

广西倒地铃体外抗氧化活性的谱效关系研究[△]

陈君^{1*}, 陈丽¹, 韦建华²(1.广西科技大学医学院, 广西柳州 545005; 2.广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0906-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.12

摘要 目的:建立11批广西倒地铃的指纹图谱并考察其体外抗氧化活性的谱效关系,为揭示其抗氧化活性物质基础提供参考。方法:采用高效液相色谱法建立11批广西倒地铃的指纹图谱,采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除法测定不同产地倒地铃的体外抗氧化活性,并运用双变量相关性分析法考察倒地铃体外抗氧化的谱效关系。结果:11批广西倒地铃图谱的相似度均大于0.9,16个共有峰中2(原儿茶酸)、3、4、12号峰含量变化与DPPH自由基清除活性大小密切相关。结论:广西不同产地倒地铃的化学成分基本一致,但产地不同时质量有一定差异;原儿茶酸(2号峰)及3、4、12号峰代表的未知化合物可能是其抗氧化活性的药效物质基础。

关键词 广西;倒地铃;体外抗氧化活性;指纹图谱

Study on the Spectrum-effect Relationship of Antioxidant Activity *in vitro* of *Cardiospermum halicacabum* from Guangxi

CHEN Jun¹, CHEN Li¹, WEI Jianhua²(1.School of Medicine, Guangxi University of Science and Technology, Guangxi Liuzhou 545005, China; 2.School of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprints of 11 batches of *Cardiospermum halicacabum* from Guangxi, and detect its spectrum-effect relationship of antioxidant activity *in vitro*, and provide reference for revealing the material basis for its antioxidant activity. METHODS: HPLC was conducted to establish the fingerprints of 11 batches of *C. halicacabum* from Guangxi, the 1, 1-diphenyl-2-trinitrobenzene hydrazine (DPPH) free radical scavenging method was used to determine the antioxidant activity *in vitro* of *C. halicacabum* from different origins, and bivariate correlation analysis was adopted to detect the spectrum-effect relationship of antioxidant activity *in vitro*. RESULTS: The similarities of 11 batches of *C. halicacabum* from Guangxi were all more than 0.9, and the content change of peak 2 (protocatechuic acid), 3, 4, 12 in 16 common peaks was closely related to the DPPH free radical scavenging activity. CONCLUSIONS: The chemical composition of *C. halicacabum* from different origins in Guangxi is basically consistent, while there are some differences in the quality of the producing area. The protocatechuic acid (peak 2) and the unknown compounds represented by peak 3, 4, 12 may be the pharmacodynamic material basis of its antioxidant activity.

KEYWORDS Guangxi; *Cardiospermum halicacabum*; Antioxidant activity *in vitro*; Fingerprint

倒地铃(*Cardiospermum halicacabum* L.)为无患子科倒地铃属植物,又名三角泡、假苦瓜、风船葛等,广泛分布于广西、广东、四川、贵州等地区,具有清热解毒、凉血、祛瘀、利尿等功效,民间多用于治疗百日咳、糖尿病、咽喉炎、皮肤湿疹、跌打损伤等^[1-3]。中药化学成分的多多样性与复杂性是其发挥疗效的物质基础,同时也是其质量评价的重点与难点。中药指纹图谱可以比较全面地反映中药所含的化学成分,但所展现的化学成分与药效的相关程度并不清楚。若将指纹图谱与中药药效评价相结合,找出与药效活性相关的药效成分群,确定相应的质控指标,可使构建的指纹图谱更有针对性地用于中药质量控制^[4]。笔者前期研究表明,倒地铃全草中主要含有黄酮、三萜类、甾醇及有机酸等多种成分,并有显著

的抗氧化活性^[5-6]。在本研究中,笔者拟建立11批广西倒地铃药材的指纹图谱,并通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除试验考察其体外抗氧化作用,运用双变量相关性分析研究倒地铃共有色谱峰含量变化与DPPH自由基清除活性的关系,建立倒地铃药材体外抗氧化活性的谱效关系,为倒地铃的质量控制提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

1260 高效液相色谱(HPLC)仪,包括四元低压梯度泵、在线真空泵、紫外检测器、Chemstation 色谱工作站(美国安捷伦公司);T6 新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);AL104 电子天平[梅特勒-托利多(上海)有限公司]。

1.2 对照品与试剂

[△] 基金项目:广西高校科学技术研究项目(No.2013YB287)

* 副教授,硕士。研究方向:中药、民族药的有效成分与质量标准。电话:0772-2056026。E-mail:lzyzchenjun@163.com

原儿茶酸对照品(北京盈泽纳新化工技术研究院,批号: MUST-13103006,纯度: 98.0%);金圣草黄素、芹菜素对照品(自制,纯度: 均>98%);DPPH(美国Sigma公司);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为市售分析纯,水为重蒸水。

1.3 药材

11批倒地铃药材为笔者亲自采收或购自来宾、百色靖西、玉林等药材市场,经广西中医药大学中药鉴定教研室廖月葵高级实验师鉴定均为无患子科植物倒地铃 *Cardiospermum halicacabum* L. 的干燥全草。倒地铃药材产地及采收时间见表1。

表1 倒地铃药材产地及采收时间

Tab 1 The origin and harvest time of *C. halicacabum*

编号	产地	采收时间
S1	北海	2013年9月
S2	崇左	2014年10月
S3	南宁九塘镇	2015年8月
S4	南宁坛洛镇	2015年8月
S5	百色靖西	2013年10月
S6	宾阳	2014年8月
S7	横县	2013年9月
S8	来宾	2014年8月
S9	玉林	2013年10月
S10	柳州	2013年10月
S11	宜州	2014年9月

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Inertsil[®] ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(B)-0.1%磷酸溶液(A),梯度洗脱(0~10 min, 95% A→80% A; 10~30 min, 67% A→30% A; 30~45 min, 30% A→5% A);流速: 1 mL/min;检测波长: 220 nm;柱温: 30 ℃;进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取原儿茶酸、金圣草黄素、芹菜素对照品适量,加甲醇溶解后定容至10 mL量瓶中,摇匀。再精密吸取各溶液1 mL,置于10 mL量瓶中,再加甲醇溶解并定容,即得原儿茶酸、金圣草黄素、芹菜素质量浓度分别为13.4、17.2、15.2 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取不同产地倒地铃(S1~S11)粉末各约1 g,置于具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇20 mL,密塞,称定质量。超声提取30 min,放冷后再称定质量,然后用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过。取上清液过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 取空白溶剂(70%乙醇)和倒地铃药材(S2)的供试品溶液各1份,按“2.1”项下色谱条件分别进样10 μL,记录色谱图。结果,空白溶剂不干扰测定,各色谱峰分离度均大于1.5,表明该方法专属性较好。

2.3.2 精密度 取倒地铃药材(S2)的供试品溶液,按

“2.1”项下色谱条件连续进样5次,记录色谱图。以芹菜素的保留时间与峰面积为参照,换算出各共有峰相对保留时间的RSD值均小于1%(n=5),相对峰面积的RSD值均小于3%,表明方法采用的HPLC仪器及整体系统精密度良好。

2.3.3 重复性 取同一批倒地铃(S2)药粉5份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以芹菜素的保留时间与峰面积为参照,换算出各共有峰相对保留时间的RSD值均小于1%(n=5),相对峰面积的RSD值均小于3%(n=5),表明该方法重复性较好。

2.3.4 稳定性 取倒地铃药材(S2)的供试品溶液,于室温下分别放置0、2、4、8、12、24 h后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以芹菜素的保留时间与峰面积为参照,换算出各共有峰相对保留时间的RSD值均小于1%(n=5),相对峰面积的RSD值均小于3%(n=5),表明供试品溶液在室温条件下24 h内稳定。

2.4 指纹图谱的研究^[7-9]

2.4.1 HPLC图谱的建立及特征峰的指认 取不同产地的倒地铃(S1~S11)粉末,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。比较11批倒地铃样品的色谱图,确立了倒地铃药材共有峰16个。其中芹菜素的信号强度适中,分离度和峰形较好,在各个不同来源的倒地铃药材样品中均含有此峰且较稳定,因此以其为参照峰。将混合对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样分析,进行峰位定位,确定供试品图中2号峰是原儿茶酸、14号峰是芹菜素、15号峰是金圣草黄素。11批倒地铃药材指纹图谱及对照图谱见图1, S2样品及混合对照品的HPLC图谱见图2。

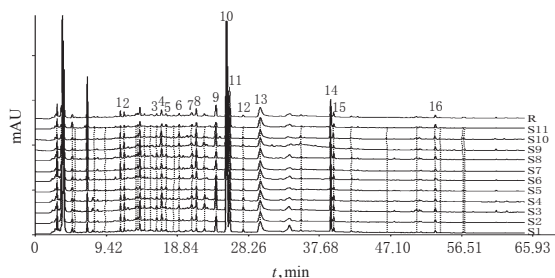


图1 11批倒地铃药材指纹图谱及对照图谱

Fig 1 Fingerprints and reference fingerprint of 11 batches of *C. halicacabum*

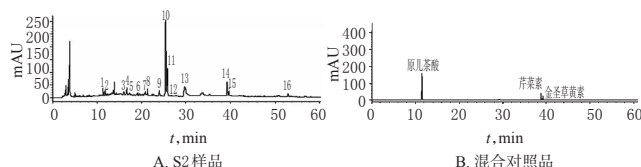


图2 倒地铃S2样品及混合对照品的HPLC图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of S2 sample of *C. halicacabum* and mixed reference substance

2.4.2 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(中国药典委员会 2004A)对 11 批倒地铃药材的色谱数据进行处理,以样品 S2 的图谱为参照,采用中位数法,按 Mark 峰进行自动匹配生成倒地铃对照指纹图谱。将该对照指纹图谱的相似度定为 1,计算出 11 批倒地铃指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.9,表明 11 批药材在化学成分的组成上基本一样。

2.4.3 聚类分析 应用 SPSS 22.0 统计学软件,以 11 批不同产地倒地铃的 HPLC 指纹图谱中 16 个共有峰的相对峰面积,采用欧氏距离进行聚类分析,将 11 批不同产地的倒地铃大致划分为两大类,6 号样品为第 II 类,其他样品均为第 I 类,结果见图 3。

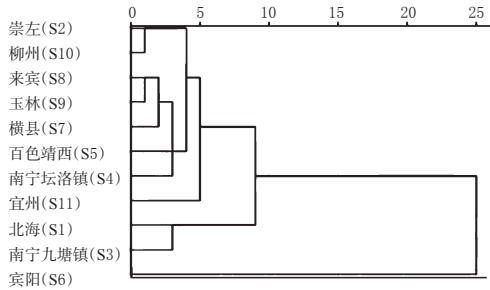


图 3 11 批倒地铃指纹图谱的聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis dendrogram of the fingerprints of 11 batches of *C. halicacabum*

2.5 体外抗氧化活性测定

2.5.1 DPPH 溶液的制备 精密称定 DPPH 适量,加 95% 乙醇定容至 50 mL 量瓶中,即得 DPPH 质量浓度为 0.057 mg/mL 的溶液,低温避光保存。

2.5.2 DPPH 自由基清除率的测定 按“2.2.2”项下方法制备倒地铃(S1~S11)的供试品溶液,分别精密吸取 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、3.0 mL 溶液,用 70% 乙醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,制成 6 个系列质量浓度的样品溶液。精密吸取各样品溶液 2 mL,分别加入 2 mL 的 DPPH 溶液,摇匀,避光放置 30 min,于 517 nm 波长处测定溶液的吸光度(A),计算 DPPH 自由基清除率: DPPH 自由基清除率 (%) = $[A_0 - (A_1 - A_s)] / A_0 \times 100\%$ (其中, A_0 为 2 mL DPPH 溶液+2 mL 70% 乙醇的 A; A_1 为 2 mL DPPH 溶液+2 mL 样品溶液的 A; A_s 为 2 mL 70% 乙醇+2 mL 样品溶液的 $A^{(10)}$)。以样品溶液质量浓度为横坐标、DPPH 自由基清除率为纵坐标,采用 Probit 模型计算清除 DPPH 自由基的半数清除浓度(IC₅₀)。结果,样品 S1~S11 对 DPPH 自由基均有明显的清除活性,且随着样品质量浓度的增大而增大(详见图 4),IC₅₀ 值分别为 1.60、0.86、0.95、0.99、2.30、2.61、1.34、1.11、0.45、1.41、4.88 mg/mL。结果提示,11 批倒地铃的抗氧化作用明显,其中样品 S11 的作用相对较弱,S9 作用最强。

2.6 指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系分析

应用 SPSS 22.0 统计学软件,对 16 个共有峰峰面积

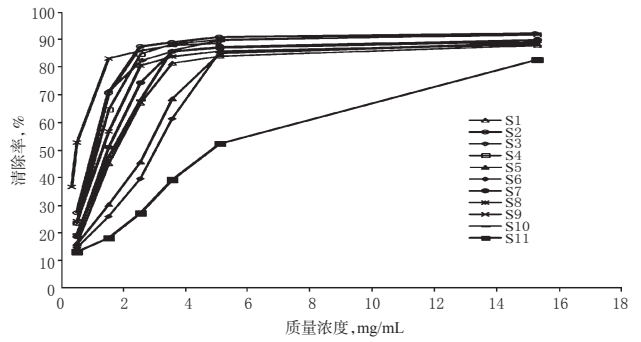


图 4 11 批倒地铃抗氧化活性测定结果

Fig 4 Determination results of antioxidant activity of 11 batches of *C. halicacabum*

与倒地铃的 IC₅₀ 进行双变量相关分析。结果,16 个特征色谱峰中 2 号峰(原儿茶酸)含量变化与 DPPH 自由基清除活性呈非常显著的负相关($P < 0.01$); 3、4、12 号峰含量变化与 DPPH 自由基清除活性呈显著的负相关($P < 0.05$)。特征指纹峰与抗氧化活性的相关系数测定结果见表 2。

表 2 特征指纹峰与抗氧化活性的相关系数测定结果

Tab 2 Determination of correlation coefficient between characteristic fingerprint peak and antioxidant activity

峰号	相关系数	P	峰号	相关系数	P
1	-0.375	0.256	9	-0.436	0.180
2	-0.793	0.004	10	0.332	0.319
3	-0.631	0.037	11	0.163	0.632
4	-0.674	0.023	12	-0.612	0.045
5	0.356	0.283	13	0.292	0.384
6	-0.115	0.736	14	-0.021	0.950
7	-0.223	0.510	15	-0.342	0.303
8	-0.324	0.332	16	0.439	0.176

3 讨论

本研究采用 HPLC 法建立了广西 11 批倒地铃的指纹图谱,使倒地铃的共有成分在色谱图中得以体现;结合相似度评价和聚类分析可知,11 批药材的相似度大于 0.9,16 个共有峰的相对保留时间符合程度较好,化学成分的组成基本一致;但相对峰面积差别较大,说明不同产地倒地铃药材质量存在一定的差异。同时,本研究以 DPPH 自由基清除法比较了不同产地倒地铃样品溶液的抗氧化作用。结果表明倒地铃样品溶液抗氧化作用明显;结合倒地铃的指纹图谱进行谱效关系研究,得出 2、3、4、12 号峰与抗氧化作用相关性显著。然而本研究只鉴定出 2 号峰为原儿茶酸,3、4、12 号峰为何种化合物还需进一步考察。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编: 下册[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 513.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 3862.

复方川芎滴丸对糖尿病肾病模型大鼠血液流变学及血气的影响

孙昕*, 刘卫*(解放军第88医院药剂科, 山东泰安 271000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0909-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.13

摘要 目的:探讨复方川芎滴丸对糖尿病肾病(DN)模型大鼠血液流变学及血气的影响。方法:将60只大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组[厄贝沙坦片,0.013 g/(kg·d)]和复方川芎滴丸高、中、低剂量组[0.4、0.2、0.1 g/(kg·d)],每组10只。除正常对照组外,其余各组大鼠均以高糖高脂饲料+ip链脲佐菌素的方法复制DN模型。成模7 d后,各给药组大鼠每天ig相应药物1次,10 mL/kg;正常对照组和模型组大鼠ig等体积纯化水。64 d后,测定大鼠血液流变学指标[全血黏度(高、中、低切)、血浆黏度、全血还原黏度]和血气指标(二氧化碳分压、氧分压、血红蛋白含量、氧饱和度、氧合血红蛋白占总蛋白的比例),苏木精-伊红染色观察大鼠肾脏组织病理变化。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血液流变学各指标和二氧化碳分压均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),氧分压、血红蛋白含量、氧饱和度、氧合血红蛋白占总蛋白的比例均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肾脏组织损伤严重。与模型组比较,除复方川芎滴丸低剂量组大鼠二氧化碳分压、氧分压、血红蛋白含量改善不显著外,其余各给药组大鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$),大鼠肾脏组织损伤也不同程度地减轻。结论:复方川芎滴丸可显著改善DN模型大鼠异常的血液流变学状态,降低血液黏度,改善微循环,提高血液运输氧的能力,且对DN大鼠的肾脏组织形态有一定的改善作用。

关键词 复方川芎滴丸;糖尿病肾病;血液流变学;血气;肾脏组织病理;大鼠

Effects of Compound *Ligusticum chuanxiong* Drop Pill on Hemorheology and Blood Gas in Model Rats with Diabetic Nephropathy

SUN Xin, LIU Wei (Dept. of Pharmacy, the 88th Hospital of PLA, Shandong Tai'an 271000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effects of Compound *Ligusticum chuanxiong* drop pill on hemorheology and blood gas in model rats with diabetic nephropathy (DN). METHODS: 60 rats were randomly divided into normal control group, model group, positive control group [Irbesartan tablet, 0.013 g/(kg·d)] and Compound *L. chuanxiong* drop pill high-dose, medium-dose, low-dose groups [0.4, 0.2, 0.1 g/(kg·d)], 10 in each group. Except for normal control group, rats in other groups were given high-sugar high-fat feed and intraperitoneally injected streptozotocin to reduce DN model. After 7 d modeling, rats in each group received related drugs intragastrically, once a day, 10 mL/kg; normal control group and model group received equal volume of purified water intragastrically. After 64 d, hemorheology indicators [whole blood viscosity (high-shear, medium-shear and low-shear), plasma viscosity, whole blood reduced viscosity] and blood gas indicators (carbon dioxide partial pressure, oxygen partial pressure, hemoglobin content, oxygen saturation, ratio of oxygenated hemoglobin to total protein) of rats were determined, hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes in kidney tissue. RESULTS: Compared with normal control group, hemorheology indicators and carbon dioxide partial pressure in model group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), oxygen partial pressure, hemoglobin content, oxygen saturation, ratio of oxygenated hemoglobin to total protein were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), with severe kidney damage. Compared with model group, except the improvement of carbon dioxide partial pressure, oxygen partial pressure, hemoglobin content in rats were not significant in Compound *L. chuanxiong* drop pill low-dose group, the

[3] 中华本草编委会.中华本草:第5卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:3969.

[4] 邓书鸿,聂磊.中药药效关系的分析方法及数据处理技术研究进展[J].中药材,2010,33(11):1819-1823.

[5] 韦建华,陈君,蔡少芳,等.倒地铃化学成分研究:1[J].中草药,2011,42(8):1509-1511.

[6] 陈君,韦建华,蔡少芳,等.倒地铃有效部位化学成分研究[J].中药材,2013,36(2):228-230.

* 副主任药师。研究方向:中药制剂。电话:0538-8839573。E-mail:s8839675@163.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:药理学、医院药学。电话:0538-8839841。E-mail:Liutrunk@163.com

[7] 陈帅,王慧竹,薛健飞,等.栀子金花丸HPLC指纹图谱及其与体外抗氧化活性的相关性分析[J].中国药房,2016,27(22):3077-3080.

[8] 张彦飞,李智萌,赵利利,等.两头尖的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2016,27(3):399-401.

[9] 宋潇,谢昭明,黄丹,等.茯苓皮药材的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2015,26(15):2019-2111.

[10] 李生茂,刘琳,谭睿,等.市售沙棘HPLC指纹图谱一致性及抗氧化活性谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11):43-48.

(收稿日期:2016-08-24 修回日期:2016-11-06)

(编辑:林静)