

- [J]. 中国计量, 2012, 30(6): 1080-1083.
- [4] XU M Z, HU C Q, JIN S H, et al. Application of uncertainty evaluation in arbitration test of determination of dissolution rate of immediate release solid oral dosage forms [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(6): 1080-1083.
- [5] The people's Republic of China National Metrology Technical specifications(中华人民共和国国家计量技术规范)JJF 1059.1-2012 [S]. 2012.
- [6] LUO S Q, ZHOU Z. Evaluation of measurement uncertainty for the determination of alcohol residue in glycididazole sodium by GC internal standard method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(2): 173-177.
- [7] LI H Q, PANG J. Assessment of the uncertainty in the determination of vitamin B1 tablets by UV [J]. Qilu Pharm. Aff(齐鲁药事), 2009, 28(5): 276-278.
- 收稿日期: 2015-06-12

裸花紫珠抑制 NO 生成活性及其活性部位的 HPLC-DAD-ESI-MS 研究

潘争红^{1,2}, 黄思思¹, 宁德生¹, 谷陟欣², 黄胜^{2,3}, 颜冬兰², 谢运昌¹, 李典鹏¹(1.广西壮族自治区·中国科学院, 广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西 桂林 541006; 2.九芝堂股份有限公司, 长沙 410008; 3.海南九芝堂药业有限公司, 海口 570311)

摘要: 目的 确定裸花紫珠抑制一氧化氮(NO)生成的活性部位, 并建立一套基于液质联用(HPLC-DAD-ESI-MS)技术快速鉴定裸花紫珠有效部位中主要成分的方法。方法 以脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞 RAW264.7 生成一氧化氮(NO)作为筛选模型, 采用液质联用(HPLC-DAD-ESI-MS)进行成分测定。结果 裸花紫珠中低极性的乙酸乙酯部位和石油醚部位显示出较强的抑制 NO 活性, 可能是其抗炎活性部位, 黄酮及黄酮苷类是乙酸乙酯部位的主要成分, 黄酮和二萜成分是石油醚部位的主要成分。结论 研究结果为裸花紫珠的产品升级及其质量控制提供了参考依据。

关键词: 裸花紫珠; 一氧化氮; 抗炎; HPLC-DAD-ESI-MS

中图分类号: R965.2; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)12-1463-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.013

Inhibition Activity on Nitric Oxide Production of *Callicarpa nudiflora* and HPLC-DAD-ESI-MS Analysis on Its Effective Part

PAN Zhenghong^{1,2}, HUANG Sisi¹, NING Desheng¹, GU Zhixin², HUANG Sheng^{2,3}, YAN Donglan², XIE Yunchang¹, LI Dianpeng¹(1.Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2.Jiuzhitang Co., Ltd., Changsha 410008, China; 3. Hainan Jiuzhitang Pharmaceutical Co., Ltd., Haikou 570311, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the active fractions of *Callicarpa nudiflora* on inhibitory of nitric oxide production, and to establish a method for identification of the main compositions of *Callicarpa nudiflora* by HPLC-DAD-ESI-MS technology. **METHODS** The inhibitory activity of nitric oxide production was carried out using lipopolysaccharide (LPS) to induce macrophage RAW264.7. The main compositions were determined by HPLC-DAD-ESI-MS technology. **RESULTS** The petroleum ether fraction and ethyl acetate fraction of *Callicarpa nudiflora* could inhibit the production of nitric oxide in lipopolysaccharide induced RAW264.7 cells ($IC_{50} < 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Flavonoids and flavonoid glycosides were the main constituents of ethyl acetate fraction, and the main constituents of petroleum ether fraction were flavonoids and diterpenoids. **CONCLUSION** The research provides a reference for the upgrading of products and the quality control of *Callicarpa nudiflora*.

KEY WORDS: *Callicarpa nudiflora*; nitric oxide; anti-inflammatory; HPLC-DAD-ESI-MS

裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.) 为马鞭草科紫珠属植物, 产自我国海南、广西、广东、印度、越南、马来西亚等地也有分布, 其

根、叶可入药, 具有收敛止血、消炎解毒等功效^[1]。由该味药材浸膏制成的裸花紫珠片已于 2000 年被列入国家基本药物目录, 在临床上用于治疗急性

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107010-3-10)

作者简介: 潘争红, 男, 博士, 副研究员

Tel: 15807737260

E-mail: pan7260@126.com

传染性肝炎、化脓性炎症、呼吸道和消化道出血等,具有疗效确切和不良反应小等特点^[2-3]。现代药理研究证明,裸花紫珠具有显著的抗炎作用^[4-6]。鉴于裸花紫珠抗炎物质基础及其内在药效机制尚未得到科学阐明,本实验以脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞 RAW264.7 作为筛选模型,考察裸花紫珠 5 个不同极性提取物抑制一氧化氮(NO)生成的活性,确定 2 个活性部位。同时建立一套基于液质联用(HPLC-DAD-ESI-MS)技术快速鉴定裸花紫珠有效部位中主要成分的方法。

1 仪器与材料

岛津 LC-MS -IT-TOF 液相质谱联用仪(日本岛津公司);BS110S 赛多利斯电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);HH-S 数显恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)。甲醇和乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

裸花紫珠药材产自海南省,由海南九芝堂药业有限公司提供,由广西植物研究所黄俞淞副研究员鉴定。

2 提取分离与活性筛选

2.1 提取分离

取裸花紫珠药材,粉碎,用 95%乙醇加热回流提取 3 次,提取液过滤后合并,减压浓缩成浸膏,浸膏均匀分散于水中,分别用适量的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取 5 次,萃取液浓缩干燥后,得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水 4 个部位,真空干燥,备用。对照品毛蕊花糖苷(1)、木犀草苷(2)、木犀草素-3'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(3)、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(4)、木犀草素(5)、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮(6)、5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮(7)均为从裸花紫珠中分离得到,均通过 NMR、MS 和文献对照等进行结构鉴定。

2.2 活性筛选

小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 在 37℃、5%CO₂的培养箱中常规培养于 DMEM 培养液中。实验时将细胞浓度调整至 3×10⁴·mL⁻¹后接种至 96 孔板,贴壁后,给药组分别加入裸花紫珠萃取物(25 μg·mL⁻¹)或对照化合物(25 μmol·L⁻¹)干预细胞 2 h,再加入诱导剂脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 终浓度 1 μg·mL⁻¹),阴性对照组加入等量的 DMEM 培养基,培养 24 h 后,吸取上清液,加入 Griess 试剂,混匀,避光静置 10 min,于 550 nm 处测定

吸光度值。

NO 生成抑制率(%)=(1-给药组 NO 浓度均数/阴性对照组 NO 浓度均数)×100%。

3 活性部位的 LC-MS 分析

活性筛选结果表明:石油醚和乙酸乙酯萃取组分是活性部位。分别取这 2 个萃取组分和各对照品适量,用甲醇配成一定浓度的样品溶液,按以下分析条件进行 HPLC-DAD-ESI-MS 分析。

色谱条件:ZORBAX SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 10.0 μL。流动相 A 为体积分数 0.1%甲酸溶液,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱过程:0~5 min, 10% B; 5~20 min, 10%→40% B; 20~40 min, 40%→50% B; 40~60 min, 50%→80% B; 60~80 min, 80% B。通过二极管阵列检测器(DAD)测定,主要色谱峰在 245 nm 处均有较大吸收,综合考虑本实验选择 245 nm 为检测波长。

质谱条件:ESI 正、负离子模式。雾化气流速 1.5 L·min⁻¹,干燥气(N₂)压力 0.1 MPa,曲型脱溶剂管(CDL)和加热块的温度均为 200℃,碰撞能量为 50%。检测器电压 1.70 kV。扫描范围(*m/z*)120~2 000。

4 结果

4.1 提取物和化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响

NO 是具有生物活性的气体信号分子,属于细胞间信息传递的重要调节因子。但 NO 的过量生成与炎症密切相关。当免疫细胞遭受微生物内毒素、炎症介质等刺激时,会生成大量的诱导型一氧化氮合成酶(induced NO synthase, iNOS),iNOS 通过催化其底物 L-精氨酸,生成 NO 进行免疫应答,因此抑制 NO 生成是化合物抗炎活性的直接指标。

裸花紫珠醇提物的石油醚和乙酸乙酯部位在 25 μg·mL⁻¹ 的浓度下显示出对激活状态 RAW 264.7 细胞 NO 释放的抑制活性,两者的抑制活性均大于醇提物,其中乙酸乙酯部位的抑制作用稍强于石油醚部位,而正丁醇部位和水部位的抑制率低于醇提物,未显示出明显的抑制活性。裸花紫珠 6 个黄酮类主成分在 25 μmol·L⁻¹ 的浓度下显示出不同程度的抑制作用,其中木犀草苷活性最高,其次是木犀草素和木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮则最弱。结果见表 1。

表1 裸花紫珠提取物和化合物对LPS诱导RAW264.7细胞NO生成的影响

Tab. 1 Effect of extracts and compounds from *Callicarpa nudiflora* on NO production in LPS-stimulated RAW264.7

编号	样品	抑制率/%
1	石油醚部位	80.19
2	乙酸乙酯部位	88.50
3	正丁醇部位	1.60
4	水部位	24.60
5	醇提取物	57.19
6	木犀草苷	90.01
7	木犀草素-3'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	31.01
8	木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	40.29
9	木犀草素	42.81
10	5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮	5.11
11	5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮	28.70
12	毛蕊花糖苷	20.70

4.2 液质联用技术鉴定活性部位主要化学成分

采用液相色谱质谱联用(LC-MS)技术,可以比较容易地根据被分离样品中各成分的紫外吸收、相对分子质量和碎片离子等信息来综合分析其结构,结合对照品或者文献对比分析质谱规律,可快速推测主要色谱峰对应的化合物归属。

对裸花紫珠的石油醚和乙酸乙酯活性部位进行 HPLC-DAD-ESI-MS 测试,综合分析其紫外吸收、相对分子质量和碎片离子等信息,对主要色谱峰进行鉴定和归属,其中结合与标准品对照鉴定了化合物 1~7,见图 1,另借助文献对照鉴定了化合物 8~9。从乙酸乙酯部位鉴定 6 个黄酮和 1 个苯乙醇苷类成分,从石油醚部位鉴定了 2 个黄酮和 3 个二萜成分,分析结果见表 2。

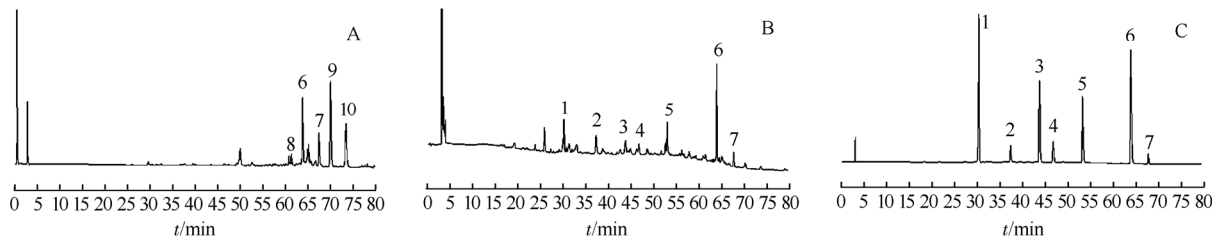


图1 裸花紫珠活性部位(A: 石油醚组分; B: 乙酸乙酯组分)和混合对照品(C)的高效液相色谱图
1-毛蕊花糖苷; 2-木犀草苷; 3-木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; 4-木犀草素-3'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; 5-木犀草素; 6-5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮; 7-5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮; 8-callicarpic acid B; 9-7α-acetoxysandaracopimaric acid; 10-sandaracopimaric acid。

Fig. 1 HPLC chromatograms of active fractions of *Callicarpa nudiflora* (A: Petroleum ether fraction; B: ethyl acetate fraction) and a standard mixture (C)

Note: 1-verbascoside; 2-luteoloside; 3-juncein; 4-dracocephaloside; 5-luteolin; 6-5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavone, pachypodol; 7-5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone; 8-callicarpic acid B; 9-7α-acetoxysandaracopimaric acid; 10-sandaracopimaric acid.

5 结论与讨论

研究结果显示,裸花紫珠醇提物的石油醚萃取部位和乙酸乙酯萃取部位具有显著的抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO生成作用。该结果与董琳等人^[7]的研究结果(裸花紫珠水提物氯仿部位的8个化合物中有7个化合物能抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO生成)相吻合。因此,裸花紫珠中、低极性部位可能是其主要的抗炎活性部位。研究已报道裸花紫珠总黄酮具有抗炎活性^[6]。对其活性部位分离得到的6个黄酮和1个苯乙醇苷类主要成分进行抑制NO生成的活性实验,它们显示出不同程度的抑制作用,其中木犀草苷活性最强,但活性都没有比萃取物明显。另外,石油醚部位还存在大量二萜成分,已有文献^[8-11]报道,这类二萜成分具有明显的抑制NO生成作用。这些都表明裸

花紫珠的抗炎作用是多成分协同作用的结果。

裸花紫珠的化学成分有黄酮及苷类、三萜及苷类、二萜、苯乙醇苷类、酚酸类、甾体类、挥发油等,目前已从中分离得到100余个化合物。对活性部位进行HPLC-DAD-ESI-MS检测发现,裸花紫珠乙酸乙酯部位的主要成分是黄酮及黄酮苷类成分,同时含有少量的苯乙醇苷类大极性成分,黄酮和二萜成分则是其石油醚部位的主要成分。5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮和5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮在2个活性部位中都有存在且含量较大,其中5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮已证实具有显著抑制二甲苯致小鼠耳肿胀的作用^[12]。本研究通过液质联用的方法,对裸花紫珠有效部位中主要成分进行定性检测,实验结果为裸花紫珠的产品升级及其质量控制提供了参考依据。

表 2 裸花紫珠活性部位主要成分的鉴定

Tab. 2 Identification of main components of active fraction of *Callicarpa nudiflora*

峰号	一级正离子 <i>m/z</i>	一级负离子 <i>m/z</i>	二级质谱 MS/MS <i>m/z</i>	紫外吸收 UV $\lambda_{\max}$ /nm	分子式	鉴定结果	来源 部位
1	647[M+Na] ⁺	623[M-H] ⁻	501[M-147+Na] ⁺ 461[M-H-caffeoyl] ⁻ 315[M-caffeoyl-147] ⁻	224, 245, 290, 335	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	毛蕊花糖苷	B
2	449[M+H] ⁺	447[M-H] ⁻	287[M-162+H] ⁺ 285[M-H-162] ⁻	250, 268, 288, 332	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草苷	B
3	449[M+H] ⁺	447[M-H] ⁻	287[M-162+H] ⁺ 285[M-H-162] ⁻	250, 268, 288, 332	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草素-3'- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷	B
4	449[M+H] ⁺	447[M-H] ⁻	287[M-162+H] ⁺ 285[M-H-162] ⁻	250, 268, 288, 332	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草素-4'- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷	B
5	287[M+H] ⁺	285[M+H] ⁻	153[M-134+H] ⁺ 151[M-H-134] ⁻ 133[M-H-152] ⁻	254, 268, 342	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素	B
6	345[M+H] ⁺	343[M-H] ⁻	330[M-CH ₃ +H] ⁺ 328[M-H-CH ₃] ⁻ 313[M-OCH ₃] ⁻	254, 342	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮	A、B
7	359[M+H] ⁺	无	344[M-CH ₃ +H] ⁺ 329[M-2CH ₃ +H] ⁺ 301[M-2CH ₃ -CO+H] ⁺	254, 342	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮	A、B
8 ^a	331[M+H] ⁺	329[M-H] ⁻	287[M-C ₃ H ₇] ⁻ 268[M-H-H ₂ O] ⁻	254	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	callicarpic acid B ^[13]	A
9	383[M+Na] ⁺	359[M-H] ⁻	323[M-CH ₃ COOH+Na] ⁺ 299[M-H-CH ₃ COOH] ⁻	206	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	7 α -acetoxysandaracopimaric acid ^[7]	A
10 ^a	303[M+H] ⁺	301[M-H] ⁻	257[M-COOH] ⁺ 229[M-H-COOH-C ₂ H ₅] ⁻	206	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	sandaracopimaric acid	A

注：A—石油醚部位；B—乙酸乙酯部位；^a—首次从该植物报道的成分。

Note: A—ether fraction; B—ethyl acetate fraction; ^a—the composition is recorded for the first time from this plant..

致谢：NO 抑制活性筛选由中国科学院昆明植物研究所天然药物活性筛选中心李艳研究组合作完成。

REFERENCES

- [1] 裴鉴, 陈守良. 中国植物志[M]. 1982, 65(1): 37-38.

[2] 颜小捷, 谷陟欣, 卢凤来, 等. 裸花紫珠中总酚, 总黄酮和总皂苷的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 2852-2854.

[3] 周志强. 裸花紫珠化学成分的研究[D]. 南昌大学医学院, 2013, 76-89.

[4] CHEN Y, YANG G C. Study on the anti-inflammatory and immunologic effects of *Callicarpa nudiflora* Hook Et Am [J]. Guangdong Trace Element Sci(广东微量元素科学), 2006, 13(8): 39-41.

[5] FU J, KUANG S T, WANG S X. Study on the effects of *Callicarpa nudiflora* tablets in the antibiosis and antiphlogosis and the hemostasis [J]. Nat Sci J Hainan Univ(海南大学学报: 自然科学版), 2002, 20(2): 154-156.

[6] 梁纪军, 徐凯, 李留法, 等. 裸花紫珠总黄酮的抗炎, 止血作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(26): 3161-3162.
- [7] 董琳, 关世侠, 刘明生, 等. 黎药-裸花紫珠氯仿部位活性成分研究[D]. 海南医学院, 2014.

[8] DONG L, ZHANG L, ZHANG X P, et al. Two new 3,4-seco-labdane diterpenoids from *Callicarpa nudiflora* and their inhibitory activities against nitric oxide production [J]. Phytochem Lett, 2014(10): 127-131.

[9] ZHANG L, LIU M S, HUANG J, et al. A new 3,4-seco-labdane diterpenoid with inhibitory activity against the production of nitric oxide from the leaves of *Callicarpa nudiflora* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(2): 216-221.

[10] ZHANG L, HUANG J, LIU M S, et al. Ent-3,4-seco-labdane diterpenoids from *Callicarpa nudiflora* leaves with anti-inflammatory activity [J]. Heterocycles, 2013, 87: 1561-1569.

[11] ZHANG L, DONG L, HUANG J, et al. 3,4-seco-Labdane diterpenoids from the leaves of *Callicarpa nudiflora* and their inhibitory effects on nitric oxide production [J]. Fitoterapia, 2013, 89: 218-223.

[12] 董琳, 张晓菁, 刘明生. 裸花紫珠 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮抗炎作用研究 [J]. 海南医学院学报, 2014, 20(11): 1460-1462.

[13] CHEN J J, WU H M, PENG C F, et al. seco-Abietane diterpenoids, a phenylethanoid derivative, and antitubercular constituents from *Callicarpa pilosissima* [J]. J Nat Prod, 2009, 72: 223-228.

收稿日期: 2015-06-19