

金银花指纹图谱及其清除 DPPH 自由基的谱-效关系

梁从莲, 刘红燕, 崔媛, 王玲娜, 孙希芳, 张永清*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:探讨金银花清除 DPPH 自由基的活性成分。方法:采用 HPLC 获得金银花甲醇提取液指纹图谱,并对色谱图进行融合处理;同时建立提取液对 DPPH 自由基的清除方程,采用双变量相关分析将 DPPH 自由基的半数清除率 IC_{50} 与 HPLC 指纹图谱共有峰的标准化峰面积比值关联。结果:4(绿原酸),10(异绿原酸 B),12(异绿原酸 C)号共有峰含量变化与 DPPH 自由基清除活性显著负性相关($P < 0.05$)。结论:金银花液相指纹图谱与清除 DPPH 自由基的谱效关系,对于金银花药用物质基础研究具有一定参考价值。

[关键词] 金银花; 指纹图谱; DPPH 自由基清除; 谱-效相关

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0044-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170044

Chromatography-efficacy Relation Between HPLC Fingerprints of Lonicerae Japonicae Flos and Its Effect in Scavenging DPPH Free Radicals LIANG Cong-lian, LIU Hong-yan, CUI Yuan, WANG Ling-na, SUN Xi-fang, ZHANG Yong-qing* (Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the active components in Lonicerae Japonicae Flos for scavenging DPPH free radicals. **Method:** The HPLC fingerprints were developed and merged. Meanwhile, the DPPH radical scavenging equation was established. The bivariate correlation analysis was applied to correlate the scavenging DPPH Free radical parameter IC_{50} and the standardized peak area ratio of common peaks of HPLC fingerprints. **Result:** The changes in the contents of common peaks 4 (chlorogenic acid), 10 (isochlorogenic acid B) and 12 (isochlorogenic acid C) show significant negative correlation with DPPH free radical scavenging activity. **Conclusion:** The chromatography-efficacy relation between the HPLC fingerprints and the DPPH free radical scavenging activity provides a certain reference value for the basic study on medicinal material base of Lonicerae Japonicae Flos.

[Key words] Lonicerae Japonicae Flos; fingerprint; DPPH free radical scavenging; chromatography-efficacy relation

金银花属于中医临床清热解毒的首选中药,主要含有有机酸类、三萜类、黄酮类及挥发油类等化学成分,具有抗菌、抗病毒、解热、抗炎等多种药理活性^[1]。HPLC 指纹图谱可以有效表征出多种化学成分信息,在中药质量控制领域得到了广泛应用^[2-5],并且已成为国内外所普遍接受的中药质量控制模式。HPLC 指纹图谱并不能完全表征其药效高低。只有深入阐明 HPLC 指纹图谱特征与药效之间的相

关性,才能为中药质量控制和药效评价提供规律性的科学依据^[6]。本研究在分析不同浓度金银花提取液清除 DPPH 自由基能力的基础上,建立了清除率计算方程,并运用双变量相关分析,考察了金银花提取液 HPLC 色谱峰与 DPPH 自由基清除活性间的“谱-效”关系,阐明了金银花清除 DPPH 自由基的药效物质基础,为评价金银花药材质量提供了新的思路和方法。

[收稿日期] 20141008(003)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI06B01);山东省自主创新专项(2013CXC20401)

[第一作者] 梁从莲,在读硕士,从事中药资源及其质量控制研究,E-mail:837309887@qq.com

[通讯作者] *张永清,教授,博士生导师,从事中药资源及其质量控制研究,E-mail:zyq622003@126.com

1 材料

金银花药材共 10 个批次,分别采自河北省巨鹿县堤村集、闫瞳镇、孙河镇等金银花种植基地,晒干或烘干。经山东中医药大学周凤琴教授鉴定,确认均为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾。

1260 系列高效液相色谱仪(G1315B 二极管阵列检测器, ChemStation 工作站, 美国 Agilent); ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 754 型紫外分光光度计(上海洪济仪器厂)。

1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH, 东京化成工业株式会社, U6VH-AR); 绿原酸(批号 20130415), 新绿原酸(批号 PA0819RA13), 隐绿原酸(批号 ZS0922BA13), 异绿原酸(批号 20130816), 异绿原酸(批号 20131021), 异绿原酸 C(批号 20130924), 木犀草苷(批号 20130521) 对照品, 纯度均 ≥ 98%, 由上海源叶生物科技有限公司提供; 乙腈、甲酸为色谱纯, 其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 金银花 HPLC 指纹图谱

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取异绿原酸 C、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、隐绿原酸、木犀草苷、绿原酸对照品适量, 加 50% 甲醇制成单个对照品储备液, 分别精密量取各储备液适量配制成质量浓度为 4.36×10^{-3} , 1.34×10^{-2} , 1.74×10^{-2} , 1.85×10^{-2} , 2.20×10^{-2} , 3.56×10^{-2} , $1.30 \times 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取 60 °C 烘干金银花粉末 2.5 g(过 60 目筛), 精密称定后置 50 mL 锥形瓶中, 加 50% 甲醇 50 mL, 密封, 超声处理 30 min, 过滤, 滤液用 50% 甲醇补足失重, 定容。

2.1.3 色谱条件 流动相 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 8% ~ 10% B; 10 ~ 30 min, 10% ~ 15% B; 30 ~ 40 min, 15% ~ 25% B; 40 ~ 50 min, 25% ~ 55% B; 50 ~ 55 min, 55% ~ 100% B; 55 ~ 60 min, 100% B), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 254, 325 nm。

2.1.4 方法学考察 ①精密密度试验: 取同一样品液连续进样 6 次, 计算色谱峰相对保留时间和峰面积 RSD 均 < 3%。②重复性试验: 取同一产地样品 5 份, 制备供试品溶液, 进样, 结果色谱峰相对保留时间和峰面积 RSD 均 < 3%。③稳定性试验: 取同一供试品溶液(样品 3), 分别于 0, 2, 6, 12, 24 h 进样, 结果色谱峰相对保留时间和峰面积 RSD 均 < 3%。

2.1.5 HPLC 指纹图谱 将色谱数据导入“中药色

谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版), 建立金银花不同波长融合指纹图谱, 见图 1, 表 1。

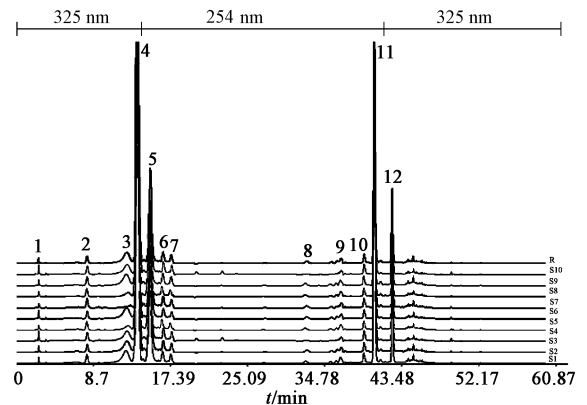


图 1 10 批金银花 HPLC 叠加

Fig. 1 Ten batch HPLC chromatographic of *Lonicerae Japonicae Flos*

金银花 HPLC 图谱特征峰数目为 12 个, 出峰时间依次为 2.53, 7.98(新绿原酸), 12.48, 13.68(绿原酸), 15.09(隐绿原酸), 16.09, 16.51, 32.64, 36.09(木犀草苷), 39.24(异绿原酸 B), 40.41(异绿原酸 A), 42.42 min(异绿原酸 C), 分别编号为 1 ~ 12。

2.2 清除 DPPH 自由基活性

2.2.1 DPPH 试剂与系列样品溶液配制 准确称取 DPPH 19.72 mg, 加 50% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 避光低温保存。取 DPPH 溶液 1 mL, 由低到高浓度逐渐加样品溶液, 室温避光反应 20 min, 记录 DPPH 溶液颜色褪去时加入样品的最大浓度, 依次稀释样品溶液为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 g · L⁻¹ 9 个梯度。

2.2.2 DPPH 清除率试验 分别取系列样品液 1 mL 与 DPPH 溶液 1 mL 混合, 室温避光反应 20 min 后, 测吸光度 A, 按下列公式计算清除率。

$$\text{清除率} = \{ [1 - (A_i - A_j)] / A_0 \} \times 100\%$$

其中, A_i 为 DPPH 溶液 1 mL + 样品溶液 1 mL 的吸光度; A_j 为样品溶液 1 mL + 50% 甲醇溶液 1 mL 的吸光度; A₀ 为 DPPH 溶液 1 mL + 50% 甲醇溶液 1 mL 的吸光度。

根据溶液质量浓度和吸光度绘制量效曲线。采用 probit 模型计算样品溶液清除 DPPH 自由基的半数清除率(IC₅₀), 见表 2。

2.3 金银花清除 DPPH 自由基谱效关系 将样品 HPLC 色谱中 12 个共有峰峰面积数据标准化处理后, 与 DPPH 自由基 IC₅₀ 值进行双变量皮尔逊相关系数分析, 结果见表 3。

表 1 金银花 HPLC 图谱共有峰峰面积

Table 1 Common peaks' area of Lonicerae's Flos HPLC fingerprints

样品	共有峰峰面积											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	160.35	678.91	3 773.44	36 337.60	16 572.08	3 131.96	3 116.08	320.47	264.13	620.70	20 972.90	4 080.12
2	159.03	584.70	3 095.42	34 901.60	14 715.13	2 724.58	2 623.82	313.25	262.72	649.58	19 004.11	4 189.52
3	263.29	650.52	3 140.71	32 212.47	10 964.35	2 695.45	2 686.81	282.27	267.03	626.63	15 542.22	4 196.40
4	260.49	859.57	3 371.60	41 106.33	12 258.22	2 858.22	2 875.54	309.50	292.07	632.23	19 619.68	4 064.57
5	209.65	566.27	3 243.80	33 859.09	12 326.26	2 631.68	2 699.52	274.33	284.47	628.17	15 454.36	4 162.25
6	173.25	688.14	3 140.71	34 991.29	13 621.87	2 638.18	2 485.17	281.23	263.22	576.99	16 629.78	3 565.26
7	182.87	640.83	3 067.60	32 860.45	11 777.94	2 604.60	2 418.57	280.63	219.40	570.02	15 954.77	3 800.00
8	161.85	686.09	3 237.17	35 511.17	13 322.26	2 732.96	2 536.46	362.47	279.76	605.57	21 665.03	4 137.60
9	274.09	709.60	4 063.72	39 617.60	3 172.23	2 448.31	2 636.46	314.40	269.30	667.40	23 865.70	4 312.56
10	188.34	688.20	4 863.72	34 953.27	11 918.06	2 702.34	2 459.34	277.87	213.03	525.23	16 999.26	3 211.10

表 2 金银花清除 DPPH 自由基解释方程

Table 2 Interpretation equation of scavenging DPPH free radical of Lonicerae Flos

样品	量效曲线(1 g 剂量)	X ²	R ²	IC ₅₀ /g·L ⁻¹
1	Probit(P) = 0.419 + 1.365	2.161	0.904	0.494
2	Probit(P) = 0.235 + 0.654	4.481	0.723	0.437
3	Probit(P) = 0.336 + 1.384	7.920	0.340	0.554
4	Probit(P) = 0.572 + 1.243	4.661	0.701	0.347
5	Probit(P) = 0.474 + 1.453	5.704	0.575	0.475
6	Probit(P) = 0.387 + 1.561	4.255	0.513	0.567
7	Probit(P) = 0.352 + 1.022	4.070	0.770	0.452
8	Probit(P) = 0.366 + 1.186	3.727	0.928	0.491
9	Probit(P) = 0.508 + 1.066	4.059	0.773	0.334
10	Probit(P) = 0.216 + 1.177	9.890	0.842	0.655

表 3 特征指纹峰与抗氧化活性的相关系数

Table 3 Correlation coefficient of characteristic peak and antioxidant activity

峰号	相关系数	P	峰号	相关系数	P
1	-0.43	0.21	7	-0.32	0.56
2	-0.32	0.36	8	0.34	0.28
3	0.29	0.41	9	-0.52	0.12
4	-0.66	0.03	10	-0.76	0.01
5	0.41	0.23	11	-0.56	0.09
6	0.12	0.74	12	-0.71	0.02

表 3 结果显示,4(绿原酸),10(异绿原酸 B),12(异绿原酸 C)号峰含量变化与 DPPH 自由基清除活性呈显著性负相关($P < 0.05$)。

3 讨论

建立了金银花 50% 甲醇提取液 HPLC 指纹图谱定性定量信息表征方法及 DPPH 自由基清除率量效关系曲线,通过双变量相关对“谱效”关系进行研究,结果发现金银花中绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C 含量的高低与 DPPH 自由基清除活性具有显著

相关性。

罗磊等^[7-8]通过对比金银花提取液、绿原酸对照品溶液及抗坏血酸对羟基自由基的清除能力、对 Fe³⁺ 的还原能力及对 DPPH 自由基的清除能力,发现金银花具有良好的抗氧化活性。本实验在前人研究的基础上,试图在验证绿原酸抗氧化作用的同时,发现其他抗氧化活性成分,结果发现除绿原酸外,异绿原酸 B、异绿原酸 C 也是金银花清除 DPPH 自由基的药效成分,从而为探明金银花药效物质基础提供了新的思路和方法。

[参考文献]

- [1] 赵国玲,刘佳佳,林丹,等. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中成药,2002,24(12):973-976.
- [2] 邵林,郭庆梅,冉蓉,等. 山东不同栽培品种金银花 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):117-120.
- [3] 白雪梅,吴健翎,罗强,等. 金银花 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2004,26(7):521-524.
- [4] 石俊英,张会敏,王颖. 山东道地药材金银花 HPLC 指纹图谱研究[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(1):69-73.
- [5] 熊艳,高慧敏,王智民,等. 金银花不同干燥技术 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):1015-1017.
- [6] 罗志江,徐彦,吴建英,等. 虎杖指纹图谱及其抗氧化活性的“谱效”关系研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2012,34(1):138-142.
- [7] 罗磊,郭晓园. 金银花提取液抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009,30(21):63-65.
- [8] 兰华,高丹,申鸿,等. 金银花提取液抗氧化酶活性与清除自由基能力的研究[J]. 中国食品学报,2007,7(2):27-32.

[责任编辑 顾雪竹]