



刘亚群,陈良辉,张泽坤,等. 不同马尾松松针提取液的成分分析与抗氧化活性研究[J]. 轻工学报,2025, 40(2):61-71.
LIU Y Q, CHEN L H, ZHANG Z K, et al. Analysis and antioxidant activity study of different extraction liquid from *Pinus massoniana* needles[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(2):61-71.
DOI: 10.12187/2025.02.007

不同马尾松松针提取液的成分分析与抗氧化活性研究

刘亚群^{1,2}, 陈良辉^{1,2}, 张泽坤^{1,2}, 郑玉忠^{1,2}, 张振霞^{1,2}

1. 韩山师范学院 生命科学与食品工程学院, 广东 潮州 521041;
2. 广东省粤东药食资源功能物质与治未病研究重点实验室, 广东 潮州 521041

摘要: 为系统研究马尾松 (*Pinus massoniana*) 松针的化学成分及其抗氧化活性, 采用气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用法研究其挥发油、水提液和醇提液的主要成分, 对活性成分进行网络药理学分析, 并采用自由基清除实验评估其抗氧化活性。结果表明: 挥发油中鉴定出 60 种化合物, 占比达 95.13%, 主要为萜类化合物, 水提液和醇提液分别含有 10 种和 16 种化合物, 主要为酮类化合物。不同提取液的成分分布差异显著, 变量权重值 (Variable Importance for the Projection, VIP) 分析确认蒎烯 (VIP=1.31)、1-石竹烯 (VIP=1.47)、L- β -蒎烯 (VIP=1.80)、 α -蒎烯 (VIP=3.32)、3-硝基-1-苯基丙基-1-酮 (VIP=7.86)、2-乙氧基异硫氰酸苯酯 (VIP=1.13) 这 6 种成分为候选差异化合物。差异化合物可能通过醛酮还原酶 AR 等影响氧化应激和自由基清除相关的生物通路发挥作用。在抗氧化活性评估中, 当 DPPH 自由基清除率达到 80% 时, 醇提液、水提液和挥发油的质量浓度分别为 0.2 mg/mL、0.9 mg/mL 和 80 mg/mL; 当 ABTS⁺ 清除率达到 80% 时, 三者的质量浓度分别为 0.07 mg/mL、0.2 mg/mL 和 10.0 mg/mL; 当 $\cdot$ OH 自由基清除率达到 80% 时, 醇提液的质量浓度为 3.5 mg/mL, 而水提液和挥发油的清除能力较低且不稳定; 当提取液质量浓度为 1.00 mg/mL 时, 醇提液的总还原能力最强。因此, 马尾松松针具有显著的抗氧化潜力, 可以通过不同提取方式获得多种具有抗氧化活性的成分。

关键词: 马尾松松针; 提取方式; 气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用法; 网络药理学; 抗氧化活性

中图分类号: TS272.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2025)02-0061-11

0 引言

马尾松 (*Pinus massoniana*) 为松科裸子植物, 主要分布在我国华中和华南地区, 以其广泛的生态适

应性而著称, 常被用于荒山生态修复, 是重要的用材树种^[1]。尽管马尾松在绿化、造纸、建筑等领域具有较高的经济价值, 但其在药食两方面的潜力尚未得到充分开发^[2]。古代医学文献记载, 松针兼具

收稿日期: 2024-04-12; 修回日期: 2024-07-22; 出版日期: 2025-04-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31930004); 广东省科技厅重点注设学科科研能力提升项目 (20222DJ3070); 潮州市科技局项目 (202404GY06)

作者简介: 刘亚群 (1990—), 女, 山西省忻州市人, 韩山师范学院讲师, 博士, 主要研究方向为中药药理分子生物学。E-mail: liuyaquin19900921@126.com

通信作者: 张振霞 (1975—), 女, 甘肃省兰州市人, 韩山师范学院教授, 博士, 主要研究方向为分子生物学。E-mail: zzx8411@hstc.edu.cn

食用和药用双重功效,近年来更是被国家卫生健康委员会新增列入《按照传统既是食品又是中药材物质目录》中,归类为药食同源类物品^[3-5]。《本草纲目》记载,“松针无毒,可长期服用,治百病,安五脏,生毛发,耐寒暑,耐风吹雨打,轻身益气,守中而辟谷延年”。现代研究^[6-7]也表明,马尾松松针提取液富含多种生物活性成分,具有抗菌、抗炎、抗氧化、延缓衰老等多种功效。

目前,对马尾松松针成分及其抗氧化活性的研究已取得一定进展,常见的提取方法包括超临界二氧化碳萃取(Supercritical Carbon Dioxide Extraction Process, SCDEP)、内置超声提取(Integrated Ultrasound Extraction Process, IUEP)、外置超声提取(Outside Ultrasound Extraction Process, OUEP)、低共熔溶剂(Deep Eutectic Solvent, DES)提取等^[8-9],不同提取方法得到的提取液在成分和抗氧化活性上存在显著差异。马尾松松针提取液的成分差异主要体现在总酚、总黄酮、多酚及挥发油成分上^[10-11],这些成分是其抗氧化活性的主要来源。对马尾松松针成分功效的多维度深入研究,有助于挖掘其药食同源潜力,推动健康养生理念及相关产业的发展。然而,目前马尾松松针成分功效的研究处于起步阶段,方法较为传统单一,相关理论基础薄弱,难以支撑其药食同源产业的创新发展。

鉴于此,本研究拟采用气相色谱-质谱(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)联用法,系统分析不同提取方式下马尾松松针挥发油、水提液及醇提液的化学成分,揭示三者之间的成分差异,通过网络药理学方法探究马尾松松针功效,并进行抗氧化活性分析,以期为马尾松松针在抗氧化产品开发中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

主要材料:马尾松松针,采摘自广东省潮州市笔架山,由韩山师范学院植物细胞工程实验室鉴定为马尾松植物的针叶,清洗后在阴凉处晾干,粉碎,备用。

主要试剂:1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-

diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH),美国 Sigma 公司;2,2'-连氮双(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt, ABTS),上海麦克林生化科技有限公司;过氧化氢(质量分数 30%)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、铁氰化钾、过硫酸钾、水杨酸、三氯化铁、硫酸亚铁、三氯乙酸等,国药集团化学试剂有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

H1850R 型台式高速冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司;Agilent 5977B GC/MSD 型 GC-MS 联用仪,安捷伦科技(中国)有限公司;Thermo Fisher Scientific F1 型移液器,赛默飞世尔科技公司;大德 DYF-500 小型高速中药粉碎机,江阴药化机械设备有限公司;科睿才 01 型挥发油提取器,南京科睿才设备有限公司;GL224-1SCN 型分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;T6 新世纪型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;HH-4S 型数显恒温水浴锅,沧州亿轩试验仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 马尾松松针提取液制备 1)挥发油制备:将马尾松松针粉末与蒸馏水按照 m (马尾松松针粉末/g): V (蒸馏水/mL)=1:4 的比例进行混合,将混合物放入 75℃ 恒温水浴锅中 2 h,之后转移到挥发油提取器中继续提取 4 h。将馏出液置于-20℃ 冰箱中冷冻分层,直至固液分离。上层即为淡黄色透明的松针挥发油,冷藏于 4℃ 冰箱中,备用。

2)水提液制备:将马尾松松针粉末与蒸馏水按照 1)中比例进行混合,将混合物置于 75℃ 恒温水浴锅中回流浸提 2 h,过滤,将滤液置于常温、10 000 r/min 条件下离心 10 min,浓缩后,冷藏于 4℃ 冰箱中,备用。

3)醇提液制备:将马尾松松针粉末与体积分数为 70%的乙醇溶液按照 m (马尾松松针粉末/g): V (乙醇/mL)=1:20 的比例进行混合,将混合物置于 85℃ 恒温水浴锅中回流浸提 2 h,过滤,将滤液置于室温、10 000 r/min 条件下离心 10 min,浓缩后,冷藏于 4℃ 冰箱中,备用。

1.3.2 马尾松松针提取液成分分析 取 1.0 μL 马尾松松针提取液(挥发油、水提液、醇提液),使用相应提取溶剂(蒸馏水或体积分数为 70% 的乙醇溶液)进行稀释,充分振荡混匀后,利用 GC-MS 联用仪对其成分进行分析。GC 条件:色谱柱为 DB-5 MS 石英毛细管柱(30.00 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm);载气为高纯 He,流速为 30 mL/min;进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;汽化室温度为 270 $^{\circ}\text{C}$;压力为 50 kPa;进样量为 1.0 μL ,分流比为 20:1;采用程序升温,60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 150 $^{\circ}\text{C}$,保持 19 min,以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 254 $^{\circ}\text{C}$,保持 17 min。MS 条件:采用电子轰击离子源(EI),离子源温度为 230 $^{\circ}\text{C}$,电子能量为 70 eV,传输线温度为 250 $^{\circ}\text{C}$,倍增电压为 1.2 kV,质量扫描范围为 35~800 amu,扫描间隔为 0.5 s,数据库为 NIST14。

1.3.3 马尾松松针提取液的自由基清除能力测定
DPPH 自由基清除能力测定^[12]:向 1 mL 不同质量浓度的提取液中加入 3 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液,振荡混匀后,避光静置 30 min,在 517 nm 波长处测定吸光度,记作 A_x ;用等体积的蒸馏水代替水提液(或用体积分数 70% 的乙醇溶液代替醇提液或用无水乙醇代替挥发油),测得的吸光度记作 A_1 ;用等体积的无水乙醇替换 DPPH-乙醇溶液,测得的吸光度记作 A_0 ,每组实验平行 3 次,结果取平均值。 $\text{DPPH 自由基清除率} = [1 - (A_x - A_0) / A_1] \times 100\%$ 。

ABTS⁺ 自由基清除能力测定^[13]:将等体积的 2.6 mmol/L 过硫酸钾与 7.4 mmol/L ABTS 进行混合,室温避光 12~16 h,使用无水乙醇于 734 nm 波长处将其稀释至吸光度为 0.7 $\pm$ 0.02,制得 ABTS⁺ 工作液。向 2.5 mL 不同质量浓度的提取液中加入 11.25 mL ABTS⁺ 工作液,混匀后室温下避光静置 8 min,测定 734 nm 波长处的吸光度,记作 B_x ;用等体积的蒸馏水代替水提液(或用等体积的体积分数 70% 的乙醇溶液代替醇提液或用等体积的无水乙醇代替挥发油),测得的吸光度记作 B_1 ;用等体积的无水乙醇替换 ABTS⁺ 工作液,测得的吸光度记作 B_0 ,每组实验平行 3 次,结果取平均值。 $\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率} = [1 - (B_x - B_0) / B_1] \times 100\%$ 。

$\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力测定^[12]:将 3 mL 硫酸亚

铁溶液(1 mmol/L)、3 mL 过氧化氢溶液(1 mmol/L)、6 mL 水杨酸-乙醇溶液(3 mmol/L)和 3 mL 不同质量浓度的提取液混合均匀,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min,测定 510 nm 波长处的吸光度,记作 C_x ;用等体积的蒸馏水代替水提液(或用等体积的体积分数 70% 的乙醇溶液代替醇提液或用等体积的无水乙醇代替挥发油),测得的吸光度记作 C_1 ;用等体积的无水乙醇替换不含提取液的空白混合液,测得的吸光度记作 C_0 ,每组实验平行 3 次,结果取平均值。 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率 = $[1 - (C_x - C_0) / C_1] \times 100\%$ 。

总还原能力测定^[13]:将 7.5 mL 磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 值为 6.6)、7.5 mL 铁氰化钾溶液(0.01 g/mL)和 3 mL 不同质量浓度的提取液混合均匀,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 20 min。快速冷却后,加入 7.5 mL 三氯乙酸溶液(0.1 g/mL),混匀后于 3000 r/min 条件下离心 10 min。取上清液,依次加入 3 mL 质量分数为 0.1% 的氯化铁溶液和 7.5 mL 蒸馏水,室温静置 10 min,在 700 nm 波长处测定吸光度,以 4 mL 蒸馏水为参比溶液,每组实验平行 3 次,结果取平均值。

1.4 数据处理分析方法

采用 NIST14 谱库对马尾松松针提取液的化学成分进行自动检索和定性定量分析。通过主成分分析(PCA)和差异性分析筛选不同马尾松松针提取液中的活性成分,利用 Pub Chem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找 Simplified Molecular Input Line Entry specification (SMILES) 格式化学式,导入 Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/>) 和 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 在线平台预测靶标位点。将候选靶标基因导入 STRING11.0 (<https://string-db.org/>) 进行靶点蛋白互作 (Protein Protein Interaction, PPI) 网络分析,用度中心性 (Degree Centrality) 识别网络中的 Hub 基因。使用 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/>) 进行 Gene Ontology (GO) 基因功能注释和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路富集分析。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方式对马尾松松针主要成分的影响分析

通过 GC-MS 检测,马尾松松针挥发油鉴定出 60 种化合物;水提液 10 种,醇提液 16 种。表 1 显示挥发油主要成分占总离子流的 95.13%,包括烯萜类(83.69%)、醇类(7.14%)、酯类(2.20%)等化合物,主要成分为单萜化合物和倍半萜化合物,如 α -蒎烯(21.90%)、L- β -蒎烯(11.70%)、1-石竹烯(9.73%)等。表 2 显示水提液主要成分包括酮类(1.11%)、杂环类(0.42%)、烷烃类(0.09%)等化

合物,其中 1-(4-甲氧基苯基)-2-苯乙烷-1,2-二酮相对含量较高。表 3 显示醇提液主要成分包括芳香烯类(0.52%)、醇类(0.44%)、酮类(17.62%)等化合物,其中 3-硝基-1-苯基丙基-1-酮(16.71%)和 2-乙氧基异硫氰酸苯酯(2.40%)相对含量较高。综上可知,挥发油成分种类较多,水提液和醇提液成分种类相对较少。3 种提取液共有成分非常少,仅在水提液和醇提液中发现两种共有成分,分别为 7-氯-2,3-二氢-3-(4-N,N-二甲基乙胺基亚甲基)-5-苯基-1H-1,4-苯并二氮杂卓-2-酮和 1-甲基-4-氮杂菲-3-羧酸。这表明提取方式的差异导致了成分的多样性增加和相似性较低,反映出不同

表 1 马尾松松针挥发油主要成分及其含量测定结果
Table 1 Composition and their concentrations of *Pinus massoniana* needles volatile oil

化合物种类	化合物序号和名称	相对含量/%	化合物种类	化合物序号和名称	相对含量/%
烯萜类	(C1) 10-柔拿烯	0.03	烯萜类	(C31) δ -葑澄茄烯	3.57
	(C2) α -蒎烯	0.03		(C32) β -榄香烯	3.65
	(C3) 异戊二烯	0.04		(C33) 伪柠檬烯	4.19
	(C4) α -铜烯	0.04		(C34) 蒎烯	8.64
	(C5) β -马利烯	0.04		(C35) 1-石竹烯	9.73
	(C6) α -卡拉胶烯	0.04		(C36) L- β -蒎烯	11.70
	(C7) Z-3,7-二甲基-1,3,6-十八烷三烯	0.08		(C37) α -蒎烯	21.90
	(C8) (E,Z)-2,6-二甲基-2,4,6-三烯	0.09	醇类	(C38) 2-降冰片醇	0.03
	(C9) 长叶烯	0.09		(C39) 2-茨醇	0.04
	(C10) 卡迪纳-3,5-二烯	0.10		(C40) (+)-葑醇	0.06
	(C11) 萜品烯	0.11		(C41) 4-萜烯醇	0.08
	(C12) 卡丁-1,4-二烯	0.11		(C42) 罗西弗醇	0.15
	(C13) γ -蒎烯	0.11		(C43) 百秋里醇	0.16
	(C14) α -葑烯	0.18		(C44) 哌啶醇氧化物	0.17
	(C15) α -镅烯	0.20		(C45) 橙花叔醇	0.40
	(C16) 1-甲基-5-亚甲基-8-(1-甲基乙基)-1,6-环十二烯	0.22		(C46) 香榧醇	0.41
	(C17) (+)-穆洛拉-4(15),5-二烯	0.29		(C47) 喇叭茶萜醇	0.45
	(C18) β -蒎烯	0.30		(C48) 芳樟醇	0.46
	(C19) (+)-香橙烯	0.31		(C49) 萜品醇	0.98
	(C20) (+)- β -椰子树烯	0.46		(C50) (-)- τ -依兰油醇	1.74
	(C21) γ -葑澄茄烯	0.64		(C51) α -毕澄茄醇	2.01
	(C22) γ -穆罗烯	0.79	酯类	(C52) 乙酸橙花酯	0.07
	(C23) α -衣兰油烯	0.84		(C53) 乙酸香叶酯	0.13
	(C24) L-茨烯	0.92		(C54) 乙酸芳樟酯	0.51
	(C25) γ -杜松烯	1.21		(C55) 左旋乙酸龙脑酯	1.49
	(C26) 大根香叶烯 D	2.15	酚类	(C56) 3,5-二叔丁基苯酚	0.21
	(C27) γ -焦烯	2.24		(C57) 维二氟酚	0.22
	(C28) (+)-大根香叶烯	2.65	醛类	(C58) 反式-2-己烯醛	0.64
	(C29) 萜品油烯	2.82		(C59) (-)-L- α -小檗素	0.19
	(C30) 石竹烯	3.18	杂环类	(C60) δ -4-蒎	0.71

表2 马尾松松针水提液主要成分及其含量测定结果

Table 2 Composition and their concentrations of <i>Pinus massoniana</i> needles aqueous extract solution					
化合物种类	化合物序号和名称	相对含量/%	化合物种类	化合物序号和名称	相对含量/%
酮类	(C61) 7-氯-2,3-二氢-3-(4-N,N-二甲基乙胺基亚甲基)-5-苯基-1H-1,4-苯并二氮杂卓-2-酮	0.12	酯类	(C66) 2-甲氧基乙酸十四酯	0.07
	(C62) 2-苯甲酰基-3-异丁烯-六氢吡咯[1,2- α]吡嗪-1,4-酮	0.18	杂环类	(C67) 9-菲胺	0.03
	(C63) 1-(4-甲氧基苯基)-2-苯乙烷-1,2-二酮	0.81		(C68) 1-硝基-4-[2],2,2-三氟-1,1-双(三氟甲基)乙基]	0.03
烷烃类	(C64) 6,6-二乙基十八烷	0.03		(C69) 4-羟基吡啶	0.10
	(C65) 正十四烷	0.06	(C70) 1-甲基-4-氮杂菲-3-羧酸	0.26	

表3 马尾松松针醇提液主要成分及其含量测定结果

Table 3 Composition and their concentrations of <i>Pinus massoniana</i> needles alcohol extract solution					
化合物种类	化合物序号和名称	相对含量/%	化合物种类	化合物序号和名称	相对含量/%
酮类	(C61) 7-氯-2,3-二氢-3-(4-N,N-二甲基乙胺基亚甲基)-5-苯基-1H-1,4-苯并二氮杂卓-2-酮	0.11	烷烃类	(C78) 3,6,9,12,15-五氧庚烷	0.37
				(C79) 3-(1-金刚烷基)类物质	0.81
	(C71) 11H-萘[1,2-b]噻吩并[3,4-d]吡喃-11-酮, 1-氨基-3-甲基	0.81		(C80) 醋酸,2-[4-[(二苯基氨基)硫氧甲基]氨基]苯基]氢	0.05
			杂环类	(C81) 反式-4-(2-(5-硝基-2-呋喃基)乙烯基)-2-喹啉胺	0.13
酯类	(C72) 3-硝基-1-苯基丙基-1-酮	16.71		(C82) <i>L</i> -异硫氨酸	0.15
	(C73) 2-甲氧基乙酸十三酯	0.06		(C70) 1-甲基-4-氮杂菲-3-羧酸	0.18
	(C74) 2,3,6-三氯苯甲酸甲酯	0.08	芳香烯类		
	(C75) 结晶紫内酯	0.14		(C83) 苯乙烯	0.52
	(C76) 二甲氧基亚砷基三硫代碳酸乙酯	0.21	醇类		
	(C77) 2-乙氧基异硫氰酸苯酯	2.40		(C84) (r,R)-(+) -1,4-二甲氧基-2,3-丁二醇	0.44

溶剂和提取过程对化合物亲和力和溶解能力的影响,这也提示了选择适当的提取方式对获得全面的化学成分信息至关重要。

2.2 马尾松松针主要成分与提取方式相关性分析

图1为不同提取方式下马尾松松针PCA分析图,展示了醇提液、挥发油和水提液成分的分布差异,PC1和PC2分别解释了83.73%和16.27%的数据方差。醇提液集中在左下方,挥发油分布在中间偏右,而水提液独立于左上方,显示出显著的特征差异。图中箭头指向对应成分,箭头越长,相应物质对该提取方式的影响和重要性就越大。蒎烯、1-石竹烯、L- β -蒎烯、 α -蒎烯、伪柠檬烯、3-硝基-1-苯基丙基-1-酮、2-乙氧基异硫氰酸苯酯和1-(4-甲氧基苯基)-2-苯乙烷-1,2-二酮箭头较长,这些成分的相对含量在图2中也进行了展示。以VIP为

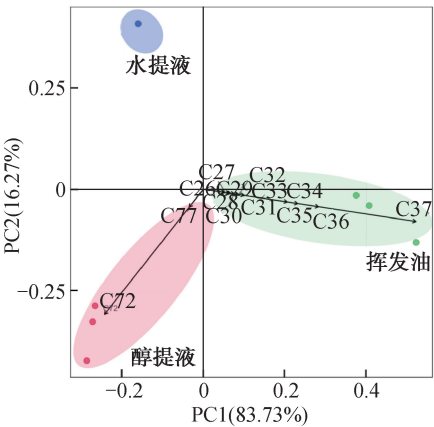


图1 不同提取方式下马尾松松针PCA分析图
Fig.1 PCA distribution of *Pinus massoniana* needles by different extraction methods

指标,对主要成分的重要性进行分析^[14]。由图3可知,VIP>1的差异性成分共有6种,分别为蒎烯(VIP=1.31)、1-石竹烯(VIP=1.47)、L- β -蒎烯(VIP=1.80)、 α -蒎烯(VIP=3.32)、3-硝基-1-苯基丙基-

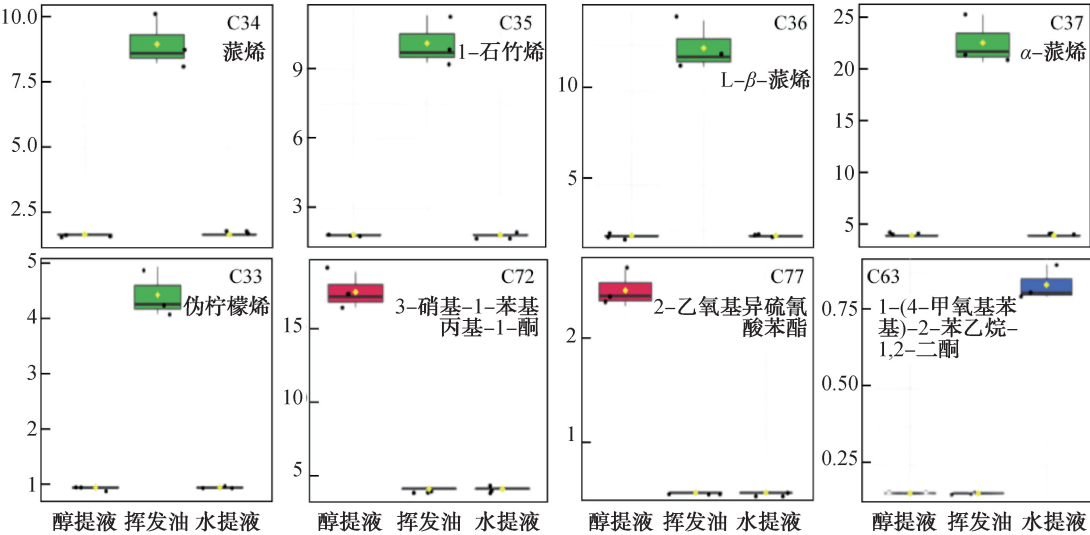


图 2 不同提取方式下马尾松松针差异性化合物相对含量

Fig. 2 Relative content of differential compounds of *Pinus massoniana* needles by different extraction methods

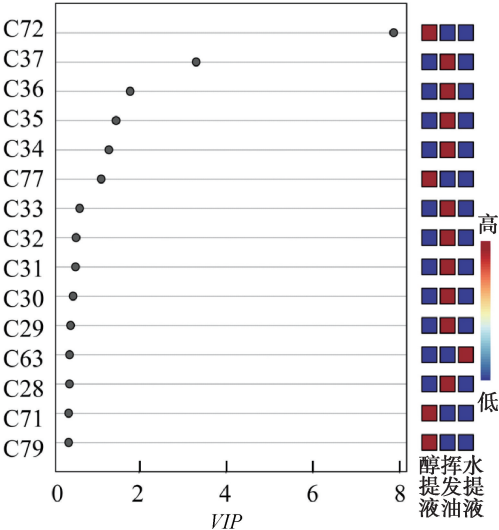


图 3 不同提取方式下马尾松松针中化合物的 VIP 及相对含量

Fig. 3 VIP and relative contents of compounds in *Pinus massoniana* needles by different extraction methods

1-酮($VIP = 7.86$)、2-乙氧基异硫氰酸苯酯($VIP = 1.13$), 据此推测这 6 种成分是马尾松松针不同提取方式的候选差异化合物。

2.3 马尾松松针成分作用靶点和 KEGG 通路富集分析

对马尾松松针 6 种候选差异性成分进行靶标分析, 筛选得到 78 个靶标蛋白, 剔除重复获得 68 个潜在作用靶点, 将这些靶标导入 STRING11.0 平台进

行 PPI 网络度中心性值分析, 结果见图 4。由图 4 可知, 由度中心性值筛选出得分靠前的 Hub 基因包括雌激素受体蛋白 ESR1、醛酮还原酶 AR、组织蛋白酶 CTSB 等。这些差异性成分作用于与氧化应激和自由基清除相关的关键蛋白, 如 AR 是抗氧化系统中的重要酶; 细胞色素 P450 家族(包括 CYP19A1、CYP3A4、CYP2B6 和 CYP17A1)与氧自由基(ROS)的生成和代谢密切相关^[15]; 在氧化应激导致 DNA 损伤时, 聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶 PARP1 会被激活^[16]。

将靶标基因导入 Metascape 数据库进行 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析, 结果见图 5。由图 5 可知, GO 基因注释显示, 在 BP 中马尾松松针靶标基因主要参与多巴胺能的突触传递, 涉及突触信号传递、缺氧反应等功能。在 CC 方面, 这些靶标基因主要涉及传递磷转移酶复合体、膜侧、近核细胞等。在 MF 方面, 它们主要包括甾体羟化酶活性、丝氨酸水解酶活性、碳酸酯脱水酶活性等。KEGG 通路富集分析表明, 马尾松松针的活性成分可能影响细胞凋亡、神经活性配体与受体相互作用、癌变、突触囊泡循环等多个生物过程。在 GO 基因功能注释中, 甾体羟化酶在细胞色素 P450 酶系中发挥作用^[17], 丝氨酸/苏氨酸及相应酶类在 p53 信号通路中起作用^[18], 羧酸酯水解酶通过水解酯键

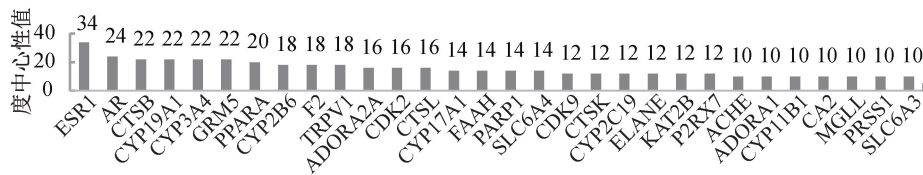


图 4 马尾松松针潜在靶点的度中心性值

Fig. 4 Degree centrality of potential targets in *Pinus massoniana* needles

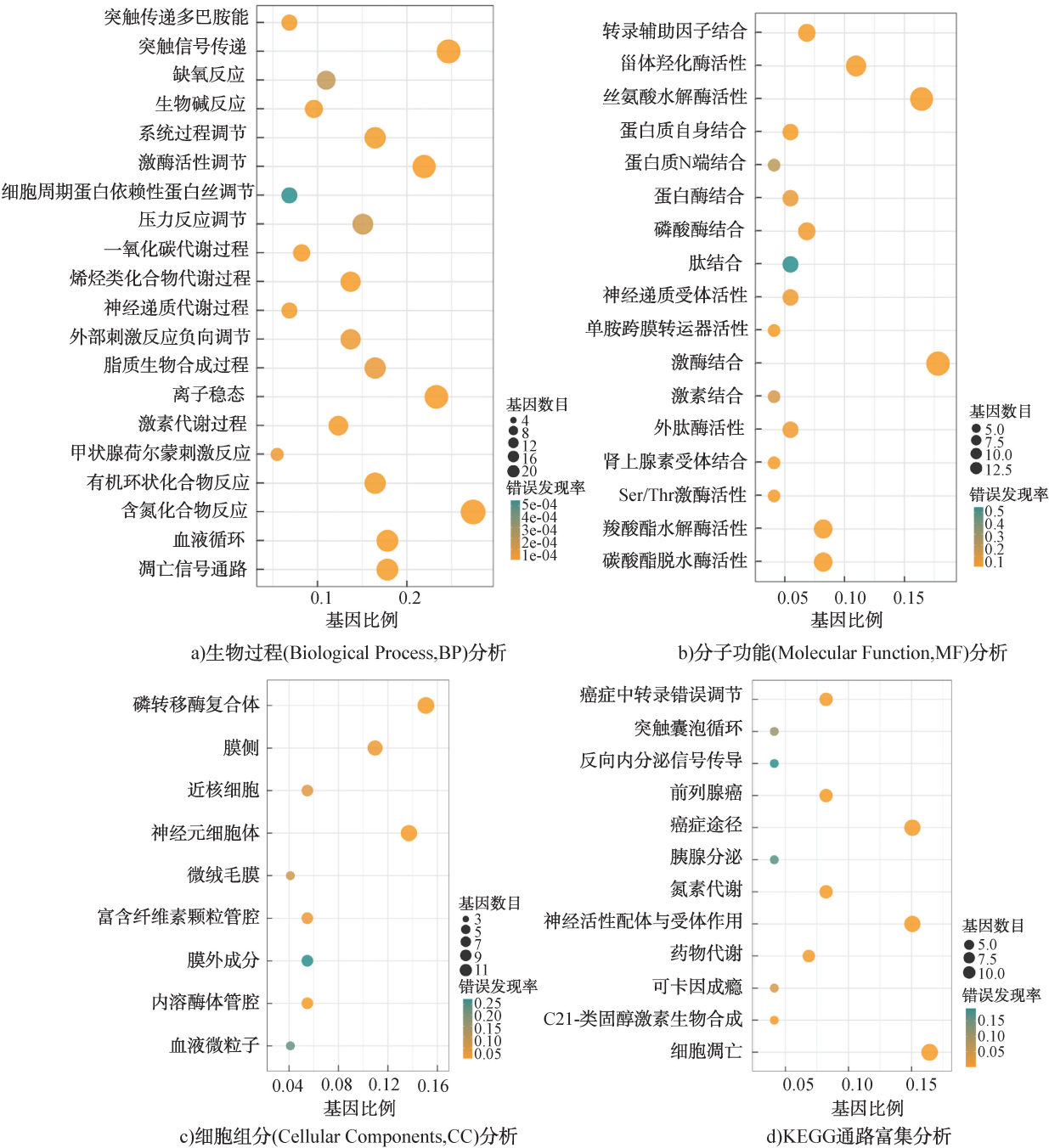


图 5 马尾松松针潜在靶点的 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析图

Fig. 5 GO gene function annotation and KEGG pathways enrichment analysis of potential targets of *Pinus massoniana* needles

清除自由基^[19],而在缺氧条件下,突触前谷氨酸的释放会增加自由基^[20]。在 KEGG 通路富集中,突触囊泡循环通过钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 的循环清除,帮助抑制自由基的生成^[21],C21 甾体苷通过改善脂质过氧化^[22]等参与抗氧化过程。

2.4 马尾松松针提取液抗氧化活性分析

图 6 为不同马尾松松针提取液对 DPPH 自由基的清除能力。由图 6 可知,马尾松松针提取液质量浓度与 DPPH 自由基清除率呈量效关系,当挥发油、水提液和醇提液的 DPPH 自由基清除率均达到 80%时,三者质量浓度分别约为 80 mg/mL、0.9 mg/mL 和 0.2 mg/mL。

图 7 为不同马尾松松针提取液对 ABTS⁺自由基的清除能力。由图 7 可知,马尾松松针 3 种提取液都具有高效的 ABTS⁺自由基清除能力,且 ABTS⁺自由基清除率随提取液质量浓度的增加而提高,当挥发油、水提液和醇提液的 ABTS⁺自由基清除率达到 80%时,三者质量浓度分别约为 10 mg/mL、0.2 mg/mL 和

0.07 mg/mL。

图 8 为不同马尾松松针提取液对 ·OH 自由基的清除能力。由图 8 可知,随着提取液质量浓度的增加,醇提液和水提液对 ·OH 自由基的清除能力均表现出一定的增强趋势,其中醇提液效果最佳,当 ·OH 自由基清除率达到 80 %时,醇提液质量浓度约为 3.5 mg/mL,而挥发油对 ·OH 自由基的清除能力较低且不稳定。

图 9 为不同马尾松松针提取液的总还原能力,吸光度越大,表示总还原能力越强。由图 9 可知,随着提取液质量浓度的增加,水提液和醇提液的吸光度均出现明显的增大趋势,而挥发油的吸光度变化较小且不明显。在质量浓度为 1.00 mg/mL 时,醇提液的总还原能力最强,水提液次之,挥发油最弱。

综上可知,马尾松松针具有显著的抗氧化潜力。前期研究^[23]也表明,马尾松松针的挥发油、水提液和醇提液均具有较强的抗氧化活性。其中,醇提

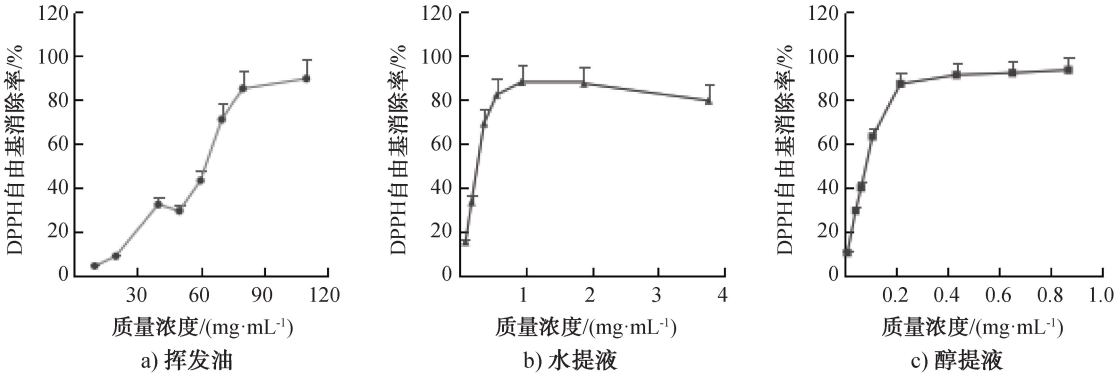


图 6 不同马尾松松针提取液对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 6 DPPH radical scavenging activity of different *Pinus massoniana* needle extraction solution

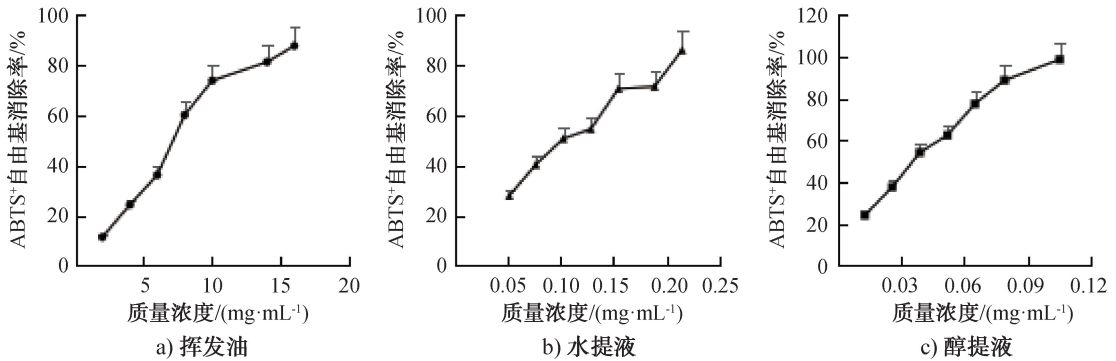


图 7 不同马尾松松针提取液对 ABTS⁺自由基的清除能力

Fig. 7 ABTS radical scavenging activity of different *Pinus massoniana* needle extraction solution

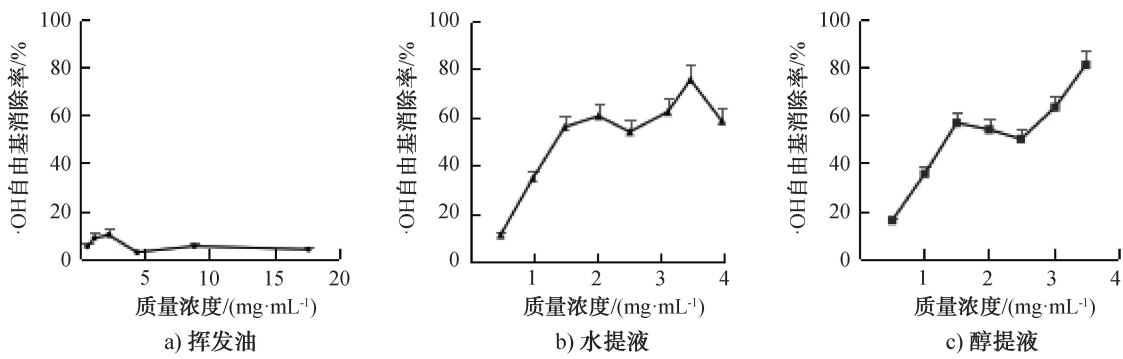


图 8 不同马尾松松针提取液对 ·OH 自由基的清除能力

Fig. 8 ·OH radical scavenging activity of different *Pinus massoniana* needle extraction solution

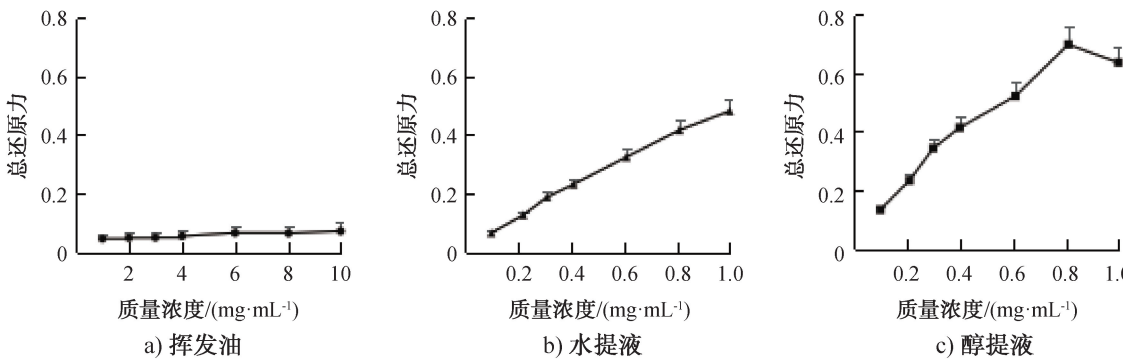


图 9 不同马尾松松针提取液的总还原能力

Fig. 9 Total reducing power of different *Pinus massoniana* needle extraction solution

液在总黄酮含量、总多酚含量和对 DPPH 自由基的清除效果上均明显优于水提液^[9]。本研究结果与之较一致,进一步验证了醇提液在抗氧化活性方面的优越性,这可能是由于醇类溶剂能够有效提取多酚和黄酮类化合物。然而,醇提液的食用安全性存在一定的问题,因此其更适合用于精提特殊的抗氧化成分。相比之下,水提液在保健食品开发中更具优势。在《保健食品原料人参西洋参灵芝备案产品技术要求》和《保健食品及其原料安全性毒理学检验与评价技术指导原则》^[24-25]中均指出,原料应通过水提法进行提取。水提法安全性较高,不会引入有害溶剂残留,符合食品安全标准。虽然水提液的抗氧化活性不如醇提液,但其在清除自由基方面仍表现良好,实现了抗氧化活性与食用安全性的平衡。挥发油的抗氧化活性相对较弱,但其富含的萜类化合物具有抗菌、抗炎、抗病毒等生物活性及独特的香气,在香料、药物、化妆品等领域中发挥着重要作用^[26-27]。此外,挥发油中的萜类化合物还可以作为药物开发的先导化合物,具有较高的研发

价值^[28]。

3 结论

本研究通过 GC-MS 技术分析了马尾松松针的挥发油、水提液和醇提液的化学成分,并采用网络药理学方法探讨了其活性成分的生物效应。同时,通过自由基清除实验,评估了这些提取液的抗氧化性能。结果表明,不同提取方式对马尾松松针主要成分的影响显著,挥发油中鉴定出 60 种化合物,占总离子流的 95.13%,主要为萜类化合物;水提液和醇提液中分别含有 10 种和 16 种化合物,主要为酮类化合物。PCA 分析显示,不同提取方式的成分分布存在差异,VIP 分析确认了蒎烯等为候选差异化合物。对候选差异化合物进行网络药理学分析,识别了 68 个潜在作用靶点,主要关联抗氧化和自由基清除,同时这些成分影响包括细胞凋亡和神经活性在内的多个关键生物过程,突显其在生物医学研究中的应用潜力。在抗氧化实验中,醇提液表现出最强的自由基清除能力和总还原能力,更适合用于

精提特殊抗氧化成分,水提液在保健食品的开发中更具优势,挥发油则可在香料、药物、化妆品等领域中发挥重要作用。不同提取方式会导致马尾松松针的成分多样性和功能性差异,应根据目标化合物的性质和预期用途来选择合适的提取方式。未来的研究应重点优化提取方式,以进一步挖掘马尾松松针提取液的生物活性成分,明确其在细胞和分子水平上的具体作用机制;同时也可以针对不同提取液的特性和功能,开展更深入的研究,实现提取液的定向应用和定制化生产,从而更好地满足不同领域的需求,推动相关产业的创新和发展。

参考文献:

- [1] 桂琴. 马尾松林下套种药材的适宜性及经济效益分析:以5种药用植物为例[D]. 贵阳:贵州大学,2023.
- [2] 张彩珍. 广西地区马尾松种植技术与经济效益浅析[J]. 南方农业,2020,14(3):9-10.
- [3] 李萍,万德光,刘玮琦,等. 马尾松松针中挥发油化学成分分析[J]. 中国中药杂志,2003,28(2):180.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 按照传统既是食品又是中药材物质目录管理办法(征求意见稿)[EB/OL]. (2014-11-06)[2025-04-07]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/yjzj/201411/67ac54fb05ed46929adc63f2db31d4bf.shtml>.
- [5] LIU H Y, CHEN H Y, DING G J, et al. Identification of candidate genes conferring tolerance to aluminum stress in *Pinus massoniana* inoculated with ectomycorrhizal fungus[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1):521.
- [6] SHANG H Q, NIU X Y, CUI W P, et al. Anti-tumor activity of polysaccharides extracted from *Pinus massoniana* pollen in colorectal cancer-*in vitro* and *in vivo* studies[J]. Food & Function, 2022, 13(11):6350-6361.
- [7] QI J S, PING D B, SUN X, et al. A herbal product inhibits carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by suppressing the epidermal growth factor receptor signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 311:116419.
- [8] 傅钰,史璇,张道明,等. 低共熔溶剂提取马尾松松针抗氧化成分的研究[J]. 北京林业大学学报,2021,43(7):149-158.
- [9] 潘析,陈顺伟,庄晓伟. 不同提取工艺的马尾松松针提取物抗氧化性能研究[J]. 生物质化学工程,2009,43(3):21-24.
- [10] 聂瑞馨,李涛,陈晶晶,等. 马尾松松针主要活性成分提取及应用研究进展[J]. 农产品加工,2020(5):79-81,84.
- [11] 孟亚会,闵建华,尚强. 马尾松松针化学成分分析[J]. 亚太传统医药,2021,17(3):60-62.
- [12] 罗晓蔓,邵靖楠,马晓鹏. 马尾松苗木根际土壤浸提物的 GC-MS 分析[J]. 绿色科技,2023,25(21):121-124,130.
- [13] 粟本超,谢济运,陈小鹏,等. 广西柳州产马尾松和湿地松松针挥发油的 GC/MS 分析[J]. 质谱学报,2008,29(2):70-75.
- [14] 李成成,苑楠楠,白桦芳,等. 基于 HPLC 指纹图谱和网络药理学的消炎退热颗粒质量标志物(Q-Marker)预测[J]. 中草药,2021,52(13):3885-3895.
- [15] 吴媛媛,田萌,谢锋,等. TRPV1 参与心肌缺血/再灌注损伤保护作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(2):67-71.
- [16] 李炜娟,肖元梅. PARP1 在氧化应激诱导的 DNA 损伤及其修复过程中的作用[J]. 中国老年学杂志,2015,35(23):6924-6925.
- [17] JIANG Z Q, GAO W, HUANG L Q. Tanshinones, critical pharmacological components in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10:202.
- [18] HUMPTON T J, HOCK A K, MADDOCKS O D K, et al. p53-mediated adaptation to serine starvation is retained by a common tumour-derived mutant [J]. Cancer & Metabolism, 2018, 6:18.
- [19] 许晖,孙兰萍,张斌,等. 微生物阿魏酸酯酶的研究进展[J]. 中国酿造,2008,27(10):11-16.
- [20] 董毅. 自由基在缺氧引起突触前谷氨酸释放增加中的作用和机制[D]. 上海:复旦大学,2010.
- [21] 孙臣友,方周溪,戚双双,等. 莪素油对慢性低氧大鼠学习与记忆和海马 p-CaMKII 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(11):2156-2161.
- [22] 王冬艳,华欣,叶记林,等. 江苏地产白首乌 C_{21} 甾体苷对高血脂大鼠的肝脏保护作用 and 抗氧化作用研究[J]. 河北医药,2016,38(3):335-337.
- [23] 胡文杰,李阁,李冠喜. 马尾松松针挥发油化学成分及抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报,2018,33(12):42-48.
- [24] 国家市场监督管理总局特殊食品安全监督管理司. 保健食品及其原料安全性毒理学检验与评价技术指导原则(2020年版)[EB/OL]. (2020-10-31)[2025-04-07]. https://www.samr.gov.cn/tssps/zcwj/art/2023/art_fc451604b4e141a59009d184a49305cd.html.
- [25] 国家市场监督管理总局. 保健食品原料人参西洋参灵芝备案产品技术要求[EB/OL]. (2024-04-30)[2025-

04-07]. https://www.samr.gov.cn/xw/zj/art/2024/art_96ca966c505b43c4b42c3b8eaf00e609.html.

[26] 董银卯,邓小锋.化妆品植物原料现状、应用与发展趋势[J].轻工学报,2016,31(04):30-38.

[27] 王雅琪,杨园珍,伍振峰,等.中药挥发油传统功效与现代研究进展[J].中草药,2018,49(2):455-461.

[28] 田民义.姜科挥发油及其萜类成分抗肿瘤活性及相关机制研究[D].贵阳:贵州大学,2021.

Analysis and antioxidant activity study of different extraction liquid from *Pinus massoniana* needles

LIU Yaqun^{1,2}, CHEN Lianghui^{1,2}, ZHANG Zekun^{1,2}, ZHENG Yuzhong^{1,2}, ZHANG Zhenxia^{1,2}

1. School of Life Sciences and Food Technology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China;

2. Guangdong Key Laboratory of Functional Substances in Medicinal Edible Resources and Healthcare Products, Chaozhou 521041, China

Abstract:To analyze the chemical composition and antioxidant activity of *Pinus massoniana* needles, the main components of essential oils, aqueous extracts, and alcoholic extracts were studied using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) coupling method. Additionally, network pharmacology was utilized to investigate the active components, and free radical scavenging experiments were conducted to evaluate their antioxidant activities. The results revealed that 60 compounds, accounting for 95.13% of the total, were identified in the essential oils, primarily consisting of terpenes. The aqueous and alcoholic extracts contained 10 and 16 compounds, respectively, mainly consisting of ketones. Significant differences were observed in the composition distribution among different extraction methods. VIP analysis identified six potential candidate differential compounds: pinene (VIP = 1.31), 1-caryophyllene (VIP = 1.47), L-β-pinene (VIP = 1.80), α-pinene (VIP = 3.32), 3-nitro-1-phenylpropyl-1-ketone (VIP = 7.86), and 2-ethoxyphenyl isothiocyanate (VIP = 1.13). These compounds may exert effects on oxidative stress and free radical scavenging pathways through interactions with proteins such as aldehyde reductase (AR). In the evaluation of antioxidant activity, when the DPPH scavenging rate reached 80%, the mass concentrations of alcoholic extract, aqueous extract, and essential oil were 0.2 mg/mL, 0.9 mg/mL, and 80 mg/mL, respectively. When the ABTS⁺ scavenging rate reached 80%, the concentrations of alcoholic extract, aqueous extract, and essential oil were 0.07 mg/mL, 0.2 mg/mL, and 10 mg/mL, respectively. When the hydroxyl radical scavenging rate reached 80%, the concentration of alcoholic extract was 3.5 mg/mL, while the scavenging abilities of aqueous extract and essential oil were relatively low and unstable. At the mass concentration of the extract liquid was 1.00 mg/mL, the alcoholic extract exhibited the strongest total reducing power. Therefore, *Pinus massoniana* needles possess significant antioxidant potential, with various components exhibiting antioxidant activities obtainable through different extraction methods.

Key words:*Pinus massoniana* needle; extraction method; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) coupling method; network pharmacology; antioxidant activity

[责任编辑:王晓波]