

聂 韡,房海灵,邓绍勇,等. 不同产地广东紫珠药材苯乙醇苷类成分含量与抗氧化能力的相关性[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):273-275. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.078

不同产地广东紫珠药材苯乙醇苷类成分含量与抗氧化能力的相关性

聂 韡,房海灵,邓绍勇,朱培林

(江西省林业科学院,江西南昌 330032)

摘要:采用超声提取广东紫珠中的连翘酯苷 B 和金石蚕苷,用 HPLC 法测定其含量,并考察其与抗氧化活性的相关性。色谱柱为 sunfire C₁₈ 4.6 mm × 250 mm 色谱柱;流动相为乙腈:水(含 0.1% 甲酸)的溶液(18:82);检测波长为 332 nm。抗氧化活性采用 DPPH 法和铁氰化钾还原法测定。测定结果,广东紫珠药材中连翘酯苷 B 和金石蚕苷含量最高的分别来自江西武宁和萍乡芦溪,相关性分析结果表明,连翘酯苷 B 和金石蚕苷含量与广东紫珠抗氧化能力均有一定的正相关性。表明不同产地广东紫珠药材中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量有显著差异;苯乙醇苷类成分为广东紫珠中主要的抗氧化成分,与自由基清除率和总还原力呈正相关。

关键词:广东紫珠;连翘酯苷 B;金石蚕苷;抗氧化活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0273-03

广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis* Chun.) 为马鞭草科紫珠属多年生落叶小灌木,茎枝以及叶入药,收录于 2010 版国家药典,具有收敛止血、清热解毒等作用^[1]。广东紫珠以地上部位入药,其中的苯乙醇苷类成分被认为是其主要化学成分,目前,研究者从中分离到 10 余种该类化合物^[2-3]。相关研究表明,植物中的苯乙醇苷类成分具有较好的抗氧化活性^[4]。相关学者对广东紫珠的抗氧化作用进行了初步研究。结果表明,广东紫珠的各极性部位均有不同程度清除 DPPH·、OH· 的能力^[5]。目前,对广东紫珠药材的抗氧化活性研究还较少,苯乙醇苷类具体成分与抗氧化能力之间的相关性研究还未见报道。因此,本试验首先利用 HPLC 法测定了 12 个不同产地的广东紫珠中连翘酯苷 B 和金石蚕苷 2 种苯乙醇苷类成分,同时测定了 12 个不同产地广东紫珠的 DPPH 清除率和总还原力,并对二者数据进行了相关性分析,对广东紫珠药材的抗氧化作用进行研究,以期为更好地综合利用广东紫珠资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪,紫外检测器 2489,美国

收稿日期:2015-09-01

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81102799)。

作者简介:聂 韡(1982—),女,江西南昌人,博士,副研究员,研究方向为中药活性成分提取及质量评价。E-mail: nw1025@hotmail.com。

Waters 公司生产;UV-752 紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司生产;CP214 型分析天平,奥豪斯仪器有限公司生产;超声清洗器,洁康超声波有限公司生产;超声波功率 120 W,频率 40 kHz;RE-52 旋转蒸发器,上海亚荣公司生产。

1.2 药品

2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)购于西格玛公司上海办事处;连翘酯苷 B 和金石蚕苷对照品购自南京泽朗医药有限公司,纯度经检验大于 98%;乙腈为色谱纯铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、甲醇、甲酸等均为分析纯;水为娃哈哈纯净水。

1.3 材料

广东紫珠药材采自 12 个不同产地,药材来源见表 1,经江西省林业科学院鉴定为马鞭草科紫珠属植物广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis* Chun.) 的地上部分。

1.4 方法

1.4.1 样品溶液的制备

1.4.1.1 对照品溶液的制备 精确称取连翘酯苷和金石蚕苷对照品各 5.00 mg,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容,精确量取各标准品溶液 1 mL,混匀,制得混合标准品溶液,进样前用微孔滤膜过滤,去杂质,备用。

1.4.1.2 样品溶液的制备 取干燥广东紫珠药材,粉碎,过 50 目筛,精确称定 2 g,置具塞锥形瓶中,加入 50% 乙醇 20 mL,36 ℃ 超声提取 30 min,提取 2 次,静置,过滤,合并 2 次滤液,并浓缩定容至 20 mL,0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。

的影响[J]. 西北农业学报,2013,22(7):12-18.

[10] Armien A G, Tokarnia C H, Peixoto P V, et al. Clinical and morphologic changes in ewes and fetuses poisoned by *Ipomoea carnea* subspecies *fistulosa* [J]. J Vet Diagn Invest, 2011, 23(2): 221-232.

[7] 吴书奇,王 帅,陈根元,等. 小花棘豆对和田羊血液生化指标的影响[J]. 东北农业大学学报,2013,44(6):62-68.

[8] 贾琦珍,陈根元,廖秋萍,等. 小花棘豆中毒对家兔脏器指标的影响[J]. 湖北农业科学,2014,53(12):2854-2856.

[9] 王 帅,张 玲,陈根元,等. 苦马豆素对小鼠脑组织抗氧化功能

表 1 样品来源信息

样品编号	产地	采集时间 (年-月-日)
1	江西井冈山	2013-10-16
2	江西九江武宁	2013-10-12
3	江西萍乡芦溪	2013-10-15
4	江西萍乡万寒寨	2013-10-15
5	江西宜春	2013-10-19
6	江西余江	2013-10-11
7	江西安远	2013-10-13
8	江西赣州 1	2013-10-14
9	江西赣州 2	2013-10-14
10	江西安福	2013-10-17
11	广西桂林	2013-10-09
12	广东南雄	2013-10-21

1.4.2 广东紫珠中苯乙醇苷成分含量测定 色谱条件:色谱柱为 sunfire C₁₈ 4.6 mm×250 mm 色谱柱;流动相为乙腈:水(含 0.1% 甲酸)为 18:82;检测波长为 332 nm;流速为 1 mL/min;柱温为 25 ℃;进样量 10 μL。

1.4.3 抗氧化活性测定方法

1.4.3.1 自由基清除活性测定方法(DPPH 法)^[6] DPPH 用无水乙醇配制成 0.039 4 mg/mL 的溶液,置于棕色瓶中备用。取各广东紫珠药材提取液(按照“1.4.1.2”节的方法制备,并稀释至浓度为 0.1 mg/mL)3 mL,加入 3 mL DPPH 标准液,于 517 nm 波长处测得吸光值 D_i;以乙醇代替样品溶液做空白试验,在 517 nm 处测吸光值 D₀;另取 3 mL 溶液加 3 mL 乙醇测得吸光度为 D_j。根据以上数据算出清除率:

清除率 = [1 - (D_i - D_j)/D₀] × 100%。

1.4.3.2 总还原力测定法(铁氰化钾法)^[7] 在 2.5 mL pH 值 6.6 磷酸缓冲溶液中加入 1 mL 广东紫珠样品溶液(按照“1.4.1.2”节的方法制备,并稀释至浓度为 2.5 mg/mL)、2.5 mL 1% 铁氰化钾,混合物在 50 ℃ 恒温条件下,加热 20 min。急速冷却,加 2.5 mL 10% 三氯乙酸,混匀后以 3 000 r/min 离心 10 min。取上层清液 2.5 mL,加 2.5 mL 蒸馏水再加 0.5 mL 0.1% FeCl₃,混合均匀,静置 10 min 后,在 700 nm 处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 广东紫珠中连翘酯苷 B 和金石蚕苷含量测定方法学考察

2.1.1 标准曲线的测定 分别精确称取连翘酯苷 B、金石蚕苷各 5 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,得对照品溶液。分别精确量取 1 mL,混合,得混合对照品储备液。注入高效液相色谱仪,进样体积分别为 1、4、8、12、16、20 μL,测定连翘酯苷 B、金石蚕苷的峰面积,分别以连翘酯苷 B、金石蚕苷的量(μg)为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,计算回归方程,得到连翘酯苷 B 的回归方程为:y = 886 531x + 284 290, r = 0.995 1;金石蚕苷的回归方程为:y = 982 413x + 371 749, r = 0.9995。结果表明,连翘酯苷 B 和金石蚕苷在 0.25 ~ 5.0 μg 范围内线性关系均良好。标准品及样品 HPLC 图见图 1、图 2。

2.1.2 精密度 取 2 种对照品的混合溶液,注入液相色谱

柱,进样量 10 μL,重复进样 6 次,测定 2 种标准品峰面积值,计算 RSD 值分别为连翘酯苷 B 0.89%,金石蚕苷 0.41%,结果表明,本测定方法有较好的精密度。

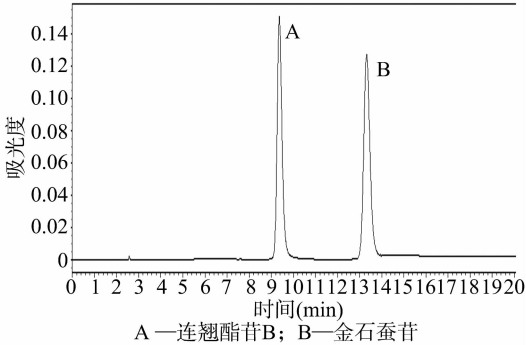


图 1 对照品 HPLC 色谱

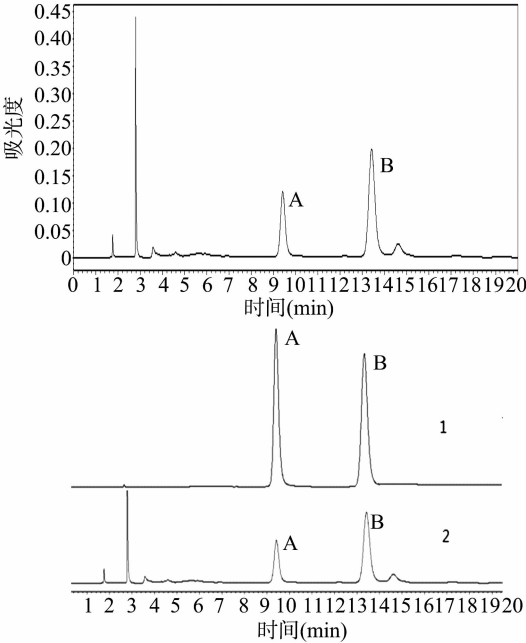


图 2 广东紫珠样品 HPLC 色谱

2.1.3 稳定性 取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 各进样 1 次,测定连翘酯苷 B、金石蚕苷的峰面积值,计算 RSD 值分别为连翘酯苷 B 1.86%,金石蚕苷 1.51%,结果表明,样品在 24 h 内有较好的稳定性。

2.1.4 重复性 称取广东紫珠药材粉末 0.5 g,平行 6 份,按“1.4.1.2”节的方法制备 6 份供试品溶液,各取 10 μL 分别注入高效液相色谱仪,测定连翘酯苷 B、金石蚕苷的峰面积值,计算 RSD 值分别为连翘酯苷 B 0.89%,金石蚕苷 0.93%。结果表明,本测定方法有较好的重复性。

2.1.5 加样回收率 采用加样回收法测定回收率。称取广东紫珠药材粉末 6 份,每份约 0.5 g,精确称定,分别加入对照品粉末各 5 mg,按“1.4.1.2”节的方法制备 6 份供试品溶液。测定连翘酯苷 B、金石蚕苷的含量,计算求得连翘酯苷 B 的平均回收率为 98.03%, RSD 为 0.66%;金石蚕苷的平均回收率为 98.15%, RSD 为 0.51%。

2.2 样品含量测定

取各产地样品,按照“1.4.1.2”节的方法进行样品溶液

制备,并按照“1.4.2”节的方法测定不同产地广东紫珠药材中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量,结果见表 2。来自 12 个不同产地的广东紫珠,其连翘酯苷 B、金石蚕苷含量均符合 2010 版《中国药典》二者之和不得低于 0.5% 的要求,但各产地之间含量差异较为显著,其中来自芦溪及武宁的广东紫珠样品的连翘酯苷 B、金石蚕苷含量明显高于其他产地,而余江、安远、广东南雄产地的广东紫珠中连翘酯苷 B、金石蚕苷的含量远远低于其他各产地。

表 2 不同产地广东紫珠中连翘酯苷 B、金石蚕苷的含量

序号	产地	连翘酯苷 B (%)	金石蚕苷 (%)	合计 (%)
1	江西井冈山	1.560	0.702	2.262
2	江西九江武宁	4.236	3.669	7.905
3	江西萍乡芦溪	4.138	5.159	9.297
4	江西萍乡万寒寨	2.415	2.098	4.513
5	江西宜春	2.523	2.948	5.471
6	江西余江	0.281	0.438	0.719
7	江西安远	0.794	0.205	0.999
8	江西赣州 1	1.248	0.401	1.649
9	江西赣州 2	1.161	0.331	1.492
10	江西安福	1.917	1.528	3.445
11	广西桂林	2.447	3.317	5.764
12	广东南雄	0.656	0.152	0.808

2.3 样品抗氧化活性测定

取各产地样品,按照“1.4.3”节的方法测定不同产地广东紫珠药材的抗氧化活性。由表 3 可见,各产地的广东紫珠样品抗氧化活性差别很大,来自广西桂林、江西宜春、江西九江武宁、江西萍乡万寒寨、江西萍乡芦溪的广东紫珠药材样品清除自由基能力较强,江西余江产的广东紫珠药材样品清除自由基能力最弱。广西桂林、江西宜春、江西萍乡万寒寨、江西井冈山、江西九江武宁产的广东紫珠药材总还原力较强,江西余江产的广东紫珠药材样品总还原力最弱。

表 3 不同产地广东紫珠中抗氧化活性结果

序号	产地	清除自由基 能力 (%)	总还原能力 (700 nm 处的吸光度)
1	江西井冈山	21.60	0.450
2	江西九江武宁	54.25	0.402
3	江西萍乡芦溪	42.45	0.270
4	江西萍乡万寒寨	48.41	0.513
5	江西宜春	57.68	0.683
6	江西余江	6.27	0.016
7	江西安远	17.44	0.089
8	江西赣州 1	24.09	0.150
9	江西赣州 2	25.80	0.151
10	江西安福	21.43	0.258
11	广西桂林	60.39	0.730
12	广东南雄	16.82	0.072

2.4 广东紫珠药材中苯乙醇苷含量与抗氧化活性的双变量相关性分析

采用 SPSS 19.0 软件进行双变量相关性分析,分析不同产地广东紫珠药材样品连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量与抗氧化活性试验结果的 pearson 相关系数,结果见表 4,双变量相关分析是研究变量之间密切程度的一种统计方法,2 个因

素之间的关系越密切,其相关系数越大。结果表明,连翘酯苷 B 和金石蚕苷与 DPPH 清除自由基能力具有显著的正相关性;与总还原力具有正相关。双变量相关分析结果表明,广东紫珠中苯乙醇苷类成分的含量与抗氧化活性具有明显的相关性,但是抗氧化活性是不同物质协同作用的结果,仅仅通过简单的相关分析不能准确、全面地反映二者之间的关系,在今后研究中还需进行进一步分析。

表 4 苯乙醇苷含量与抗氧化活性的相关系数

抗氧化活性	相关系数		
	连翘酯苷 B	金石蚕苷	总含量
自由基清除能力	0.799 **	0.783 **	0.803 **
总还原力	0.528 *	0.532 *	0.539

注: *、** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平(双侧)上显著相关。

3 讨论

流动相的考察。分别考察了甲醇-水、乙腈-水 2 种基本流动相系统,结果表明,乙腈-水为流动相系统的色谱峰峰形较好,且考虑到连翘酯苷 B 和金石蚕苷 2 种化学成分含有酚羟基,略显酸性,因此,尝试在流动相中加入少许酸以调节峰形。分别试验了 0.1% 甲酸、0.1% 乙酸、0.05% 三氟乙酸、0.2% 磷酸,结果表明,流动相中加入少许酸可显著调节色谱峰峰形,且 4 种酸的效果基本相似,但考虑到磷酸黏度较大,对仪器和柱子损伤较大;三氟乙酸价格较贵;且乙酸相比甲酸沸点高,不易挥发,因此选择乙腈-水(0.1% 甲酸)为最佳流动相。最后确定 HPLC 色谱条件为:以乙腈-水(0.1% 甲酸)为流动相系统;柱温:25℃;检测波长:332 nm;流速:1 mL/min。

众多文献报道,苯乙醇苷类成分具有较强的抗氧化活性,而广东紫珠药材中主要的化学成分也是苯乙醇苷类成分,因此理论上广东紫珠药材也应该是一种具有较强抗氧化活性的中药材。本研究结果表明,广东紫珠药材具有显著的清除自由基作用,总还原力也较强;相关性分析结果也显示抗氧化活性和苯乙醇苷类成分的含量具有正相关性。广东紫珠在抗氧化方面会有很好的应用前景。本研究结果也为广东紫珠药材抗氧化活性的深入研究提供了理论基础。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 版. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 郭文,付辉政,周国平,等. 广东紫珠正丁醇部位化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):30-33.

[3] 胡晓,李丽,杨义芳,等. 广东紫珠中咖啡酰苯乙醇苷类化合物[J]. 中国中药杂志,2014,39(9):1630-1634.

[4] 颜芳,曾光尧,谭健兵,等. 植物中苯乙醇苷类化合物研究进展[J]. 中南药学,2013,11(5):358-362.

[5] 郑钦方. 广东紫珠药材质量及抗氧化与烫伤愈合活性研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2012.

[6] 周莹,刘广锋,冯娟,等. 何首乌 3 种组分的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究[J]. 广东药学院学报,2014,30(3):301-304.

[7] 吴海虹,玄国东,刘春泉,等. 肉苁蓉苯乙醇苷的纯化及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2008,29(6):190-193.