线性变化	12%~20%, 线性变化
5~15	80%~75%, 线性变化	20%~25%, 线性变化
15~25	75%~88%, 线性变化	25%~12%, 线性变化
25~30	88%	12%

3.2 方法学考察

3.2.1 线性关系 取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品制成质量浓度分别为 2、10、20、40、80、120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混合对照溶液, 按 2.2 色谱条件进行分析, 以对照品溶液质量浓度为横坐标, 各对照品色谱峰面积为纵坐标进行线性回归, 得到柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷线性回归方程, 结果如表 2 所示, 表明各对照品质量浓度在 2.0 ~ 120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与色谱峰面积呈良好线性关系, 检测下限为 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表2 柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷线性回归方程

成分	线性回归方程	r
柚皮苷	$Y = 11.996X + 9.1803$	0.9998
橙皮苷	$Y = 12.869X + 10.483$	0.9999
新橙皮苷	$Y = 16.002X + 1.2485$	0.9999

3.2.2 精密度、重复性及稳定性试验 取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷混合对照溶液, 进样 6 次, 其 RSD 分别为 0.89%、0.76%、0.81%, 表明其精密度良好; 取同一供试品 6 份, 按照 2.2 色谱条件, 测定柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量, 其 RSD 分别为 1.1%、1.3%、1.2%, 表明该色谱测定条件下方法重复性良好; 取供试品溶液, 分别于 0、1、2、5、7、10、15、20、24 h 后进行其供试品中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量测定, 计算其 RSD 分别为 0.8%、0.9%、0.85%, 表明其稳定性良好。

3.2.3 加样回收率试验 精密称取已知含量的枳壳样品粉末 0.1 g, 共 9 份, 每组按低、中、高浓度分别精密加入柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品溶液, 并按照 2.1.1 样品提取方法进行提取定容, 按 2.2 色谱条件进行测定分析, 结果见表 3。

3.3 枳壳抗氧化物分析

3.3.1 含量测定 按照 2.1.1 条件同时制备 3 组供试品溶液, 通过高效液相色谱测定柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量, 测得枳壳中三者质量分数分别为 52.64、2.41、34.27 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.12%、

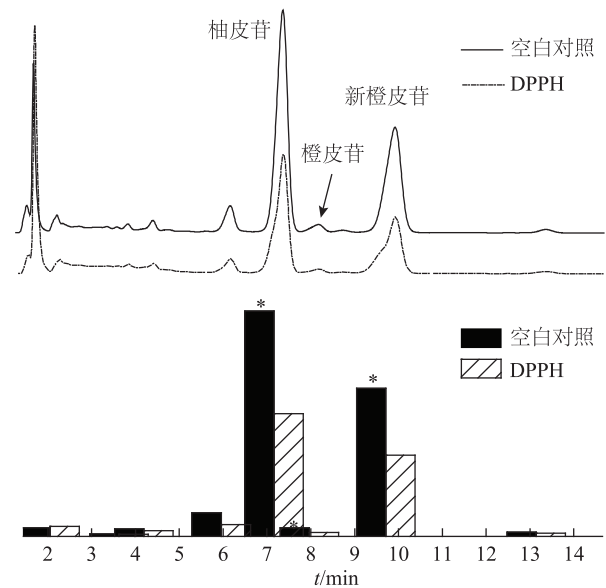
1.67%、1.08% (见表4), 表明实验方法准确可靠。其中柚皮苷、新橙皮苷含量均高于《中华人民共和国药典》标准, 表明药材品质较高。

表3 柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷加样回收率试验

化合物	样品中含量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
柚皮苷	5.263 8	4.122 7	9.493 2	102.6	101.8	1.20
			9.445 8	101.4		
			9.542 1	103.8		
			10.260 1	102.5		
			10.481 7	99.2		
			10.539 8	100.3		
			11.631 2 5	103.3		
			11.626 8	100.8		
			11.721 3	102.3		
			11.721 3	102.3		
			11.721 3	102.3		
			橙皮苷	0.241 2	0.192 9	
0.439 9	103.0					
0.433 6	99.7					
0.241 5	102.3					
0.486 5	101.6					
0.481 7	99.6					
0.289 6	99.7					
0.544 6	104.8					
0.536 1	101.8					
0.536 1	101.8					
0.536 1	101.8					
新橙皮苷	3.426 5	2.750 2				6.251 8
			6.197 9	100.8		
			6.301 2	104.5		
			3.435 8	99.6		
			6.932 6	102.0		
			6.951 2	102.3		
			4.125 1	102.5		
			7.680 8	103.1		
7.618 7	101.6					

3.3.2 抗氧化能力评价 HPLC-DPPH 联用技术对枳壳中黄酮类化合物进行抗氧化能力分析, 通过高效液相色谱图可以清晰判断各抗氧化活性化合物对 DPPH 自由基产生了显著的清除能力 ($P < 0.05$), 峰面积响应减弱 (见图3)。结果表明柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷均具有较强的抗氧化能力, 其中, 抗氧化能力贡献率 (AA^{*}): 柚皮苷 > 新橙皮苷 > 橙皮苷, 柚皮苷和新橙皮苷抗氧化贡献率之和大于 90%, 表明二者是主导抗氧化活性成分。通过等质量浓度对照品对 DPPH 自由基清除能力进行比较, 表明柚皮苷对 DPPH 自由基的清除率 (AA^{**}) 最强,

橙皮苷和新橙皮苷则基本一致, 表明就单一化合物而言, 柚皮苷具有更强的抗氧化能力 (见表4)。



注: 与 DPPH 比较, * $P < 0.05$ 。

图3 枳壳中黄酮类化合物抗氧化能力分析

表4 枳壳黄酮化合物含量测定及抗氧化能力分析 ($n = 3$)

成分	质量分数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD (%)	AA [*] (%)	AA ^{**} (%)
柚皮苷	52.64	1.12	58.9	47.8
橙皮苷	2.41	1.67	2.8	38.1
新橙皮苷	34.27	1.08	38.3	36.2

4 结论

枳壳提取物总抗氧化能力与抗氧化活性化合物的含量有直接关系, 柚皮苷含量最高, 对总提取物总抗氧化能力贡献最大, 新橙皮苷次之, 二者构成了枳壳黄酮中主要的抗氧化活性成分。黄酮化合物自身抗氧化能力则与其化学结构特殊性有关, 其抗氧化能力强弱常常与化学结构、羟基化程度、取代基类型、共轭键及聚合程度等有重要关系^[16]。从化学结构来看 (见图4), 在黄酮母核结构的 A、B 环上, 柚皮苷的 C-4' 及 C-5 位各含有一个酚羟基 (-OH), 表现出较强的供质子能力; 新橙皮苷和橙皮苷除了 C-7 上的糖基取代基不同外, 其余结构一致, 故而抗氧化能力基本一致; 二者在 B 环上的 C-4' 位上则被甲氧基 (-OCH₃) 所取代, C-3' 的 -OH 由于处于邻位, 导致供质子能力减弱, 所以二者抗氧化能力低于柚皮苷。

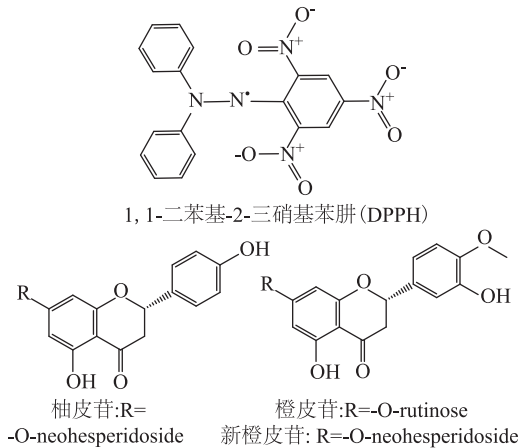


图4 DPPH及枳壳主要抗氧化活性成分化学结构

实验研究建立了 HPLC-DPPH 联用快速测定枳壳中主要抗氧化活性成分并同时分析其抗氧化能力的方法；其优势在于：第一，避免了传统实验方法测定植物提取物抗氧化能力过程中出现的操作繁琐、耗时等缺点；第二，该方法能够在分子水平对枳壳中抗氧化物进行分析讨论，能更加深入分析各化合物的抗氧化能力以及各化合物对提取物总抗氧化能力贡献。本文对枳壳中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量和抗氧化活性进行了评价，如能结合质谱方法对其他成分进行定性分析，将对枳壳中具有抗氧化活性的黄酮类化合物筛选提供一种非常便利的方法，也为其他天然药用植物活性成分的筛选、评价、深入研究以及开发利用提供新思路。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:246.
- [2] Lin Z, Wang H, Xu Y, et al. Identification of antioxidants in *Fructus aurantii*, and its quality evaluation using a new on-line combination of analytical techniques[J]. *Food Chem*, 2012, 134(2):1181-1191.
- [3] 彭国平,牛贺明,徐丽华. 枳实活性成分的研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2001, 17(2):91-92.
- [4] 曹君,王少军,龚千锋,等. 不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. *中草药*, 2005, 36(2):172-177.
- [5] Cho H E, Ahn S Y, Kim S C, et al. Determination of fla-

- vonoid glycosides, polymethoxyflavones, and coumarins in herbal drugs of *Citrus* and *Poncirus* Fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry[J]. *Anal Lett*, 2014, 47(8):1299-1323.
- [6] Chen H F, Zhang W G, Yuan J B, et al. Simultaneous quantification of polymethoxylated flavones and coumarins in *Fructus aurantii*, and *Fructus aurantii immaturus*, using HPLC-ESI-MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59(3):90-95.
- [7] 贾强,白杨,马燕,等. 枳壳和枳实化学成分的 HPLC-ESI-MS 分析[J]. *中草药*, 2005, 36(2):169-172.
- [8] Jung M J, Heo S I, Wang M H. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*[J]. *Food Chem*, 2008, 108(2):482-487.
- [9] Tsukagoshi K, Saito T, Nakajima R. Analysis of antioxidants by microchip capillary electrophoresis with chemiluminescence detection based on luminol reaction[J]. *Talanta*, 2008, 77(2):514-517.
- [10] Karagözler A A, Erdağ B, Emek Y Ç, et al. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*[J]. *Food Chem*, 2008, 111(2):400-407.
- [11] Du Q, Li B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens*, by high-speed counter-current chromatographic separation-DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity[J]. *Food Chem*, 2012, 131(4):1181-1186.
- [12] And D B, Murkovic M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.)[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(9):2482-2487.
- [13] Yu L, Zhao J, Zhu Q, et al. Macrophage biospecific extraction and high performance liquid chromatography for hypothesis of immunological active components in *Cordyceps sinensis*[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2):439.
- [14] 郑雪良,刘春荣,王登亮,等. 胡柚小青果的黄酮类化合物及抗氧化活性研究[J]. *浙江农业学报*, 2015, 27(7):1185-1191.
- [15] 邹建国,刘飞,刘燕燕,等. 响应面法优化微波辅助提取枳壳中总黄酮工艺[J]. *食品科学*, 2012(2):24-28.
- [16] Tripoli E, Guardia M L, Giammanco S, et al. Citrus, flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review[J]. *Food Chem*, 2007, 104(2):466-479.

(收稿日期 2017-01-06)