DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.02.025

基于DPPH联合GC-MS技术快速筛选棒毛络新妇油脂的抗氧化成分

王诗雨,吕恒,高萌,陈彤彤,赵晨曦,罗建蓉
(大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室,大理大学药学院,云南 大理 671000)

摘要:目的 建立1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl,DPPH)联合气相色谱和质谱联用技术(Gas Chromatography-Mass Spectrometry,GC-MS)快速筛选棒毛络新妇油脂中的抗氧化活性成分。方法 采用DPPH自由基化学反应与GC-MS色谱分析相结合的方法进行研究,通过分析棒毛络新妇油脂与自由基反应前后色谱图的变化来筛选抗氧化成分,并以各化合物的色谱峰面积降低率评价其抗氧化活性。同时进行方法学考察,并采用酶标仪法测定对照品的自由基清除能力,以验证DPPH-GC-MS方法的抗氧化成分筛选结果。结果 从棒毛络新妇油脂中共鉴定出22个化合物,占总量的89.67%,主要为脂肪酸和脂肪酸酯,其中油酸甲酯和亚油酸甲酯相对含量较高。通过DPPH-GC-MS方法从中快速筛选到16个抗氧化成分,其中2,4-二叔丁基苯酚、硬脂酸乙酯、亚油酸、亚油酸乙酯、油酸乙酯和棕榈酸乙酯的抗氧化能力较强。活性验证结果表明DPPH-GC-MS方法可靠,可对天然产物中的抗氧化活性物质进行快速筛选和鉴定。结论 DPPH-GC-MS方法可简便高效地筛选出棒毛络新妇油脂中的抗氧化成分,为进一步开发利用棒毛络新妇资源提供实验依据。

关键词:棒毛络新妇;油脂;DPPH-GC-MS;抗氧化成分
中图分类号:R284.2 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)02-0108-05

Rapid Screening of Antioxidants of Oil Extracted from Bangmaoluoxinfu (Trichonephila clavata) Based on GC-MS Coupled with DPPH Assay

WANG Shiyu, LYU Heng, GAO Meng, CHEN Tongtong, ZHAO Chenxi, LUO Jianrong
(Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China)

Abstract: *Objective* To establish a gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) technique using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) as a free radical for rapid screening of antioxidant active components in the oil extracted from Bangmaoluoxinfu (Trichonephila clavata). *Methods* The method combining GC-MS chromatographic analysis with DPPH radical chemical reaction was used to screen antioxidant components by analyzing the changes in the chromatographic of the oil extracted from Bangmaoluoxinfu (Trichonephila clavata) before and after reaction with DPPH. Furthermore, the antioxidant activity of each compound was evaluated by the rate of reduction of the peak area of the chromatograms. At the same time, to verify the screening results of antioxidants by the DPPH-GC-MS method, a methodological study was carried out, and the free radical scavenging ability of the control product was determined by a microplate reader. *Result* A total of 22 compounds were identified from the oil extracted from Bangmaoluoxinfu (Trichonephila clavata), accounting for 89.67% of the total, mainly consisting of fatty acids and esters, with relatively high levels of methyl oleate and methyl linoleate. Sixteen antioxidants were rapidly screened from them by the DPPH-GC-MS method, among which 2,4-Di-tert-butylphenol, ethyl stearate, linoleic acid, ethyl linoleate, ethyl oleate and palmitic acid ethyl ester showed strong antioxidant capacity. The results of activity verification showed that the DPPH-GC-MS method was reliable and can be used for rapid screening and identification of antioxidants in natural products. *Conclusion* The DPPH-GC-MS method can simply and efficiently screen out the antioxidants in the oil extracted from Bangmaoluoxinfu (Trichonephila clavata), and provided the experimental basis for further development and utilization of Bangmaoluoxinfu (Trichonephila clavata) resources.

Keywords: Bangmaoluoxinfu (Trichonephila clavata); oil; DPPH-GC-MS; antioxidants

基金项目:国家自然科学基金项目(32160113);云南省地方本科高校基础研究联合专项(202101AO070274);云南省昆虫生物医药研发重点实验室开放项目(AP2022004);云南省大学生创新创业训练计划项目(202210679010);云南省"兴滇英才支持计划"团队专项(202305AS350001)
作者简介:王诗雨(1998-),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士在读,研究方向:药效物质基础。
通讯作者:罗建蓉(1979-),女(傣族),云南玉溪人,副教授,硕士研究生导师,研究方向:药效物质基础及质量标准。E-mail:4578486@qq.com。

棒毛络新妇(*Trichonephila clavata*)为节肢动物门蛛形纲蜘蛛目圆蛛科毛络新妇属蜘蛛[1],民间多称其为花蜘蛛、金丝蜘蛛[2],广泛分布于云贵高原,为一年生节肢动物[3]。蜘蛛具有悠久的药用历史,早在唐代《本草拾遗》中便记载蜘蛛"主蛇毒,温疟,霍乱,止呕逆"。《本草纲目》记载蜘蛛"微寒、有小毒,主治婴儿口噤、泄痛脱肛、结核、蛇虫叮咬等"。明代陈文治编撰的《疡科选粹》记载棒毛络新妇的临床验方"花蛛散",用于治疗内外痔。《中国药用动物志》中记载棒毛络新妇以全体入药,微苦、凉,有小毒,具有解热消肿、截疟杀虫、退黄生肌

的功效,主治温证、瘰疬、疮肿、毒蛇咬伤等[4]。现代研究发现棒毛络新妇提取物对人口腔上皮癌 KB 细胞株、人肺癌 A549 细胞和白血病 HL-60 细胞具有显著抑制作用,具有抑制金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌生长的作用,具有抑制单纯疱疹病毒 HSV-1 生长的作用[5-8]。棒毛络新妇毒液中含有的 N-酰基氨基酸 JSTX-3 具有抗癫痫作用[9-10]。蛛丝中的主要成分黄尿酸可抑制广谱细菌生长[11]。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl,DPPH)是一种稳定存在的自由基,当抗氧剂与 DPPH 自由基反应时抗氧剂把电子和质子传递给 DPPH 自由基,抗氧剂被氧化结构改变[12-13]。基于此原理,可用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography,HPLC)或气相色谱(Gas Chromatography,GC)分析天然产物与 DPPH 自由基反应前后色谱峰面积的变化,从复杂成分中快速筛选出抗氧化活性成分[14]。对于挥发性天然产物更适于用 DPPH 自由基结合 GC 进行检测,WANG X 等[15]运用 DPPH-GC-质谱(Mass Spectrometry,MS)方法在温郁金挥发油中筛选到 5 种抗氧化活性成分。NIE J Y 等[16]运用 DPPH、ABTS 和羟基等自由基联合 GC 电子鼻法筛选八角茴香精油中的抗氧化成分。目前棒毛络新妇的研究主要集中于蛛毒生物活性的研究[9,17],对于棒毛络新妇全虫化学成分的研究较少。课题组前期采用GC-MS 分析不同产地的棒毛络新妇油脂,发现其主要成分类型为脂肪酸[18]。鉴于此,本研究通过测定棒毛络新妇油脂的 DPPH 自由基清除率来评估其抗氧化能力,并进一步建立 DPPH-GC-MS 方法,通过比较与 DPPH 自由基反应前后色谱图的变化,从而快速筛选和鉴定棒毛络新妇油脂中的抗氧化活性物质。以期综合评价棒毛络新妇油脂的抗氧化活性,并明确其抗氧化物质基础,丰富棒毛络新妇药效物质基础数据,为棒毛络新妇资源的开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

7890A/5975C 型气相色谱-质谱联用分析仪(美国 Agilent 公司);Varioskan LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SB25-12D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);R-210 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司);FA2104 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 试药

棒毛络新妇样品于 2022 年 10 月份采集于云南大理,经大理大学杨自忠教授鉴定为毛络新妇属蜘蛛棒毛络新妇(*Trichonephila clavata*)。DPPH 自由基(日本东京化成工业株式会社,批号:KN54G-AN);维生素 C(日本东京化成工业株式会社,批号:8ABZI-JE);BHT(日本东京化成工业株式会社,批号:KSSZD-DB);油酸(上海源叶生物科技有限公司,批号:M21GB149066);肉豆蔻酸(上海源叶生物科技有限公司,批号:J051IS219065);甲醇(分析纯,西陇科学股份有限公司,批号:190222)。

2 方法与结果

2.1 棒毛络新妇油脂的制备

棒毛络新妇鲜品去足后,称取 95.8 g 研碎,用 80% 乙醇超声提取 6 次,每次 30 min,提取液减压浓缩至小体积,用石油醚萃取 3 次,萃取液经回收溶剂后冻干,制得棒毛络新妇油脂,得率为 6.5%。

2.2 酶标仪法抗氧化活性测定

采用倍比稀释法配制浓度为 4、2、1、0.5、0.25 mg·mL^{-1} 的棒毛络新妇油脂甲醇溶液。参考文献[19-20]方法,分别取棒毛络新妇油脂溶液 50 μL 和 0.2 mmol·L^{-1} 的 DPPH 甲醇溶液 50 μL 于 96 孔板中混匀,室温下避光反应 30 min,517 nm 处测吸光度(A),Vc 为阳性对照,设 3 个重复,取平均值,按公式计算清除率。DPPH 自由基清除率 = [1-(A$_1$-A$_2$)/A$_0$] × 100%,式中 A$_1$ 为供试品 + DPPH,A$_2$ 为供试品 + 甲醇,A$_0$ 为 DPPH + 甲醇。

检测结果由图 1 可知,棒毛络新妇油脂具有一定抗氧化能力,其 DPPH 自由基清除能力与浓度呈明显的正相关。当油脂浓度为 4.0 mg·mL^{-1} 时,DPPH 清除率达 91.22%,其清除 DPPH 的 IC$_{50}$ 值为 1.45 mg·mL^{-1}。

2.3 DPPH-GC-MS 法抗氧化成分筛选

2.3.1 GC-MS 检测条件 GC 条件:Agilent HP-5MS 石英弹性毛细管柱(30 m×250 μm,0.25 μm),载气为高纯氦,进样量为 1.0 μL,进样口温度 230 ℃,分流比 10∶1,柱流量 1.0 mL·min^{-1};升温程序:起始柱温 60 ℃,保持 1 min,以 20 ℃·min^{-1} 升温至 240 ℃,后以 1 ℃·min^{-1} 升温至 250 ℃,再按 5 ℃·min^{-1} 升温至 260 ℃。

MS 条件:EI 离子源,离子源温度 230 ℃,电离能量为 70 eV;四极杆温度 150 ℃;质量扫描范围为全扫描;溶剂延迟 3 min。质谱采用 NIST11.L 标准谱库进行检索。

2.3.2 DPPH 自由基浓度考察 DPPH 自由基浓度是影响筛选抗氧化成分的关键因素,浓度过低会造成低活性或低含量的抗氧化成分无法有效筛选;浓度过高会使其分解产物增多,增加色谱峰分离难度,干扰抗氧化成分筛选[14],故而本文对 DPPH 自由基浓度进行考察[15,21]。配制 2、1、0.5、0.25 mg·mL^{-1} 的 DPPH 甲醇溶液,分别取各浓度的 DPPH 溶液 0.5 mL 与 1 mg·mL^{-1} 的棒毛络新妇油脂溶液 0.5 mL 混匀,于 37 ℃下避光反应 30 min,将反应液按“2.3.1”项下条件进行检测,考察不同浓度 DPPH 自由基对色谱峰峰面积降低率的影响。

结果(插页Ⅻ图 1、表 1)显示,不同浓度的 DPPH 自由基对样品中的抗氧化活性色谱峰峰面积的降低程度有明显的影响;随 DPPH 浓度增大,峰面积降低的色谱峰数目增多,同时主要活性色谱峰的峰面积降低率也逐渐增大。当 DPPH 自由基浓度为 0.5 mg·mL^{-1} 时,峰面积降低的变化最明显;而浓度继续增大至≥1 mg·mL^{-1} 时,峰面积降低率无更明显增加,故后续实验以 0.5 mg·mL^{-1} 为最佳的 DPPH 自由基浓度。

表 1 不同浓度 DPPH 对峰面积降低率的影响 单位:%

DPPH 浓度/(mg·mL^{-1})	3 号峰	7 号峰	9 号峰	10 号峰	13 号峰	14 号峰	17 号峰	18 号峰	19 号峰	20 号峰	21 号峰
0.25	0.06	10.55	14.66	74.04	-0.28	0.21	28.88	10.62	70.56	68.24	18.59
0.5	90.55	17.38	24.24	71.03	21.81	17.79	41.90	55.65	76.68	70.95	89.22
1	100.00	18.91	26.5	57.72	12.45	11.07	34.95	58.47	78.51	58.21	90.12
2	100.00	17.46	34.82	51.37	14.24	19.32	43.86	59.32	82.49	65.94	92.80

2.3.3 抗氧化成分筛选流程 取 1 mg·mL^{-1} 的棒毛络新妇油脂甲醇溶液与 0.5 mg·mL^{-1} 的 DPPH 自由基甲醇溶液等体积混匀,37 ℃下避光反应 30 min,制得反应后样品;加等体积甲醇代替自由基试剂,制得反应前样品,将各样品按“2.3.1”项下条件进行检测,通过计算分析反应前后各色谱峰的峰面积降低率,来筛选抗氧化活性成分。

2.3.4 抗氧化成分筛选结果 棒毛络新妇油脂经 GC-MS 分析,从中共鉴定 22 个化学成分(见表 2 和插页Ⅻ图 2),相对含量占总量 89.67%,主要成分类型为脂肪酸和脂肪酸酯,另外检出少量烷烃和酚类。检出脂肪酸酯的数目最多为 13 个,其中油酸甲酯和亚油酸甲酯的含量最高,其相对含量均大于 10%。

与 DPPH 自由基反应后，棒毛络新妇油脂的色谱图中共 16 个色谱峰的峰面积有不同程度减少。其中 3、10、18、19、20 和 21 号峰的峰面积减少明显，峰面积降低率超过 50%，提示其对应的化合物 2,4－二叔丁基苯酚、棕榈酸乙酯、亚油酸、亚油酸乙酯、油酸乙酯和硬脂酸乙酯具有较强的 DPPH 自由基清除能力，为棒毛络新妇油脂中的强抗氧化成分，其中以油酸乙酯、亚油酸乙酯和亚油酸为丰量抗氧化成分。另外，1、2、5、6、7、9、11、13、14 和 17 号峰的峰面积呈现一定程度减少，峰面积降低率为 8.74 % ~ 41.90%，提示正十一烷、正十二烷、肉豆蔻酸甲酯、肉豆蔻酸、棕榈油酸甲酯、棕榈酸、10－二十一碳烯、亚油酸甲酯、油酸甲酯和油酸等成分在棒毛络新妇油脂中发挥一定程度的抗氧化作用。见表 3。

表 2 棒毛络新妇油脂的化学成分

峰号	保留时间/(min)	化合物名称	分子式	相对含量/(%)
1	4.96	正十一烷 Hendecane	$C_{11}H_{24}$	0.86
2	5.74	正十二烷 Dodecane	$C_{12}H_{26}$	0.55
3	7.94	2,4－二叔丁基苯酚 2,4－Di－tert－butylphenol	$C_{14}H_{22}O$	2.67
4	8.71	二苯胺 Diphenylamine	$C_{12}H_{11}N$	1.63
5	9.15	肉豆蔻酸甲酯 Methyl myristate	$C_{15}H_{30}O_2$	0.70
6	9.35	肉豆蔻酸 Myristic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	0.40
7	10.14	棕榈油酸甲酯 Methyl palmitoleate	$C_{17}H_{32}O_2$	7.36
8	10.24	十三烷酸甲酯 Methyl tridecanoate	$C_{17}H_{34}O_2$	8.32
9	10.42	棕榈酸 Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	5.85
10	10.61	棕榈酸乙酯 Palmitic acid ethyl ester	$C_{18}H_{36}O_2$	4.43
11	10.69	10－二十一碳烯 10－Heneicosene	$C_{12}H_{42}$	0.82
12	10.81	十七烷酸甲酯 Methyl margarate	$C_{18}H_{36}O_2$	0.50
13	11.27	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	$C_{19}H_{34}O_2$	10.34
14	11.31	油酸甲酯 Methyl oleate	$C_{19}H_{36}O_2$	18.46
15	11.34	13－十八碳烯酸甲酯 13－Octadecylenoic acid methyl ester	$C_{19}H_{36}O_2$	7.37
16	11.46	16－甲基十七烷酸甲酯 16－Methylheptadecanoic acid methyl ester	$C_{19}H_{38}O_2$	3.06
17	11.56	油酸 Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	2.80
18	11.60	亚油酸 Linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	3.26
19	11.74	亚油酸乙酯 Ethyl linoleate	$C_{20}H_{36}O_2$	3.39
20	11.77	油酸乙酯 Ethyl oleate	$C_{20}H_{38}O_2$	5.14
21	11.95	硬脂酸乙酯 Ethyl stearate	$C_{20}H_{40}O_2$	1.23
22	13.17	18－甲基十九烷酸甲酯 Methyl 18－methylnonadecanoate	$C_{21}H_{42}O_2$	0.53

2.4 *方法学考察*

2.4.1 *线性关系考察* 将 2,6－二叔丁基对甲酚(BHT)、肉豆蔻酸和油酸对照品配制成 0.2、0.1、0.05、0.025 和 0.012 5 mg·mL^{-1}系列浓度的混合对照品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件检测。以浓度为横坐标，对照品色谱峰面积为纵坐标，进行线性回归，得到 3 个对照品的线性回归方程(见表 4)。结果表明，在上述色谱条件下，3 个对照品在 0.012 5 ~ 0.2 mg·mL^{-1}范围内呈良好的线性关系。

2.4.2 *精密度试验* 取混合对照品溶液，按“2.3.1”项下条件连续进样 6 次，记录峰面积，计算 RSD 值。结果得 BHT、肉豆蔻酸和油酸对照品峰面积的 RSD 值分别为 1.64%、0.99% 和 1.47%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 *重复性试验* 取同一批棒毛络新妇样品，按“2.1”方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3.1”项下条件进行分析，记录保留时间及峰面积，计算 RSD 值。所鉴定出的 22 种成分保留时间的 RSD 值在 0 ~ 0.01% 之间，峰面积的 RSD 值在 0.19% ~ 5.55% 之间，表明在该色谱条件下方法重复性良好。

表 3 棒毛络新妇油脂中抗氧化成分

峰号	保留时间/(min)	化合物名称	反应前峰面积	反应后峰面积	峰面积降低率/(%)
1	4.96	正十一烷	15 743	14 367	8.74
2	5.74	正十二烷	10 479	9 527	9.09
3	7.94	2,4－二叔丁基苯酚	47 251	4466	90.55
5	9.15	肉豆蔻酸甲酯	11 388	10 341	9.19
6	9.35	肉豆蔻酸	5 011	4509	10.01
7	10.14	棕榈油酸甲酯	147 278	121 677	17.38
9	10.42	棕榈酸	91 168	69 069	24.24
10	10.61	棕榈酸乙酯	71 210	20 633	71.03
11	10.69	10－二十一碳烯	10 355	9348	9.73
13	11.27	亚油酸甲酯	279 425	218 469	21.81
14	11.31	油酸甲酯	359 529	295 562	17.79
17	11.56	油酸	46 977	27 295	41.90
18	11.60	亚油酸	54 664	24 246	55.65
19	11.74	亚油酸乙酯	56 797	13 242	76.68
20	11.77	油酸乙酯	86 142	25 028	70.95
21	11.95	硬脂酸乙酯	15 567	1678	89.22

表 4 3 个对照品的线性回归方程

对照品	回归方程	相关系数(r)
BHT	y = 1 457 943x + 35 895 688	0.991 3
肉豆蔻酸	y = 1 480 521x － 4 849 509	0.999 8
油酸	y = 1 410 688x － 12 759 988	0.994 5

2.4.4 *稳定性试验* 取棒毛络新妇油脂甲醇溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.3.1”项下条件进行检测，计算保留时间及峰面积的 RSD 值。所鉴定出的 22 种成分保留时间 RSD 值在 0 ~ 0.14% 之间，峰面积 RSD 值在 2.58% ~ 7.86% 之间，表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.4.5 *抗氧化成分筛选结果验证* 油酸和肉豆蔻酸为棒毛络新妇油脂中的化学成分，油酸具有 DPPH 自由基清除能力[22－23]；肉豆蔻酸表现出微弱的 DPPH 自由基清除能力[24]；BHT 为人工合成抗氧剂，具有很强的抗氧化活性，常用作阳性对照[25]，故而选择 BHT、油酸和肉豆蔻酸为对照品进行验证。取“2.4.1”项下 1 mg·mL^{-1}的混合对照品溶液，采用 DPPH－GC－MS 方法按“2.3.3”项下操作，来研究混合对照品中的抗氧化活性成分；并采用酶标仪法按“2.2”项检测对照品的自由基清除率，加以验证其抗氧化活性。

DPPH－GC－MS 法检测结果(插页Ⅻ图 3)显示混合对照品中 BHT 的峰面积降低率最高为 93.18%，其次为油酸其峰面积降低率为 35.32%，而肉豆蔻酸仅降低 6.31%，3 种对照品的抗氧化能力强弱为 BHT > 油酸 > 肉豆蔻酸。酶标仪法检测结果(插页Ⅻ图 4)显示，3 个对照品中 BHT 的抗氧化能力最强，油酸次之，肉豆蔻酸最弱。由此可见，DPPH－GC－MS 方法的筛选结果与酶标仪法的检测结果一致，表明 DPPH－GC－MS 方法的研究结果可靠。

3 讨论

棒毛络新妇是一种广泛分布于云贵高原的药用蜘蛛，目前未见有关棒毛络新妇抗氧化活性及其成分的相关报道。本研究利用 DPPH 自由基与棒毛络新妇油脂反应，通过 GC－MS 分析反应前后色谱峰的变化，快速发现棒毛络新妇油脂中所含有的 16 种抗氧化活性成分。含量较高的抗氧化活性成分为不饱和脂肪酸及其酯类成分，主要有亚油酸、油酸、亚油酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸乙酯和油酸乙酯。其中，亚油酸是一种人体正

常代谢不可缺少的但自身又无法合成的必需脂肪酸[26]，可抑制动脉血栓形成、降低人体血清中胆固醇水平，具有防治高血压、预防癌症、调节人体免疫的功能[27]；油酸是人体最易消化吸收的脂肪酸，具有保护心脑血管健康、调节血脂水平的作用[28]。抗氧化活性最强的成分 2，4 - 二叔丁基苯酚对过氧化氢诱导的 PC12 细胞和小鼠的氧化应激起保护作用[29-30]，对人胃腺癌 AGS 细胞具有抑制作用[31]，并具有良好的抗结核活性[32]。

在抗氧化成分筛选实验中，观察到与 DPPH 自由基反应后，色谱图中新增加 3 个色谱峰（Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ号），其峰面积随 DPPH 自由基浓度增大而增加，结合质谱信息判断为 DPPH 自由基及其分解产物的色谱峰。在 QIU J Y 等[33-34] 运用 DPPH - HPLC - DAD - TOF/MS 方法筛选花生壳中的天然抗氧化剂及运用 DPPH - HPLC - PAD 筛选银杏花粉中的抗氧化成分时也出现过类似情况。因此本实验中需要考察 DPPH 自由基浓度，以避免浓度过高导致分解产物峰面积过大，增加色谱峰分离难度，干扰抗氧化成分筛选。

从混合物中快速筛选抗氧化活性成分是具有挑战的，传统的自由基清除率测定方法主要用于评价总提物的抗氧化活性，而针对其中单体成分的抗氧化研究需要先分离得到单体化合物再进行活性测定。DPPH - GC - MS 方法采用自由基化学反应与色谱法分析相结合，可快速从混合物中筛选出抗氧化活性成分，无须进行单体成分的分离，相较于传统模式具有操作简便、耗时短等优势。本研究建立 DPPH - GC - MS 方法简便高效地对棒毛络新妇油脂中抗氧化活性成分进行筛选，为药用蜘蛛棒毛络新妇的进一步开发利用提供实验基础。

参考文献

[1] KUNTNER M, HAMILTON C A, CHENG R C, et al. Golden orbweavers ignore biological rules: phylogenomic and comparative analyses unravel a complex evolution of sexual size dimorphism[J]. Syst Biol, 2019, 68(4): 555 - 572.
[2] YONG H S, SONG S L, CHUA K O, et al. Complete mitochondrial genomes and phylogenetic relationships of the Genera *Nephila* and *Trichonephila* (Araneae, Araneoidea)[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 10680.
[3] 万晓瑜，廖绍波. 云南民间食用蜘蛛初报[J]. 楚雄师范学院学报，2013，28(3)：56 - 59.
[4] 李军德，黄璐琦，曲晓波. 中国药用动物志[M]. 2 版. 福州：福建科学技术出版社，2013：432 - 433.
[5] 高鹏飞，刘正文，郑园园，等. 络新妇属蜘蛛提取物抗肿瘤部位的制备方法及医药用途：CN103638057A[P]. 2014 - 03 - 19.
[6] 巫秀美，郭华，冯萍，等. 抑制真菌生长的络新妇属蜘蛛有效部位的制备及其用途：CN103655631A[P]. 2014 - 03 - 26.
[7] 陈俊雅，李启艳，方春生，等. 一种络新妇属蜘蛛有效部位的制备及抗革兰氏菌医药用途：CN103638058A[P]. 2014 - 03 - 19.
[8] 杨自忠，朱振东，马艳滟，等. 一种具抗病毒功效的络新妇属蜘蛛有效部位及其制备方法：CN104042632B[P]. 2018 - 05 - 01.
[9] SALAMONI S D, COSTA DA COSTA J, PALMA M S, et al. Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX - 3 on rat hippocampal CA1 neurons *in vitro*[J]. Brain Res, 2005, 1048(1 - 2): 170 - 176.
[10] JIN L, FANG M Q, CHEN M R, et al. An insecticidal toxin from *Nephila clavata* spider venom[J]. Amino Acids, 2017, 49(7): 1237 - 1245.
[11] FUJIWARA M, KONO N, HIRAYAMA A, et al. Xanthurenic acid is the main pigment of *Trichonephila clavata* gold dragline silk[J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 563.
[12] 施树云，郭柯柯，彭胜，等. DPPH - HPLC - QTOF - MS/MS 快速筛选和鉴定杜仲黑茶中抗氧化活性成分[J]. 天然产物研究与开发，2018，30(11)：1913 - 1917.
[13] 袁永雷，王飞飞，曲丽萍. HPLC - DPPH 快速发现重楼果壳总黄酮中抗氧化成分及其活性初步验证[J]. 中国药师，2021，24(8)：550 - 552，557.
[14] 钱金珠，梁明，余意，等. HPLC - DPPH 在线联用技术评价制首乌的抗氧化活性[J]. 中国药科大学学报，2022，53(2)：185 - 191.
[15] WANG X, ZUO G L, WANG C Y, et al. An off - line DPPH - GC - MS coupling countercurrent chromatography method for screening, identification, and separation of antioxidant compounds in essential oil[J]. Antioxidants, 2020, 9(8): 702.
[16] NIE J Y, LI R, JIANG Z T, et al. Screening and evaluation of radical scavenging active compounds in the essential oil from *Magnolia biondii* Pamp by electronic nose coupled with chemical methodology [J]. Ind Crops Prod, 2020, 144: 112060.
[17] DING L J, WU X M, ZHANG C G, et al. Toxin diversity revealed by *de novo* transcriptome assembly for venom gland in two species of spiders (*Trichonephila clavata* and *Sinopoda pengi*)[J]. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2022, 42: 100984.
[18] 顾小亮，杨月娥，杨志斌，等. 不同产地棒毛络新妇蜘蛛的脂溶性成分 GC - MS 分析[J]. 中华中医药学刊，2023，41(4)：239 - 243，后插 41 - 后插 42.
[19] 赵彤，邵瑾，杨颖，等. 藏紫菀不同溶剂提取物的体外抗氧化活性[J]. 中成药，2021，43(4)：1103 - 1107.
[20] 王立抗，陈鸿庚，黄智霖，等. 牛大力不同部位总黄酮、多酚含量及其抗氧化活性研究[J]. 中华中医药学刊，2022，40(3)：139 - 142.
[21] SHI Q Y, CHEN J L, ZHOU Q F, et al. Indirect identification of antioxidants in Polygalae *Radix* through their reaction with 2, 2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl and subsequent HPLC - ESI - Q - TOF - MS/MS[J]. Talanta, 2015, 144: 830 - 835.
[22] 赵育卉. 盐生海芦笋及其内生真菌 Salicorn - 5 次级代谢产物研究[D]. 南京：南京农业大学，2013.
[23] 任永娜. SLPE 的抗氧化、抗肿瘤成分分析及活性检测[D]. 石家庄：河北师范大学，2011.
[24] 袁子民，刘欢，贾天柱，等. 肉豆蔻及炮制品醇提取物的抗氧化作用[J]. 长春中医药大学学报，2015，31(5)：930 - 932.
[25] 周军伟，陈建发，万代红，等. 酚类抗氧剂 BHT 的应用和降解路径的研究进展[J]. 应用化工，2022，51(4)：1077 - 1082.
[26] SINCLAIR A J. 世界食物供应中亚油酸含量高对人体健康的影响[J]. 粮油食品科技，2022，30(3)：23 - 32.
[27] 徐水宇，庄怡雪，詹志来，等. 鸦胆子的化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志，2022，47(19)：5158 - 5170.
[28] 金青哲，王月，方靖凯，等. 油酸和高油酸油脂对人体健康的影响研究进展[J]. 粮食与油脂，2023，36(3)：1 - 3，8.
[29] ZHAO F Q, WANG P, LUCARDI R D, et al. Natural sources and bioactivities of 2, 4 - di - tert - butylphenol and its analogs[J]. Toxins, 2020, 12(1): 35.
[30] CHOI S J, KIM J K, KIM H K, et al. 2, 4 - Di - tert - butylphenol from sweet potato protects against oxidative stress in PC12 cells and in mice[J]. J Med Food, 2013, 16(11): 977 - 983.
[31] SONG Y W, LIM Y, CHO S K. 2, 4 - Di - tert - butylphenol, a potential HDAC6 inhibitor, induces senescence and mitotic catastrophe in human gastric adenocarcinoma AGS cells[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865(5): 675 - 683.
[32] KAARI M, JOSEPH J, MANIKKAM R, et al. A novel finding: 2, 4 - Di - tert - butylphenol from *Streptomyces bacillaris* ans2 effective against *Mycobacterium* tuberculosis and cancer cell lines[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2023, 195(11): 6572 - 6585.
[33] QIU J Y, CHEN L L, ZHU Q J, et al. Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH - HPLC - DAD - TOF/MS methods [J]. Food Chem, 2012, 135(4): 2366 - 2371.
[34] QIU J Y, CHEN X Y, NETRUSOV A I, et al. Screening and identifying antioxidative components in *Ginkgo biloba* pollen by DPPH - HPLC - PAD coupled with HPLC - ESI - MS2[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170141.

基于 DPPH 联合 GC－MS 技术快速筛选棒毛络新妇油脂的抗氧化成分

（正文见 108－111 页）

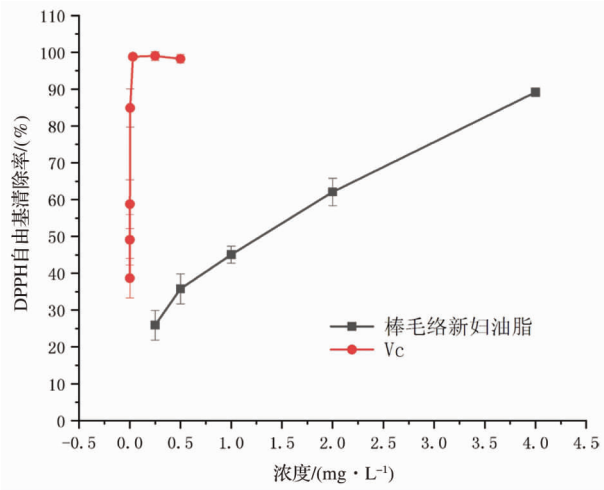


图 1 棒毛络新妇油脂的 DPPH 自由基清除能力

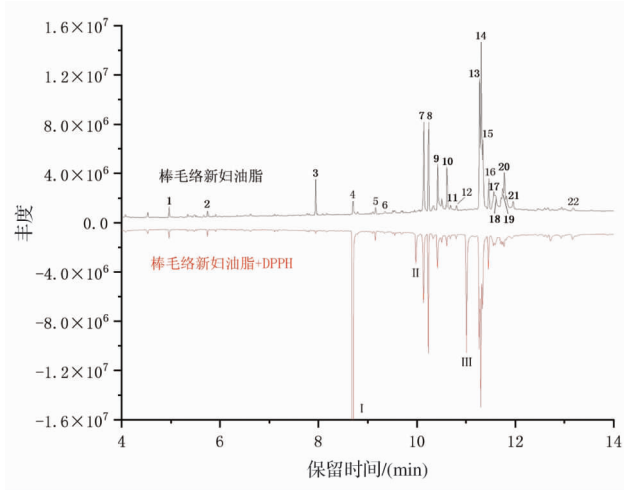


图 2 棒毛络新妇油脂与 DPPH 反应前后的色谱图

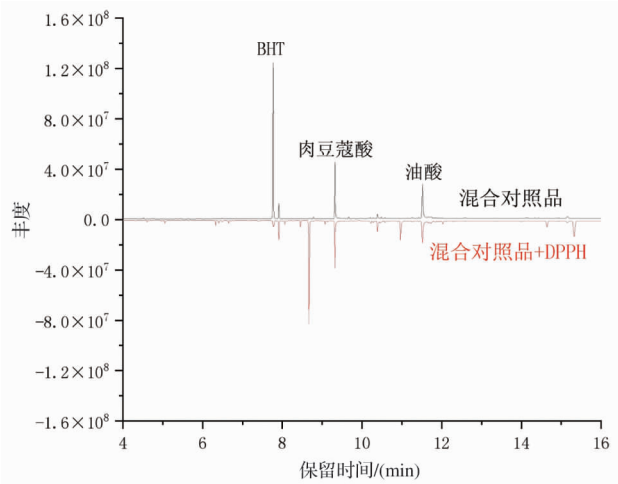


图 3 混合对照品与 DPPH 反应前后的色谱图

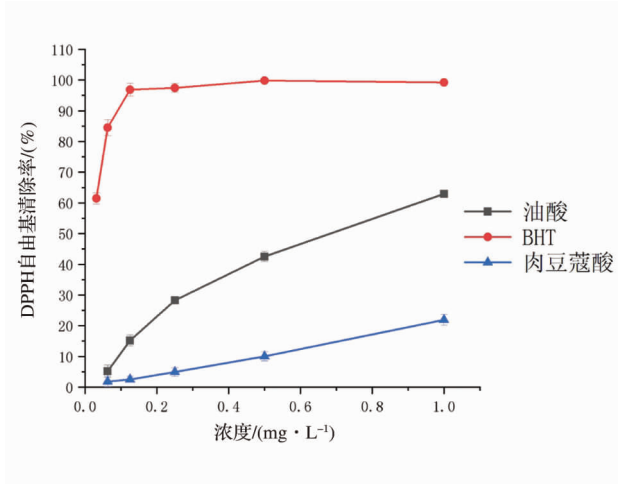


图 4 3 个对照品的 DPPH 自由基的清除能力