

虎杖提取物指纹图谱与其体外抗氧化作用的灰关联度分析

李玉娇¹, 李清², 赫宇霏², 马晶², 毕开顺^{2*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] **目的:**探索虎杖总提取物及不同极性部位指纹图谱各特征峰所代表的化学成分对其体外抗氧化作用贡献大小。**方法:**采用 DPPH 测定虎杖总提取物及不同极性部位的体外抗氧化活性;采用 HPLC 法测定其特征指纹图谱;采用灰关联度分析法研究其谱效关系。**结果:**虎杖体外抗氧化活性是其内部多种成分共同作用的结果,各成分对抗氧化作用贡献大小顺序(按特征峰编号)为 8 > 1 > 12(蒽苷 B) > 4(虎杖苷) > 2 > 6(白藜芦醇) > 3 > 7 > 5 > 10 > 9 > 13 > 14(大黄素) > 11 > 15(大黄素甲醚)。结合文献报道,初步确定在本实验参数条件下,关联度值低于 0.6 的 11, 14, 15 号色谱峰所代表的化学成分无贡献作用。**结论:**本试验对虎杖总提取物及不同极性部位抗氧化活性的谱效关系进行了初步探索,为中药药效物质基础和谱效关系研究提供了一定参考。

[关键词] 虎杖; 指纹图谱; 抗氧化; 灰关联度分析; 谱效关系

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0076-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140076

Grey Relational Analysis on Fingerprints of Extracts from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* and Antioxidant Capacity *in vitro*

LI Yu-jiao¹, LI Qing², HE Yu-fei², MA Jing², BI Kai-shun^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Materia, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the contributions of components represented by characteristic peaks of fingerprints of total extract from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* and its fractions of different polarity to antioxidant capacity *in vitro*. **Method:** The antioxidant capacity of total extract from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* and its fractions of different polarity was evaluated using DPPH assay. HPLC method was introduced to determine fingerprints of the extracts. The correlation between fingerprint and antioxidant capacity was investigated by grey relational analysis. **Result:** The antioxidant capacity was resulted from the combined effect of multiple components. The order of contributions was (number of peaks) 8 > 1 > 12 (anthraglycoside B) > 4 (polydatin) > 2 > 6 (resveratrol) > 3 > 7 > 5 > 10 > 9 > 13 > 14 (emodin) > 11 > 15 (physcion). Combined with the results in literature, peaks of No. 11, 14 and 15, the grey relational values of which were lower than 0.6, made no contribution under this experimental parameter condition. **Conclusion:** The spectrum-effect relationship of antioxidant capacity *in vitro* of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* was investigated preliminarily, which would provide some reference for the study of pharmacodynamic material basis and spectrum-effect relationship of traditional Chinese medicine.

[Key words] *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*; fingerprint; antioxidant activity; grey relational analysis; spectrum-effect relationship

[收稿日期] 20130927(007)

[基金项目] 辽宁省高等学校中药质量控制关键技术创新团队项目(LT2012018)

[第一作者] 李玉娇, 硕士生, 从事中药质量标准及药效物质基础研究, Tel: 15998367476, E-mail: liyujiao1225@163.com

[通讯作者] * 毕开顺, 博士, 教授, 从事中药化学指纹图谱、药效物质基础和质量标准的研究, Tel: 024-23986012, E-mail: kaishunbi_syphu@gmail.com

虎杖为蓼科植物虎杖的干燥根茎和根,收载于《中国药典》2010年版(一部)^[1]。文献报道,虎杖具有较强的抗氧化活性^[2];现代药理学研究亦表明,虎杖具有保护心血管^[3]、保肝利胆^[4-5]、抗癌等作用^[6],这些作用均与虎杖清除自由基、抗氧化活性相关。因此有必要对虎杖的抗氧化活性及其有效成分深入研究。

中药色谱指纹图谱中每个特征峰代表一种化学成分,其药效亦是多种成分共同作用的结果,指纹图谱与药效之间必然存在某种关联。多篇文献报道采用灰关联度分析法对中药化学成分信息与药效信息相关联,进行谱效关系研究,探索药效物质基础^[7-9]。近年来,对虎杖指纹图谱的研究有较多报道,亦有文献对虎杖指纹图谱与其抗菌、抗病毒活性进行相关性研究^[8],但尚未开展对其指纹图谱与抗氧化作用的相关分析研究。

本文以虎杖总提取物及不同极性部位为研究对象,比较其体外抗氧化活性,并测定其特征指纹图谱,采用灰关联度分析法进行数据处理,以探索指纹图谱各特征峰所代表的化学成分对虎杖体外抗氧化作用贡献大小,旨在为虎杖抗氧化方面的进一步开发和利用提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 TU-1800型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),L-2100型高效液相色谱仪(日本日立公司),98-I-B型电子调温加热套(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(Sigma公司),维生素C(天津市大茂化学试剂厂),甲醇、磷酸、二甲基亚砷(天津科密欧化学试剂有限公司)为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

1.3 对照品 虎杖苷(批号111575-200502)、白藜芦醇(批号111535-200502)、大黄素(批号110756-200110)、大黄素甲醚(批号110758-201013)购自中国食品药品检定研究院,大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷(蒽苷B)(批号11042)购自四川省维克奇生物科技有限公司。

1.4 药材 虎杖药材购于安国药材市场,产地四川省,经沈阳药科大学中药学院贾英副教授鉴定为正品蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et. Zucc.。

2 方法与结果

2.1 虎杖总提取物及不同极性部位清除 DPPH 自由基活性测定

2.1.1 溶液的制备 供试品溶液的制备 取虎杖粉末(过50目筛)约50g,加10倍量70%乙醇,回流提取2次,第1次1h,第2次0.5h。滤过,合并提取液,减压回收溶剂制备浸膏。取约五分之一的浸膏浓缩、干燥,制成虎杖总提取物A。剩余浸膏用适量水打散,按极性由小到大的顺序依次用二氯甲烷、乙酸乙酯、水饱和和正丁醇萃取,回收相应萃取液,浓缩干燥,得二氯甲烷(B)、乙酸乙酯(C)、正丁醇(D)以及水(E)4个化学部位,备用。取A,B,C,D各约25mg,精密称定,分别置25mL量瓶中,加DMSO溶解并稀释至刻度,得A,B,C,D样品储备液。取上述储备液,分别稀释,制成系列A,B,C,D样品溶液(10.00~500.0mg·L⁻¹)。取E约50mg,精密称定,置25mL量瓶中,加DMSO溶解并稀释至刻度,得E储备液。取E储备液稀释,制成系列E样品溶液(100.0~2000mg·L⁻¹)。

维生素C溶液的制备 取维生素C约5mg,精密称定,置10mL量瓶中,加DMSO溶解并稀释至刻度,得维生素C储备液。取该储备液稀释,制成系列维生素C溶液(5.000~500.0mg·L⁻¹)。

DPPH溶液的制备 取DPPH约16mg,精密称定,置10mL量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,得DPPH储备液。取该储备液5.0mL于50mL量瓶中,加乙醇稀释至刻度,即得。

2.1.2 样品测定 取各样品溶液0.2mL与DPPH溶液2.8mL,混匀后室温避光放置30min,517nm处测定吸收度A_i;对照组以等体积DMSO代替样品溶液,空白组以等体积无水乙醇代替DPPH溶液,吸光度分别记为A₀和A_j。按式(1)计算各样品清除率,平行测定3次,求平均值。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

2.1.3 测定结果 以维生素C及虎杖各样品的清除率对质量浓度作图,得清除率曲线,见图1,2。在一定质量浓度范围内,维生素C、虎杖总提取物及各极性部位对DPPH自由基清除率与其质量浓度呈近似线性关系,通过回归分析,得V_C,A,B,C,D,E的IC₅₀分别为54.33,137.5,230.9,98.8,84.4,1027mg·L⁻¹。

2.2 虎杖总提取物及不同极性部位高效液相色谱指纹图谱测定

2.2.1 色谱条件 WAT054275 Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6mm×250mm,5μm),流动相甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~30min,25%~

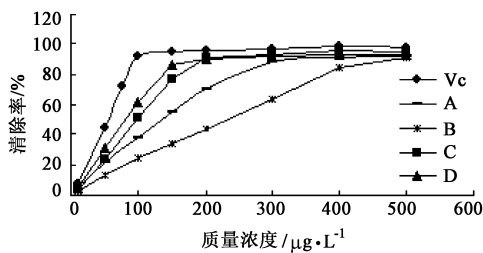


图 1 维生素 C 和提取物 A, B, C, D 的清除率曲线

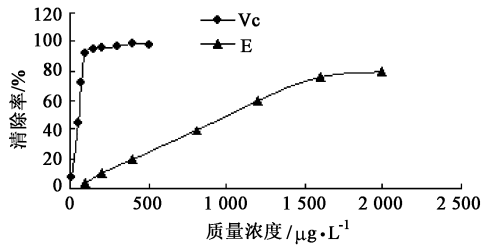


图 2 维生素 C 和提取物 E 的清除率曲线

35% A; 30 ~ 45 min, 51% A; 45 ~ 60 min, 51% ~ 100% A; 60 ~ 70 min, 100% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 289 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。

2.2.2 溶液的制备 混合对照品溶液的制备 取虎杖苷、白藜芦醇、蒽苷 B、大黄素、大黄素甲醚对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解制备成各对照品储备液。分别精密量取各储备液适量于同一 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得虎杖苷、白藜芦醇、蒽苷 B、大黄素、大黄素甲醚质量浓度分别为 104.2, 27.60, 97.2, 40.95, 12.12 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备 取 2.1.1 项下虎杖总提取物 (A) 及二氯甲烷 (B)、乙酸乙酯 (C)、正丁醇 (D) 部位样品溶液 (500 mg·L⁻¹), 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 方法学验证 精密度试验: 取 A 供试品溶液, 重复进样 6 次, 各特征峰与内参比峰 (12 号峰) 的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%。表明仪器精密度良好。

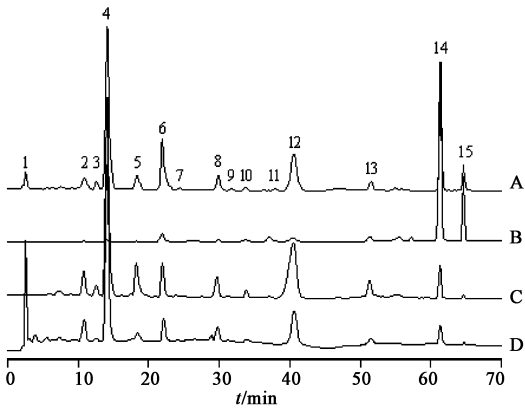
重复性试验 取 A 样品 6 份, 按 2.2.2 项下制备供试品溶液, 进样分析, 各特征峰与内参比峰 (12 号峰) 的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%。表明方法重复性良好。

稳定性试验 取 A 供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 进样分析, 各特征峰与内参比峰 (12 号峰) 的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%。表明供试品溶液室温放置 12 h 内稳定。

2.2.4 样品测定 用所建立的色谱指纹图谱方法, 测定虎杖总提取物及各极性部位样品。虎杖总提取物色谱图中共获得 15 个特征峰, 其中 4 号为虎杖苷, 6 号为白藜芦醇, 12 号为蒽苷 B, 14 号为大黄素, 15 号为大黄素甲醚。计算各样品色谱图中 15 个特征峰峰面积对其称样量的比值, 数据见表 1。各样品色谱指纹图谱见图 3。若某一图谱在某一保留时间处无峰, 相应的峰面积为零, 仍给相应的编号, 以保证各图谱都有相同的色谱峰数。

表 1 虎杖总提取物及不同极性部位指纹图谱特征峰量化峰面积

峰号	A	B	C	D
1	2.461 × 10 ⁴	0	7.836 × 10 ³	2.363 × 10 ⁴
2	1.621 × 10 ⁴	1.519 × 10 ⁴	1.014 × 10 ⁵	2.262 × 10 ⁴
3	1.576 × 10 ⁴	0	6.179 × 10 ⁴	2.866 × 10 ³
4	4.378 × 10 ⁵	5.782 × 10 ⁴	1.289 × 10 ⁶	1.830 × 10 ⁵
5	2.251 × 10 ⁴	7.714 × 10 ³	1.593 × 10 ⁵	1.258 × 10 ⁴
6	4.068 × 10 ⁴	2.015 × 10 ⁵	1.311 × 10 ⁵	1.979 × 10 ⁴
7	3.448 × 10 ³	0	5.055 × 10 ³	2.447 × 10 ²
8	3.825 × 10 ⁴	2.275 × 10 ⁴	9.720 × 10 ⁴	1.619 × 10 ⁴
9	1.357 × 10 ³	0	7.755 × 10 ³	2.186 × 10 ²
10	9.430 × 10 ³	2.851 × 10 ⁴	3.007 × 10 ⁴	2.609 × 10 ³
11	3.196 × 10 ³	1.383 × 10 ⁵	6.064 × 10 ³	1.001 × 10 ³
12	2.517 × 10 ⁵	1.545 × 10 ⁵	6.549 × 10 ⁵	7.311 × 10 ⁴
13	1.290 × 10 ⁴	1.376 × 10 ⁵	6.652 × 10 ⁴	9.120 × 10 ³
14	1.528 × 10 ⁵	3.214 × 10 ⁶	8.800 × 10 ⁴	1.434 × 10 ⁴
15	3.395 × 10 ⁴	6.536 × 10 ⁵	7.095 × 10 ³	1.434 × 10 ³



4. 虎杖苷;6. 白藜芦醇;12. 蒽苷 B;
14. 大黄素;15. 大黄素甲醚

图3 虎杖总提取物(A)及二氯甲烷(B)、
乙酸乙酯(C)、正丁醇(D)部位指纹谱

2.3 虎杖总提取物及不同极性部位指纹图谱与清除 DPPH 自由基作用的灰关联度分析

2.3.1 R 值的计算 将虎杖总提取物(A)清除 DPPH 自由基作用药效值定为 100.0,其他极性部位药效值依此量化,二氯甲烷(B)、乙酸乙酯(C)、正丁醇(D)部位的 R 值分别为 32.07,128.1,138.6。

2.3.2 灰关联度分析 以 A,B,C,D 清除 DPPH 自由基作用 R 值为母序列,以 A,B,C,D 指纹图谱 15 个特征峰峰面积数据为子序列,进行灰关联度分析。

采用均值化变换法,将各原始数据除以该序列数据均值,进行规格化处理。

标准化处理后的母序列记为 $Y_0(m)$,子序列记为 $Y_i(m)$,绝对差序列为 $\Delta_{0i}(m) = |Y_0(m) - Y_i(m)|$ 。

母序列 $\{Y_0(m)\}$ 与子序列 $\{Y_i(m)\}$ 的关联系数为 $K_{0i}(m) = [\Delta(\min) + \rho \times \Delta(\max)] / [\Delta_{0i}(m) + \rho \times \Delta(\max)]$ 。其中, $\Delta(\min)$ 为绝对差值的最小差, $\Delta(\max)$ 为绝对差值的最大差; ρ 为分辨系数,意义是削弱最大绝对差数值太大引起的失真,提高关联系数之间的差异显著性, $\rho \in (0, 1)$,本实验中 ρ 取值为 0.5。

求各子序列上各个考查点关联系数的平均值,即得各色谱峰与清除 DPPH 自由基活性的灰色关联度值,见表 2。

将各子序列对母序列的关联度按大小顺序排列起来,便组成关联序。依据关联度大小,确定了虎杖中各成分对清除 DPPH 自由基活性贡献的大小顺序,见表 2。

3 讨论

本研究采用 DPPH 法对虎杖总提取物及不同极

表 2 虎杖化学成分与清除 DPPH 自由基活性的灰关联序

关联序	峰号	关联度	关联序	峰号	关联度
1	8	0.797 4	9	5	0.706 0
2	1	0.795 6	10	10	0.704 8
3	12	0.784 7	11	9	0.687 2
4	4	0.777 3	12	13	0.684 4
5	2	0.759 1	13	14	0.555 3
6	6	0.721 7	14	11	0.552 9
7	3	0.719 6	15	15	0.552 3
8	7	0.717 8			

性部位进行了体外抗氧化活性研究。根据测定的 IC_{50} ,抗氧化活性顺序为:正丁醇部位 > 乙酸乙酯部位 > 总提取物 > 二氯甲烷部位 > 水部位。虎杖总提取物及二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇部位均具有较强的清除 DPPH 自由基活性,当样品溶液达到一定浓度时,抗氧化活性可达 90% 以上,与阳性对照维生素 C 相当。清除 DPPH 自由基活性最弱的为水部位, IC_{50} 为 $1\ 027\ mg \cdot L^{-1}$,当水层样品浓度增大至 $2\ 000\ mg \cdot L^{-1}$ 时,清除率仅为 79%。

本试验选择抗氧化活性较强的虎杖总提取物及二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇部位进行指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系研究,获得了指纹图谱中各特征峰所代表的化学成分对体外抗氧化作用贡献的大小。

结果显示,虎杖中 8 号、1 号、12 号(蒽苷 B)、4 号(虎杖苷)、2 号、6 号(白藜芦醇)等成分灰关联度值较高。文献报道虎杖苷和白藜芦醇均具有很强的抗氧化活性^[10-11],白藜芦醇是存在于植物中的天然抗氧化剂。由此可推测,灰关联度值高于白藜芦醇的 1,2,8 号成分及蒽苷 B 同样具有较强的抗氧化活性,可开发为天然的抗氧化剂。关于蒽醌苷类成分的抗氧化活性报道很少,本研究可为蒽醌苷类成分蒽苷 B 作为抗氧化物质的开发利用提供一定的参考依据。

虎杖中 14(大黄素),15(大黄素甲醚),11 号成分与清除 DPPH 自由基活性的灰关联度值约为 0.55,明显低于其他物质;查阅相关文献发现,由虎杖分离提取得到的大黄素和大黄素甲醚对 DPPH 自由基不具有清除作用^[12]。结合本文灰关联度值及文献的研究结果,初步确定在本实验参数条件下,关联度值低于 0.6 可以认为相应成分无贡献作用,即本研究中大黄素、大黄素甲醚及 11 号色谱峰所代表的化学成分对虎杖清除 DPPH 自由基活性无贡献。

阳春砂仁不同部位挥发油成分的 GC-MS 分析

陈璐¹, 敖慧^{2*}, 叶强¹, 李鸿翔²

(1. 成都中医药大学中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;
2. 成都中医药大学分析测试中心, 成都 611137)

[摘要] 目的: 对阳春砂仁不同部位的挥发油成分进行分析比较。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取阳春砂仁完整果实、果皮和种子团3个部位挥发油, 采用GC-MS技术对挥发油的化学成分进行分析鉴定, 并采用面积归一化法获得各化合物的相对含量。结果: 从阳春砂仁果实、种子团和果皮挥发油中分别鉴定出29, 20, 31种化合物, 占各部位挥发油总量的94.82%, 93.99%, 87.39%。三者共鉴定化合物40种, 其中共有成分13种。结论: 阳春砂仁完整果实与种子团挥发油化学成分相似, 果皮挥发油与二者化学成分差异较大。阳春砂仁果皮的药理作用和功效尚待进一步研究明确。

[关键词] 阳春砂仁; 挥发油; 气相色谱-质谱联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0080-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140080

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140604.1409.001.html>

[网络出版时间] 2014-06-4 14:09

[收稿日期] 20131225(007)

[基金项目] 成都中医药大学科技发展基金项目(ZRMS201271); 成都中医药大学实验技术项目(13117)

[第一作者] 陈璐, 博士, 讲师, 从事中药品种品质与资源研究, Tel: 028-61515731, E-mail: chenlu@edutcm.edu.cn

[通讯作者] *敖慧, 博士, 高级实验师, 从事中药药理与中药质量控制研究, Tel: 028-61800231, E-mail: aohui2005@126.com

本试验以虎杖不同极性部位体外抗氧化作用为例, 对虎杖总提取物及不同极性部位的谱效关系进行了初步的探索性研究, 可为中药“谱效关联”的指纹图谱的建立提供新的思路, 为中药药理活性物质基础研究提供一定的参考。

[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, 2010: 194.

[2] 孟洁, 杭瑚. 虎杖提取物的抗氧化活性及稳定性研究[J]. 化学世界, 2000, 41(8): 418.

[3] 金春华, 刘杰, 黄绪亮, 等. 虎杖苷对心肌细胞收缩性的影响[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(4): 400.

[4] 鲍琛. 虎杖提取物对CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 海峡药学, 2010, 22(6): 36.

[5] Chang J S, Liu H W, Wang K C, et al. Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line [J]. Antiviral Res, 2005, 66(1): 29.

[6] 周立东, 周希辉, 张淑春. 虎杖煎剂对艾氏腹水癌的抑瘤作用[J]. 中西医结合杂志, 1989, 9(2): 111.

[7] 李治建, 周露, 古力娜·达吾提, 等. 地锦草洗脱部位指纹图谱特征与其抗真菌作用的灰关联度分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 580.

[8] 陈华国, 赵宏宾, 赵超, 等. 虎杖提取物 HPLC 指纹图谱归属分析及谱效关系初探[J]. 中国药房, 2010, 21(19): 1775.

[9] 邓巨龙. 灰色系统基本方法[M]. 湖北: 华中工学院出版社, 1987.

[10] 朱立贤, 金征宇, 罗欣. 白藜芦醇和白藜芦醇苷抗氧化作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 22.

[11] 王修德, 孙华斌. 白藜芦醇的抗氧化作用及其在疾病防治中的应用前景[J]. 预防医学论坛, 2009, 15(12): 1246.

[12] 袁晓, 舒楚金, 龚二兰, 等. 虎杖蒽醌化合物的分离及抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(2): 22.

[责任编辑 顾雪竹]