

· 研究进展 ·

化学发光法测定中药抗氧化活性研究进展

查祎凡^{1,2}, 聂黎行^{1*}, 于健东^{1*}, 戴忠¹, 马双成¹ (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 中国药科大学, 南京 211198)

摘要: 抗氧化活性是中药的重要药效之一, 化学发光法 (CL) 是有力的评价手段, 具有灵敏度高、线性范围宽、重现性好等优点。本文对近10年来化学发光法在中药抗氧化活性评价中的应用进行了综述, 涉及多种中药材和中成药, 包括直接测定和流动注射法 (FIA) 测定自由基清除率, 与毛细管色谱 (CE) 和高效液相色谱 (HPLC) 联用筛选抗氧化活性成分, 并辅以质谱鉴定结构。最后, 展望化学发光法在中药质量评价中的应用前景。

关键词: 化学发光; 中药; 抗氧化; 自由基

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)01-0032-09

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.01.006

Research Progress of Determination of Antioxidant Activity of Traditional Chinese Medicine by Chemiluminescence Method

Zha Yifan^{1,2}, Nie Lixing^{1*}, Yu Jiandong^{1*}, Dai Zhong¹, Ma Shuangcheng¹ (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: Antioxidant activity is one of the important pharmaceutical effects of traditional Chinese medicine (TCM). Chemiluminescence (CL) is a better evaluation method with high sensitivity, wide linear range and good reproducibility. In this paper, the application of CL in the evaluation of antioxidant activity of TCM in recent 10 years was reviewed, involving a variety of Chinese medicinal materials and Chinese patent medicines. Direct assay and flow injection analysis (FIA) were used to determine free radical scavenging rate. Capillary electrophoresis (CE) was combined with high performance liquid chromatography (HPLC) to screen antioxidant active ingredients. The structure was identified by mass spectrometry. Finally, application of CL in the quality evaluation of TCM was prospected.

Keywords: chemiluminescence; traditional Chinese medicine; antioxidant; free radical

人体的许多疾病与机体的氧化损伤有关。因此, 寻找具有抗氧化活性的化合物、清除体内的自由基显得尤为重要, 而中药的抗氧化成分以其低毒、高效、价廉的优势成为近年来的研究热点。化

学发光 (Chemiluminescence, CL) 反应是指反应体系中的物质吸收了反应释放的化学能, 电子从基态跃迁至激发态, 再以光辐射的形式释放能量回到基态的过程。化学发光分析法是通过分析化学发光反

基金项目: 国家自然科学基金 (编号81303194); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金 (编号2017X1); 国家中医药管理局“中药标准化建设”项目 (编号ZYBZH-C-JS-32)

作者简介: 查祎凡, 在读硕士; Tel: (010) 67095282; E-mail: chayifan@163.com

通信作者: 聂黎行, 副研究员; 研究方向: 中药质量控制、中药标准物质研制、光谱技术评价药品质量; Tel: (010) 67095282;

E-mail: nielixing@163.com

于健东, 主任药师; 研究方向: 中药分析; Tel: (010) 67095282; E-mail: yujiandong@nifdc.org.cn

应中辐射光强度大小来确定反应体系中某种物质浓度的方法。目前,常用于中药抗氧化成分的分析方法除化学发光法外,还有二苯代苦味肼基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)法、氧化自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)法和铁离子还原/抗氧化能力(Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)法等。它们都是利用待测物与某类自由基反应,通过测定反应后剩余的自由基或产物来评价待测物的抗氧化性。DPPH法、ORAC法和FRAP法通过紫外-可见分光光度计或荧光分光光度计直接测定DPPH、荧光素钠和 Fe^{2+} -三吡啶三嗪发光,操作快速简便,但是,具有较强的光吸收特性或荧光(淬灭)特性的物质会干扰测定结果。化学发光法不需要外界提供能量,可避免背景光和杂散光的干扰,具有灵敏度高、线性范围宽、无光散射的干扰、重现性好、仪器简单和分析速度快等优点,近年来,广泛用于中药抗氧化活性的评价,但是,全面、系统的论述尚未见报道。本文对2008-2017年采用化学发光法测定中药抗氧化活性的文献进行综述,以期对相关研究提供参考。

1 常见化学发光体系和原理

生物体内自由基主要有活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)、半醌类自由基、氮自由基、碳自由基、硫自由基等,其中活性氧在生理活动中发挥着最重要的作用。广义的活性氧泛指含氧的反应活性高的化合物,狭义的活性氧主要是指4种高反应性的氧分子,即超氧阴离子($\text{O}_2^- \cdot$)、羟基自由基($\text{OH} \cdot$)、过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧($^1\text{O}_2$)。凡是能抑制各种化学发光体系产生自由基的药物都可以抑制体系的化学发光,测量体系的发光强度改变就可间接地了解药物的抗氧化功效。常用的化学发光试剂有鲁米诺、吖啶酯、过氧化草酸酯、荧光素等,中药抗氧化活性测定中以鲁米诺应用最广。鲁米诺(5-氨基-2,3-二氢-1,4-二杂氮萘二酮)属于酰肼类有机化合物,结构简单、容易合成、水溶性好、无毒、不污染环境,是最常用的化学发光试剂之一。在碱性条件下可以被多种氧化剂氧化成激发态的3-氨基邻苯二甲酸盐,在回到基态时发出蓝光。常用的氧化剂有过氧化氢、铁氰化钾、高锰酸钾等。某些酶类催化剂可以提高氧化反应速率,如辣根过氧化物酶、过氧化氢酶、

黄嘌呤氧化酶、细胞色素C、血红蛋白等。 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 等过渡金属离子则可以极大提高化学发光反应强度。常见的几种鲁米诺发光体系的原理如下。

1.1 过氧化氢-鲁米诺体系

鲁米诺-过氧化氢化学发光反应是应用最为广泛的鲁米诺体系。 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 和 Fe^{2+} 等过渡金属离子对鲁米诺-过氧化氢化学发光反应有很好的催化作用,这一特点使得该化学发光反应获得广泛的应用。20世纪70年代, Burdo T G等^[1]就提出了金属离子与鲁米诺-过氧化氢化学发光反应的机理。 M^{n+} 先与 HO_2^- 配位,生成的配合物再与鲁米诺发生氧化反应, M^{n+} 失去一个电子变成 M^{n+1} ,鲁米诺则被氧化成鲁米诺游离基。随后,鲁米诺游离基进一步被 H_2O_2 氧化成氨基邻苯二甲酸根离子产生化学发光。 NaCl 也会增强鲁米诺-过氧化氢化学发光反应强度, Cl^- 在氧化剂作用下可以产生 Cl_2 或者是新生态氯,氧化性提高,可能增强化学发光强度,类似的 Br^- 增强化学发光效果更好。 Li A 等^[2]研究发现表面活性剂十二烷基苯磺酸钠(Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate, SDBS)对鲁米诺-过氧化氢化学发光强度有增强作用,发光体依然是激发态的鲁米诺氧化产物,表面活性剂并没有参与反应。

1.2 邻苯三酚-鲁米诺体系

邻苯三酚在碱性条件下不稳定,自氧化产生 $\text{O}_2^- \cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 与鲁米诺反应使之氧化,产生一个电子激发态的中间体,回到基态时发光。

1.3 铁氰化钾-鲁米诺体系

Shevlin P B等^[3]对鲁米诺和铁氰化钾的反应机理进行了详细的研究,提出鲁米诺与铁氰化钾的氧化还原反应为单电子氧化过程,鲁米诺阴离子被铁氰化钾氧化后生产中间态的鲁米诺自由基,中间态的阴离子自由基进一步被溶解氧氧化产生激发态的氨基邻苯二甲酸离子,在返回基态时产生化学发光。若没有溶解氧的参与,发生无发光反应。在铁氰化钾的存在下,亚铁氰化钾可以降低鲁米诺化学发光强度,因此,在实验过程中常会选择合适浓度的亚铁氰化钾来降低背景信号。 Na F 等^[4]发现当鲁米诺和铁氰化钾反应结束后,加入 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 或 Zn^{2+} 可以重新发生化学发光反应,也就是二次发光。

1.4 黄嘌呤/次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶-鲁米诺体系

黄嘌呤氧化酶在有氧条件下,催化底物黄嘌呤或次黄嘌呤发生氧化反应生成尿酸,并生成 $O_2^- \cdot$ 等自由基。这些自由基进一步与化学发光剂鲁米诺反应,使后者激发,在返回基态时产生化学发光。

1.5 过氧亚硝基-鲁米诺体系

过氧亚硝基(Peroxynitrite, $ONOO^-$)是生物体内有一氧化氮(NO)和超氧阴离子($O_2^- \cdot$)快速结合生成的一种生物活性分子,具有强氧化性和硝化性质。鲁米诺可被过氧亚硝基氧化而处于电子激发态,当其由激发态回到基态时就辐射出蓝色光。

2 化学发光法在中药抗氧化活性测定中的应用

2.1 简单化学发光反应测定中药抗氧化活性

最简单的化学发光法应用是将发光试剂和待测物直接混合进行化学反应,通过记录发光强度的变化值,评价待测物的抗氧化活性。中药的抗氧化作用一般表现为对发光强度的抑制能力,检测到的化学发光信号越弱,表明待测样品的抗氧化能力越强,通常以清除率或半抑制浓度(Half Maximal Inhibitory Concentration, IC_{50})来表征。

清除率(%) = $[(\text{阴性对照光强} - \text{样品光强}) / (\text{阴性对照光强} - \text{空白背景值})] \times 100\%$ 。以待测样品的浓度为横坐标,相应清除率为纵坐标,绘制浓度-清除率曲线图,当清除率为50%时样品的浓度为 IC_{50} 。

俞培忠^[5]采用邻苯三酚-鲁米诺体系测定红景天苷及其苷元酪醇 $O_2^- \cdot$ 的清除率。试管中先后加入碳酸盐缓冲液(Carbonate Buffer Solution, CBS)(0.1 Mm, pH 10.3) 300 μ L,鲁米诺溶液(1.0 Mm) 100 μ L,样品溶液50 μ L,邻苯三酚溶液(1 mmol \cdot L⁻¹) 50 μ L,振荡6 s后测得酪醇清除率略高于红景天苷,说明红景天苷的抗氧化活性与苷元有关。舒希凯^[6]分别采用邻苯三酚-鲁米诺、过氧化氢-鲁米诺、 Fe^{2+} -过氧化氢-鲁米诺体系考察了3种干燥方法处理的芍药花50%醇提取物对 $O_2^- \cdot$ 、 H_2O_2 、OH \cdot 的清除率。以抗坏血酸为阳性对照,依次加入鲁米诺溶液4 mL、样品0.5 mL、氧化溶液0.2~0.4 mL,光电倍增管高压800 V,记录200~400 s内的发光积分强度,计算 IC_{50} 。结果

IC_{50} 阴干<烘干<冻干,与总酚和总黄酮含量呈正相关。Benchenouf A等^[7]采用 Co^{2+} -过氧化氢-鲁米诺体系测定枸杞不同部位(样品经正己烷脱脂,二氯甲烷和甲醇提取,提取液经液液萃取分为甲醇、乙酸乙酯和正丁醇部位)OH \cdot 的清除率。样品池中加入含有 $CoCl_2$ (2 mg \cdot mL⁻¹)和EDTA(10 mg \cdot mL⁻¹)的鲁米诺溶液(0.56 mM) 100 μ L,硼酸缓冲液控制pH 9,加入提取物溶液,混合15 s,再加入 H_2O_2 (5.4 mM) 25 μ L开始反应。结果显示乙酸乙酯部位的抗氧化活性最强。Lee J C等^[8]采用过氧化氢-鲁米诺体系揭示了雪莲醇提物的抗氧化活性。鲁米诺溶液(磷酸盐缓冲液调pH值至7.4) 0.1 mL和样品溶液0.2 mL混合120 s后加入 H_2O_2 溶液0.1 mL,记录300 s内的累积发光强度。雷利芳^[9]使用微孔板式生物化学发光仪测定覆盆子水提取物对3种自由基的清除能力。将样品稀释后加于微孔中,再将氧化剂和鲁米诺分别引入分析系统,振板混匀使之快速反应,记录发光信号。对3种体系的条件进行优化,当pH值为9.2,鲁米诺、 H_2O_2 浓度分别为 4×10^{-5} mol \cdot L⁻¹和0.48%时,清除 H_2O_2 能力最强;鲁米诺、邻苯三酚、NaOH浓度分别为 1×10^{-4} 、 2.5×10^{-4} 、 6.0×10^{-3} mol \cdot L⁻¹时,清除 $O_2^- \cdot$ 的能力最强;鲁米诺、 $CuSO_4$ 、 H_2O_2 浓度分别为 5×10^{-6} mol \cdot L⁻¹、 7×10^{-8} mol \cdot L⁻¹、0.24 %时,清除OH \cdot 的能力最强。结果显示覆盆子水提取物对这3种自由基均有明显的抑制作用。岳鹏飞等^[10]采用基于中性粒细胞呼吸爆发效应抑制作用的生物化学发光检测技术评价复方丹参滴丸体外释放行为。大鼠中性粒细胞与刺激物(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)接触,激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH)产生大量活性氧自由基,即呼吸爆发。氧自由基被鲁米诺捕获产生化学发光,如在反应体系中加入能够抑制呼吸爆发的药物,则化学发光强度减弱。将多形核中性粒细胞(PMN)与鲁米诺置于37 $^{\circ}$ C发光池中孵育10~12 min,监测其自发光过程(5 s计数一次),以辅料为空白,加入不同时间点的复方丹参滴丸溶出液,继续测定5 min,再加入PMA刺激剂,继续测定15~20 min。药物对PMN细胞呼吸爆发效应抑制能力以刺激后发光值与PMN自发光稳定值的差值表征。进一步绘制体外抑制中性粒细胞呼吸爆发

效应(I%)–药物释放时间(T)的释放动力学曲线。复方丹参滴丸10 min即达到抑制中性粒细胞呼吸爆发效应的峰值,基本释放完全,结果与基于指标成分的化学分析方法获得的释放曲线一致。

2.2 流动/顺序注射化学发光分析法测定中药抗氧化活性

大多数化学发光非常微弱,且反应速度很快,手工操作重现性差,采用流动注射(FI)进样可提高测定的重现性,不需要达到化学平衡的状态下就能进行操作,实现自动连续分析。在流动注射分析(Flow Injection Analysis, FIA)的基础上,又发展了顺序注射(Sequential Injection, SI),多通道选择阀分别与检测器、样品、试剂等通道相连,试剂与试样由于径向扩散和轴向对流作用混合一定时间后推至检测器。与传统的流动注射分析相比,顺序注射可以用同一装置完成不同项目的分析而无需改变流路设置^[11]。

李玉亮^[12]分别采用黄嘌呤–黄嘌呤氧化酶–鲁米诺和 Co^{2+} –过氧化氢–鲁米诺体系比较了川芎水、醇提取物对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 $\text{OH}\cdot$ 的清除率。将鲁米诺、催化剂[黄嘌呤氧化酶或 $\text{Co}(\text{II})$ –EDTA]和样品溶液混合后振荡,再加入氧化剂(黄嘌呤或过氧化氢),记录60 s内化学发光动力学曲线,计算 IC_{50} 。结果表明水提取物抗氧化活性优于醇提取物。Fan H等^[13–14]采用 Co^{2+} –过氧化氢–鲁米诺体系发现黑风藤和破布叶的茎干中的抗氧化成分分别为kanakugiol和表儿茶酸。 Co^{2+} 、鲁米诺和 H_2O_2 溶液浓度为 $7.12 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.28 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.8 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CBS控制pH值为9.0。刘彩虹等^[15–16]研究金钱草提取物(75%乙醇提取石油醚萃取)和款冬花多糖的抗氧化性能。以维生素C(Vitamin C, VC)为阳性对照,分别采用邻苯三酚–鲁米诺、亚铁氰化钾–过氧化氢–鲁米诺、过氧化氢–鲁米诺体系测定清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 $\text{OH}\cdot$ 、 H_2O_2 的能力。仪器条件:延迟时间20 s,测量时间15 s,增益1,采样速度 $20 \text{次}\cdot\text{s}^{-1}$,用 NaHCO_3 – Na_2CO_3 缓冲液控制pH 10左右。泵速和负高压对发光强度和稳定性影响显著,经优化,3个发光体系主副泵的泵速分别为40和 $40 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 40和 $30 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30和 $20 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$; 3个体系的负高压分别为600、400、500 V。结果显示金钱草提取物和款冬花多糖均具有一定的抗氧化性能,前者对3种自由基的清除能力依次为 H_2O_2

$> \text{OH}\cdot > \text{O}_2^{\cdot -}$,后者对3种自由基的清除能力依次为 $\text{OH}\cdot > \text{H}_2\text{O}_2 > \text{O}_2^{\cdot -}$ 。贾巧^[17]以VC为阳性对照,分别采用硫酸亚铁–过氧化氢–鲁米诺和鲁米诺–邻苯三酚体系测定桑白皮多糖和黄酮及8种丹参制剂对 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除率。先将催化剂、氧化剂和样品溶液混合,再经六通阀引入鲁米诺,该混合模式能有效消除背景干扰。优化后实验条件如下:鲁米诺和邻苯三酚浓度分别为 0.025 、 $0.12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, H_2O_2 和邻苯三酚浓度分别为 0.048% 、 $0.04 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Fe^{2+} 浓度为 $0.02 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,缓冲液pH 10.5,主副泵同步转速 $40 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,负高压780 V。结果桑白皮多糖的清除能力小于VC,桑白皮黄酮的清除能力大于VC。心脑血管胶囊清除 $\text{OH}\cdot$ 能力最强,脑心通胶囊最弱。复方丹参滴丸清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 能力最强,脑心通胶囊最弱。柏桦^[18]采用类似方法,分别采用过氧化氢–鲁米诺和黄嘌呤–黄嘌呤氧化酶–鲁米诺体系考察了11种中药(川芎、当归、丹参、黄精、黄芪、红景天、山药、生地、太子参、五味子和玉米须)70%乙醇提取物对 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除率。川芎、丹参、红景天和玉麦须醇提取物清除 OH 能力较强,黄精和生地的清除 OH 能力则相对较弱。川芎、丹参、太子参和玉麦须醇提取物表现出较强的清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 能力,而黄精和生地对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除能力相对较弱。董顺福等^[19]采用邻苯三酚–鲁米诺发光体系对丹参、黄芪和人参的总黄酮提取液的抗氧化活性进行了比较,结果总黄酮抗氧化活性顺序为丹参 $>$ 黄芪 $>$ 人参。史妮^[20]采用过氧化氢–鲁米诺发光体系证明了蜜炙可增强黄芪的抗氧化活性。赵芳等^[21]采用邻苯三酚–盐酸肾上腺素发光体系,评价杭白菊、马齿苋、槲皮素和芦丁对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 自由基的清除率,结果芦丁清除作用大于槲皮素,杭白菊清除作用大于马齿苋。Yao H^[22]使用酶标仪创建了基于1,1–二苯基–2–三硝基苯胍–鲁米诺和过氧化氢–鲁米诺体系的中药抗氧化活性组分高通量筛选平台。以黄芩苷为阳性对照,考察了11种药材(黄芩、射干、枳实、忍冬藤、红花、蒲黄、罗布麻叶、金银花、葛根、枳壳、菊花)总黄酮苷的抗氧化活性。注射泵1将氧化剂 $100 \mu\text{L}$ 加入预先加入了 $10 \mu\text{L}$ 待测物的96孔板中,振荡10 s后静置5 min;注射泵2将鲁米诺溶液加入到各个96孔板孔中。每注射1孔,仪器自动将板孔移动到光纤检测探头下检测化学发光强

度(检测时间为0.1 s)。经优化, H_2O_2 和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼浓度分别为0.1%和 1.0×10^{-5} M, 鲁米诺浓度为 1.0×10^{-4} M时, 发光最强。除忍冬藤外, 其余药材的总黄酮均对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼有清除作用, 清除率由大到小依次为黄芩>菊花>葛根>金银花>罗布麻叶>红花>射干>蒲黄>枳壳>枳实>忍冬藤; 当浓度为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 黄芩、红花、罗布麻叶、金银花和菊花 H_2O_2 清除率超过90%, 黄芩>罗布麻叶>金银花>菊花>蒲黄>红花>枳壳>葛根>射干>枳实>忍冬藤。该方法灵敏度高、线性范围宽、基质干扰小、试剂消耗少、操作简便, 可实现大批量样本的快速筛选。姚宏^[23]采用相同方法发现血塞通注射液及其所含12个人参皂苷(R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{g2} 、 R_{h1} 、 R_c 、 R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 、 R_d 、 $20(S)-R_{g3}$ 和 $20(R)-R_{g3}$)均具有一定的直接抗氧化和清除自由基活性, 与浓度呈一定程度的负相关, 尤其是低浓度的 R_{b1} 和 R_{b2} , 清除自由基活性强于血塞通注射液及其它皂苷成分, 与H9C2心肌细胞过氧化氢损伤模型筛选结果一致。戚雯欣^[24]测定了七种中药(黄芪、甘草、绞股蓝、当归、何首乌、五味子和银杏叶)在 Co^{2+} -过氧化氢-鲁米诺体系中 $OH \cdot$ 的清除率。首先吸入样品- $Co(II)/EDTA(1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 混合溶液, 而后吸入 H_2O_2 溶液($5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 最后吸入鲁米诺溶液($3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。区带体积为 $50 \mu\text{L}$, 流速为 $70 \mu\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 。结果显示五味子、何首乌和绞股蓝对 $OH \cdot$ 清除率达90%以上, 银杏叶的滤渣与滤液 $OH \cdot$ 清除能力没有明显差别。作者还提出了碱性条件下采用硫代硫酸钠-鲁米诺体系测定 $O_2^- \cdot$ 清除率的新方法, 结果显示甘草和当归对 $O_2^- \cdot$ 自由基清除率达90%以上, 甘草、当归和银杏叶的滤渣与滤液相比, 对 $O_2^- \cdot$ 清除能力没有明显减弱。

2.3 高效液相色谱化学发光联用法(HPLC-CL)测定中药抗氧化活性

中药为多组分复杂体, 传统方法对化学成分逐一分离、鉴定并评价抗氧化性, 步骤繁琐、费时。将化学发光检测器与HPLC等技术联用, 样品经分离后进入T型管与氧化剂和发光剂反应, 记录发光信号, 可以将高效分离手段与高灵敏的检测技术相结合, 使复杂组分经过色谱柱逐一分离, 进行抗氧化活性的测定和评价。在此基础上, 再辅以液

质(HPLC-MS)鉴定, 可进一步明确抗氧化成分的结构。

Yi L I等^[25]采用过氧化氢-鲁米诺体系研究冠心宁注射液中15种酚酸的抗氧化活性。样品经XB- C_{18} 色谱柱分离, 甲醇-0.8%甲酸洗脱, 鲁米诺和 H_2O_2 溶液浓度分别为 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 蠕动泵流速 $45 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 流通池用碳酸盐缓冲液控制pH 10.0。15种酚酸自由基清除能力依次为咖啡酸>1,3-二咖啡酰奎宁酸>绿原酸>3-O-咖啡酰奎宁酸>阿魏酸>迷迭香酸>异缬草酸C>原儿茶醛>丹酚酸A>异缬草酸A>丹酚酸B; 丹参素>迷迭香酸; 4-O-咖啡酰奎宁酸>1,3-二咖啡酰奎宁酸>绿原酸>3-O-咖啡酰奎宁酸。丹参素、原儿茶醛和迷迭香酸是冠心宁注射液的主要抗氧化成分。Sun S等^[26]采用相同体系筛选喘可治注射液中的抗氧化活性成分。样品经Kromasil C_{18} 色谱柱分离, 乙腈-水梯度洗脱。结果(+)-cycloolivil抗氧化活性最强, (-)-olivil-4'-O-glucopyranoside次之, 柔藿苷、宝藿苷V、淫羊藿苷A无抗氧化活性。Wang R^[27]、Wu L^[28]、Sun S^[29]、Xie G Y等^[30]采用HPLC-DAD-CL技术, 辅以HPLC-MS鉴定, 筛选中药抗氧化成分。结果黄芩中抗氧化成分按清除率由高到低分别为黄芩苷、黄芩素、去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖酸、5,7,2',5'-四羟基-8,6'-二甲氧基黄酮、去甲汉黄芩素、白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-葡萄糖、5,7,3,2',6'-五羟基黄烷酮、5,7,3,2',6'-四羟基黄酮^[27]; 单药味自由基清除率低于生脉散总提取物, 说明生脉散的抗氧化活性可能源于煎煮过程药物相互作用, 其主要抗氧化活性成分为含酚羟基的联苯环辛二烯型木脂素^[28]; 咖啡酸酯和双环氧型木脂素糖苷是野木瓜的主要抗氧化成分^[29]; 射干的3种原植物(射干、鸢尾和白射干)中含有的鸢尾甲黄素异黄酮苷及其异构体具有较强的自由基清除活性^[30]。Chang YX^[31-32]采用过氧化氢-鲁米诺和邻苯三酚-鲁米诺体系建立了丹参注射液的活性指纹图谱。样品经Extend C_{18} 色谱柱分离, 0.1%磷酸-乙腈梯度洗脱。自由基清除活性强的色谱峰经HPLC-MS鉴定为3,4-二羟基苯基乳酸、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A、丹酚酸C和丹酚酸H。Ding XP^[33]等采用HPLC-DAD-CL法筛选银杏叶提取物的抗氧化成分。样品经LiChrospher

C₁₈色谱柱分离, 0.1%磷酸-乙腈梯度洗脱, 蠕动泵控制流速1.1 mL·min⁻¹。过氧化氢-鲁米诺体系中鲁米诺和H₂O₂溶液的浓度分别为9.1×10⁻⁶和8.82×10⁻⁴ mol·L⁻¹, CBS控制pH 10。邻苯三酚-鲁米诺体系中鲁米诺和邻苯三酚溶液的浓度分别为5.4×10⁻⁵和1.53×10⁻⁵ mol·L⁻¹, CBS控制pH 11。结果15个峰显示出清除自由基的能力, 进一步采用HPLC-MS^[34]指出12个黄酮类成分, 分别为3-O-[2-O,6-O-二(α-L-鼠李糖基)-β-D-葡萄糖苷]槲皮素、3-O-[2-O,6-O-二(α-L-鼠李糖基)-β-D-葡萄糖苷]山柰酚、3-O-[2-O,6-O-二(α-L-鼠李糖基)-β-D-葡萄糖苷]异鼠李素、3-O-[6-O-(α-L-鼠李糖基)-β-D-葡萄糖苷]槲皮素、3-O-[6-O-(α-L-鼠李糖基)-β-D-葡萄糖苷]-3'-甲氧基杨梅素、3-O-(β-D-葡萄糖苷)槲皮素、3-O-[2-O-(β-D-葡萄糖苷)-α-L-鼠李糖基]槲皮素、3-O-[6-O-(α-L-鼠李糖基)-β-D-葡萄糖苷]山柰酚、3-O-[6-O-(α-L-鼠李糖基)-β-D-葡萄糖苷]异鼠李素、3-O-[2-O-(β-D-葡萄糖苷)-α-L-鼠李糖基]山柰酚、3-O-[2-O-(6-O-对羟基-反式-肉桂酰基)-β-葡萄糖苷)-α-L-鼠李糖基]槲皮素和3-O-[2-O-(6-O-对羟基-反式-肉桂酰基)-β-葡萄糖苷)-α-L-鼠李糖基]山柰酚。作者采用相同方法研究虎杖^[35]、淫羊藿^[36]、山楂叶^[37]、葛根和粉葛^[38]的谱效关系, 指出虎杖的抗氧化成分为儿茶素、白藜芦醇苷、黄烷醇五倍子酸酯、云杉新苷、白藜芦醇、决明茶乙酮-8-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素。4个基源的淫羊藿中含邻羟基的酚酸和黄酮苷具有抑制化学发光的作用; 山楂叶中可确定结构的抗氧化成分为绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、牡荆素400-O-葡萄糖苷、牡荆素200-O-鼠李糖苷和槲皮素3-O-β-D-葡萄糖苷。3'-羟基葛根素、染料木素8-C-糖苷-木糖苷、葛根素、6'-O-木糖基葛根素、芹糖葛根素苷和大豆黄素是区分葛根和粉葛的主要活性成分。朱卉等^[39]采用类似方法鉴定出消癌平注射液中3-咖啡酰奎尼酸、5-咖啡酰奎尼酸和4-咖啡酰奎尼酸3个成分清除H₂O₂和O₂^{-·}的能力较强。王莹等^[40]考察玄参中具有ONOO⁻清除活性的成分。样品经Alltima C₁₈色谱柱分离, 0.1%磷酸-乙腈梯度洗脱, 蠕动泵流速1.2 mL·min⁻¹。过氧亚

硝酸盐和鲁米诺溶液浓度为2.4×10⁻⁴和5.41×10⁻⁶ mol·L⁻¹, 碳酸钠缓冲液控制pH 9.16。经质谱确证, 抗氧化成分为去咖啡酰洋丁香酚苷、洋丁香酚苷、6-O-阿魏酰基哈帕苷、顺式洋丁香酚苷和安格洛苷C。Qi J等^[41]采用相同方法鉴定出金银花中的5种ONOO⁻清除剂(新绿原酸、绿原酸、3,4-O-二咖啡酰奎尼酸、3,5-O-二咖啡酰奎尼酸和4,5-O-二咖啡酰奎尼酸)。Chen HF等^[42]分别采用过氧化氢-鲁米诺、邻苯三酚-鲁米诺和过氧亚硝酸盐-鲁米诺体系研究制何首乌的抗氧化成分。样品经Venusil MP C₁₈色谱柱分离, 0.1%磷酸-乙腈梯度洗脱, 蠕动泵流速1.1 mL·min⁻¹。H₂O₂和鲁米诺浓度为8.8×10⁻⁷和9.0×10⁻⁶ mol·L⁻¹, CBS控制pH 10.0。邻苯三酚和鲁米诺浓度为1.51×10⁻⁵和5.4×10⁻⁵ mol·L⁻¹, CBS控制pH 11.0。过氧亚硝酸盐和鲁米诺浓度为4.97×10⁻⁴和9.0×10⁻⁶ mol·L⁻¹, CBS控制pH 9.0。经HPLC-MS分析, 没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、2,3,5,4'-四羟基芪-2-O-(6"-O-a-D-吡喃葡萄糖基)-糖基吡喃葡萄糖苷、顺式-2,3,5,4'-四羟基芪-2-O-5,4'葡萄糖苷、反式-2,3,5,4'-四羟基芪-2-O-5,4'葡萄糖苷、2,3,5,4'-四羟基芪-2-O-,4'-(2"-没食子酰)-葡萄糖苷、决明茶乙酮-8-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-黄-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-大黄D-葡萄糖苷、大黄素和4个未知成分具有自由基清除作用。

2.4 毛细管电泳化学发光联用法(CE-CL)测定中药抗氧化活性

毛细管电泳是一类以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力的液相分离技术, 将其与化学发光检测器联用, 具有分析速度快、试剂用量少、仪器简单等优点。将分离毛细管末端插入内径稍大的反应毛细管中, 另在反应毛细管上钻一小孔插入引流毛细管, 发光试剂采用重力引流方式通过引流管引入, 分析物、发光试剂在分离毛细管出口处相遇, 进行化学发光反应。但是, 由于受到电泳液流与发光液流相互干扰、信噪比不高等影响; 目前, CE-CL联用技术的应用较少。

庞媛^[43]采用次氯酸钠-过氧化氢-鲁米诺和Cu²⁺-过氧化氢-鲁米诺体系研究麻黄、苦参、黄连、黄柏和贝母中生物碱的抗氧化活性。CE缓冲介质为硼酸盐, pH 9.60, 分离电压15 kV。鲁米

诺的浓度 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, H_2O_2 浓度 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaClO 浓度 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引流位差 25 cm ; 鲁米诺浓度 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, H_2O_2 浓度 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Cu^{2+} 浓度 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引流位差 5 cm 。结果显示苦参含有的抗氧化组分最多且氧化活性也最强, 其余依次是黄柏、麻黄、黄连和贝母。作者^[44]还建立了黄芪抗氧化活性生物指纹图谱。测得黄芪甲苷等6个色谱峰对 $\text{OH} \cdot$ 具有清除作用。张静^[45]采用类似方法筛选得到灯盏细辛注射液含有野黄芩苷等4个抗氧化组分。

3 结语与展望

化学发光法应用于中药分析, 具有灵敏度高、线性范围宽、操作简便的特点。可以直接测定样品对各种氧自由基的清除率, 引入流动/顺序注射装置可实现高通量筛选, 与HPLC或CE等分离方法联用, 可同时对多个化学成分的抗氧化活性进行评价, 建立生物活性谱, 探索谱效关系, 结合HPLC-MS技术, 还可对抗氧化成分的结构加以确证。展望未来, 尝试将化学发光检测与更多的色谱方法联用, 可对中药抗氧化成分进行更为快速、准确地筛选和分析; 将抗氧化活性评价与药理学、药代动力学研究相结合, 可为中药药效的综合评价提供有利手段。

参考文献:

- [1] Burdo T G, Seitz W R. Mechanism of Cobalt Catalysis of Luminol Chemiluminescence[J]. Analytical Chemistry, 1975, 47 (9): 1639-1643.
- [2] Li A, Liu X, Kong J, et al. Determination of Organophosphorous Pesticide Phosphamidon in Environmental Water with Luminol Chemiluminescence Detection[J]. Journal of Aoac International, 2009, 92 (3): 914-918.
- [3] Shevlin P B, Neufeld H A. Mechanism of the Ferricyanide-catalyzed Chemiluminescence of Luminol[J]. Journal of Organic Chemistry, 1970, 35 (7): 2178-2182.
- [4] Na F, Lu J, He Y, et al. Post-chemiluminescence Behaviour of Ni^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} in the Potassium Ferricyanide - luminol Reaction[J]. Luminescence the Journal of Biological & Chemical Luminescence, 2005, 20 (4-5): 266.
- [5] 俞培忠. 1. 肉苁蓉化学成分及其生物活性研究 2. 椭圆叶花锚化学成分的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [6] 舒希凯. 芍药花抗氧化活性成分的分离和鉴定[D]. 济南: 山东师范大学, 2013.
- [7] Benchennouf A, Grigorakis S, Loupassaki S, et al. Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of Lycium Barbarum (Goji) Cultivated in Greece[J]. Pharmaceutical Biology, 2017, 55 (1): 596.
- [8] Lee J C, Kao J Y, Kuo D H, et al. Antifatigue and Antioxidant Activity of Alcoholic Extract from Saussurea Involucrata[J]. Journal of Traditional & Complementary Medicine, 2011, 1 (1): 64.
- [9] 雷利芳. 覆盆子的抗氧化活性及其与化学成分和显微特征常数的相关性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2013.
- [10] 岳鹏飞, 郑琴, 吴彬, 等. 基于生物效应计量的复方丹参滴丸“总量”释放动力学研究[C]// 全国中药学术研讨会, 2010.
- [11] 王蕊, 魏书华, 史泽溪, 等. 流动注射分析的发展及应用[J]. 河北工业科技, 2009, 26 (5): 379-382.
- [12] 李玉亮, 彭洁, 梁欣, 等. 川芎提取物的多模型体系抗氧化活性测定[J]. 癌变畸变突变, 2011, 23 (2): 87-92.
- [13] Fan H, Zheng T, Chen Y, et al. Chemical Constituents with Free-radical-scavenging Activities from the Stem of Fissistigma Polyanthum[J]. Pharmacognosy Magazine, 2012, 8 (30): 98-102.
- [14] Fan H, Yang G Z, Zheng T, et al. Chemical Constituents with Free-radical-scavenging Activities from the Stem of Microcos Paniculata[J]. Molecules, 2010, 15 (8): 5547-5560.
- [15] 刘彩红, 张莹, 李玉琴, 等. 流动注射化学发光测定金钱草抗氧化活性[J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (5): 1267-1268.
- [16] 刘彩红, 王爱玲, 李玉琴, 等. 款冬花多糖抗氧化能力测定[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28 (10): 886-889.
- [17] 贾巧. 丹参制剂及桑白皮的抗氧化药效评价[D]. 重庆: 重庆大学, 2014.
- [18] 柏桦. 抗氧化中药的筛选及玉麦须醇提物抗氧化应激作用的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2008.
- [19] 董顺福, 李亚新, 韩丽琴. 丹参等三种中药总黄酮含量分析及其抗氧化机制研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24 (5): 1107-1109.
- [20] 史妮. 中药黄芪抗氧化性能的分析研究[D]. 长沙: 湖南

- 师范大学, 2011.
- [21] 赵芳, 杜志坚, 边丽, 等. 流动注射化学发光法研究黄酮等物质清除超氧自由基的作用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (1) : 77-78.
- [22] Yao H, Wu B, Cheng Y, et al. High Throughput Chemiluminescence Platform for Evaluating Antioxidative Activity of Total Flavonoid Glycosides from Plant Extracts[J]. Food Chemistry, 2009, 115 (1) : 380-386.
- [23] 姚宏. 血塞通注射液药效物质及其体内过程研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [24] 戚雯欣. 顺序注射化学发光联用技术测定活性氧自由基的研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2010.
- [25] Yi L I, Ming R, Luo J G, et al. On-line Antioxidant Activity Determination of Main Ingredients in Guan-Xin-Ning Injection by HPLC-DAD-CL[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2012, 10 (6) : 448-455.
- [26] Sun S, Liu H, Xu Y, et al. Identification of Antioxidative Components in ChuanKeZhi Injection and Discussion on Its Quality Control Method[J]. Current Pharmaceutical Analysis, 2017, 13 (5) : 427-432.
- [27] Wang R, Luo J, Kong L. Screening of Radical Scavengers in Scutellaria Baicalensis Using HPLC with Diode Array and Chemiluminescence Detection[J]. Journal of Separation Science, 2012, 35 (17) : 2223-2227.
- [28] Wu L, Ding X P, Zhu D N, et al. Study on the Radical Scavengers in the Traditional Chinese Medicine Formula Shengmai San by HPLC-DAD coupled with Chemiluminescence (CL) and ESI-MS/MS.[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2010, 52 (4) : 438-445.
- [29] Sun S, Xu S, Yan Y, et al. Optimized High Performance Liquid Chromatography Tandem Chemiluminescent Detector Applied to Assess the Antioxidative Activity of Caulis Stauntoniae Assisted by Chemometrics[J]. Analytical Methods, 2013, 5 (7) : 1837-1842.
- [30] Xie G Y, Zhu Y, Shu P, et al. Phenolic Metabolite Profiles and Antioxidants Assay of Three Iridaceae Medicinal Plants for Traditional Chinese Medicine "She-gan" by on-line HPLC-DAD Coupled with Chemiluminescence (CL) and ESI-Q-TOF-MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2014, (98) : 40-51.
- [31] Chang Y X, Ding X P, Qi J, et al. The Antioxidant-activity-integrated Fingerprint: An Advantageous Tool for the Evaluation of Quality of Herbal Medicines[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1208 (1-2) : 76-82.
- [32] Chang Y X, Yan D M, Chen L L, et al. Potency Fingerprint of Herbal Products Danshen Injection for Their Quality Evaluation[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2009, 57 (6) : 586-590.
- [33] Ding X P, Wang X T, Xu T, et al. Comparison of Two On-Line Analysis Techniques Used for the Screening of Antioxidants in EGb 761[J]. Chromatographia, 2010, 71 (5-6) : 493-497.
- [34] Ding X P, Qi J, Chang Y X, et al. Quality Control of Flavonoids in Ginkgo biloba, Leaves by High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and On-line Radical Scavenging Activity Detection[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216 (11) : 2204-2210.
- [35] Ding X P, Zhang C L, Qi J, et al. The Spectrum-Effect Integrated Fingerprint of Polygonum cuspidatum Based on HPLC-diode Array Detection-flow Injection-chemiluminescence[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11 (5) : 546-552.
- [36] Ding X P, Wang X T, Chen L L, et al. On-line High-performance Liquid Chromatography-diode Array Detection-electrospray Ionization-mass Spectrometry-chemiluminescence Assay of Radical Scavengers in Epimedium[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218 (9) : 1227-1235.
- [37] Ding X P, Wang X T, Chen L L, et al. Quality and Antioxidant Activity Detection of Crataegus Leaves Using On-line High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector Coupled to Chemiluminescence Detection[J]. Food Chemistry, 2010, 120 (3) : 929-933.
- [38] Zhang C L, Ding X P, Hu Z F, et al. Comparative Study of Puerariae Lobatae and Puerariae Thomsonii by HPLC-diode Array Detection-flow Injection-chemiluminescence Coupled with HPLC-electrospray Ionization-MS[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2011, 59 (5) : 541-545.
- [39] 朱卉, 朱丹妮, 余伯阳. HPLC-CL联用在线检测消癌平注射液清除 H_2O_2 及 $O_2^{\cdot-}$ 自由基活性[J]. 中成药,

- 2010, 32 (8) : 1386-1390.
- [40] 王莹, 陈佑华, 戚进, 等. 两种筛选玄参中清除过氧亚硝基活性成分的在线检测方法比较研究[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47 (5) : 560-565.
- [41] Qi J, Chen Y, Wang Y, et al. Screening of Peroxynitrite Scavengers in Flos Lonicerae by Using Two New Methods, An HPLC - DAD - CL Technique and A Peroxynitrite Spiking Test Followed by HPLC - DAD Analysis[J]. *Phytochemical Analysis*, 2016, 27 (1) : 57-63.
- [42] Chen H F, Chen Y H, Liu C H, et al. Integrated Chemometric Fingerprints of Antioxidant Activities and HPLC - DAD - CL for Assessing the Quality of the Processed Roots of *Polygonum Multiflorum* Thunb. (Heshouwu)[J]. *Chin Med*, 2016, 11 (1) : 18.
- [43] 庞媛. 天然产物抗氧化组分的毛细管电泳-化学发光法筛选与评价[D]. 重庆: 重庆大学, 2010.
- [44] 夏之宁, 庞媛, 郑国灿. 基于毛细管电泳的黄芪抗氧化生物指纹图谱研究[J]. *分析化学*, 2008, 36 (12) : 1646-1650.
- [45] 张静. 灯盏细辛脑靶向神经保护药效物质基础研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.

(收稿日期 2018年1月4日 编辑 范玉明)