

中药青蒿抗氧化活性的谱效关系研究

赖立勇, 夏天爽, 徐圣焱, 蒋益萍, 岳小强, 辛海量

Study on spectrum-effect relationship based on antioxidant activity of *Artemisiae Annuae Herba*

LAI Liyong, XIA Tianshuang, XU Shengyan, JIANG Yiping, YUE Xiaoqiang, XIN Hailiang

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202211012>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于正交投影偏最小二乘法对复方首乌藤合剂抗失眠作用的谱效关系研究

Study on spectrum-effect relationship of sedative and hypnotic effect of compound caulis polygoni multiflori mixture based on orthogonal partial least squares regression analysis

药学实践与服务. 2019, 37(5): 427-432 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.008

恩施巴戟环烯醚萜苷类成分提取工艺优选及抗氧化活性研究

Study on extraction process and antioxidant activity of iridoid glycosides in *Damnacanthus officinarum* Huang

药学实践与服务. 2020, 38(4): 346-349 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201911013

槲皮素与锌离子结合性质及抗氧化活性研究

Studies on the binding properties of Zn²⁺ ion to quercetin and the antioxidant activities

药学实践与服务. 2018, 36(1): 50-54 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.010

HPLC-ELSD同时测定铁破锣中3种三萜皂苷含量及体外抗氧化性研究

The assay of three triterpenoid saponin extracted from *Bessia calthaeifolia* simultaneously by HPLC-ELSD and their antioxidant effects *in vitro*

药学实践与服务. 2019, 37(4): 337-341,347 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.010

啤酒花经抗氧化途径减轻A β 损伤成骨细胞作用研究

Hops extract alleviates A β -injury to osteoblasts through antioxidant pathway

药学实践与服务. 2021, 39(6): 509-514 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202103018

基于抗氧化和抗炎生物效应的生脉注射液质量评价

Quality control and evaluation of Shengmai injection based on anti-oxidant and anti-inflammatory biological effects

药学实践与服务. 2020, 38(2): 143-147 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201906029



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

中药青蒿抗氧化活性的谱效关系研究

赖立勇^{1a,1b}, 夏天爽^{1a}, 徐圣焱^{1a}, 蒋益萍^{1a}, 岳小强², 辛海量^{1a} (1. 海军军医大学: a. 药学系生药学教研室, b. 中医系, 上海 200433, 2. 海军军医大学第二附属医院中医科, 上海 200003)

[摘要] 目的 通过考察 11 批青蒿的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱与体外抗氧化活性的谱效关系, 筛选出青蒿体外抗氧化作用的药效物质基础成分。方法 色谱柱为 Aglient C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.2% 磷酸水-甲醇, 流速为 1 ml/min; 柱温为室温; 检测波长为 220 nm; 进样量为 10 μl。以异绿原酸 A 为参照, 采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 确定并记录 11 批青蒿样品的共有峰。检测不同青蒿样品对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除效率, 作为其抗氧化评价, 利用 SIMCA14.1 软件构建 PLSR 模型并分析谱效关系。结果 11 批青蒿样品中共检测出 48 个共有峰, 鉴定 11 个成分, 分别为东莨菪内酯、滨蒿内酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、木犀草素、芹菜素、猫眼草黄素、青蒿素、艾黄素和青蒿酸。检测 11 批青蒿样品的 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力, 谱效关系显示, 异绿原酸 A、B、C 和滨蒿内酯峰面积与青蒿的 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力正相关, 且变量投影值大于 1, 表明这些成分在青蒿的体外抗氧化方面有显著贡献。结论 本研究考察了青蒿中不同物质的体外抗氧化能力, 证明异绿原酸 A、B、C 和滨蒿内酯为青蒿的体外抗氧化活性的药效物质基础。

[关键词] 青蒿; 高效液相色谱法; 抗氧化; 谱效关系; 药效物质基础

[文章编号] 2097-2024(2024)00-0001-09

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202211012

Study on spectrum-effect relationship based on antioxidant activity of Artemisiae Annuae Herba

LAI Liyong^{1a,1b}, XIA Tianshuang^{1a}, XU Shengyan^{1a}, JIANG Yiping^{1a}, YUE Xiaoqiang², XIN Hailiang^{1a} (a. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, b. School of Traditional Chinese Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433, China, 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective** To screen the pharmacodynamic material basic components of Artemisiae Annuae Herba and study its antioxidant activity *in vitro* by investigating the spectrum-effect relationship between the HPLC fingerprints of 11 batches of Artemisiae Annuae Herba (dried aerial part of *Artemisia annua* L.). **Methods** The determination was performed on Aglient C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of 0.2% phosphoric acid solution-Methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was indoor temperature, and detection wavelength was 220 nm, with sample size of 10 μl. Using isochlorogenic acid A as reference, HPLC fingerprints of 11 batches of samples were determined. The common peaks of 11 batches of samples were identified and recorded through TCM chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2012 edition). Using scavenging rate of DPPH and ABTS free radical as pharmacodynamic indicators of antioxidant effects, SIMCA 14.1 analysis software was used for PLSR to establish the spectra-effect relationship. **Results** There were 48 common peaks on 11 batches of sample, 11 components were identified as scopoletin, scoparone, isochlorogenic acid B, A, C, luteolin, apigenin, chrysopterin, artemisinin, artemisetin and artemisinic acid. The scavenging activity of 11 batches of samples to DPPH and ABTS free radicals was detected. The spectrum-effect relationship showed that isochlorogenic acid A, B, C and scoparone were positively associated with its antioxidant capacity, and variable projection value was greater than 1. It is suggested that these components are the material basis of antioxidant effect in Artemisiae Annuae Herba. **Conclusion** This study investigates the antioxidant capacity of different substances in Artemisiae Annuae Herba *in vitro*, and proves that isochlorogenic acid B, A, C and scoparone play a major role for the antioxidant capacity.

[基金项目] 国家自然科学基金(82174079, U1603283)

[作者简介] 赖立勇, 博士研究生, Email: 17301785074@163.com

[通信作者] 岳小强, 博士, 教授, 研究方向: 中西医临床与科研, Email: yuexiaoqiang@163.com; 辛海量, 博士, 教授, 研究方向: 中药资源、品质评价、药理学研究, Email: hailiangxin@163.com

[Key words] Artemisiae Annuae Herba; HPLC; antioxidant; spectrum-effect relationship; pharmacodynamic material basis

中药青蒿为植物菊科黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 的干燥地上部分, 味苦、辛, 性寒, 归肝、胆经, 具有清虚热等功效^[1]。现代研究表明, 青蒿及其所含有关单体成分除了在抗疟疾方面有效外, 在抑菌抗炎、免疫调节和缓解热应激等方面也有效果^[2], 特别是在抗氧化方面, 青蒿亦表现出良好作用^[3]。现有研究表明, 氧化应激与许多疾病联系密切, 过度氧化应激可导致骨质疏松症等疾病^[4]。目前, 对青蒿所含活性成分青蒿素研究较多, 特别是其抗疟、抗氧化等作用受到关注^[5], 但青蒿素之外的其他成分在抗氧化方面亦有活性^[6-9], 应受到重视。本研究进行青蒿抗氧化活性的谱效关系研究, 分析色谱特征峰与 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力的关联性^[10], 探究青蒿所含不同化学成分的抗氧化活性, 以阐明青蒿体外抗氧化活性的药效物质基础, 为青蒿的质量评价和资源开发等提供依据。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪, 包括四元泵、PAD 检测器、自动进样器 (日本岛津株式会社); BT285S 型万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); DL-1000B 型超声波清洗仪 (上海之信仪器有限公司); ELx 800 型多功能酶标仪 (美国 Biotek 公司)。

1.2 试剂

东莨菪内酯 (批号: 20220215)、芹菜素 (批号: 20220216)、木犀草素 (批号: 20220216) 购自上海历鼎生物技术有限公司; 异绿原酸 A (批号: DSTDY054701)、异绿原酸 B (批号: DST210625-037)、异绿原酸 C (批号: DSTDY003802)、滨蒿内酯 (批号: DSTDB003101)、艾黄素 (批号: DST220119-004)、青蒿素 (批号: DSTDQ004702)、青蒿酸 (批号: DST210919-048) 购自成都德思特生物技术有限公司; 所有对照品纯度均 $\geq 98\%$ 。DPPH 自由基清除能力试剂盒 (批号: 20220223)、ABTS 自由基清除能力试剂盒 (批号: 20220224) 购自上海励瑞生物科技有限公司。

1.3 样品

11 批青蒿药材样品信息见表 1, 经海军军医大学药学院生药教研室辛海量教授鉴定为 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分。

表 1 药材样品来源信息

No.	产地	No.	产地
S1	河北邯郸	S7	安徽亳州
S2	安徽亳州	S8	江西赣州
S3	河南驻马店	S9	四川自贡
S4	安徽亳州	S10	河南南阳
S5	湖北恩施	S11	重庆市
S6	安徽亳州		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.2% 磷酸水溶液 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 90%→82.5% A; 5~10 min, 82.5%→75% A; 10~30 min, 75%→62% A; 30~38 min, 62%→58.3% A; 38~43 min, 58.3% A; 43~48 min, 58.3%→55% A; 48~58 min, 55%→40% A; 58~68 min, 40%→20% A; 68~72 min, 20%→18.5% A; 72~80 min, 18.5%→5% A; 80~90 min, 5%→90% A); 流速: 1 ml/min; 柱温: 室温; 检测波长: 220 nm; 进样量: 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取青蒿素、艾黄素、青蒿酸、猫眼草黄素、芹菜素、木犀草素、异绿原酸 C、异绿原酸 A、异绿原酸 B、滨蒿内酯、东莨菪内酯对照品适量, 用甲醇溶解得到浓度分别为 300、31、96、78、16、12、52、134、28、18、86 μg/ml 的混合对照品溶液^[11]。

2.2.2 供试品溶液

药材粉末过 50 目筛后, 精密称取 1.5 g, 精密加入甲醇 50 ml, 记录重量后超声 (600 W, 40 kHz, 50 °C) 提取 50 min, 取出放置冷却至室温后加甲醇至之前的重量, 混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度实验

取“2.2.2”项下编号为 S10 的供试品溶液适量, 按“2.1”项所述条件连续运行 6 次, 计算得到 RSD (色谱峰保留时间) 均小于 0.49%, RSD (峰面积) 均小于 1.93%, 表明本研究所用设备精密度良好。

2.3.2 稳定性实验

取“2.2.2”项下编号为 S10 的供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、12、16、24 h 时按

“2.1”所述条件运行,计算得到RSD(色谱峰保留时间)均小于0.69%,RSD(峰面积)均小于4.67%,说明配制的溶液在1d内具有稳定性。

2.3.3 重复性实验

取编号为S10的青蒿样品粉末1.5g,共6份,精密称定,按“2.2.2”项和“2.1”项下制备供试品溶液并运行,计算得到色谱峰保留时间均小于0.72%,峰面积均小于4.76%,表明该方法重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱的建立和共有峰指认

2.4.1 HPLC 指纹图谱的建立

分别取11批青蒿样品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液10 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样检测后,将获得的HPLC数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版),得到11批青蒿样品的指纹图谱,指认出48个共有峰,见图1、图2。

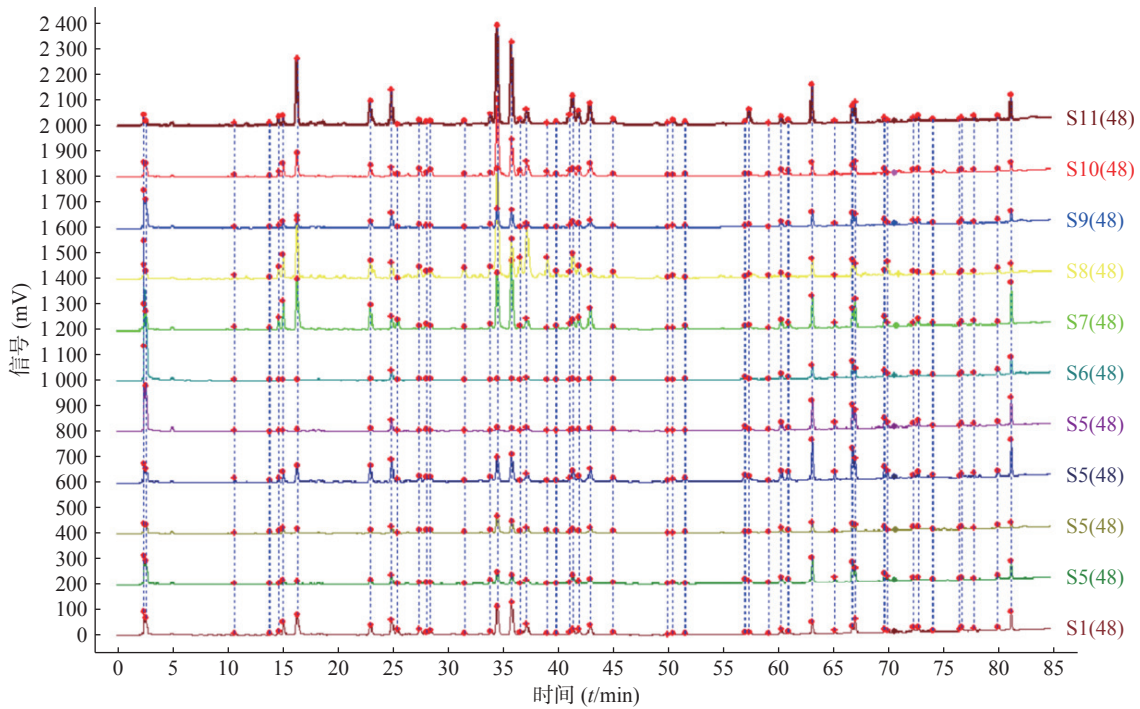


图1 11批中药青蒿样品的HPLC叠加指纹图谱

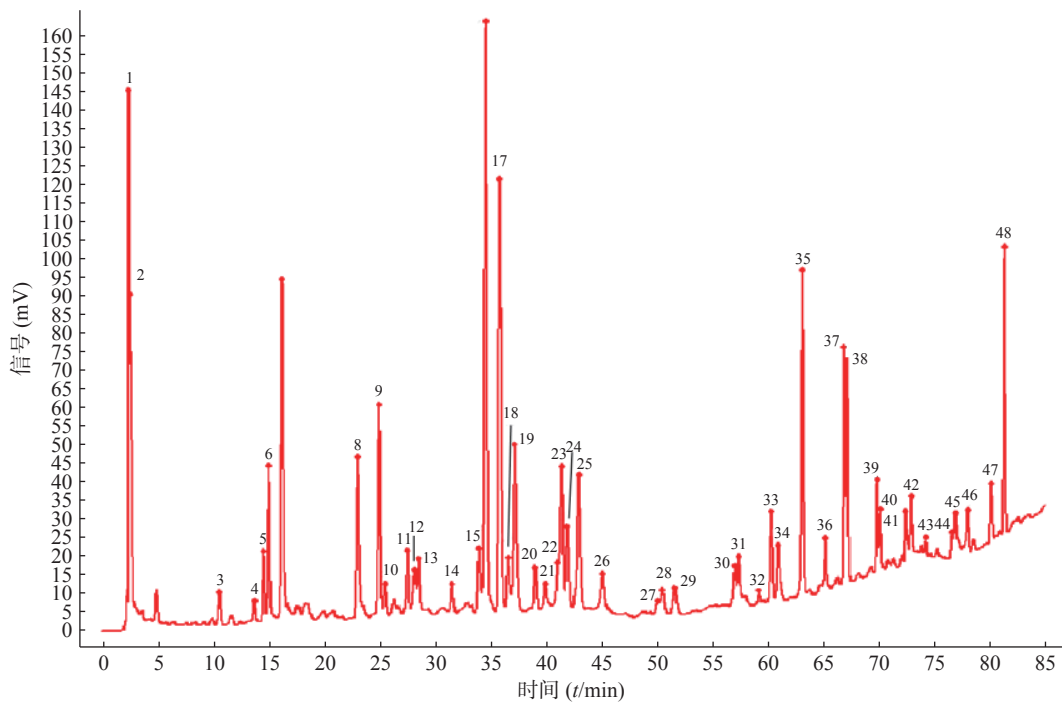


图2 11批中药青蒿样品的HPLC对照图谱

2.4.2 共有峰指认

11批青蒿样品共有48个共有峰,共有峰占总峰比在0.776~0.864之间。选择S10为参照图谱,时间窗宽度设置为0.1 min,采用平均数法,以指纹图谱中峰形较好的色谱峰进行多点校正后生成叠加图谱,即为对照图谱。通过与混合对照品的HPLC分析结果对比,指认出9号峰为东莨菪内酯、14号峰为滨蒿内酯、15号峰为异绿原酸B、

16号峰为异绿原酸A、23号峰为异绿原酸C、31号峰为木犀草素、35号峰为芹菜素、38号峰为猫眼草黄素、39号峰为青蒿素、40号峰为艾黄素、48号峰为青蒿酸,详见图3。图谱显示,异绿原酸A峰面积大且稳定,分离度良好,故对比其保留时间(峰面积),其他峰的相对保留时间(峰面积)=其他峰的保留时间(峰面积)/异绿原酸A的保留时间(峰面积),详见表2、表3。

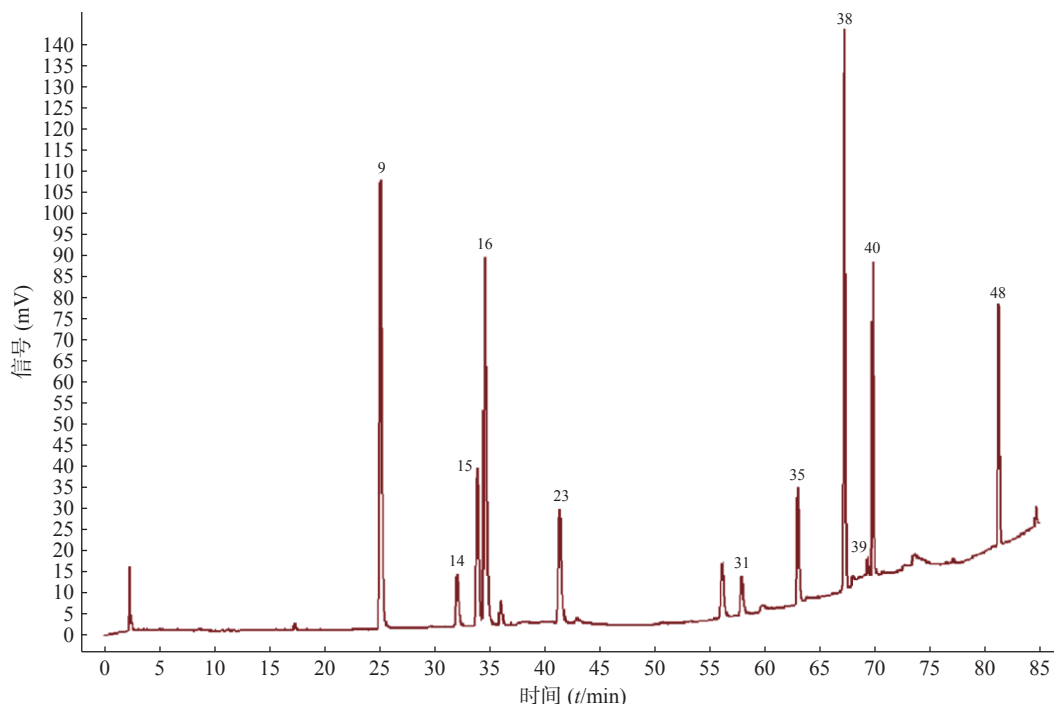


图3 混合对照品的HPLC图

表2 11批中药青蒿样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	RSD(%)
峰1	0.071	0.071	0.071	0.071	0.070	0.070	0.070	0.071	0.070	0.072	0.072	1.060
峰2	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.074	0.075	0.075	0.074	0.075	0.075	0.540
峰3	0.303	0.308	0.308	0.309	0.309	0.309	0.310	0.311	0.310	0.310	0.309	0.680
峰4	0.396	0.401	0.401	0.401	0.400	0.401	0.401	0.402	0.402	0.403	0.402	0.450
峰5	0.418	0.423	0.423	0.424	0.424	0.423	0.424	0.425	0.424	0.425	0.425	0.460
峰6	0.433	0.437	0.437	0.437	0.436	0.436	0.436	0.437	0.437	0.439	0.438	0.340
峰7	0.468	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.473	0.473	0.473	0.473	0.300
峰8	0.662	0.667	0.667	0.667	0.667	0.666	0.667	0.668	0.667	0.668	0.668	0.250
峰9	0.717	0.723	0.723	0.723	0.723	0.722	0.724	0.724	0.724	0.724	0.724	0.280
峰10	0.731	0.739	0.738	0.738	0.741	0.737	0.738	0.738	0.738	0.738	0.740	0.340
峰11	0.794	0.796	0.796	0.796	0.796	0.795	0.797	0.797	0.796	0.797	0.797	0.120
峰12	0.810	0.815	0.815	0.815	0.809	0.814	0.815	0.815	0.814	0.817	0.817	0.310
峰13	0.823	0.825	0.825	0.825	0.825	0.824	0.826	0.827	0.825	0.826	0.826	0.130
峰14	0.912	0.912	0.912	0.913	0.911	0.912	0.914	0.914	0.913	0.913	0.914	0.110
峰15	0.983	0.982	0.983	0.983	0.982	0.982	0.983	0.985	0.982	0.984	0.983	0.100

(续表 2)

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	RSD(%)
峰16	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
峰17	1.038	1.037	1.037	1.037	1.037	1.037	1.037	1.038	1.037	1.038	1.038	0.050
峰18	1.058	1.056	1.058	1.058	1.060	1.060	1.061	1.062	1.060	1.059	1.059	0.160
峰19	1.078	1.079	1.078	1.078	1.075	1.074	1.078	1.079	1.075	1.078	1.079	0.170
峰20	1.133	1.131	1.131	1.131	1.131	1.129	1.130	1.131	1.129	1.132	1.132	0.110
峰21	1.157	1.154	1.157	1.155	1.155	1.156	1.156	1.157	1.154	1.158	1.156	0.110
峰22	1.190	1.190	1.189	1.189	1.190	1.192	1.188	1.189	1.187	1.189	1.192	0.130
峰23	1.199	1.198	1.198	1.198	1.198	1.198	1.199	1.199	1.197	1.198	1.198	0.050
峰24	1.215	1.214	1.214	1.214	1.213	1.213	1.213	1.215	1.212	1.214	1.214	0.070
峰25	1.246	1.244	1.244	1.244	1.243	1.242	1.243	1.244	1.242	1.244	1.245	0.100
峰26	1.307	1.306	1.306	1.307	1.306	1.305	1.306	1.308	1.306	1.306	1.308	0.070
峰27	1.452	1.453	1.450	1.450	1.450	1.450	1.450	1.453	1.449	1.448	1.449	0.110
峰28	1.464	1.462	1.463	1.463	1.464	1.463	1.464	1.465	1.461	1.461	1.460	0.110
峰29	1.497	1.493	1.495	1.495	1.492	1.492	1.495	1.500	1.492	1.494	1.494	0.160
峰30	1.656	1.655	1.656	1.653	1.648	1.645	1.648	1.649	1.647	1.658	1.659	0.300
峰31	1.665	1.665	1.672	1.663	1.659	1.657	1.657	1.658	1.656	1.667	1.667	0.320
峰32	1.718	1.718	1.717	1.716	1.711	1.709	1.710	1.711	1.708	1.719	1.721	0.270
峰33	1.752	1.752	1.751	1.748	1.743	1.738	1.738	1.740	1.739	1.754	1.756	0.400
峰34	1.770	1.770	1.769	1.767	1.762	1.758	1.758	1.759	1.758	1.772	1.775	0.360
峰35	1.833	1.834	1.833	1.830	1.825	1.821	1.821	1.822	1.820	1.835	1.838	0.360
峰36	1.893	1.894	1.893	1.890	1.884	1.879	1.879	1.880	1.879	1.896	1.900	0.420
峰37	1.942	1.943	1.942	1.939	1.932	1.927	1.927	1.928	1.928	1.945	1.949	0.430
峰38	1.950	1.950	1.949	1.946	1.939	1.934	1.934	1.935	1.935	1.953	1.956	0.430
峰39	2.027	2.027	2.026	2.023	2.015	2.010	2.009	2.011	2.011	2.030	2.034	0.460
峰40	2.036	2.036	2.032	2.031	2.024	2.019	2.018	2.016	2.020	2.039	2.043	0.470
峰41	2.102	2.102	2.101	2.097	2.090	2.084	2.084	2.085	2.085	2.105	2.109	0.450
峰42	2.117	2.116	2.114	2.111	2.103	2.097	2.097	2.097	2.098	2.119	2.122	0.470
峰43	2.156	2.155	2.153	2.149	2.141	2.135	2.134	2.135	2.136	2.157	2.161	0.490
峰44	2.226	2.224	2.223	2.219	2.211	2.204	2.204	2.205	2.205	2.226	2.230	0.470
峰45	2.233	2.232	2.230	2.226	2.218	2.212	2.211	2.213	2.212	2.234	2.238	0.470
峰46	2.267	2.265	2.263	2.259	2.250	2.243	2.243	2.244	2.244	2.265	2.270	0.490
峰47	2.329	2.327	2.325	2.321	2.312	2.306	2.304	2.306	2.306	2.328	2.332	0.480
峰48	2.363	2.362	2.36	2.355	2.346	2.339	2.338	2.340	2.340	2.363	2.367	0.490
共有峰/总峰	0.837	0.815	0.778	0.821	0.811	0.834	0.864	0.776	0.823	0.806	0.838	

2.5 抗氧化作用考察

2.5.1 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力标准曲线制作

将试剂盒中 Trolox 溶液按说明稀释成梯度浓度,按说明书加入反应液、不同浓度的 Trolox 溶液,并设置空白对照。反应结束后,在相应波长下测出测定孔吸光度 A_c 、空白孔吸光度 A_k ,自由基清

除率(%)= $(1-(A_c-A_k) \div A_k) \times 100\%$,以浓度(Y)对 DPPH 自由基清除率(X)进行线性回归获得标准回归曲线方程,见表 4,以标准回归曲线方程计算出自由基清除能力。

2.5.2 DPPH 自由基清除能力测定

取 11 批供试品溶液(编号: S1 ~ 11,按“2.2.2”项下方法制备)各 1 ml,加无水甲醇 9 ml 稀释

表 3 11 批中药青蒿样品 HPLC 图谱共有峰的相对峰面积

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	RSD(%)
峰1	0.221	0.718	0.167	0.215	6.001	18.615	0.134	0.037	0.545	0.046	0.033	232.240
峰2	0.539	2.042	0.539	0.505	11.735	36.124	0.337	0.055	1.571	0.192	0.041	223.380
峰3	0.065	0.102	0.060	0.131	0.300	0.356	0.050	0.035	0.070	0.032	0.028	100.170
峰4	0.066	0.061	0.059	0.088	0.121	0.476	0.033	0.015	0.064	0.021	0.026	139.490
峰5	0.134	0.056	0.104	0.130	0.183	0.339	0.145	0.084	0.080	0.054	0.073	64.820
峰6	0.391	0.338	0.288	0.344	0.243	0.408	0.321	0.169	0.271	0.131	0.077	39.430
峰7	0.987	0.201	0.214	0.514	0.385	0.315	0.850	0.405	0.308	0.251	0.482	57.330
峰8	0.375	0.295	0.217	0.584	0.686	0.903	0.376	0.150	0.338	0.143	0.305	59.310
峰9	0.533	0.646	0.316	0.766	2.647	4.610	0.201	0.130	0.674	0.112	0.332	139.510
峰10	0.223	0.058	0.024	0.137	0.259	0.464	0.189	0.008	0.051	0.039	0.023	104.800
峰11	0.225	0.203	0.202	0.236	0.365	0.952	0.079	0.120	0.145	0.112	0.069	101.160
峰12	0.119	0.213	0.234	0.245	0.516	0.872	0.116	0.072	0.117	0.055	0.049	105.050
峰13	0.197	0.181	0.207	0.214	0.376	1.106	0.085	0.107	0.143	0.111	0.061	116.600
峰14	0.055	0.151	0.081	0.096	0.132	0.242	0.064	0.129	0.067	0.047	0.058	57.120
峰15	0.125	0.315	0.186	0.226	0.295	0.477	0.109	0.138	0.179	0.062	0.126	58.660
峰16	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
峰17	1.130	0.724	0.667	1.118	0.879	0.891	1.175	0.356	0.943	0.466	0.849	31.770
峰18	0.104	0.101	0.185	0.115	0.241	0.060	0.089	0.224	0.053	0.108	0.087	51.150
峰19	0.551	0.465	0.406	0.497	1.441	1.610	0.265	0.566	0.291	0.253	0.229	79.600
峰20	0.050	0.093	0.222	0.077	0.080	0.171	0.041	0.214	0.047	0.079	0.029	69.220
峰21	0.086	0.169	0.206	0.138	0.095	0.248	0.085	0.079	0.120	0.066	0.058	50.140
峰22	0.096	0.098	0.081	0.120	0.130	0.177	0.105	0.050	0.112	0.069	0.078	33.720
峰23	0.251	0.842	0.321	0.530	0.626	0.594	0.206	0.256	0.418	0.121	0.353	52.610
峰24	0.237	0.280	0.147	0.286	0.324	0.264	0.244	0.138	0.289	0.122	0.176	30.790
峰25	0.445	0.565	0.441	0.730	0.725	0.619	0.486	0.121	0.558	0.243	0.306	40.560
峰26	0.175	0.211	0.243	0.279	0.427	0.832	0.121	0.107	0.199	0.093	0.120	83.960
峰27	0.050	0.045	0.030	0.090	0.161	0.245	0.056	0.006	0.071	0.028	0.027	95.860
峰28	0.063	0.243	0.054	0.177	0.170	0.123	0.049	0.036	0.127	0.018	0.080	68.020
峰29	0.107	0.125	0.092	0.177	0.361	0.428	0.091	0.015	0.109	0.053	0.041	90.430
峰30	0.080	0.390	0.063	0.298	1.373	1.312	0.065	0.019	0.113	0.026	0.030	148.400
峰31	0.071	0.216	0.066	0.163	0.244	0.216	0.065	0.023	0.100	0.030	0.158	64.710
峰32	0.027	0.071	0.019	0.054	0.303	0.210	0.030	0.014	0.032	0.017	0.018	131.430
峰33	0.160	0.445	0.234	0.380	1.852	2.801	0.146	0.036	0.261	0.087	0.075	151.790
峰34	0.114	0.280	0.166	0.312	0.777	1.295	0.117	0.019	0.159	0.054	0.055	128.230
峰35	0.336	1.630	0.399	1.267	6.102	5.469	0.423	0.117	0.603	0.123	0.317	141.670
峰36	0.070	0.330	0.042	0.260	1.421	1.875	0.063	0.004	0.116	0.013	0.021	167.530
峰37	0.153	0.999	0.269	0.774	3.799	5.304	0.195	0.088	0.399	0.071	0.106	159.420
峰38	0.304	0.702	0.221	0.534	3.139	3.099	0.303	0.068	0.400	0.101	0.143	140.610
峰39	0.090	0.447	0.148	0.331	1.801	2.513	0.123	0.022	0.194	0.042	0.033	159.710
峰40	0.084	0.285	0.091	0.199	1.102	1.365	0.043	0.076	0.122	0.021	0.016	151.000
峰41	0.190	0.366	0.232	0.172	1.131	2.101	0.068	0.033	0.226	0.055	0.039	152.190
峰42	0.157	0.322	0.185	0.229	1.672	2.273	0.121	0.028	0.231	0.047	0.052	155.930

(续表 3)

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	RSD(%)
峰43	0.065	0.137	0.091	0.109	0.535	1.037	0.049	0.017	0.093	0.027	0.027	157.670
峰44	0.059	0.108	0.068	0.049	0.303	0.650	0.019	0.012	0.062	0.017	0.014	156.080
峰45	0.110	0.234	0.138	0.113	0.747	1.344	0.045	0.020	0.135	0.033	0.025	153.940
峰46	0.083	0.114	0.089	0.161	0.705	1.559	0.064	0.024	0.127	0.032	0.049	170.940
峰47	0.108	0.285	0.176	0.201	1.054	2.412	0.039	0.039	0.161	0.037	0.038	175.050
峰48	0.389	0.878	0.171	0.854	4.399	5.353	0.419	0.045	0.356	0.065	0.162	155.94

表 4 自由基标准回归曲线方程

自由基	标准回归曲线方程	R ²
DPPH	$Y=0.0218X+0.0057$	0.9995
ABTS	$Y=0.4476X+0.0124$	0.9947

10 倍;对照孔加入供试品 100 μl、无水甲醇 150 μl,测定孔加入供试品 100 μl、DPPH 工作液 150 μl,空白孔加入供试品 100 μl、DPPH 工作液 150 μl 后混匀,避光室温下静置 0.5 h,于 540 nm 波长处测得对照孔吸光度 A_d ,测定孔吸光度 A_c ,空白孔吸光度 A_k ,DPPH 自由基清除率(%)= $(1-(A_c-A_d) \div A_k) \times 100\%$,供试品 DPPH 自由基清除能力(mmol/L Trolox)=带入标准回归曲线方程所得 Trolox 的浓度 $\times 10$,结果见表 5。11 批青蒿样品中,样品 8(编号:S8)清除 DPPH 自由基的能力最强。

表 5 青蒿抗氧化活性检测

编号	DPPH清除能力 (mmol/L Trolox)	ABTS清除能力 (mmol/L Trolox)
S1	2.725	6.243
S2	1.336	2.025
S3	2.765	4.521
S4	3.110	7.190
S5	1.617	2.848
S6	0.970	0.853
S7	5.057	8.641
S8	6.477	10.453
S9	2.025	2.575
S10	4.731	8.313
S11	5.321	9.848

2.5.3 ABTS 自由基清除能力测定

取 11 批供试品溶液(编号:S1~11,按“2.2.2”项下方法制备)各 1 ml,加无水甲醇 9 ml 稀释 10 倍;对照孔加入供试品 100 μl、无水甲醇 150 μl,测定孔加入供试品 100 μl、ABTS 工作液 150 μl,空白孔加入无水乙醇 100 μl、ABTS 工作液 150 μl,混匀置于室温反应 6 min,于 405 nm 波长处测得对照

孔吸光度 A_d ,测定孔吸光度 A_c ,空白孔吸光度 A_k ,DPPH 自由基清除率(%)= $(1-(A_c-A_d) \div A_k) \times 100\%$,供试品 ABTS 自由基清除能力(mmol/L Trolox)=代入标准回归曲线方程所得 Trolox 的浓度 $\times 10$,结果见表 5。11 批青蒿样品中,样品 8(编号:S8)清除 ABTS 自由基的能力最强。

2.6 谱效关系分析

将表 5 青蒿抗氧化活性结果和表 3 的相对峰面积数据导入 SIMCA 14.1 软件构建 PLSR 模型。结果显示,峰 3~峰 8、峰 10~峰 27、峰 29、峰 32~峰 34、峰 38、峰 40、峰 42~峰 43、峰 46 与 DPPH 自由基清除率呈正相关;峰 3~峰 29、峰 31~峰 35、峰 38、峰 40、峰 42~峰 44、峰 46、峰 48 与 ABTS 自由基清除率呈正相关,结果见图 4。

变量投影(VIP)用于评估每个自变量对因变量的重要性,VIP>1 表明自变量对因变量的贡献有显著性。筛选出对自由基清除能力呈正相关,且 VIP>1 的峰。结果显示,青蒿药材样品已明确成分中对 DPPH 自由基清除能力的贡献大小依次为异绿原酸 A(16 号峰)>异绿原酸 B(15 号峰)>滨蒿内酯(14 号峰)>异绿原酸 C(23 号峰);青蒿药材样品已明确成分中对 ABTS 自由基清除能力的贡献大小依次为异绿原酸 A(16 号峰)>异绿原酸 B(15 号峰)>异绿原酸 C(23 号峰)>滨蒿内酯(14 号峰),提示相应成分与青蒿抗氧化能力呈正相关,结果见图 5。

3 讨论

利用 HPLC 法测定青蒿药材样品的图谱,能准确、稳定地检测青蒿中的多种有效成分。实验前期研究发现,在乙腈-0.1% 磷酸水、甲醇-0.1% 磷酸水等流动相中,甲醇-0.1% 磷酸水为流动相的分离效果最优,但青蒿素和艾黄素的分离度不佳;随后将水相改为 0.2% 磷酸水后,分离度得到了提高。研究前期考察了多个波长下各成分的显峰情况,发现在高波长下青蒿素不显峰,故最后选择 220 nm 为

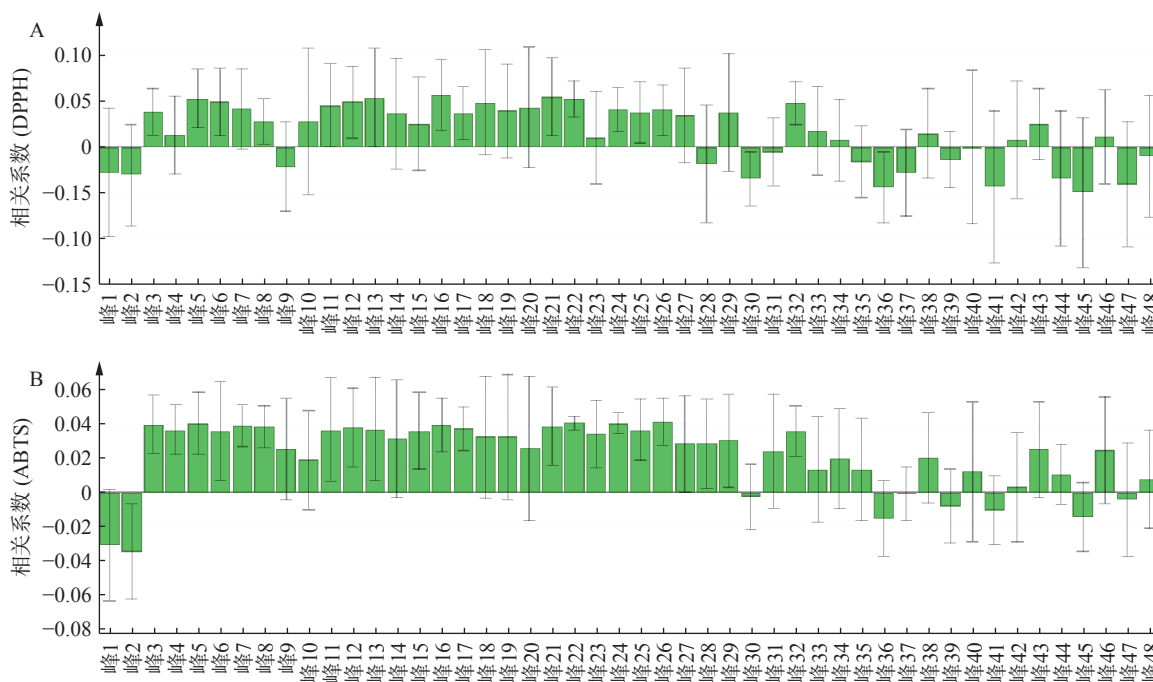


图4 各共有峰相关系数

A. 清除 DPPH 自由基; B. 清除 ABTS 自由基

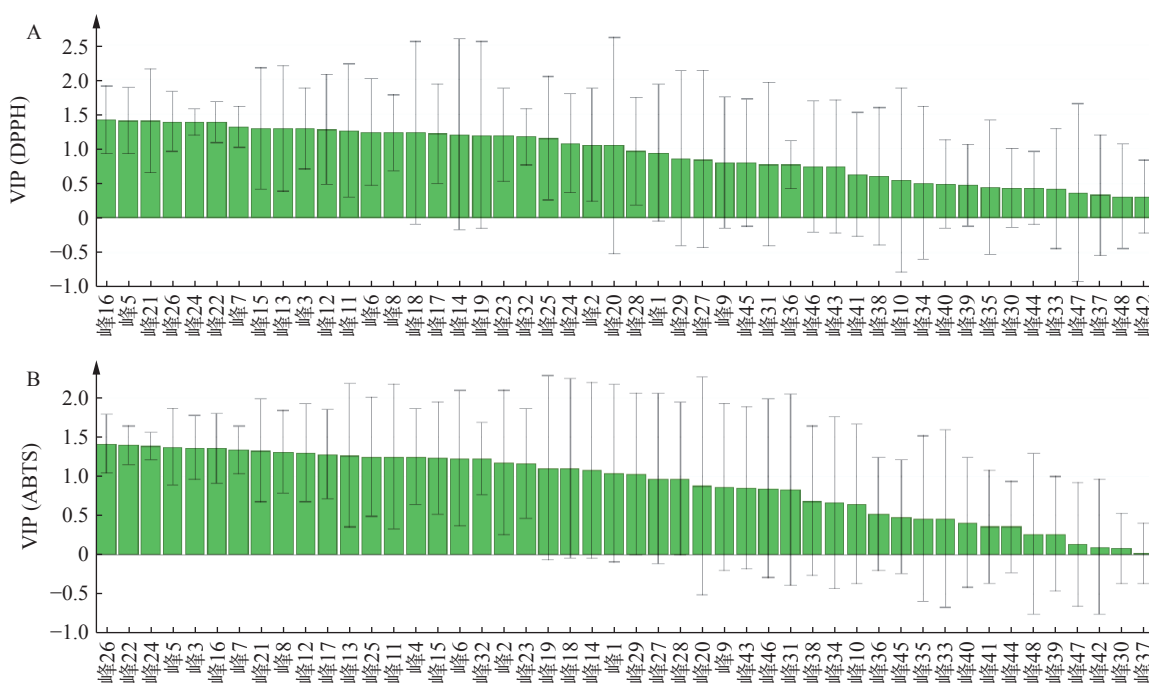


图5 各共有峰的VIP值

A. 清除 DPPH 自由基; B. 清除 ABTS 自由基

指纹图谱波长,但低波长时显峰较多,在一定程度上影响了几种已知成分的VIP值。

本研究以11批不同地区青蒿为研究对象,采用HPLC法研究其各共有峰与体外抗氧化能力之间的关系,探究青蒿体外抗氧化作用的药效物质基础。结果显示,异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C和滨蒿内酯与自由基清除率呈正相关,提示这

些成分是青蒿体外抗氧化的药效物质基础。青蒿素是青蒿中的重要成分,有文献研究发现其具有抗氧化的作用^[12],也有文献研究发现其可以激活氧化应激^[13],而本研究发现青蒿素的抗氧化作用并不明显。推测原因可能在于本研究所用的是基于清除自由基的抗氧化测试方法,青蒿素可能是通过清除自由基之外的途径起到抗氧化作用^[14],仍有待今后

深入研究。

【参考文献】

- [1] 张兴. 认识身边的中药: 青蒿 [J]. 中医健康养生, 2021, 7(4): 26-27.
- [2] 徐明霞. 青蒿素及其衍生物在动物生产中的应用研究 [J]. 饲料研究, 2021, 44(4): 147-149.
- [3] SKOWYRA M, GALLEGRO M G, SEGOVIA F, et al. Antioxidant properties of Artemisia annua extracts in model food emulsions[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2014, 3(1): 116-128.
- [4] 赖立勇, 徐圣焱, 夏天爽, 等. 基于抗氧化机制的中药及其化学成分在骨质疏松中的应用 [J]. 海军军医大学学报, 2022(8): 943-950.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典—一部: 2020年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [6] 张秋红, 朱子微, 李晋, 等. 中药青蒿化学成分与种植研究现状 [J]. *中国医药导报*, 2011, 8(19): 10-12.
- [7] WANG Q, XIAO L. Isochlorogenic acid A attenuates acute lung injury induced by LPS via Nf- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(11): 7018-7026.
- [8] SROKA Z, CISOWKI W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids[J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(6): 753-758.
- [9] WITAICENIS A, SEITO L N, DA SILVEIRA CHAGAS A, et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(3): 240-246.
- [10] 刘晓燕, 蒋益萍, 张嘉宝等. 啤酒花的 HPLC 指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究 [J]. *中国药房*, 2020, 31(02): 138-143.
- [11] 朱亚莹, 吴啟南, 段慧芳等. 青蒿 UPLC 指纹图谱的建立与多种成分含量测定 [J]. *中药材*, 2019, 42(10): 2323-2329.
- [12] YAN F X, WANG H T, GAO Y, et al. Artemisinin protects retinal neuronal cells against oxidative stress and restores rat retinal physiological function from light exposed damage[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8(8): 1713-1723.
- [13] EFFERTH T. From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 46: 65-83.
- [14] JONE D P. Radical-free biology of oxidative stress[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(4): C849-68.

[收稿日期] 2022-11-07 [修回日期] 2024-01-26
[本文编辑] 李春德