

文章编号:1001-6880(2014)7-1000-05

沉淀敲出法快速发现霍山产铁皮石斛生物碱及其组分抗氧化活性在线测定

陈存武^{1,2},陈乃东^{1,2,3*},孟云飞¹,张艳¹,胡建¹

¹皖西学院生物与制药工程学院;²皖西中药与天然药物工程技术研究中心,六安 237012;

³安徽医科大学临床药理研究所,合肥 230032

摘要:为了给霍山产铁皮石斛药效物质基础研究及抗氧化活性物质快速发现提供依据,在预实验基础上,采用鲁米诺-双氧水发光体系作为羟自由基清除活性评价平台,HPLC-UV-CL 联用在线测定了铁皮石斛生物碱部位各组分清除自由基活性。以磷钼酸-碘-碘化钾为沉淀试剂敲出总生物碱提取物中生物碱组分,对比敲出前后HPLC 图谱变化,确定铁皮石斛的生物碱组分。结果表明,在本实验条件下,霍山产铁皮石斛中检出的 5 种生物碱中有 4 种可降低鲁米诺-双氧水发光体系的发光值。HPLC-UV-CL 可用于铁皮石斛生物碱清除自由基活性快速测定。实验结果可为铁皮石斛质量控制、抗氧化活性成分定向分离的研究提供依据。

关键词:铁皮石斛;沉淀敲出;高效液相色谱-化学发光联用法;生物碱

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

Quick Recognition of Unknown Alkaloids from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo by an Alkaloid-knocking-out Method and the On-line HPLC-UV-CL Analysis of Their Antioxidant Activity

CHEN Cun-wu^{1,2}, CHEN Nai-dong^{1,2,3*}, MENG Yun-fei¹, ZHANG Yan¹, HU Jian¹

¹ College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University; ² West Anhui Biotechnology Research Center of Natural Medicine and Traditional Chinese Medicine, West Anhui University, Anhui Lu'an 237012, China;

³ Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Anhui Hefei 230032, China

Abstract: The aims of this study were to explore method for the on-line detection of alkaloids with antioxidant activity from the stems of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo by HPLC-UV-CL system, and to provide references on researching the potential material base of *D. officinale* and on quick discovery of antioxidants from traditional Chinese medicine. The on-line HPLC-UV-CL analysis with Luminol-perhydrol chemiluminescence system as the donor of hydroxyl radicals was applied to evaluate the antioxidant activity of the constituents of the total alkaloid extract from *D. officinale*. The alkaloids were discerned by alkaloid knock out using phosphomolybdic acid and iodine-potassium iodide as precipitation reagent. It was resulted that total five kinds of *D. officinale* alkaloids (HPLC peak 5, 7, 8, 10 and 11) were detected and four of them showed remarkable hydroxyl-radical-clearing activity with the calibration clearance values of 3.8%, 4.0%, 5.2% and 2.6%, respectively, determined by the established on-line HPLC-UV-CL method. The on-line HPLC-UV-CL system can be used to evaluate the antioxidant activity of *D. officinale* alkaloids and our study might provide experimental data for the quality control and the following directional isolation of antioxidant active components of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; knock out by precipitation; HPLC-UV-CL; alkaloids.

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Mi-

收稿日期:2014-01-22 接受日期:2014-05-29

基金项目:国家自然科学基金项目(81274021);中国博士后基金面上项目(2014M551791);安徽省人事厅博士后研究项目;安徽高校省级科学研究重点项目(KJ2012A277);六安市定向委托皖西学院市级研究重点项目(2011LWA001);皖西学院研究性学习项目(WXX YX2013063, WXXX YX2013055, WXXX YX2013080)

* 通讯作者 E-mail:2004cnd@163.com

go)为兰科石斛属多年生草本植物和中国传统名贵中药材,具有益胃生津、滋阴清热、润肺止渴等功效,能够提高机体免疫力和抗氧化^[1]、抗衰老等作用^[2,3],主要含有糖和生物碱等活性成分,其药理作用与二者有着密切关联^[2]。其中,作为主要石斛类药材活性成分之一的生物碱,是石斛属植物中最早分离并进行结构确认的化合物,其含量极低,仅为

铁皮石斛干重的 0.04%^[4], 目前尚未有从铁皮石斛中分离到生物碱类化合物研究报道^[5]。

大量研究表明自由基在人体过量积累与肿瘤、糖尿病、心血管系统疾病等多种疾病的发病密切相关^[6,7], 快速发现中药中抗氧化活性成分对于阐明中药的作用机制和中药新药创制具有重要意义。中药活性物质的发现通常采用先分离得到的单一化合物再进行活性测定的方式进行, 然而, 这种先分离再活性测定的方法盲目性较大, 研究成果的取得带有很大的偶然性, 效率极为低下。针对上述弊端, 本实验拟从铁皮石斛清除自由基活性入手, 采用 HPLC-UV-CL 联用技术对铁皮石斛总生物碱提取物抗氧化活性进行在线测定以快速发现铁皮石斛中存在的活性物质, 为后续的天然来源的药物先导化合物的定向分离、揭示铁皮石斛抗氧化活性物质基础及其临床应用提供理论依据, 为探讨新的中药质量评价模式提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪: Waters1525 HPLC 色谱仪 (Breeze 工作站、Waters2487 双通道紫外检测器, 美国); 化学发光仪(西安瑞迈)。

1.2 试剂

甲醇(AR, 上海振兴化工一厂), 色谱甲醇(上海星可生化有限公司), 色谱乙腈(上海星可生化有限公司), 磷酸(上海振起化学试剂有限公司), 二乙胺(汕头市西陇化工厂有限公司), 三乙胺(国药集团化学试剂有限公司), 二氯甲烷、三氯甲烷(西陇化工股份有限公司), 磷钼酸、雷氏铵盐、碘化钾(国药集团化学试剂有限公司), 碘化汞钾(贵州铜仁化学试剂厂出品)。

1.3 材料

实验材料铁皮石斛, 2013 年 5 月采自安徽霍山, 品种经由植物细胞工程安徽省工程技术研究中心陈乃富教授鉴定为铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)。

2 实验方法

2.1 样品的制备

60 ℃烘干至恒重的铁皮石斛, 粉碎, 精密称取 20.0 g, 放入圆底烧瓶中, 加入 95% 甲醇溶液 50 mL, 60 ℃水浴冷凝回流浸提 3 次, 每次 3 h, 合并滤

液, 减压浓缩至干, 残渣溶于 5% 的盐酸溶液, 等体积二氯甲烷萃取 3 次, 酸水相加氨水调 pH 至 10.0, 等体积氯仿萃取 3 遍, 回收氯仿获总生物碱提取物, 溶于色谱甲醇配成 2.5 mg/mL 溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤、备用。

2.2 HPLC-UV-CL 在线分析中 HPLC 条件

参照相关文献^[8], 经过反复预实验, 确定霍山产铁皮石斛总生物碱 HPLC 检测条件为: Kromasil ODS C₁₈ 柱; 流动相 0.02 mol/L 二乙胺溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 0 ~ 8.0 min, 20% B; 8.0 ~ 10.0 min, 20% ~ 30% B; 10.0 ~ 17.0 min, 30% B; 17.0 ~ 30.0 min, 30% ~ 45% B; 30.0 ~ 33.0 min, 45% ~ 50%; 33.0 ~ 40.0 min, 50% B; 40.0 ~ 42.0 min, 50% ~ 65% B; 42.0 ~ 48.0 min, 65% B; 48.0 ~ 50.0 min, 65% ~ 80% B; 50.0 ~ 57.0 min, 80% B; 57.0 ~ 60.0 min, 80% ~ 100% B; 60.0 ~ 73.0 min, 100% B; 73.0 ~ 80.0 min, 100% ~ 20% B; 80.0 ~ 90.0 min, 20% B, 流速 0.6 mL/min; 检测波长 240 nm; 柱温 25 ℃; 进样量 20 μL。

2.3 HPLC-UV-CL 在线分析中 CL 条件

参考余伯阳^[8]、李萍^[9]等方法, 在前期实验基础上^[10], 采用鲁米诺-双氧水发光体系在线评价铁皮石斛生物碱部位清除羟自由基活性。主要测定条件如下:

碳酸盐缓冲液: 0.1 mol/L NaHCO₃ 水溶液以 0.1 mol/L Na₂CO₃ 碳酸钠水溶液调 pH 值至 10.0, 0.45 μm 微孔滤膜过滤、备用。

H₂O₂ 溶液: 精密量取 30% H₂O₂ 溶液加双蒸水稀释成 1.0 × 10⁻⁵ mol/L 的 H₂O₂ 溶液 0.45 μm 微孔滤膜过滤、备用。

鲁米诺溶液: 精密称取鲁米诺碳酸盐缓冲液稀配制成 1.8 × 10⁻⁵ mol/L 鲁米诺溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤、备用。

以双蒸水为空白对照。

2.4 抗氧化活性计算方法

实验提出以校正清除率评价 HPLC-UV-CL 在线测定时各组分对羟自由基的清除能力, 校正清除率在数值指 HPLC 分离的组分峰, 其 1% 峰面积所代表的质量对自由基的清除活性, 计算方法如下:

$$\text{校正清除率}(\%) =$$

$$\frac{(CL_{\text{空白}} - CL_{\text{本底}}) - (CL_{\text{样品}} - CL_{\text{本底}})}{(CL_{\text{空白}} - CL_{\text{本底}}) \times (Area\% \times 100)} \times 100\%$$

式中, CL_{空白} 为空白对照组的相对发光强度;

$CL_{\text{底}}/CL_{\text{样品}}$ 为本底组的相对发光强度; $CL_{\text{样品}}$ 为样品组的相对发光强度; Area% 为 HPLC 样品峰的峰面积比例。校正清除率越高, 表明样品清除自由基能力越强。

2.5 霍山产铁皮石斛生物碱组分的沉淀敲出——生物碱组分定性分析

实验采用磷钼酸、碘-碘化钾^[11]作为霍山产铁皮石斛生物碱的沉淀试剂, 精密吸取配制的 2.5 mg/mL 总生物碱部位溶液 0.5 mL, 分别与沉淀试剂等体积混合, 摆匀, 10 ℃ 下 10000 rpm 离心 10.0 min, 上清液即为敲除了生物碱组份的总生物碱提取液, 与“2.2”项测定的总生物碱提取物的 HPLC 结果相比较, 确定霍山产铁皮石斛生物碱组份峰。

3 实验结果

3.1 铁皮石斛总生物碱提取物的 HPLC-UV 检测结果

铁皮石斛总生物碱提取物的 HPLC 结果如图 1 所示。在本实验条件下, HPLC 谱上显示 12 个组分峰(peak 1 ~ 15), 但无法确定生物碱组份峰。

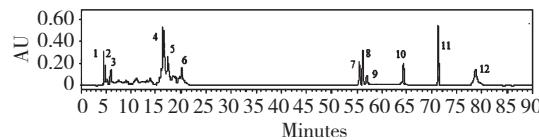


图 1 铁皮石斛总生物碱提取物 HPLC 特征图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference total alkaloid extract from the stems of *D. officinale*

表 1 铁皮石斛生物碱部位各组分清除羟自由基活性 HPLC-UV-CL 在线测定结果

Table 1 On-line HPLC-UV-CL detection results showing hydroxyl radicals cleaning activities of alkaloid constituents from *D. officinale*

HPLC 峰号	HPLC Peak	3	4	6	7	8	9	10	11
峰面积比(%)	Peak area ratio	3.77	13.65	6.32	3.73	7.81	2.68	8.12	12.67
校正清除率(%)	Corrected clearance	4.1	2.6	5.2	3.8	4.0	4.8	5.2	2.6

3.3 铁皮石斛总生物碱提取物生物碱组分的定性分析

样品加入沉淀试剂磷钼酸后, 与未加沉淀试剂时铁皮石斛 HPLC 图谱(图 3-1)及沉淀试剂磷钼酸空白(图 3-3)对照对比, HPLC 色谱峰 peak7、8、11 的 AU 值显著降低, peak5、10 信号消失, 提示铁皮石斛生物碱部位的 HPLC 组分峰中 peak5、7、8、10 及 11 为生物碱组分峰(图 3)。

沉淀试剂碘-碘化钾对铁皮石斛生物碱组分沉淀淬灭的结果如图 4-2 所示, 与铁皮石斛生物碱部

3.2 铁皮石斛总生物碱提取物的 HPLC-UV-CL 在线检测结果

分析 CL 图谱与 HPLC 图谱可知, 铁皮石斛总生物碱 HPLC 检出的 12 种组分, 对的影响化学发光强度存在明显差异(图 2): 在本实验条件下, 有 10 个组分可使鲁米诺-双氧水系统化学发光强度下降, 有 2 个组分峰(peak5、12)未检测到明显的发光抑制活性, 提示铁皮石斛生物碱部位 12 种成分对羟自由基清除能力存在差异。8 个发光抑制组分对鲁米诺-双氧水系统中羟自由基的校正清除率如表 1 所示。组分峰 6 和 10 对羟自由基的校正清除率最高, 达 5.2%, 其次是峰 14, 校正清除率达 10.94%。

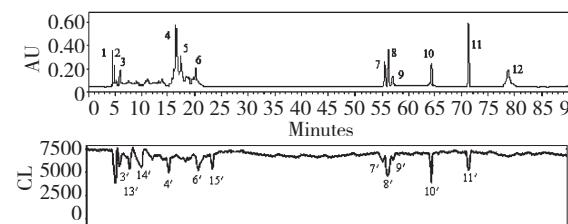


图 2 铁皮石斛 HPLC-UV-CL 测定结果

Fig. 2 Chromatographic and antioxidant activity fingerprints of *D. officinale* scavenging H_2O_2

值得注意的是, CL 峰 13'、14'、15', 在 HPLC 上并未检测到相应的组分峰 13、14、15, 可能是这些组分在在本实验设定的 HPLC-UV 色谱条件($\lambda = 240$ nm)下无吸收, 这一结果提示 HPLC-UV-CL 检测用于抗氧化活性物质快速发现可能存在的局限性。

位 HPLC 图谱(图 4-1)、沉淀试剂空白(图 4-3)对照对比, 生物碱部位 HPLC 色谱峰 peak5、7、8、10、11 消失, peak11 强度明显下降, 与磷钼酸沉淀敲出结果一致, 证明 HPLC 色谱峰 peak5、7、8、10、11 为铁皮石斛的生物碱组分峰(图 4)。

综合 HPLC-UV-CL 检测结果及霍山产铁皮石斛生物碱组分沉淀敲出结果, 本实验条件下, 可从霍山产铁皮石斛中检测到 5 种生物碱(peak5、7、8、10、11), 其峰面积比例从大到小依次为 peak11 > peak10 > peak8 > peak5 > peak7。5 种铁皮石斛生物碱

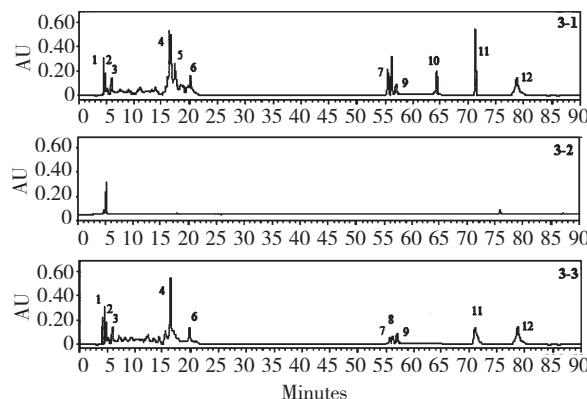


图3 铁皮石斛生物碱部位生物碱组分磷钼酸沉淀敲出结果

Fig. 3 HPLC chromatograms of knocked-out alkaloids extract from *D. officinale* by phosphomolybdic acid

注:3-1. 铁皮石斛总生物碱部位 HPLC 色谱图;3-2. 磷钼酸空白对照 HPLC 色谱图;3-3. 铁皮石斛总生物碱部位以磷钼酸沉淀敲除生物碱后 HPLC 色谱图

Note: 3-1. HPLC chromatogram of total alkaloid extract of *D. officinale*; 3-2. HPLC chromatogram of blank control phosphomolybdic acid; 3-3. HPLC chromatogram of total alkaloid extract of *D. officinale* after knocked-out by phosphomolybdic acid

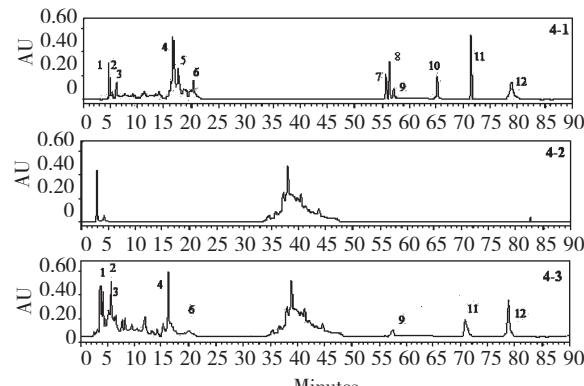


图4 铁皮石斛生物碱部位生物碱组分碘-碘化钾沉淀敲出结果

Fig. 4 HPLC chromatograms of knocked-out alkaloids extract from *D. officinale* by iodine-potassium iodide

注:4-1. 铁皮石斛总生物碱部位 HPLC 色谱图;4-2. 碘-碘化钾空白对照 HPLC 色谱图;4-3. 铁皮石斛总生物碱部位以碘-碘化钾沉淀敲除生物碱后 HPLC 色谱图

Note: 4-1. HPLC chromatogram of total alkaloid extract of *D. officinale*; 4-2. HPLC chromatogram of blank control iodine-potassium iodide; 4-3. HPLC chromatogram of total alkaloid extract of *D. officinale* after knocked-out by iodine-potassium iodide

对鲁米诺-双氧水系统的羟自由基表现出不同的清除活性,peak10 生物碱活性最强,对羟自由基的校

正清除率达 5.2%,而含量较高的 peak11,校正清除率仅为 2.6%,peak5 所代表的生物碱未检测到明显的羟自由基清除活性。

4 讨论

天然来源的生物碱具有羟自由基清除活性,本实验采用鲁米诺-双氧水系统作为羟自由基供体和抗氧化活性评价平台,对铁皮石斛生物碱部位的各组分抗氧化活性进行在线评价,在 HPLC 检出的 12 种组分中,10 种具有清除羟自由基活性,另 2 种组分在本实验条件下未检出明显的羟自由基清除活性。由于铁皮石斛中生物碱含量极低,对基于生物碱的铁皮石斛品质研究、甚至质量标准构建因缺乏标准对照品而陷于困境,因此,本实验的研究结果对于阐明铁皮石斛的药效物质基础具有一定的参考价值。

采用 HPLC-UV-CL 在线测定中药提取物的活性,如何评价 HPLC 分离的各组分——尤其是未知组分的活性是一难题。在 HPLC-UV 测定中,HPLC-UV-CL 测定抗氧化活性高的组分,其抗氧化活性不一定真正的高,因为 CL 测定的是该组分总的抗氧化活性,没有考虑到该组分的浓度对其活性的影响,CL 在线测定的高抗氧化组分可能是由于其浓度较高的缘故,CL 活性低可能是由于该组分浓度相对较低,因此,在 HPLC-UV-CL 在线评价组分活性时,必须考虑各组分的量对活性的影响。基于上述考虑,本实验尝试引入校正清除率的概念,采用各组分的 1% 峰面积对自由基的清除率作为在线评价物质活性的指标,对于母核结构相似、紫外吸收性质相近的物质,校正清除率大小反映了物质抗氧化活性大小,因此,采用 HPLC-UV-CL 在线测定方法,以校正清除率为评价指标,可从含有的结构类似物的中药中快速发现抗氧化活性物质,实验结果可为中药药效物质基础的快速发现提供参考。

此外,本实验结果可为基于谱效关系的铁皮石斛综合质量评价体系提供前期研究基础。

参考文献

- Cai YP(蔡永萍), Yu LW(于力文), Zhang HY(张鹤英), et al. Determination of some resistant oxide enzymes and activated substances of three *Dendrobium* in Huoshan county. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 1996, 31:649-651.

(下转第 1013 页)