

地稔中6种成分含量测定及其与抗氧化活性的相关性分析[△]

刘静^{1*}, 明惠仪², 麻秀萍^{1,3,4#}, 钱松¹, 杨菁^{1,4}, 吴登莉¹, 郭江涛^{1,4} (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 织金县人民医院药剂科, 贵州毕节 552100; 3. 国家苗药工程技术研究中心/贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵阳 550025; 4. 贵州中医药大学茶+大健康食品开发研究中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R917;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)16-1962-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.16.08



摘要 目的 建立同时测定地稔药材中6种成分含量的方法,考察上述成分与抗氧化活性的相关性。方法 采用超高效液相色谱法进行测定,以牡荆素为内参物,采用一测多评(QAMS)法计算23批地稔药材中没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的含量,并与外标法测定结果进行比较。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基法、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)法和铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)法测定23批地稔药材的抗氧化活性,以灰色关联度分析和双变量相关性分析评价地稔中6种成分含量与抗氧化活性的相关性。结果 地稔中牡荆素的含量为0.021%~0.182%,没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的QAMS法含量测定结果分别为0.008%~0.042%、0.003%~0.023%、0.071%~0.283%、0.013%~0.140%、0.006%~0.021%,与外标法测定结果比较的 P 均大于0.05。灰色关联度分析显示,6种成分含量与抗氧化活性的灰色关联系数为0.727 6~0.866 9。双变量相关性分析显示,牡荆素、异牡荆素、芦丁含量与抗氧化活性呈显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),没食子酸、原儿茶酸含量与抗氧化活性呈显著负相关($P<0.05$),鞣花酸与抗氧化活性无显著相关性。结论 成功建立了同时测定地稔中6种成分含量的QAMS法;地稔中6种成分含量与抗氧化活性均有较高相关性。

关键词 地稔;含量测定;一测多评法;抗氧化;相关性

Content determination of 6 components in *Melastoma dodecandrum* and analysis of its correlation with antioxidant activity

LIU Jing¹, MING Huiyi², MA Xiuping^{1,3,4}, QIAN Song¹, YANG Jing^{1,4}, WU Dengli¹, GUO Jiangtao^{1,4} (1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Dept. of Pharmacy, Zhijin County People's Hospital, Guizhou Bijie 552100, China; 3. National Miao Medicine Engineering Technology Research Center/Guizhou Traditional Chinese Medicine Processing and Preparation Engineering Technology Research Center, Guiyang 550025, China; 4. Tea + Big Health Food Development and Research Center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish a method for simultaneous determination of six components in *Melastoma dodecandrum* and investigate its correlation with antioxidant activity. **METHODS** Ultra high-performance liquid chromatography (UPLC) method was adopted. The contents of gallic acid, protocatechuic acid, isovitexin, rutin and ellagic acid in 23 batches of *M. dodecandrum* were determined by quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method, using vitexin as the internal reference. Then 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical method, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) method and ferric ion reduction/antioxidant power (FRAP) method were applied to determine the antioxidant activity of 23 batches of *M. dodecandrum*. Grey correlation analysis and bivariate correlation analysis were used to evaluate the correlation between six components and antioxidant activity. **RESULTS** The content of vitexin were 0.021%-0.182%. The contents of gallic acid, protocatechuic acid, isovitexin, rutin and ellagic acid by QAMS method were 0.008%-0.042%, 0.003%-0.023%, 0.071%-0.283%, 0.013%-0.140% and 0.006%-0.021%, respectively. Compared with the results of external standard method, P was greater than 0.05. Grey correlation analysis showed that the grey correlation coefficients between the contents of six components and antioxidant activity was 0.727 6-0.866 9. Bivariate correlation analysis showed that the contents of vitexin, isovitexin and rutin were positively correlated with antioxidant activity ($P<0.05$ or $P<0.01$), the content of gallic acid and protocatechuic acid were negatively correlated with antioxidant activity ($P<0.05$). There was no significant correlation between ellagic acid and antioxidant activity.

[△] 基金项目 国家自然科学基金地区科学资助项目(No.81860695); 贵州省教育厅滚动支持省属高校科研平台团队项目(No.黔教技[2022]022号); 贵州省药物新剂型新工艺科技创新人才团队项目(No.黔科合平台人才[2017]5655)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药及民族药质量控制及新药研发。E-mail:2731677964@qq.com

通信作者 教授,硕士生导师。研究方向:中药及民族药质量控制及新药研发。E-mail:mxp001130@sina.com

CONCLUSIONS QAMS method is successfully established for the simultaneous determination of six components in *M. dodecandrum*. The six components in *M. dodecandrum* are highly correlated with antioxidant activity.

KEYWORDS *Melastoma dodecandrum*; content determination; QAMS; antioxidant activity; correlation

地稔为野牡丹科植物地稔 *Melastoma dodecandrum* Lour. 的新鲜或干燥全草, 是贵州地区常用民族药, 具有清热解毒、活血止血的功效, 临床常用于治疗高热、肺痈、水肿、带下、产后腹痛、痈肿等症^[1]。现代研究表明, 地稔含有黄酮、有机酸、甾体及其苷、鞣质、多糖等多种化学成分, 具有抗氧化、抗炎、止血、降脂、降血糖等作用^[2-3]。《贵州省中药材、民族药质量标准》中仅记载了地稔的性状、鉴别、性味归经等, 尚无含量测定项目, 不能有效评价其质量。已有文献报道采用外标法测定地稔中没食子酸、芦丁、牡荆素、异牡荆素、鞣花酸等成分的含量^[4-6], 但所报道的方法仅能同时测定1~2种成分, 难以经济、有效地评价地稔的质量, 故建立同时测定地稔中多指标成分含量的方法很有必要。

一测多评(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)法是以性质稳定且廉价易得的某个成分为内参物, 建立该成分与其他成分的相对校正因子(f_{ri})来计算待测成分含量的方法, 可实现多个成分同时测定^[7-8]。该方法既解决了对照品不稳定、价格昂贵等问题, 也节约了工作时间, 降低了含量测定成本^[8]。活性氧是一系列参与人体病理和退行过程的代谢物, 过量的活性氧会诱导器官及组织的自由基损伤, 从而加速多种疾病的发展^[9]。有研究表明, 地稔可有效地清除氧自由基, 发挥抗氧化作用^[10], 但目前对其发挥抗氧化活性的有效成分尚不明确。本研究选择地稔中6种含量相对较高的成分(包括酚酸类成分没食子酸、原儿茶酸, 黄酮类成分牡荆素、异牡荆素、芦丁, 鞣质类成分鞣花酸)为对象, 建立QAMS法同时测定其含量, 并分析上述6种成分含量与抗氧化活性的相关性, 旨在为地稔的质量分析及控制提供准确、可行、经济的评价方法。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Agilent 1290 Infinity II 系列超高效液相色谱(UPLC)仪(美国 Agilent 公司)、MS205DU 型十万分之一电子天平(美国 Mettler Toledo 公司)、FA2204N 型万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司)、1530 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)等。

1.2 主要药品与试剂

没食子酸对照品(批号 110831-201906, 纯度 91.5%)、原儿茶酸对照品(批号 110809-201906, 纯度 97.7%)、牡荆素对照品(批号 111687-201704, 纯度 94.9%)、鞣花酸对照品(批号 111959-201903, 纯度 88.8%)均购自中国食品药品检定研究院; 芦丁对照品

(批号 C100001-200628, 纯度 98.0%) 和异牡荆素对照品(批号 C101499-201219, 纯度 98.00%) 均购自贵州迪大生物科技有限公司; 甲醇(色谱纯)购自美国 Tedia 公司; 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

23 批地稔药材采集于贵州、广东、广西、湖南、浙江等地, 由贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定均为野牡丹科植物地稔 *M. dodecandrum* Lour. 的全草。地稔药材来源信息见表 1。

表 1 地稔药材来源信息

编号	采收期	产地	编号	采收期	产地
DR01	2020年7月	贵阳市花溪区高坡乡	DR13	2021年5月	黔东南州榕江县兴华乡
DR02	2020年7月	黔南州龙里县民族乡	DR14	2021年5月	黔东南州榕江县定威水族乡
DR03	2020年7月	黔南州罗甸县边阳镇	DR15	2021年5月	黔东南州榕江县八开乡
DR04	2020年8月	黔南州惠水县高镇镇	DR16	2021年5月	黔东南州从江县加榜乡
DR05	2020年8月	黔南州长顺县	DR17	2021年5月	黔南州三都县打渔乡
DR06	2020年8月	黔南州锦屏县	DR18	2021年7月	揭阳市揭西县龙潭镇
DR07	2020年8月	黔南州贵定县	DR19	2021年7月	永州市道县寿雁镇
DR08	2020年7月	遵义市湄潭县	DR20	2021年7月	清远市连州市龙平镇
DR09	2020年9月	黔南州惠水县塘乡	DR21	2021年6月	玉林市容县白良镇
DR10	2018年8月	黔南州惠水县三都镇	DR22	2021年7月	台州市温岭市均根镇
DR11	2018年7月	黔南州惠水县高镇镇	DR23	2019年7月	黔南州龙里县
DR12	2018年7月	黔东南州榕江县古州镇			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 Waters ACQUITY UPLCHSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 为色谱柱, 以 0.1% 磷酸溶液为流动相 A、甲醇为流动相 B 进行洗脱梯度(0~4 min, 3% B; 4~6 min, 3% B~5% B; 6~18 min, 5% B~10% B; 18~23 min, 10% B~25% B; 23~27 min, 25% B~30% B; 27~42 min, 30% B~35% B; 42~44 min, 35% B; 44~48 min, 35% B~40% B; 48~50 min, 40% B~50% B); 流速为 0.2 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 260 nm; 进样体积为 0.8 μL。

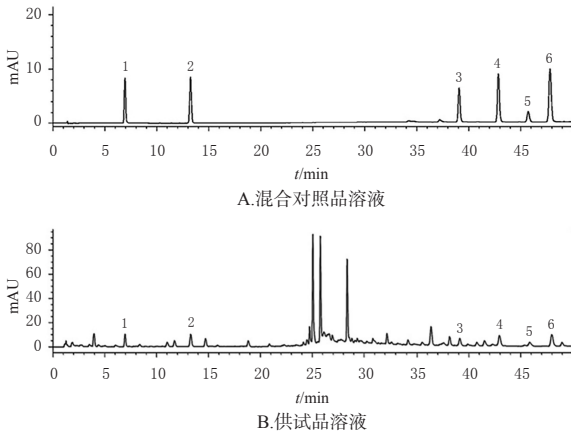
2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取没食子酸、原儿茶酸、牡荆素、异牡荆素、芦丁对照品各适量, 加甲醇溶解, 分别制成质量浓度为 0.361、0.314、0.325、0.400、0.454 mg/mL 的单一对照品溶液。另精密称取鞣花酸对照品适量, 加入二甲基亚砜 2 mL 使溶解, 再以甲醇稀释制成 0.165 mg/mL 的鞣花酸对照品溶液。取上述 6 种单一对照品溶液适量, 置于同一量瓶中, 加甲醇稀释至所需浓度制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取地稔粉末(过 2 号筛) 1 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 称定质量, 85 °C 水浴回流提取 1 h, 取出放冷, 用 75% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 以 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性考察 分别精密量取空白溶剂(75%甲醇)、混合对照品溶液、供试品溶液各0.8 μL,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,空白溶剂对6种待测成分的检测无干扰,方法专属性好。色谱图见图1(空白溶剂图略)。



1:没食子酸;2:原儿茶酸;3:牡荆素;4:异牡荆素;5:芦丁;6:鞣花酸

图1 地稔中6种待测成分的UPLC图

2.3.2 线性范围考察 精密吸取“2.2.1”项下各单一对照品溶液各适量,加甲醇稀释制成6个不同质量浓度的系列混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以各待测对照品的质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归。结果见表2。

表2 地稔中6种待测成分的线性关系考察结果

待测成分	回归方程	r	线性范围/(μg/mL)
没食子酸	$y=9.4741x+6.5342$	0.9997	10.00~40.01
原儿茶酸	$y=17.538x+4.8208$	0.9996	7.00~25.12
牡荆素	$y=2.4275x+5.1354$	0.9996	40.00~90.00
异牡荆素	$y=2.4377x-5.2826$	0.9991	20.00~115.00
芦丁	$y=3.7766x+1.2448$	0.9999	10.03~50.10
鞣花酸	$y=37.312x-13.355$	0.9996	5.97~19.80

2.3.3 精密度试验 精密吸取“2.3.2”项下线性范围下限浓度的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、牡荆素、异牡荆素、芦丁、鞣花酸峰面积的RSD分别为0.36%、0.28%、0.64%、0.29%、0.20%、0.69%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(编号DR23),分别于室温放置2、4、6、8、10、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、牡荆素、异牡荆素、芦丁、鞣花酸峰面积的RSD分别为0.27%、0.38%、0.56%、0.60%、0.29%、2.96%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批地稔药材(编号DR23)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,代入回归方程计算各成

分的含量。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、牡荆素、异牡荆素、芦丁、鞣花酸含量的RSD分别为2.06%、1.64%、1.57%、2.36%、2.93%、2.49%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取同一批地稔药材(编号DR23)6份,每份0.5 g,精密称定,分别加入与地稔中各成分含量相当的对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、牡荆素、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的平均加样回收率分别为97.79%、100.18%、97.84%、96.45%、91.84%、108.06%,RSD分别为1.71%、2.32%、1.41%、1.48%、1.20%、6.66%(n=6),表明该方法准确度较好。

2.4 QAMS法的建立

2.4.1 f_{si} 的计算 分别精密吸取“2.3.2”项下的系列混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录各成分的峰面积。以牡荆素为内参物,采用多点校正法计算没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的 f_{si} : $f_{si}=(A_s \times c_i)/(c_s \times A_i)$ (A_s 为内参物的峰面积, c_i 为待测成分的质量浓度, c_s 为内参物的质量浓度, A_i 为待测成分的峰面积)^[11]。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的 f_{si} 分别为0.255、0.140、1.038、0.654、0.070,RSD分别为1.46%、1.18%、2.51%、0.91%、3.28%(n=6)。

2.4.2 不同色谱柱、柱温和流速对 f_{si} 的影响 采用Agilent 1290 Infinity II系列UPLC仪,考察不同色谱柱(Waters ACQUITY UPLC HSS T3、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈、Agilent ZORBAX Stable Bond SB-C₁₈,规格均为2.1 mm×100 mm,1.8 μm)、柱温(25、30、35 ℃)、流速(0.18、0.20、0.22 mL/min)对各成分 f_{si} 的影响。结果显示,在不同色谱柱、柱温和流速下,没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的平均 f_{si} 分别为0.259、0.141、1.061、0.616、0.076,RSD分别为0.72%、0.83%、0.73%、1.07%、1.48%(n=9),表明不同色谱柱、柱温和流速对5种待测成分的 f_{si} 无明显影响。

2.4.3 不同色谱柱、柱温和流速对相对保留时间和相对保留时间差的影响 以牡荆素为内参物,计算没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的相对保留时间和相对保留时间差,考察“2.4.2”项下不同色谱柱、柱温、流速对相对保留时间和相对保留时间差的影响。结果显示,5种成分的平均相对保留时间分别为0.175、0.336、1.092、1.166、1.215,RSD分别为10.27%、7.27%、0.96%、1.40%、1.99%(n=9);平均相对保留时间差分别为-25.628、-31.860、3.546、6.439、8.344,RSD分别为1.70%、1.89%、13.95%、12.76%、13.77%。可见,异牡荆素、芦丁、鞣花酸均可利用相对保留时间值法进行准确定位。由于没食子酸和原儿茶酸的相对保留时间偏小,

其相对保留时间的RSD均大于5%,利用相对保留时间值法对没食子酸和原儿茶酸准确定位较为困难;而二者相对保留时间差的RSD均小于5%,表明二者可利用相对保留时间差值法进行准确定位,此外还可结合二者的紫外吸收特征对色谱峰进行定位。

2.5 地稔中6种成分含量的测定

取23批地稔药材,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以牡荆素为内参物,通过 f_{si} 分别计算没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的含量,同时采用外标法计算没食子酸、原儿茶酸、牡荆素、异牡荆素、芦丁、鞣花酸的含量。采用SPSS 25.0软件对外标法与QAMS法的含量测定结果进行独立样本 t 检验。平行2份操作,取平均值,结果见表3。

表3 23批地稔药材中6种成分外标法与QAMS法的含量测定结果($n=2, \%$)

药材编号	牡荆素 (外标法)	没食子酸		原儿茶酸		异牡荆素		芦丁		鞣花酸	
		外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法
DR01	0.133	0.022	0.022	0.009	0.008	0.190	0.198	0.082	0.082	0.015	0.014
DR02	0.089	0.024	0.024	0.007	0.007	0.143	0.149	0.045	0.045	0.014	0.012
DR03	0.023	0.024	0.024	0.008	0.008	0.129	0.134	0.038	0.038	0.016	0.015
DR04	0.064	0.014	0.014	0.006	0.006	0.126	0.130	0.057	0.056	0.009	0.008
DR05	0.113	0.012	0.012	0.006	0.006	0.191	0.199	0.031	0.031	0.014	0.013
DR06	0.038	0.031	0.031	0.008	0.008	0.127	0.132	0.045	0.044	0.012	0.011
DR07	0.121	0.019	0.019	0.006	0.006	0.175	0.182	0.064	0.063	0.020	0.018
DR08	0.088	0.026	0.025	0.018	0.018	0.138	0.144	0.037	0.037	0.013	0.012
DR09	0.149	0.020	0.020	0.006	0.006	0.234	0.243	0.111	0.110	0.022	0.020
DR10	0.182	0.032	0.032	0.012	0.012	0.273	0.283	0.125	0.125	0.023	0.021
DR11	0.132	0.021	0.021	0.010	0.010	0.194	0.201	0.062	0.062	0.022	0.020
DR12	0.107	0.032	0.032	0.010	0.010	0.160	0.167	0.104	0.104	0.013	0.011
DR13	0.133	0.015	0.015	0.007	0.007	0.193	0.201	0.141	0.140	0.012	0.011
DR14	0.100	0.009	0.009	0.005	0.005	0.168	0.175	0.062	0.061	0.010	0.009
DR15	0.110	0.013	0.013	0.004	0.004	0.177	0.184	0.062	0.061	0.011	0.010
DR16	0.130	0.012	0.012	0.004	0.004	0.202	0.210	0.094	0.093	0.013	0.012
DR17	0.079	0.008	0.008	0.003	0.003	0.134	0.139	0.072	0.071	0.008	0.007
DR18	0.050	0.017	0.017	0.007	0.007	0.107	0.112	0.065	0.064	0.013	0.010
DR19	0.116	0.017	0.016	0.009	0.009	0.174	0.182	0.101	0.100	0.014	0.011
DR20	0.021	0.013	0.013	0.006	0.006	0.068	0.071	0.013	0.013	0.007	0.006
DR21	0.065	0.015	0.015	0.009	0.009	0.111	0.116	0.017	0.016	0.011	0.009
DR22	0.046	0.012	0.012	0.008	0.008	0.089	0.093	0.023	0.023	0.009	0.007
DR23	0.157	0.041	0.042	0.023	0.023	0.228	0.239	0.052	0.052	0.016	0.015
t		0.017		0.033		-0.452		0.052		1.186	
P		0.986		0.974		0.654		0.959		0.242	

2.6 地稔抗氧化活性的测定

2.6.1 DPPH自由基清除法 参考文献[12]的方法制备1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)工作液。取“2.2.2”项下供试品溶液,用75%甲醇稀释200倍,得到生药质量浓度为0.2 mg/mL的供试品溶液。将96孔板分为空白组、样品组、对照组,每组设置4个平行样。空白组加入75%甲醇溶液100 μ L+DPPH工作液100 μ L,样品组加入供试品溶液100 μ L+DPPH工作液100 μ L,对照组加入供试品溶液100 μ L+75%甲醇100 μ L。3组样品均于室温

下避光静置20 min,在517 nm波长下测定吸光度,依次记为 A_0 (空白组)、 A_1 (样品组)和 A_2 (对照组)。按下式计算自由基清除率:自由基清除率= $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$ 。结果见表4。

表4 23批地稔药材的抗氧化活性测定结果($n=4$)

编号	DPPH自由基清除率/%	ABTS自由基清除率/%	FRAP值/(mmol/L)
DR01	61.69	57.72	0.34
DR02	47.90	36.81	0.22
DR03	55.92	44.83	0.25
DR04	45.18	47.85	0.26
DR05	52.72	55.88	0.33
DR06	39.18	37.23	0.21
DR07	58.78	50.43	0.34
DR08	38.60	40.23	0.21
DR09	71.91	65.85	0.38
DR10	74.31	63.55	0.39
DR11	64.93	56.34	0.35
DR12	50.64	46.17	0.25
DR13	69.08	69.87	0.45
DR14	72.20	62.38	0.37
DR15	68.41	60.22	0.35
DR16	64.98	65.09	0.40
DR17	59.42	56.60	0.32
DR18	58.80	57.73	0.31
DR19	62.42	57.68	0.35
DR20	57.19	55.35	0.31
DR21	38.94	45.55	0.25
DR22	50.84	53.06	0.29
DR23	40.80	57.72	0.22

2.6.2 ABTS自由基清除法 参考文献[12]的方法制备2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)法工作液。取“2.2.2”项下供试品溶液,用75%甲醇稀释100倍,得到生药质量浓度为0.4 mg/mL的供试品溶液。将96孔板分为空白组、样品组、对照组,每组设置4个平行样。空白组加入75%甲醇溶液20 μ L+ABTS工作液180 μ L,样品组加入供试品溶液20 μ L+ABTS工作液180 μ L,对照组加入供试品溶液20 μ L+水180 μ L。3组样品均于室温下避光静置30 min,在734 nm波长下测定吸光度,依次记为 A_0 (空白组)、 A_1 (样品组)和 A_2 (对照组)。按“2.6.1”项下公式计算ABTS自由基清除率。结果见表4。

2.6.3 FRAP法 参考文献[13]的方法制备铁离子还原/抗氧化能力(ferric ion reducing/antioxidant power, FRAP)工作液。将96孔板分为样品组和空白组,每组设置4个平行样。样品组加入“2.6.2”项下生药质量浓度为0.4 mg/mL的供试品溶液20 μ L+FRAP工作液180 μ L,空白组加入75%甲醇20 μ L+FRAP工作液180 μ L。2组样品均于37 $^{\circ}$ C下静置10 min,在593 nm波长下测定吸光度,分别记为 A_1 (样品组)、 A_2 (空白组)。另分别配制浓度为0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mmol/L的硫酸亚铁溶液,按上述方法测定吸光度后绘制标准曲线。将供试品溶液的吸光度($A_1 - A_2$)代入标准曲线方程计算对应的硫酸亚铁浓度,记为“FRAP值”。结果见表4。

2.7 6种成分的含量与抗氧化活性的相关性分析

2.7.1 灰色关联度分析 采用Excel 2010软件,对23批地稔药材中6种成分的含量与抗氧化活性进行灰色关联度分析。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、牡荆素、异牡荆素、芦丁、鞣花酸含量与抗氧化活性的关联系数均大于0.6,表明关联度较高^[13]。6种成分对DPPH自由基清除率贡献大小顺序为异牡荆素>鞣花酸>牡荆素>芦丁>原儿茶酸>没食子酸,对ABTS自由基清除率贡献大小顺序为异牡荆素>芦丁>牡荆素>鞣花酸>原儿茶酸>没食子酸,对FRAP值贡献大小顺序为异牡荆素>牡荆素>芦丁>鞣花酸>原儿茶酸>没食子酸。结果见表5。

表5 地稔中6种成分含量与抗氧化活性的灰色关联系数

成分	DPPH自由基清除率	ABTS自由基清除率	FRAP值
没食子酸	0.749 8	0.727 6	0.730 7
原儿茶酸	0.768 3	0.749 0	0.745 8
牡荆素	0.796 1	0.784 6	0.801 2
异牡荆素	0.866 9	0.851 2	0.857 4
芦丁	0.787 9	0.793 0	0.800 6
鞣花酸	0.804 3	0.778 8	0.782 9

2.7.2 双变量相关性分析 采用SPSS 25.0软件进行双变量相关性分析。结果显示,牡荆素、异牡荆素、芦丁含量与DPPH自由基清除率呈显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),原儿茶酸含量与DPPH自由基清除率呈显著负相关($P<0.05$)。在ABTS自由基清除率和FRAP值分析中,牡荆素、异牡荆素、芦丁含量与抗氧化活性呈显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),没食子酸、原儿茶酸含量与抗氧化活性呈显著负相关($P<0.05$)。结果见表6。

表6 地稔中6种成分含量与抗氧化活性的双变量相关系数

成分	DPPH自由基清除率	ABTS自由基清除率	FRAP值
没食子酸	-0.342	-0.515 ^a	-0.467 ^a
原儿茶酸	-0.459 ^a	-0.460 ^a	-0.463 ^a
牡荆素	0.475 ^a	0.437 ^a	0.530 ^b
异牡荆素	0.502 ^a	0.414 ^a	0.500 ^a
芦丁	0.642 ^b	0.606 ^b	0.659 ^b
鞣花酸	0.340	0.544	0.241

a: $P<0.05$; b: $P<0.01$

3 讨论

3.1 供试品溶液制备条件及检测波长的筛选

本研究预实验对供试品溶液的制备条件[提取方式(回流、超声)和甲醇体积分数(25%、50%、75%、100%)]进行了比较,并对不同检测波长进行了考察。以6种成分的提取率为指标,综合优选采用75%甲醇回流提取制备供试品溶液。6种成分在254 nm和260 nm波长下均有较大吸收,牡荆素和异牡荆素在260 nm波长下较254 nm波长下响应值高,因此选择检测波长为260 nm。

3.2 混合对照品溶液稳定性的考察

本研究预实验考察了混合对照品溶液在5 d和2、3个月内的稳定性。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、异牡荆素、芦丁溶液放置3个月的 $f_{0.5}$ 的RSD均小于3.00%,表明稳定性较好;鞣花酸溶液在上述3个时间段的 $f_{0.5}$ 的RSD分别为2.36%、3.70%、7.00%,表明稳定性相对较差。由于鞣花酸同时含有亲脂结构(4个环)和亲水结构(4个酚基和2个内酯环),导致其亲水性及亲脂性均较差,微溶于水和醇,溶于二甲基亚砜,故制备鞣花酸对照品溶液时需加适量二甲基亚砜助溶^[14]。本研究还发现,鞣花酸的 $f_{0.5}$ 会随放置时间延长而增大,故不宜保存过久,尽量在5 d内测定。

3.3 地稔中6种成分的抗氧化活性分析

酚类化合物中羟基的数量、位置、相关的糖基化以及其他取代基在很大程度上决定了其自由基清除活性,其中邻二羟基是所有酚类化合物显示出高活性最重要的结构特征^[15]。黄酮类化合物骨架中2,3-双键、4-酮基、3',4'-邻二酚羟基和C-3位羟基结构对抗氧化活性起重要作用^[16-17]。已有研究报道,鞣花酸、没食子酸对地稔抗氧化活性贡献显著,原因可能与其含量及结构中邻二酚羟基有关^[3]。灰色关联度分析结果显示,6种成分的含量与抗氧化活性均有较高关联度,其中异牡荆素与抗氧化活性关联度最高,没食子酸与抗氧化活性关联度最低;双变量相关性分析结果显示,芦丁与抗氧化活性相关性最显著,而鞣花酸与抗氧化活性无显著相关性。这一结果差异可能是因为制备的地稔供试品溶液未经水解,致使没食子酸含量偏低,而鞣花酸理化性质特殊,单纯使用75%甲醇提取率较低所致。

综上所述,本研究成功建立了QAMS法同时测定地稔中6种成分的含量,测定结果与外标法无显著差异;地稔中6种成分与抗氧化活性均有较高相关性。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:9[M].上海:上海科学技术出版社,1999:628.
- [2] 明惠仪,麻秀萍,杨菁,等.民族药地稔研究的现状分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(11):228-234.
- [3] TONG Y P, JIANG Y, CHEN X B, et al. Extraction, enrichment, and quantification of main antioxidant aglycones of flavonoids and tannins from *Melastoma dodecandrum* Lour.: guided by UPLC-ESI-MS/MS[J]. J Chem, 2019,2019:2793058.
- [4] 麻秀萍,张明昶,徐文芬,等.黔产地稔药材中没食子酸和芦丁含量的测定与评价[J].贵州农业科学,2012,40(4):59-62.
- [5] 曹丹,姜岩,林瑞超,等. HPLC法测定地稔药材中牡荆素和异牡荆素的含量[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(5):1012-1015.

- [6] 刘敏,余乐,李水福,等.可变波长高效液相色谱法同时测定地稔中没食子酸和鞣花酸的含量[J].医药导报,2016,35(2):180-183.
- [7] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1925-1928.
- [8] 陆兔林,石上梅,蔡宝昌,等.基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J].中草药,2012,43(12):2525-2529.
- [9] CHEN C, WANG L, WANG R, et al. Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats[J]. Food Chem, 2018, 239: 260-267.
- [10] 张超,张婷,姚慧珍,等.地苿总黄酮体外抗小鼠肝线粒体脂质过氧化作用的研究[J].中医药学刊,2005,23(9):1680-1682.
- [11] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-658.
- [12] 钱松,刘琴,麻秀萍,等.地稔醇提物抗氧化活性的谱效关系研究[J].中国药房,2021,32(16):1969-1974.
- [13] 王振宇,杨斯月,吕维,等.利用3种不同化学计量学方法分析枸杞子抗氧化部位的谱效关系[J].中国中药杂志,2021,46(13):3377-3387.
- [14] 骆菊文,蒋新元,徐佳敏,等.鞣花酸的稳定性及其保护作用[J].日用化学工业,2020,50(8):547-552.
- [15] CAI Y Z, SUN M, XING J, et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants[J]. Life Sci, 2006,78(25):2872-2888.
- [16] ZHANG Q, YANG W B, LIU J C, et al. Identification of six flavonoids as novel cellular antioxidants and their structure-activity relationship[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020,2020:4150897.
- [17] 赵雪巍,刘培玉,刘丹,等.黄酮类化合物的构效关系研究进展[J].中草药,2015,46(21):3264-3271.
- (收稿日期:2022-04-14 修回日期:2022-07-26)
(编辑:邹丽娟)

(上接第1961页)

- [2] 万敏.生、炒决明子多种成分的含量测定及其护肝作用的比较研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2018.
- [3] 聂春霞.基于¹H-NMR代谢组学研究山楂不同炮制品化学成分及降脂和促消化功效的差异[D].太原:山西中医药大学,2019.
- [4] 刘德文,龚千锋,刘强,等.泽泻的采收、产地加工、炮制及质量评价研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(16):203-211.
- [5] 吴鹏,李慧芬,张学兰,等. HPLC-TOF/MS分析丹参酒炙前后化学成分的变化[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11):6-9.
- [6] 权亮.醋郁金炮制工艺、质量标准及其药效学研究[D].成都:成都中医药大学,2019.
- [7] 汪巍,陈映辉,王丽娜,等.柴胡与醋柴胡疏肝解郁作用比较研究[J].中成药,2014,36(3):617-619.
- [8] 彭平,田瑞华,杜菁,等.白虎加桂枝汤单煎与合煎提取物质量表征特性分析[J].中国中药杂志,2018,43(16):3263-3269.
- [9] 成颜芬,杜克群,吴亿晗,等.基于化学特征与核心功效分析经典名方桃红四物汤复方合煎与单煎差异研究[J].中草药,2021,52(19):5879-5890.
- [10] 乔三洋,王学勇,李耿,等.基于化学全息研究四物汤煎煮溶出规律[J].中草药,2020,51(19):4960-4971.
- [11] 何艳,刘冠琼,胡小祥.高效液相色谱指纹图谱结合化学模式识别评价伤风停胶囊的质量[J].中药新药与临床药理,2021,32(10):1513-1518.
- [12] 管咏梅,万鑫浩,吴文婷,等.经典名方桂枝加葛根汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2021,52(18):5535-5542.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:31-32.
- [14] 林秀敏,岳丽丹,张振凌,等. GC-IMS法比较不同方法炮制酒当归特异气味成分差异[J].中草药,2020,51(17):4464-4472.
- [15] 王强,苏若,王翰华.醒脾养儿颗粒 HPLC 指纹图谱研究与化学模式识别[J].药物分析杂志,2021,41(6):1083-1090.
- [16] 许红蕾,王庭芳,张川.丹参素及其衍生物药理作用机制和应用研究进展[J].中国现代应用药学,2021,38(2):237-243.
- [17] 杨诗婷,王晓倩,廖广辉.金丝桃苷的药理作用机制研究进展[J].中国现代应用药学,2018,35(6):947-951.
- [18] 潘然,丁滨,胡林峰,等.芦丁通过调控TG代谢途径抑制肝细胞脂肪变性的作用机制研究[J].云南中医学院学报,2015,38(5):1-6.
- [19] 吴芙蓉,姜玲,何晓丽,等.橙皮苷对化学性肝纤维化大鼠的保护作用[J].中药材,2015,38(11):2390-2393.
- [20] 伍洋科,李莎,蒋菲娅,等.代谢组学方法研究橙黄决明素对高血脂症大鼠血浆游离脂肪酸的影响[J].分析科学学报,2020,36(2):205-211.
- (收稿日期:2022-02-27 修回日期:2022-06-20)
(编辑:张元媛)