

瑶药翼核果中翼核果素和翼核果醌- I 的含量测定及抗氧化活性研究

胡筱希¹, 陆国寿^{1,2*}, 黄周锋¹, 黄建猷¹, 谭晓¹, 甘吉丽³ (1.广西中医药研究院, 南宁 530022; 2.广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022; 广西中医药大学药学院, 南宁 530022)

摘要: 目的 建立翼核果中的翼核果素及翼核果醌- I 的含量测定方法, 对翼核果素及翼核果醌- I 抗氧化活性进行初步评价。方法 采用 HPLC 对翼核果药材中的翼核果素及翼核果醌- I 的含量进行测定, 并进行方法学考察; 通过测定翼核果素及翼核果醌- I 对 DPPH 自由基的清除能力, 以半数清除浓度(IC₅₀)值作为评价清除 DPPH 自由基能力的指标。结果 翼核果药材中翼核果素及翼核果醌- I 的含量分别为 0.56%, 0.10%。2 种成分清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 1.13, 1.63 mg·mL⁻¹。结论 2 种成分的定量分析方法分离度良好, 重复性好, 抗氧化方法简便、快捷, 为翼核果的深入研究提供了实验依据。

关键词: 翼核果素; 翼核果醌- I; 含量测定; 抗氧化活性

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)07-0820-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.010

引用本文: 胡筱希, 陆国寿, 黄周锋, 等. 瑶药翼核果中翼核果素和翼核果醌- I 的含量测定及抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 820-823.

Determination and Evaluation on Anti-oxidant Activity of Ventilagolin and Ventiloquinone- I in *Ventilago leiocarpa* Benth

HU Xiaoxi¹, LU Guoshou^{1,2*}, HUANG Zhoufeng¹, HUANG Jianyou¹, TAN Xiao¹, GAN Jili³ (1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China; 3. Guangxi University of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Nanning 530022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of ventilagolin and ventiloquinone- I from *Ventilago leiocarpa* Benth and to evaluate DPPH free radical scavenging for the anti-oxidant activity. **METHODS** HPLC method was used to determine the content of ventilagolin and ventiloquinone- I and methodologically inspected. Taking IC₅₀ as the evaluating criterion of scavenging capability by determining the DPPH free radical scavenging rate of ventilagolin and ventiloquinone- I. **RESULTS** The contents of ventilagolin and ventiloquinone- I were 0.56% and 0.10%. The DPPH free radical scavenging capability of IC₅₀ were 1.13, 1.63 mg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The method has good separation and good reproducibility. The method is convenient and rapid, as well as provide an experimental to intense research of *Ventilago leiocarpa* Benth.

KEYWORDS: ventilagolin; ventiloquinone- I; determination; anti-oxidant activity

在广西传统瑶药中, 最具代表性和民族特色的是民间传统使用的“五虎、九牛、十八钻、七十二风”药材, “九牛”包括白九牛、红九牛、花九牛、青九牛、黄九牛、黑九牛、紫九牛、蓝九牛^[1]。翼核果又名紫九牛, 为鼠李科属植物翼核果(*Ventilago leiocarpa* Benth)的根茎, 收载于《全国中草药汇编》《中国瑶药学》等, 别名血风根、血风藤、红蛇根、青筋藤、铁牛入石、拉牛入石; 瑶医认为紫九牛具有养血祛风、舒筋活络、固肾

益精等功效; 用于治疗贫血头晕、月经不调、闭经、慢性肝炎、肝硬化、风湿筋骨疼痛、风湿性关节炎、腰肌劳损、四肢麻木、神经痛、跌打损伤、内伤等疾病^[2-3]。现代药理学证明^[4], 翼核果及其提取物具有多重功效, 可以减轻乙醇所致小鼠急性肝损伤的影响, 其醇提物能降低乙醇所致小鼠血清谷丙转氨酶的升高, 提高肝脏过氧化氢酶和总抗氧化能力, 且可明显减轻肝组织病理改变。经查阅文献, 从翼核果中分离得到的醌类化

基金项目: 广西自然科学基金项目(2016GXNSFAA380092); 广西中药质量标准研究重点实验室自主研究课题(桂中重自 201506, 桂中重自 201601)

作者简介: 胡筱希, 女, 硕士生 Tel: 15078810745 E-mail: huxiaoxi0124@126.com

***通信作者:** 陆国寿, 男, 副主任药师 Tel:

(0771)5868986 E-mail: luguoshou@foxmail.com

合物有翼核果醌-K、翼核果醌、翼核果醌-I、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-6,8-二甲醚、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、翼核果素、1-羟基-6,7,8-三甲氧基-3-甲基蒽醌、1,2,4,8-四羟基-3-甲基蒽醌和1-羟基蒽醌等^[5-9]。笔者前期从瑶药紫九牛中分离得到翼核果素及翼核果醌-I，这2种成分目前仅在翼核果中被分离得到，可认为它们是翼核果中具有特征性的醌类化合物。笔者在建立翼核果素及翼核果醌-I含量测定的基础上，又对其抗氧化活性进行初步探究，为翼核果药材的质量控制及深入研究提供实验依据。

1 仪器与材料

LC-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津); Multiskan Go 全波长酶标仪(赛默飞)。

DPPH($C_{18}H_{12}N_5O_6$, 麦克林公司); 翼核果素及翼核果醌-I 对照品为本实验室自制, 从翼核果药材中分离得到, 经结构鉴定及 HPLC 归一化法测得含量 $\geq 98\%$, 结构图见图1; 翼核果药材采自广东深圳, 经广西壮族自治区卢文杰主任药师鉴定为鼠李科属植物翼核果(*Ventilago leiocarpa* Benth)的根茎; 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

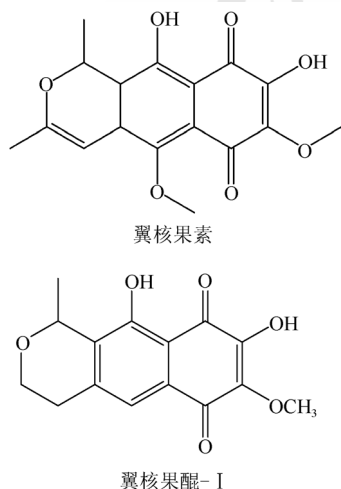


图1 结构图

Fig. 1 Structure diagram

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(2:1); 流速为1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温为25 $^{\circ}$ C; 进样量为20 μ L; 测定波长为282 nm。翼核果素和翼核

果醌-I 对照品及翼核果药材的 HPLC 色谱图见图2。

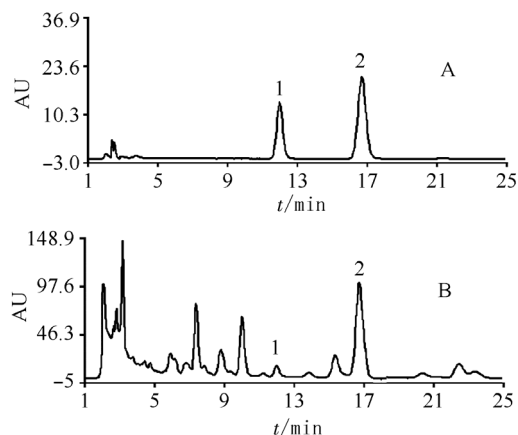


图2 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-翼核果醌-I; 2-翼核果素。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; 1-ventiloquinone-I; 2-ventilagolin.

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取翼核果素、翼核果醌-I 对照品60, 20 mg, 用甲醇分别定容于100 mL 量瓶中, 得到600, 200 μ g $\cdot$ mL⁻¹的对照品贮备液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取翼核果药材1.0 g, 加20 mL 70%乙醇回流50 min, 蒸干溶剂后, 用甲醇定容于50 mL 量瓶中, 滤过。

2.4 标准曲线的绘制

配置一系列不同浓度的混合品对照品工作液, 翼核果素浓度为37.5, 75, 150, 300, 600 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 翼核果醌-I 浓度为1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ g $\cdot$ mL⁻¹。进样测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得翼核果素在37.5~600 μ g $\cdot$ mL⁻¹的回归方程为 $y=49\,364x-124\,552$ ($r=0.998\,5$); 翼核果醌-I 在1.25~20 μ g $\cdot$ mL⁻¹的回归方程为 $y=29\,854x+24\,280$ ($r=0.997\,4$)。

2.5 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液20 μ L, 按“2.1”项下色谱条件重复进样6次, 结果翼核果素及翼核果醌-I 峰保留时间的RSD分别为1.2%, 1.3%, 峰面积的RSD均为1.8%。

2.6 重复性试验

按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备5份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果翼核果素及翼核果醌-I 峰保留时间的RSD分别为1.5%, 1.4%, 峰面积的RSD分别为1.6%, 1.4%。

2.7 稳定性试验

各取同一浓度混合对照品溶液及供试品溶液1份,室温下放置,分别于0,2,4,8,12,24 h进样分析,结果表明混合对照品溶液翼核果素及翼核果醌-I峰保留时间的RSD均为1.8%,峰面积RSD分别为2.1%,1.7%;供试品中翼核果素及翼核果醌-I峰保留时间的RSD均为1.7%,峰面积RSD分别为1.8%,1.6%。

2.8 加样回收率试验

取已知翼核果素及翼核果醌-I含量的9份翼核果药材粉末1.0 g,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,加入适量不同浓度翼核果素及翼核果醌-I对照品,测定翼核果素及翼核果醌-I的含量,每个浓度各测定3次,分别计算翼核果素及翼核果醌-I的平均回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Recoveries of the assay

成分	样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	平均测 得量/mg	回收率/ %
翼核果素	5.60	6.72	12.42	12.40	101.19
	5.60	6.72	12.38		
	5.60	6.72	12.40		
	5.60	5.60	11.21	11.24	100.71
	5.60	5.60	11.25		
	5.60	5.60	11.26		
	5.60	4.48	10.13	10.11	100.67
	5.60	4.48	10.09		
	5.60	4.48	10.11		
翼核果醌-I	1.00	1.20	2.23	2.22	101.67
	1.00	1.20	2.24		
	1.00	1.20	2.19		
	1.00	1.00	1.98	2.03	103.00
	1.00	1.00	2.03		
	1.00	1.00	2.05		
	1.00	0.80	1.83	1.82	102.50
	1.00	0.80	1.81		
	1.00	0.80	1.82		

2.9 含量测定

按“2.3”项下方法制备供试品溶液;按“2.1”项下色谱条件测定峰面积,代入标准曲线计算含量。药材中翼核果素及翼核果醌-I的含量分别为0.56%,0.10%。

2.10 抗氧化活性的测定^[10]

采用清除DPPH自由基的方法测定成分的抗氧化能力。称取25.4 mg的DPPH,使用无水乙醇

溶解,定容于100 mL量瓶,备用,使用时稀释10倍;样品浓度设置为5个梯度(翼核果提取物浓度为1,2,4,6,8 mg·mL⁻¹;翼核果素及翼核果醌-I的浓度分别为0.25,0.5,1,1.5,2 mg·mL⁻¹),将每种供试品溶液分别取20 μL加样到96孔板中,再在每个孔中平行加入180 μL DPPH溶液。同时设立对照组、空白组。充分混匀,将96孔板放置在避光环境下反应30 min。在515 nm处测吸光度(A)。

$$\text{清除率}=[1-(A_i-A_j)/A_0]\times 100\%$$

其中: A_0 为加入180 μL DPPH和20 μL供试品溶剂混匀后测得的吸光度; A_i 为180 μL DPPH和20 μL供试品溶液混匀后测得的吸光度; A_j 为180 μL无水乙醇和20 μL供试品混匀后测定的吸光度值。

以样品浓度为横坐标,清除率为纵坐标作图,结果显示,在测定的浓度范围内,2组抗氧化活性均随着试样浓度的增加而逐渐增强,呈现良好的剂量依赖性,结果见图3~4。

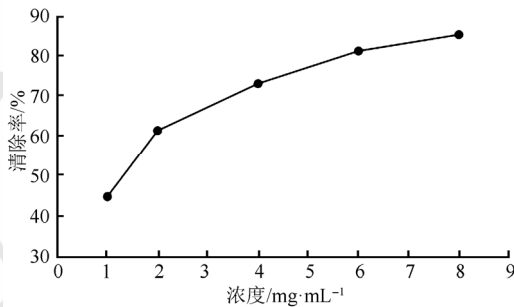


图3 翼核果提取物对DPPH自由基的清除能力

Fig. 3 Scavenging activity of free radical in DPPH of extract from *Ventilago leiocarpa* Benth

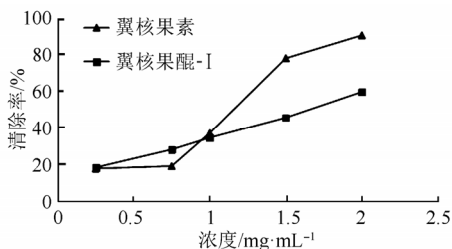


图4 翼核果素及翼核果醌-I对DPPH自由基的清除能力

Fig. 4 Scavenging activity of free radical in DPPH of ventilagin and ventiloquinone-I

使用回归分析方法得到回归方程:翼核果提取物为 $y=10.181x+30.847(r=0.9319)$,计算得 IC_{50} 值为1.88 mg·mL⁻¹;翼核果素为 $y=47.952x-4.3622(r=0.9541)$,计算得 IC_{50} 值为1.13 mg·mL⁻¹;翼核

果醌-I 为 $y=22.19x+13.829(r=0.9912)$, 计算得 IC_{50} 值为 $1.63\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

通过 Scifinder 的检索, 翼核果素为一个新的 1,4-萘醌类化合物, 其母核在 SCIfinder 上搜索, 暂时没检索到此类结构的化合物。翼核果素及翼核果醌-I 目前仅在翼核果中被分离得到, 为翼核果药材中的特征成分, 为其今后的质量控制提供依据。

采用紫外全波长扫描对最佳检测波长进行比较研究, 由翼核果素、翼核果醌-I 对照品溶液的紫外吸收光谱可知, 在 342, 282 nm 附近均有较大吸收, 但在 342 nm 波长下基线漂移较严重, 因此确定 282 nm 作为测定波长。

实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸-水溶液、乙腈-磷酸-水溶液等不同流动相系统, 均未取得理想效果。以乙腈为有机相, 分离度较差; 以甲醇-水为流动相时, 未达到基线分离, 且峰型较宽, 后将水相改为 0.1%磷酸水溶液, 当甲醇与 0.1%磷酸水溶液的比例为 2:1 时, 这 2 种成分能排除其他成分的干扰, 得到良好的分离效果。

DPPH 是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 当有抗氧化剂存在时, 其吸收消失或减弱, 且吸光度变小的程度与自由基被清除的程度呈定量关系, 因而可通过检测其吸光度来评价样品的抗氧化性^[11]。从化合物结构看出: 在醌类结构中, 酚羟基的间位有个取代基会增加其抗氧自由基活性, 且该基团的吸电子能力越强, 其抗氧自由基的作用越强^[12]。从本研究结果可以看出, 翼核果提取物具有抗氧化活性, 由于翼核果素的抗氧化活性和含量均大于翼核果醌-I, 可以推测翼核果

素为翼核果提取物抗氧化活性的主要贡献者。据《中国瑶药学》^[3]记载, 民间可用于治疗慢性肝炎以及肝硬化, 抗氧化能力是有效反映肝损伤与肝再生失衡状态评价的重要因素, 翼核果中的特征成分翼核果素及翼核果醌-I 具有一定的清除自由基能力, 是否也与该抗氧化功效相关仍需进一步验证。

REFERENCES

- [1] 覃迅云, 李彤. 中国瑶医学[M]. 北京: 民族出版社, 2001: 42.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册) [M]. 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 1996: 926.
- [3] 覃迅云, 李彤. 中国瑶药学[M]. 北京: 民族出版社, 2002: 27-28.
- [4] HUANG J, WEI Y J, WEI Q N, et al. Acute toxicity and effects of *Ventilago leiocarpa* on ethanol acute liver injury [J]. *J Youjiang Med Univ Nat*, 2014, 36(3): 323-325.
- [5] 王雪芬, 卢文杰, 陈家源, 等. 翼核果化学成分的研究[J]. *药学学报*, 1993, 28(2): 122-125.
- [6] 应百平, 韩玖, 利国威, 等. 翼核果中蒽醌的研究[J]. *药学学报*, 1988, 23(2): 126.
- [7] 王晓炜, 徐绥绪, 王喆星, 等. 翼核果中的化学成分研究 I [J]. *沈阳药科大学学报*, 1996, 13(3): 189-191.
- [8] WANG X W, XU S X, WANG Z X, et al. A new compound in *Ventilago leiocarpa* Benth [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 1997, 14(4): 296-297.
- [9] XU S X, WANG X W, WANG H Y, et al. Two new minor compound and their bioactivity from *Ventilago leiocarpa* Benth [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 1998, 15(4): 250-253.
- [10] WANG X Q. Evaluation on anti-oxidant activity of *Curcuma longa* extracts based on DPPH free radical scavenging capability [J]. *Drug Evaluat Res*, 2011, 34(5): 360-363.
- [11] INDRADI R B, FIDRIANNY I, WIRASUTISNA K R. DPPH scavenging activities and phytochemical content of four asteraceae plants [J]. *Int J Pharm Phytochem Res*, 2017, 9(6): 755-759.
- [12] BAJPAI V K, BAEK K H, KANG S C. Antioxidant and free radical scavenging activities of taxoquinone, a diterpenoid isolated from *Metasequoia glyptostroboides* [J]. *South African J Botany*, 2017(111): 93-98.

收稿日期: 2018-04-04

(本文责编: 曹粤锋)