

连翘叶抗氧化谱效相关质量评价研究

张元波^{1,2}, 张敏³, 程启斌¹, 马丽莎¹, 张立伟^{1*}¹山西大学分子科学研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室;²山西大学中医药现代研究中心; ³山西省分析科学研究院, 太原 030006

摘要: 建立连翘叶抗氧化谱效相关质量评价指标, 探索连翘叶抗氧化主要活性成分。用高效液相色谱 (HPLC) 法研究 18 个不同产地连翘叶提取物的指纹图谱; 分别采用 1,1-二苯基-2-苦肼基 (DPPH·) 清除法和 Folin-Ciocalteu 法测定了连翘叶的抗氧化活性和总酚含量。通过抗氧化活性和总酚含量的双变量相关分析, 结果显示连翘叶抗氧化活性与其总酚含量具有较高的相关性; 通过主成分、双变量相关、多元线性回归进一步分析了连翘叶抗氧化的谱效关系, 结果显示连翘叶中主要有 3 个化学成分与其抗氧化活性之间存在着明显的关联性。本研究结果为连翘叶抗氧化活性的评价提供了依据。

关键词: 连翘叶; 指纹图谱; 抗氧化; 谱效相关

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.017

Relationship Between HPLC Fingerprint Chromatogram and Antioxidant Activity of *Forsythia suspense* Leaves

ZHANG Yuan-bo^{1,2}, ZHANG Min³, CHENG Qi-bin¹, MA Li-sha¹, ZHANG Li-wei^{1*}¹The Institute of Molecular Science, Shanxi University; ²Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University; ³Academy of Analytical Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: A spectrum-effect correlation pattern was developed to evaluate the antioxidant activity and the main active components of *Forsythia suspense* leaves in this study. The fingerprint chromatogram of the 18 *Forsythia suspense* leaves extracts collected from different places was established by HPLC. In addition the antioxidant activity and the content of total phenol of these 18 extracts were studied using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH·)-scavenging method and Folin-Ciocalteus method, respectively. The results showed that the antioxidant activity was correlated to the content of total phenol by the analysis of bivariate correlation. Furthermore, three components played a role in antioxidant activity of *F. suspense* leaves through the analysis of principal component, bivariate correlation and multiple linear regression. The study provided reference for the evaluation of antioxidant activity of *F. suspense* leaves.

Key words: *Forsythia suspense* leaves; fingerprint; antioxidant activity; spectrum-effect correlation pattern

连翘叶为木犀科 (Oleaceae) 连翘属 (*Forsythia*) 连翘 [*Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl] 的干燥叶^[1]。《中药大辞典》、《中华本草》等现代典籍记载“连翘茎叶, 味苦, 性寒”, 具有清热解毒作用, 主治“心肺积热”^[2]。连翘叶相关研究众多, 支旭然等^[3]研究表明连翘叶中含有连翘苷、连翘酯苷 A、芦丁、连翘脂素、右旋松脂酚等化学成分, 与连翘果实十分类似。药理活性研究表明连翘叶具有降血糖、保肝、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤等作用^[4-8]。

指纹图谱作为一种重要的定性、定量分析方法, 在评价药材化学成分及其含量的差异上得到广泛的应用。然而, 由于中药材作用的复杂性, 指纹图谱也存在一定的局限性, 但将中药指纹图谱中化学成分的变化跟中药药效结果联系起来, 建立起有实际意义的中药“谱-效”关系, 能为中药的质量控制和药效评价标准提供规律性的科学依据^[9-12]。连翘叶资源丰富, 来源广泛, 民间多制成茶饮, 关于连翘叶抗氧化活性相关研究较多, 证实了可能是其保健作用的来源之一。但是对于其抗氧化作用物质基础研究尚不充分, 且主要着重于总多酚、总黄酮等, 具体化合物作用规律并不明晰。基于此, 本研究采用谱效相关性分析法初步探讨不同产地连翘叶中某些化学指

收稿日期: 2016-10-17 接受日期: 2016-12-29

基金项目: 山西省国际合作项目(2014081049-1); 山西省科学技术发展计划(2014ZD00402)

* 通讯作者 Tel: 86-013603357119; E-mail: lwzhang@sxu.edu.cn

标成分与其抗氧化活性之间的相关作用,通过主成分、双变量相关及多元线性回归分析方法研究了连翘叶指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系,以期为其物质作用基础研究提供科学借鉴,为连翘叶更深层次的开发利用给予指导。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), B-3200 DTS 超声波扫描清洗机(宁波新芝生物科技有限公司), GZX-9070-MBE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司), 恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)。芦丁(批号:160219)、连翘酯苷 A

(批号:160124)、连翘苷(批号:160103)、连翘酯素(批号:160127)对照品均购于上海融禾医药科技有限公司;没食子酸对照品(批号: MUST-15042910)(98%, HPLC, 成都曼思特生物科技有限公司)、1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH·)[阿拉丁试剂(上海)有限公司];色谱乙腈、色谱冰醋酸均购于塞默飞世尔科技(中国)有限公司,其他化学试剂均为分析纯,所用水均为娃哈哈纯净水。

1.2 实验材料

连翘叶样品于 2015 年 7、8 月份采摘自绛县等主产地,采用代表植株、等量采摘、均匀混合原则,经本校分子科学研究所张立伟教授鉴定为木犀科连翘属植物连翘(*Forsythia suspense* leaves)的叶。如表 1:

表 1 连翘叶样品采集表
Table 1 Sources of *F. suspense* leaves

编号 Number	采集地点 Gathering place	编号 Number	采集地点 Gathering place	编号 Number	采集地点 Gathering place
1	绛县	7	安泽	13	黎城
2	平定	8	沁水	14	泽州
3	夏县	9	沁源	15	壶关
4	闻喜	10	浮山	16	陵川
5	长子	11	古县	17	平顺
6	左权	12	屯留	18	阳城

2 实验方法

2.1 连翘叶提取物的制备^[13]

取连翘叶粉末约 1 g,精密称定,用 35 mL 80% 的乙醇回流两次,每次 1 h,滤过,减压浓缩,冷冻干燥,得到固体粉末。

2.2 不同产地连翘叶指纹图谱测定^[14]

2.2.1 供试品溶液和对照品溶液的制备

取连翘叶粉末约 0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定重量,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,即得供试品溶液。取连翘酯苷 A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成 1 mL 含 1 mg 的溶液,即得(临用配制,避光)。取芦丁 5 mg,连翘脂素 4 mg,连翘苷 5 mg 对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成 0.5、0.4、0.5 mg/mL 的溶液,即得。

2.2.2 指纹图谱测定

采用 Agilent Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5

μm) 色谱柱,以 0.4% 醋酸水溶液为流动相 A,以乙腈为流动相 B,梯度洗脱:0 ~ 38 min, 14% B; 38 ~ 48 min, 14% ~ 25% B; 48 ~ 65 min, 25% B,流速 1 mL/min,柱温 25 °C,检测波长 0 ~ 38 min, 330 nm, 38 ~ 48 min, 330 nm, 48 ~ 65 min, 277 nm,分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定。

2.3 不同产地连翘叶抗氧化活性成分及总酚含量的测定

2.3.1 不同产地连翘叶提取物的抗氧化活性的测定^[15]

将连翘叶提取物配制成浓度分别为 5、10、15、20、25、30、35 μg/mL 无水乙醇溶液作为待测样品备用,取不同浓度样品 3 mL 加入等体积 0.09 mmol/L DPPH· 无水乙醇溶液,混合后避光反应 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光度值 A₁,同时,以无水乙醇代替 DPPH· 溶液测定为 A₂ 样品对照,以无水乙醇代替样品测定 A₀ 为样品空白对照,样品对 DPPH· 的清除作用,用下列公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

以清除百分率(%)对样品浓度 $C(\mu\text{g}/\text{mL})$ 作图,根据拟合方程,计算在清除百分率为 50% 时的样品浓度,即 IC_{50} 值。

2.3.2 不同产地连翘叶提取物中的总酚含量测定^[16]

2.3.2.1 没食子酸标准曲线的绘制

准确称取 10 mg 没食子酸标准样品,加入 10 mL 去离子水至完全溶解后,转移至 10 mL 棕色容量瓶中,定容,即得 1.0 mg/mL 的没食子酸标准溶液。用移液枪准确量取 0、20、40、60、80、100、120 μL 标准液于 10 mL 棕色容量瓶中,分别加入 6 mL 去离子水,摇匀,加入 0.5 mL Folin-Ciocalteu 试剂,充分摇匀,静置 1 min 后,加入 20% 无水碳酸钠溶液 1.5 mL,混匀后用去离子水定容至刻度。得没食子酸浓度分别为 0.002、0.004、0.006、0.008、0.010、0.012、0.014、0.016、0.020 mg/mL 的没食子酸标准品溶液。在 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下反应 10 min,冷却,760 nm 波长下测定吸光度值,同时以去离子水作空白对照,以吸光度值 A 为横坐标,以总酚质量浓度 $C(\text{mg}/\text{mL})$ 为纵坐标绘制标准曲线。

2.3.2.2 样品总酚含量测定

精密称取 5 mg 连翘叶样品加 70% 甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,得样品溶液母液。取 50 μL 样品母液于 10 mL 棕色容量瓶中,加 6 mL 的去离子水,0.5 mL Folin-ciocateu 试剂摇匀,20% 无水碳酸钠溶液 1.5 mL,加水定容至刻度。75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下反应 10 min,冷却,按此方法测定 760 nm 处的吸光度值,同时以去离子水为空白为对照。平行测量三次,测得总酚含量。

2.4 数据分析

本实验数据的主成分、双变量相关、多元线性回归分析采用 SPSS for windows 16.0 处理。

3 实验结果

3.1 不同产地连翘叶指纹图谱

得 18 个产地的连翘叶样品的指纹图谱,选取各样品中共有的 14 个色谱峰作为共有峰见图 1,与对照品溶液色谱峰的保留时间对比分析,确定色谱峰 6 为(芦丁)、峰 8 为(连翘酯苷 A)、峰 14 为(连翘苷)。

色谱图以 AIA 格式输出,导入相似度软件,对连翘叶药材进行相似度的比较。采用中药色谱指纹

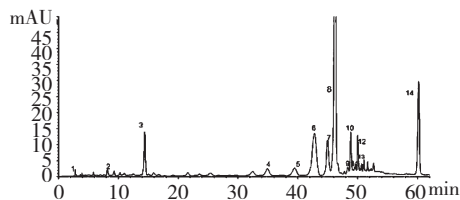


图 1 连翘叶药材特征共有峰指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of *Forsythia suspense* leaves by HPLC

图谱相似度评价系(2008A)对各样品色谱图的原始数据文件进行分析,自动匹配(见图 2),计算各色谱图的整体相似度,供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算,样品相似度均在 0.970~0.998 之间。

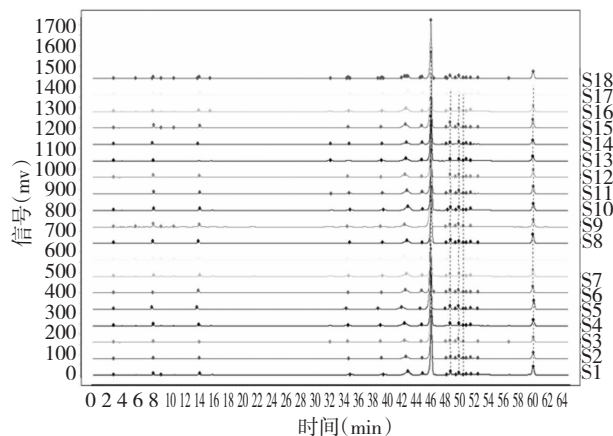


图 2 样品相似度曲线

Fig. 2 The similarity analysis results

3.2 不同产地连翘叶抗氧化活性成分及总酚含量得没食子酸标准曲线得回归方程:

$$Y = 37.723X - 0.0112, R^2 = 0.9991.$$

3.3 总酚含量与抗氧化之间的双变量相关分析^[17]

采用 SPSS for windows 16.0 中双变量相关分析方法处理,计算连翘叶样品中的总酚含量与抗氧化活性的 Person 相关系数,结果可知总酚含量与抗氧化活性(IC_{50} 值)之间的 Person 相关系数为 -0.972 ($P < 0.01$) 具有显著性,相关性很高,且呈负相关。

3.4 谱效关系分析^[18]

3.4.1 主成分分析(PCA)

经 HPLC 法选出 14 个共有峰,运用 SPSS for windows 16.0 统计软件中的主成分分析法,寻找出对连翘叶化学成分有较大影响且有较大累计贡献率的指标。经过分析获得这些性状的特征值、贡献率(方差百分比)、累计贡献率。确定主成分的个数的

表 2 不同产地连翘叶样品总酚含量及抗氧化活性

Table 2 The determination of total phenolic content and antioxidant activity of different *F. suspense* leaves

样品 Sample	总酚含量 Total phenolic content	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	样品 Sample	总酚含量 Total phenolic content	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	样品 Sample	总酚含量 Total phenolic content	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	34.4	10.06	7	37.6	8.09	13	33.0	10.26
2	40.1	6.48	8	34.8	9.72	14	35.5	9.40
3	39.9	7.60	9	35.2	9.47	15	37.2	8.41
4	35.6	9.24	10	39.8	7.67	16	36.0	8.89
5	40.0	7.56	11	39.0	7.91	17	38.0	7.92
6	37.2	8.48	12	34.6	9.91	18	42.0	5.70

原则有二:一是特征值,保留特征值大于 1 成分,二是累计贡献率,累计贡献率大于 80% 为标准来确定要保留的主成分个数。根据这两个判断标准,再结合表中信息,可知,特征值大于 1 的主成分有五个。这五个主成分的累计贡献率为 81.2%,完全符

合累计贡献率大于 80% 和以最少的主成分个数量来提供最多的原始数据所代表的信息的原则,能够提供大部分的信息,故确定五个主成分。由 SPSS for windows 16.0 主成分分析得主成分的因子载荷矩阵,如下表 3。

表 3 连翘叶活性成分的 PCA 分析因子载荷矩阵

Table 3 PCA factor loading matrix of active ingredient of *F. suspense* leaves

序号(峰) Order number(peak)	主成分 1 Component 1	主成分 2 Component 2	主成分 3 Component 3	主成分 4 Component 4	主成分 5 Component 5
1	0.350	-0.455	0.187	0.057	0.505
2	0.805	-0.046	-0.339	0.206	-0.044
3	0.779	-0.312	-0.347	-0.049	0.276
4	0.754	0.345	0.333	-0.001	-0.240
5	0.779	-0.305	0.201	0.201	-0.110
6	0.242	0.149	0.788	-0.437	-0.005
7	0.228	0.386	0.229	-0.090	0.747
8	0.892	0.330	-0.011	0.059	-0.117
9	-0.285	0.522	0.089	0.761	0.113
10	0.757	0.052	-0.234	0.148	0.168
11	0.246	0.747	-0.239	0.041	-0.011
12	0.458	0.429	-0.363	-0.620	-0.017
13	0.563	-0.004	0.511	0.237	-0.126
14	0.861	-0.314	-0.027	0.019	-0.195

载荷量的绝对值越大,说明该组分受该指标的影响值也越大。由上表可计算,主成分的特征值贡献率为 81.2%,对其他峰特征值有较大的负荷($P > 0.500$)。因此,从表 4 中可知连翘叶中对抗氧化作用较大且有较大贡献率的指标分别为峰 2、3、4、5、6、8、10、11、12、13、14。

3.4.2 谱效双变量相关分析

采用 SPSS for windows 16.0 中双变量相关分析

法处理,计算指纹图谱中 14 个共有峰与抗氧化的 Person 相关系数,如下表 4。由表可以看出,以峰 8、11、14 与连翘叶抗氧化活性相关性很高($P < 0.05$),且呈正相关。通过对照品分析,峰 8 为连翘酯苷 A、峰 14 为连翘苷。

3.4.3 谱效多元回归分析

利用 SPSS for windows 16.0 中多元线性回归分析中的强迫引入法处理(保留 $P < 0.05$ 的各因素),

表 4 共有峰与抗氧化活性成分的 Person 相关系数

Table 4 The Person correlation coefficients of characteristic peaks and antioxidant activity

序号(峰) order number(peak)	相关系数 correlation coefficients	序号(峰) order number(peak)	相关系数 correlation coefficients
1	0.316	8	0.691**
2	0.142	9	0.239
3	0.284	10	0.225
4	0.116	11	0.551*
5	-0.451	12	0.360
6	0.322	13	0.232
7	0.280	14	0.642**

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

以经主成分分析筛选出来的峰面积作为自变量,抗氧化作为因变量。所得方程为: $Y = -2.675 + X_2^* 0.005 - X_3^* 0.006 + X_4^* 0.012 - X_5^* 0.022 - X_6^* 0.047 - X_8^* 0.185 + X_{10}^* 0.091 + X_{11}^* 0.1 - X_{12}^* 0.081 + X_{13}^* 0.006 + X_{14}^* 0.13$ ($P < 0.05$, $R^2 = 0.942$)。

模型拟和后的 $R^2 = 0.942$, 即变量的偏差可以解释为抗氧化变化的 94.2%。由方差分析表知, $F = 8.723$, 越大越好。 $P = 0.03 < 0.05$, 表明回归性显著, 可信。 $P < 0.05$, 此回归模型具有统计学意义。

4 结论

本文测定了 18 个不同产地连翘叶提取物的指纹图谱, 并对不同来源连翘叶中总酚含量及 DPPH·清除率进行测定, 通过相关分析, 连翘叶的抗氧化活性和总酚含量呈现显著的相关性, 说明了连翘叶抗氧化的化学物质基础为酚类物质^[19]。此外, 不同产地的连翘叶提取物, 其抗氧化能力有所不同, 其中黎城, 绛县的连翘叶抗氧化能力很低, 而阳城最高。原因可能是不同省市地理环境不同, 对连翘叶的化学成分及活性产生了影响, 但具体的影响因素及产生影响的机理还需要进一步的研究。在建立中药谱-效相关关系方面, 通过采用了主成分分析, 相关分析及多元线性回归分析, 结果显示连翘叶中主要有 3 个化学成分与其抗氧化活性之间存在着明显的关联性, 可能为主要作用物质基础, 其中两个为连翘酯苷 A 和连翘苷, 但另一个尚不明确, 还有待进一步的研究。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会).

Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 11.

- The State Administration of Traditional Chinese Medicine 《Chinese materia medica》Editorial Board (国家中医药管理局《中华本草》编委会). The Chinese Materia Medica Sixteenth Volume (中华本草第十六卷). Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999. 157-159.
- Zhi XR (支旭然), Yuan L (苑霖), Sheng N (生宁), et al. Determination of nine components in forsythia folium collected in different period. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 44:3231-3235.
- Jiao J, Yan QG, Meng L, et al. Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal *Forsythia suspense* leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity. *Food Res Int*, 2013, 53:857-863.
- Yang JX (杨建雄), Liu J (刘静), Li FR (李发荣). Study on anti-senile and anti-oxidative activities of *Forsythia suspense* leaves tea. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2004, 26(1):65-67.
- Liu J (刘静), Yang JX (杨建雄), Li XD (李小丹). The experimental study on the oxidation resistance of the extracts of *Forsythia suspense* leaves to grease. *J Shanxi Inst Edu* (陕西教育学院学报), 2006, 22(2):93-95.
- Huang YY (黄亚亚), Yang JX (杨建雄), Zhao YM (赵咏梅). Experimental study on fatigue resistance of flavonoids from *Forsythia suspense* leaves in swimming-induced injury model mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21:1019-1022.
- Lei QX (雷秋香), Zhao LM (赵连梅), Yan X (颜晰). Ethanol extract from *Forsythia suspense* leaves suppresses human esophageal carcinoma cells growth. *Cancer Res Prevent Treat*

- (肿瘤防治研究), 2012, 39:394-399.
- 9 Yang YF(杨义芳), Yang Z(杨震), Xiao W(萧伟). Herbal Drug Efficacy. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 2012. 231-241.
 - 10 Li R(李戎), Yan ZY(闫智勇), Li WJ(李文军). Creating the spectrum effect relationship of Chinese medicine. *Edu Chin Med* (中医教育), 2002, 62(2):62-63.
 - 11 Li WM(李卫民), GaoY(高英). Application of fuzzy mathematics in Chinese medicine quality contro. *J Chin Med Mater* (中药材), 1992, 5:43-44.
 - 12 Yu J(余婧), Yang YF(杨义芳), Hu X(胡晓). Spectrum-effect correlation for blood coagulation activity of *Callicarpa kwangtungensis* chun. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2015, 46:467-472.
 - 13 Jia DS(贾东升), Li RQ(李荣乔), Xie XL(谢晓亮). Study on antioxidant activity of different solvents extracts of *Forsythia suspense* leaves. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2016, 37(2):14-18.
 - 14 Cui YY(崔云云). Study on quality standard of *Forsythia* leaves(连翘叶的质量标准研究). Shanxi: University of Shanxi(山西大学), MSc. 2014.
 - 15 Wang Y(王燕), Wang RB(王儒彬), Sun L(孙磊). Relationship between total flavonoids, total phenolics and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activities during growth of *Forsythia suspensa* leaves. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17:109-112.
 - 16 Cheng QB(程启斌), Li SF(李石飞), Zhang LW(张立伟). Study on comparison of antioxidant activity and determination of total phenol content in different parts of *Forsythia suspensa*. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2016, 28:610-616.
 - 17 Luo ZJ(罗志江), Xu Y(徐彦), Wu JY(吴建英). Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Polygonum cospidatum*. *J Southwestern Univ*(西南大学学报), 2012, 34:138-142.
 - 18 Jiang T(姜涛), Zhang LW(张立伟). Study on relationship between HPLC fingerprint chromatogram and antibacterial activity of *Forsythia suspensa* Vahl. *Chem Res Appl*(化学研究与应用), 2015, 27:256-261.
 - 19 Liu C(刘畅), Zhou JC(周家春). Research on antioxidation of plant polyphenols. *Cereals Oils*(粮食与油脂), 2011, 2:43-46.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

中国科学院广西植物研究所