

· 化学与分析 ·

HPLC-ABTS-DAD 在线检测 生脉散和益气复脉粉针的体外抗氧化能力

王宇卿, 朱丹妮, 寇俊萍, 余伯阳*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

[摘要] **目的:** 比较生脉散和益气复脉粉针体外抗氧化活性成分的差异。**方法:** 采用 HPLC-ABTS-DAD 联用技术, 在线检测生脉散和益气复脉粉针清除 ABTS^{·+} 自由基活性成分, 在此基础上比较两者体外抗氧化活性成分的差异。**结果:** 生脉散具有较强的直接清除 ABTS^{·+} 自由基作用, 主要是通过具备酚羟基结构的物质、糖类、氨基酸类大极性物质和部分木脂素类成分实现的; 而益气复脉粉针直接清除 ABTS^{·+} 自由基活性较弱, 且小极性部位基本没有活性。**结论:** 生脉散和益气复脉粉针虽然是同一复方的不同制剂但是其在直接抗氧化方面作用的差异较大, 直接抗氧化在两者治疗心血管疾病时所发挥的作用有所不同。

[关键词] 生脉散; 益气复脉粉针; 自由基; 抗氧化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0051-04

[doi] 10.11653/syfj2013160051

On-line Determination of Free Radicals Scavenging Effect of SMS and YQFM by HPLC-ABTS-DAD

WANG Yu-qing, ZHU Dan-ni, KOU Jun-ping, YU Bo-yang*

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the vitro antioxidant components of Shengmaisan (SMS) and Yiqi Fumai sterile powder (YQFM). **Method:** The scavenging activities of SMS and YQFM for ABTS^{·+} radicals was determined by HPLC-ABTS-DAD. **Result:** SMS had a good effect of scavenging ABTS^{·+} radicals with the saccharides, amino acids and lignans as potential active components responsible for its scavenging activities. The scavenging activities of YQFM were relatively weak. **Conclusion:** Although SMS and YQFM are the different preparations for the same complex prescription, they have large differences in directly scavenging radicals.

[Key words] Shengmaisan; Yiqi Fumai sterile powder; free radicals; antioxidant

自由基氧化损伤在心血管疾病发病过程中起重

要作用, 因此基于清除自由基的抗氧化能力评价成为近年研究心血管疾病治疗药物的热点之一。为了满足中药复方等复杂组样品清除自由基能力的快速测定, 近年来建立各种抗氧化活性的在线检测技术也异常流行。其中 HPLC-ABTS-DAD 在线检测技术是一种方便快捷、不需制备单一化合物的抗氧化有效成分筛选方法, 能够同时完成分离和在线测定复杂样品中清除自由基活性成分^[1-3]。

古方生脉散和现代化制剂益气复脉粉针临床应用于心血管疾病都取得了很好的疗效。在前期的研

[收稿日期] 20130306(005)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI51B03); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX12_0314)

[第一作者] 王宇卿, 博士, 讲师, 从事中药质量控制及新制剂研究, Tel: 18651676813, E-mail: wyq2013@163.com

[通讯作者] *余伯阳, 博士, 教授, 从事中药复方研究, Tel: 025-86185158, E-mail: boyangyu59@163.com

究中笔者发现生脉散和益气复脉粉针对于心肌缺血氧化损伤都有较好的疗效,并且两者化学成分存在较大的差别,这提示两者治疗心肌缺血损伤的具体作用机制和有效物质基础可能存在差异。那么两者是否在清除氧自由基这一环节起作用?如果有的话,两者抗氧化物质基础是否相同?这一系列问题都还存在困扰。

基于上述问题,本实验拟采用 HPLC-ABTS-DAD 联用技术,在线检测生脉散和益气复脉粉针清除 ABTS^{·+} 自由基活性成分,在此基础上比较两者体外抗氧化活性成分的差异。

1 材料

人参、麦冬、五味子由天士力之娇药业提供,经中国药科大学余伯阳教授鉴定符合 2010 年版《中国药典》要求;益气复脉冻干粉(天士力之娇药业,批号 20111008),2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS, Sigma 公司),过硫酸钾(上海凌峰, AR),正丁醇(山东禹王, AR),乙腈(Tedia ROE, 美国)。

AE240 型电子天平(Mettler Toledo 公司),旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司),LC-2010C HT 色谱仪,SPD-M20A 二极管阵列检测器,LC-10AT 液相色谱泵(日本岛津),超纯水机(Millipore, 美国)。

2 方法

2.1 样品溶液的制备 生脉散:按 1:3:1.5 的比例称取人参、麦冬、五味子,分别加 10,8,6 倍量的水煎煮 3 次,每次 1 h,过滤,浓缩得生脉散水煎液(SMS)。取 2 mL,3 倍量水饱和正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇部位,蒸干,残渣用 2 mL 流动相溶解,高速离心,取上清液供 HPLC 分析。

益气复脉粉针:称取益气复脉粉针 1.04 g 加 10 mL 水溶解,3 倍量水饱和正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇萃部位,蒸干,残渣用 2 mL 流动相溶解,高速离心,取上清液供 HPLC 分析。

2.2 ABTS^{·+} 自由基体系工作液的配制 取 0.5 mL 70 mmol·L⁻¹ 的过硫酸钾溶液加入到 50 mL 2 mmol·L⁻¹ 的 ABTS 水溶液中,暗处放置,反应 16 h,以水稀释,直至在 734 nm 波长处测得吸光度为 0.7 ± 0.05,即得。

2.3 HPLC-ABTS-DAD 联用测定生脉散和益气复脉粉针在线清除 ABTS^{·+} 活性成分

2.3.1 检测装置示意图 HPLC-ABTS-DAD 联用系统是由岛津 LC-2010C HT 高效液相色谱仪、岛津 LC-10AT 高效液相色谱泵、岛津 SPD-M20A DAD 检测器、三通管和 PEEK 管等主要组成部分连接而成

(图 1)。ABTS^{·+} 自由基工作液流速为 0.5 mL·min⁻¹,经单独的泵泵出后与液相流出液进入三通管中混合,再流经 PEEK 管(0.25 mm × 20 m)使其充分反应,后经 DAD 检测器检测,检测波长为 734 nm。

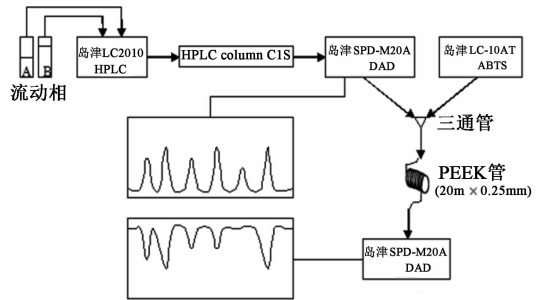


图 1 HPLC-ABTS-DAD 联用系统

2.3.2 色谱条件 Alltech C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 203 nm,柱温 30 °C,流动相乙腈-0.01% 甲酸水溶液,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 生脉散和益气复脉粉针的 HPLC 梯度洗脱程序

t/min	甲酸-水 (A, 100:0.01) / %	乙腈(B) / %
0	95	5
30	65	35
50	57	43
80	35	65
90	25	75
95	95	5

2.3.3 清除 ABTS^{·+} 自由基活性成分鉴定 实验结果提示生脉散和益气复脉粉针具有清除 ABTS^{·+} 自由基活性成分为液相色谱不易分离检测的大极性物质和部分小分子物质,因此我们采用核磁共振、化学鉴定和液质联用(HPLC-MS/MS)相结合的方法来初步鉴定生脉散和益气复脉粉针在线清除 ABTS^{·+} 自由基活性成分。

液质联用分析:按上述色谱条件进样,样品经 HPLC 分离 DAD 检测后的流出液离子化后进入三重四级杆质谱检测器。氮气为去溶剂气,流速 800 L·h⁻¹,温度 400 °C。毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 30 V;氦气为碰撞裂解气,流速 50 L·h⁻¹,碰撞能量 30 V。正负离子扫描,扫描范围 200 ~ 1 200。

化学鉴别:取生脉散和益气复脉粉针样品连续进样,不断收集生脉散 0 ~ 20 min 流出液和益气复脉粉针 0 ~ 6 min 流出液,分别浓缩,采用相应的化学鉴别反应鉴别改部位可能含有的物质。

3 结果与讨论

3.1 ABTS 法的原理 ABTS 法是模拟体内氧化损伤反应的方法,用来检测物质清除 ABTS^{·+} 自由基的

能力,借此来评价其抗氧化活性的大小。ABTS 经活性氧化后生成 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基,其在 734 nm 具有最大吸收。当被测物质中存在抗氧化活性成分时,则该物质会与 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基发生反应而使反应体系褪色,可以用比色法或紫外-可见光检测器检测^[4-6]。

3.2 在线清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基分析方法的建立 利用 HPLC-ABTS-DAD 联用技术可以快速在线检测样品中不同的化学成分清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性的能力。笔者通过试验考察了不同 ABTS 溶液浓度、不同过硫酸钾溶液浓度、反应 PEEK 管的长度、 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基工作液流速、检测波长等影响 HPLC-ABTS-DAD 在线测定体系的主要因素最终确定以 2.3 项下条件为最优。

3.3 在线清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性比较 由生脉散清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基的图谱可知(图 2),0~20 min 段成分具有很强的清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性。峰 1, 2, 3, 4, 5 也显现出了倒峰,也具有一定的清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性。

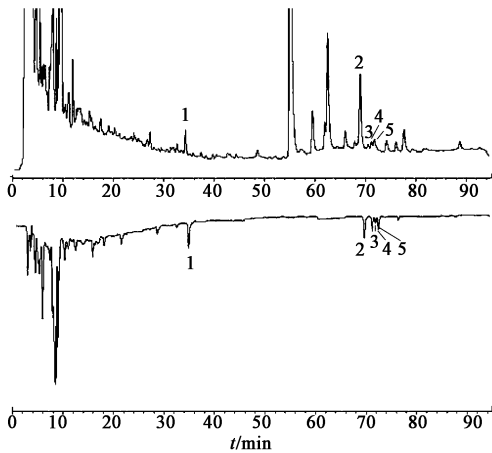


图 2 生脉散 203 nm 下 HPLC 色谱及其清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性

由益气复脉粉针清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基的图谱可知(图 3),0~6 min 段成分具有较强的清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性,但与生脉散相比明显较弱。10 min 后的小分子类成分几乎都没有显现出明显的倒峰,说明益气复脉粉针中所含的小分子的成分基本没有清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性,它们可能不是通过直接清除自由基的途径起到心肌缺血损伤保护作用的。

3.4 在线清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性成分鉴定

3.4.1 生脉散和益气复脉粉针大极性部位的化学鉴别 以上在线测定结果证明生脉散 0~20 min 的成分和益气复脉粉针 0~6 min 的成分具有较强的清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性,这些成分主要为一些大极

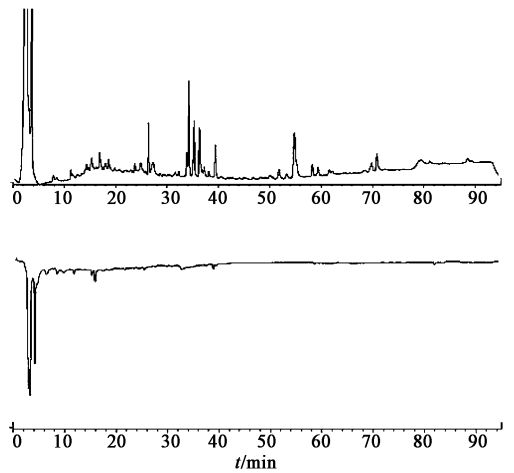


图 3 益气复脉粉针 203 nm 下 HPLC 色谱及其清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性

性物质,采用液质联用的手段无法得到分离鉴定。查阅相关文献可知生脉制剂中主要含有糖类、氨基酸、人参皂苷、麦冬皂苷、黄酮和木质素类成分^[7-10],因此可以采用化学鉴别结合核磁共振的方法初步鉴定这些活性较强的大极性物质,结果见表 2,图 4。

表 2 生脉散和益气复脉粉针中清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性成分化学鉴定

化学成分	鉴别反应	生脉散	益气复脉粉针
		0~20 min 部位	0~6 min 部位
糖	硫酸-苯酚反应	+	+
氨基酸	茚三酮反应	+	+
皂苷	醋酐-浓硫酸反应	-	-
黄酮	盐酸-镁粉反应	-	-
木质素	没食子酸-浓硫酸反应	-	-

在生脉制剂及人参、麦冬、五味子 3 味药的众多化学成分研究中,大都注重于人参皂苷、麦冬皂苷、高异黄酮、五味子木质素类的研究,很少涉及其他类的成分^[7-10]。大极性物质的分离分析是中药分析中的难题,因此生脉制剂中大极性部分的物质也是很少见报道。本文证实生脉散和益气复脉粉针中的大极性成分具有较好的清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性,并且采用化学鉴定的方法初步推断其可能属于哪一类化学物质,结果证实该部位含有糖类和氨基酸,而不含皂苷、黄酮和木质素类物质,这为进一步抗氧化活性物质基础研究提供了基础。

3.4.2 HPLC-MS-MS 分析 由生脉散 HPLC-MS-MS 分析结果可知,生脉散小极性部位中具有清除 $ABTS^{\cdot+}$ 自由基活性的峰 2, 3, 4, 5 分别为 angeloylgomisin H, benzoylgomisin H, tigloylgomisin P, gomisin G, 结果见表 3, 各峰的光谱图见图 4。前期对益气复脉粉针化学成分的研究表明其中小极性部

表 3 生脉散中小极性部位清除 ABTS^{·+} 自由基活性成分鉴定

NO.	t_R /min	λ_{max} /nm	分子量	负离子 (m/z)	正离子 (m/z)	鉴定
1	34.252	252	-	703, 692	227, 426, 399, 372	未知
2	68.928	215,248,286	500		501 [M + H] ⁺ 483 [M + H-H ₂ O] ⁺ 431 [M + H-C ₅ H ₁₀] ⁺ 401 [M + H-C ₅ H ₈ O ₂] ⁺	angeloylgomisin H
3	70.516	217,250,282	522	521 [M-H] ⁻	523 [M + H] ⁺ 505 [M + H-H ₂ O] ⁺ 401 [M + H-C ₇ H ₆ O ₂] ⁺	benzoylgomisin H
4	71.202	217,255	514		532 [M + NH ₄] ⁺ 487 [M + H-CO] ⁺ 415 [M + H-C ₅ H ₈ O ₂] ⁺ 371 [M + H-C ₅ H ₈ O ₂ -C ₂ H ₄ O] ⁺	tigloylgomisin P
5	71.746	220,253	536		537 [M + H] ⁺ 415 [M + H-C ₇ H ₆ O ₂] ⁺ 371 [M + H-C ₇ H ₆ O ₂ -C ₂ H ₄ O] ⁺	gomisin G

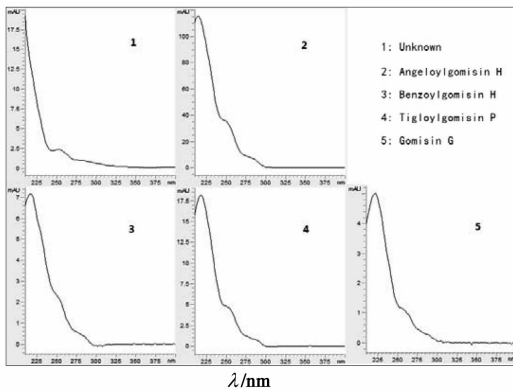


图 4 生脉散中小极性部位清除 ABTS^{·+} 自由基活性成分光谱

位的化学物质主要为人参皂苷和少量木脂素,其不含有生脉散上述 5 个具有直接清除自由基活性的成分,结合本实验的研究说明益气复脉粉针的小极性部位不具备直接清除自由基的活性。

总之,由以上结果和分析可知,生脉散与益气复脉粉针相比具有明显较强的直接清除 ABTS^{·+} 自由基作用,主要是通过其糖类、氨基酸类大极性物质和部分木脂素类成分实现直接抗氧化作用的,这说明直接清除自由基可能是生脉抗心肌缺血损伤的一个重要药理作用环节;而益气复脉粉针的糖、氨基酸类大极性成分含量和生脉散相比明显较少,并且不含 angeloylgomisin H, benzoylgomisin H, tigloylgomisin P, gomisin G 等几个具备直接清除 ABTS^{·+} 自由基活性的成分,这说明益气复脉粉针直接清除自由基抗氧化的作用和生脉散相比较弱,它可能通过其他途径达到和生脉散相当的心肌缺血损伤保护作用。

[参考文献]

[1] Borges G, Degeneve A, Mullen W, et al. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants,

blueberries, raspberries, red currants and cranberries [J]. J Agric Food Chem, 2010,58(7):3901.

[2] Koleva II, Niederländer HAG, van Beek TA. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. Anal Chem, 2001,73(14):3373.

[3] 高翔,王燕,朱丹妮,等. HPLC 在线检测消癌平注射液清除 ABTS^{·+} 活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(5):54.

[4] Miller N J, Rice-Evans C, Davies M J, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [J]. Clin Sci, 1993,84(4):407.

[5] 尹震花,顾雪竹,张一冰,等. 三白草体外抗氧化活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(4):99.

[6] 罗超,刘霁明,邢惟青,等. 石参总黄酮抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(13):198.

[7] 周洪玉. 生脉注射液药效物质基础研究 [D]. 长春:吉林大学, 2011.

[8] Wang Y H, Qiu C, Wang D W, et al. Identification of multiple constituents in the traditional Chinese medicine formula Sheng-Mai San and rat plasma after oral administration by HPLC-DAD-MS-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011,54(5):1110.

[9] Liu R, Nie L X, Li X F, et al. Simultaneous determination of ginsenosides and lignans in Sheng-mai injection by ultra-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. Pharmazie, 2012,67(1):14.

[10] Zhou D D, Jiang S J, Tong L, et al. Quantitative determination of eight major constituents in the traditional chinese medicinal Yi-Qi-Fu-Mai preparation by LC [J]. Chromatographia, 2009,70(5):969.

[责任编辑 顾雪竹]