

山楂叶抗超氧阴离子活性与化学特征相关指纹的探索研究

刘荣华¹, 陈兰英¹, 余伯阳², 黄慧莲¹, 邵峰¹, 任刚^{1*}(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004; 2 中国药科大学
中药复方研究室, 江苏 南京 210038)

摘要:目的 研究山楂叶 HPLC 指纹图谱与其抗超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)活性之间的相互关系。方法 以山楂叶对超氧阴离子的清除活性为评价指标, 分别对 5 种不同山楂叶 HPLC 指纹图谱的各指纹峰进行药效实验, 建立各指纹峰峰面积与抗超氧阴离子活性之间关系(峰效关系)的数学模型, 再通过数学、化学计量学、计算机编程与模拟等手段将山楂叶的 HPLC 指纹图谱翻译成生物活性指纹图谱(包括药效指纹图谱和效价指纹图谱)。结果 建立了山楂叶的质量评价新模式, 该模式预测值与实际值 $r = 0.846 (P < 0.05)$; 5 个样品预测值均为实际值的 70% 以上。结论 该模式是融化学鉴定与生物活性评价为一体的综合质量评价体系, 弥补了已有中药质量评价模式的局限性, 为中药现代化研究提供了一条新的思路。

关键词: 山楂叶; 谱效关系; 质量评价模式; 生物活性指纹图谱

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1173-06

Exploring study on inhibition on $O_2^{\cdot-}$ and correlative chemical characteristic fingerprint of *Crataegi Folium*

LIU Rong-hua¹, CHEN Lan-ying¹, YU Bo-yang², HUANG Huilian¹, SHAO Feng¹, REN Gang¹

(1 Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2 Department of Chinese Complex Recipe Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between HPLC fingerprint and its inhibition on $O_2^{\cdot-}$ in *Crataegi Folium*. **Methods** The effect of *Crataegi Folium* on scavenging superoxide anion was taken as the target. HPLC Fingerprint peaks of five species of *Crataegi Folium* were isolated and used for the effective experiment. The mathematic models of the relation between the area and the effect of fingerprint peaks were established. According to the mathematic models, the HPLC fingerprint was changed into bioactive fingerprint (include effect fingerprint and potency fingerprint) with the help of mathematics, chemometrics, bioinformatics, and computer simulation, etc. **Results** The new evaluative pattern for the quality of Chinese materia medica (CMM) was established. The correlation coefficient between expected value and practical value was 0.846 ($P < 0.05$). The expected values of five samples were all more than 70% of those in the practical value. **Conclusion** This evaluative pattern is an all-around evaluative system, which includes not only chemical identification but also effective evaluation for CMM. This study has made up for the deficiencies of the current evaluative pattern for the quality of CMM and has also provided a new idea for modern study on CMM.

Key words: *Crataegi Folium*; chromatogram-effect relationship; quality evaluative pattern; bioactive fingerprint;

指纹图谱是一种综合的量化的鉴别手段, 改变了传统质量标准以个别成分为指标来控制内在质量

的不完善性, 是目前国内外广泛接受的一种中药质量评价模式。然而目前国内外对中药(或植物药)指

* 收稿日期: 2009-09-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472161); 江西省自然科学基金资助项目(0640163)

作者简介: 刘荣华(1964—), 男, 江西省永新县人, 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室中药质量控制方向带头人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药质量评价及中药活性物质基础研究。

Tel: (0791) 7119010 Fax: (0791) 7118658 E-mail: rhliu@163.com

纹图谱的研究还存在不完善之处,没有以药效作为指纹性的依据。鉴于此,本研究提出“生物活性与化学特征相关指纹”的概念,以山楂叶为研究对象,选择其抗冠心病的主要临床作用,以抗超氧阴离子为生物活性评价指标,将 HPLC 指纹图谱上的化学指纹峰分别收集并进行活性研究,经过数学建模、生物信息收集整理和计算机编程及模拟等手段,将化学指纹峰翻译成生物活性值,建立中药的生物活性指纹图谱,为中药谱效关系及中药现代化研究提供一条新的思路。

1 材料

1.1 药材:德国单叶山楂 *Crataegus monogyna* Jacq 叶,山里红 *C. pinnatifida* Bge var. *major* N. E. Br. 叶,山楂 *C. pinnatifida* Bge 叶,野山楂 *C. cuneata* Sieb. & Zucc 叶,云南山楂 *C. scabrifolia* (Franch.) Rehd, 5 种样品均采于 2003 年 5 月,并经笔者鉴定,凭证标本存于中国药科大学植物标本室。

1.2 试剂: Diaion HP-20 大孔吸附树脂(三菱化成工业株式会社), 3-氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺, Luminal, Sigma 公司), 色谱纯乙腈(Merck 公司), 其余均为国产分析纯或优级纯试剂,实验用水为重蒸水。

1.3 仪器: BPCL-1-G-C 微弱发光测量仪及 BPCL App1. 7. 2 数据处理工作站(中国科学院北京生物物理研究所); Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括 HP 工作站, G1312A 型二元泵, G1313A 型微量全自动进样器, G1316A 型柱温箱, G1314A 型可变波长检测器)。

2 方法

2.1 山楂叶药效模型的建立和药效评价指标的确定:山楂叶对冠心病有良好的治疗作用^[1-4];心肌缺血再灌注激活血液与组织间的中性粒细胞(PMN),使其耗氧量增加,产生呼吸爆发,同时激活辅酶 II (NADPH) 氧化酶,使 O_2 立即被还原成超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)^[5,6]。本实验针对山楂叶抗冠心病活性,建立微量、快速的体外抗氧自由基实验模型,以抗 $O_2^{\cdot-}$ 活性为评价指标。

2.2 山楂叶 HPLC 指纹图谱的建立:山楂叶抗氧自由基主要活性成分为多元酚类化合物^[7-9], 本实验主要针对该类成分进行指纹图谱分析。

2.2.1 色谱条件:按文献方法^[10], Lichrospher ODS C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)(南京汉邦科技有限公司);柱温 25 $^{\circ}$ C;体积流量 1 mL/min,进样量 10 μ L,检测波长为 360 nm;梯度洗脱,流动相 A

为乙腈-四氢呋喃(95:5)、B 为 0.5% 磷酸水溶液,流动相梯度为 0~12 min A 由 12%~17%、12~30 min A 由 17%~18%、30~45 min A 由 18%~40%、45~55 min A 由 40%~70%、55~60 min A 由 70%~100%。

2.2.2 样品溶液制备:分别取 5 种山楂叶 5 g, 60 $^{\circ}$ C 干燥 8 h(恒重)后粉碎成 60 目粉末,各取 0.5 g 置于 10 mL 量瓶中,精密加入 50% 甲醇 10 mL 称质量,超声提取 45 min,加 50% 甲醇补足至原质量,混匀,放置澄清后用 0.45 μ m 微孔滤膜滤取上清液。

2.3 指纹峰的收集:按文献方法^[10],选取具有代表性指纹峰的几种山楂叶 20 g 左右,用 50% 甲醇回流提取,上清液浓缩至无醇味,上 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱,先用水洗至无色,再用 60% 乙醇洗至无色,减压浓缩乙醇洗脱液至干,得山楂叶总提取物。分别取各山楂叶提取物 100 mg,用 60% 甲醇定容于 1 mL 量瓶中。取上清液按以上 HPLC 条件进样,每次进样体积为 50 μ L,根据几种山楂叶的指纹叠加图谱,多次收集信噪比 ≥ 5 的各共有峰和不同种山楂叶的特有峰,减压除去有机溶剂,用固相萃取柱萃取并用甲醇洗脱, HPLC 检查纯度(归一法纯度 95% 以上为合格),不纯的指纹峰更换 HPLC 条件进行多次分离。各指纹峰纯度合格后甲醇定容到一定体积,备用。

2.4 指纹峰的归属:筛选一内标物,加入各样品中,按以上色谱条件进行 HPLC 测定,以指纹峰与内标峰的相对保留时间(α)对各指纹峰进行匹配和归属。

2.5 山楂叶各指纹峰的药效筛选及峰效关系数学模型的建立:各指纹峰甲醇溶液用于抗 $O_2^{\cdot-}$ 活性筛选,对有活性的指纹峰甲醇溶液用甲醇按倍数(1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64……)稀释并分别进行抗氧化实验和 HPLC 测其峰面积。建立抗氧化活性与 HPLC 峰面积之间的峰效关系,并建立数学模型。

2.6 山楂叶抗 $O_2^{\cdot-}$ 生物活性指纹图谱的建立

2.6.1 药效指纹图谱的建立:借助 Microsoft Visual Basic 6.0 编程软件将各指纹峰数学模型编入计算机程序,再将各山楂叶 HPLC 指纹峰面积调入程序进行运算,计算出各指纹峰的药效值,通过计算机模拟将各指纹峰药效值模拟成指纹图谱,即为药效指纹图谱。

2.6.2 效价指纹图谱的建立:选择一种抗氧化阳性药,建立该阳性药的抗氧化量效关系数学模型,编入计算机程序,将山楂叶各指纹峰的药效值导入程序进行运算,得到各药效指纹峰相当于阳性药的量

(μg), 以 $1\ \mu\text{g}$ 阳性药的药效为一个效价单位, 算出指纹峰相当于多少个效价单位, 即效价值, 用计算机模拟将各指纹峰的效价值绘制成图谱, 即为效价指纹图谱。

3 结果与讨论

3.1 药效模型与药效指标: 本实验要求药效指标要精确、稳定、可量化。经大量实验筛选, 选用邻苯三酚-鲁米诺-碳酸缓冲液 (pH 10.2) 体系产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ [11]。该体系的精密度较高, RSD 值达 6.99% [11]。

3.2 山楂叶指纹图谱的建立与指纹峰的收集: 根据以上色谱条件, 分别对所有山楂叶指纹图谱进行分析, 以不遗漏谱峰为原则, 选取了野山楂叶、山里红叶、单子山楂叶和云南山楂叶这 4 个种进行指纹峰收集。对这 4 种山楂叶指纹图谱进行叠加处理, 信/噪比 ≥ 5 的峰为要收集的指纹峰, 见图 1。针对性收集了 39 个指纹峰, 经过反复纯化, 各指纹峰的纯度均在 95%。

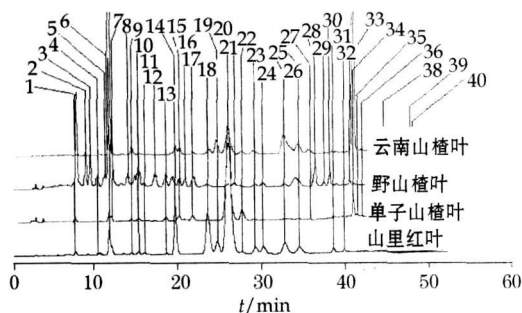


图 1 4 种山楂叶的指纹叠加图谱及信/噪比 ≥ 5 的标记峰

Fig 1 Overlay of HPLC fingerprint of *Crataegi Folium* from four species and marked peaks (S/N ≥ 5)

3.3 山楂叶各指纹峰的归属及峰效关系数学模型: 39 个指纹峰分别进行活性筛选, 其中 34 个指纹峰有活性。建立这 34 个指纹峰峰效关系的数学模型 (表 1)。选择杨梅素 (myricetin) 为内标物 (图 2), 算出各指纹峰的 a , a 相对 t_R 来说要稳定的多。本实验所有指纹峰均以 a 进行归属, 以确保该研究的重现性。

本研究收集的活性指纹峰最终均用甲醇定容到 1 mL, 为初始溶液。通过 HPLC 比较, 初始溶液峰面积是山楂叶样品常规分析时该对应峰面积的 100 倍以上。将初始溶液进行倍数逐步稀释至对自由基清除率接近 0, 所有活性指纹峰稀释后样本数量均在 7 个以上, 然后进行曲线拟和, 从表 1 可见, 拟和度 $R^2 \geq 0.994$ 。对表 1 各数学模型进行试验验证, 结果表明, 当指纹峰峰面积在线性范围内时, 与其相应数学模型预测的自由基清除率非常接近。

3.4 山楂叶的药效指纹图谱: 各指纹峰的药效值见表 2, 药效指纹图谱见图 3(b)。该图谱是建立在 HPLC 指纹图谱基础上的一种生物活性指纹图谱, 因而不仅具有 HPLC 指纹图谱的所有特征, 而且还能反映各指纹峰的药效, 从而能更好地反映中药的质量。

3.5 山楂叶的效价指纹图谱: 药效指纹图谱不能完全反映整体效果, 整体药效并不等于各指纹峰药效之和, 因为峰效曲线是二次函数或三次函数 (表 1)。因此, 选择芦丁 (Rutin) 为阳性药, 其抗氧化量效关系数学模型为: $y = 1.10857 + 4.35744x - 0.067696x^2 + 3.15176 \times 10^{-4}x^3$ [x 为芦丁的量 μg , y 为抗 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性, 用清除率 (%) 表示]。通过该模型求算各指纹峰的效价值 (potency), 见表 2; 计算机模拟山楂叶效价指纹图谱, 见图 3(c)。各指纹峰的效价值之和可反映该山楂叶的总体活性 (总效价) (表 2)。不同山楂叶的总效价有所不同, 表明抗氧化活性有差异。

表 1 山楂叶各指纹峰的峰效关系数学模型

Table 1 Mathematic models of relationship between area and effect of fingerprint peaks of *Crataegi Folium*

峰号	a	数学模型	R^2
1	0.1843	$y = 1.9934 + 0.0036x - 9 \times 10^{-8}x^2$	0.994
2	0.2095	$y = 0.9997 + 0.0103x - 4 \times 10^{-6}x^2 + 7.9 \times 10^{-10}x^3$	1.000
3	0.2220	$y = 0.8997 + 0.0067x + 6.4 \times 10^{-7}x^2 - 4 \times 10^{-12}x^3$	1.000
4	0.2449	$y = 0.8223 + 0.0082x - 3 \times 10^{-6}x^2 + \times 10^{-9}x^3$	0.999
5	0.2606	$y = 1.4214 + 0.0052x + 2.2 \times 10^{-6}x^2 - 6 \times 10^{-10}x^3$	1.000
6	0.2726	$y = 3.7891 + 0.0060x - 1 \times 10^{-7}x^2$	0.998
7	0.2802	$y = 0.5791 + 0.0363x - 4 \times 10^{-5}x^2 + 1.9 \times 10^{-8}x^3$	0.999
8	0.3241	$y = 0.9695 + 0.0206x - 2 \times 10^{-5}x^2 + 7.8 \times 10^{-9}x^3$	0.997
9	0.3338	$y = 2.2073 + 0.0140x - 2 \times 10^{-5}x^2$	0.999
10	0.3516	$y = 1.7513 + 0.0040x + 5.9 \times 10^{-6}x^2 - 2 \times 10^{-9}x^3$	0.996
11	0.3691	$y = 1.5413 + 0.0087x - 6 \times 10^{-5}x^2 + 7 \times 10^{-8}x^3$	1.000
12	0.3978	$y = 1.2412 + 0.0072x + 1.2 \times 10^{-6}x^2 - 7 \times 10^{-10}x^3$	0.995
13	0.4287	$y = 1.3134 + 0.0143x + 1.3 \times 10^{-5}x^2 - 7 \times 10^{-9}x^3$	1.000
14	0.4465	$y = 1.2325 + 0.0033x + 8.0 \times 10^{-7}x^2 - 10^{-10}x^3$	1.000
15	0.4618	$y = 5.1619 + 0.0023x - 2 \times 10^{-8}x^2$	0.997
16	0.4826	$y = 1.1453 + 0.0096x + 7.6 \times 10^{-7}x^2 - 2 \times 10^{-10}x^3$	0.999
17	0.5017	$y = 2.5902 + 0.0071x - 2 \times 10^{-7}x^2$	0.996
18	0.5431	$y = 3.2711 + 0.0013x - 6 \times 10^{-9}x^2$	0.996
19	0.5671	$y = 2.0658 + 0.0087x - 6 \times 10^{-7}x^2$	1.000
20	0.6004	$y = 3.7828 + 0.0013x - 6 \times 10^{-9}x^2$	0.997
21	0.6212	$y = 1.5075 + 0.0033x - 10^{-7}x^2$	0.998
22	0.6362	$y = 2.6812 + 0.0013x - 5 \times 10^{-9}x^2$	0.999
23	0.6697	$y = 1.6338 + 0.0034x - 10^{-7}x^2$	0.997
24	0.6955	$y = 1.1549 + 0.0029x - 3 \times 10^{-8}x^2 + 9.3 \times 10^{-14}x^3$	1.000
25	0.7554	$y = 4.5938 + 0.0050x - 7 \times 10^{-8}x^2$	0.996
26	0.7907	$y = 1.3463 + 0.0117x - 2 \times 10^{-6}x^2 + 1.8 \times 10^{-10}x^3$	0.998
27	0.8277	$y = 1.6221 + 0.0041x + 2.7 \times 10^{-6}x^2 - 6 \times 10^{-10}x^3$	1.000
28	0.8425	$y = 1.6134 + 0.0072x - 4 \times 10^{-7}x^2 + 1.3 \times 10^{-11}x^3$	1.000
30	0.8829	$y = 0.9917 + 0.0123x - 4 \times 10^{-7}x^2 - 10^{-10}x^3$	1.000
32	0.9205	$y = 2.2283 + 0.0007x + 5.6 \times 10^{-6}x^2 - 8 \times 10^{-10}x^3$	0.997
34	0.9478	$y = 4.7926 + 0.0018x - 10^{-8}x^2$	0.995
35	0.9580	$y = 3.0769 + 0.0200x - 2 \times 10^{-6}x^2 + 5.4 \times 10^{-11}x^3$	0.999
37	1.0000	内标	
38	1.0506	$y = 0.8327 + 0.0006x - 3 \times 10^{-9}x^2$	1.000
40	1.1132	$y = 3.3121 + 0.0158x - 6 \times 10^{-7}x^2$	0.996

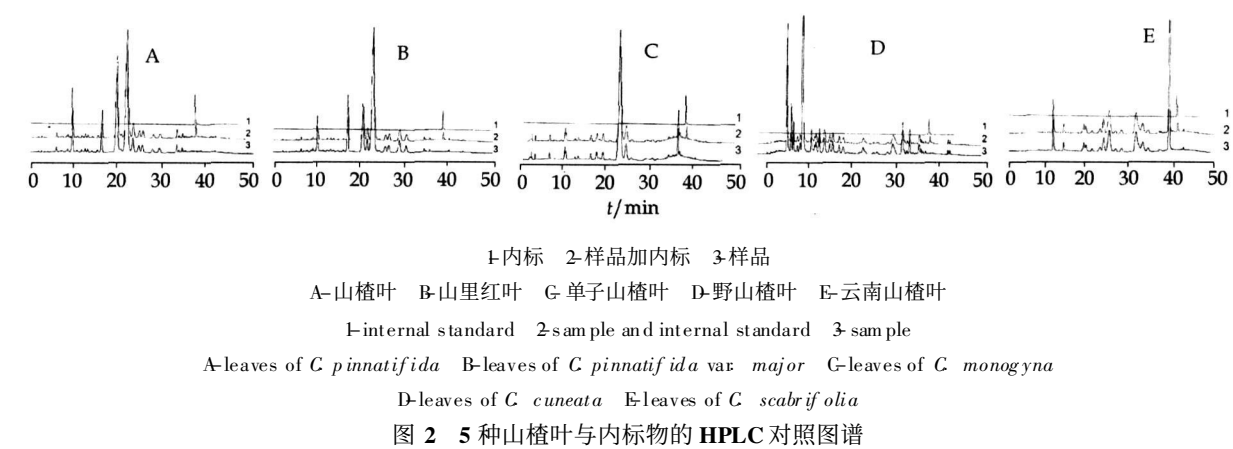


Fig 2 HPLC Chromatograms in five species of *Grataegi Folium* and intenal standard

表 2 5 种山楂叶各指纹峰的药效和效价

Table 2 Effect and potency of fingerprint peaks from five species of *Crataegi Folium*

α	药效(自由基清除率) / %					效 价				
	S1	S2	S3	S4	S5	S1	S2	S3	S4	S5
0 184 3	2 377 5	2 405 2	11 945 9	2 502 8		0 292 5	0 299 0	2 590 1	0 321 6	
0 209 5			8 652 5					1 780 1		
0 222 0			9 271 3					1 930 7		
0 244 9	1 765 1		4 995 8			0 151 0		0 904 8		
0 260 6		1 723 7	5 229 9				0 141 5	0 960 1		
0 272 6	8 318 2	10 751 4	87 510 4	5 452 4	11 851 9	1 699 1	2 293 8	40 564 8	1 012 7	2 566 6
0 280 2	7 042 0			5 738 5		1 391 6			1 080 6	
0 324 1			8 330 7					1 702 1		
0 333 8	3 261 0	3 310 5	4 415 9	3 689 1	4 177 5	0 497 8	0 509 3	0 768 1	0 597 8	0 712 2
0 351 6	2 273 1	2 289 2	10 693 9	2 519 4		0 268 4	0 272 1	2 279 7	0 325 4	
0 369 1	1 888 3	1 869 6				0 179 4	0 175 1			
0 397 8		2 079 8	8 531 7				0 223 7	1 750 8		
0 428 7	2 884 6	2 747 3	16 096 4	5 085 2		0 410 2	0 378 3	3 642 2	0 925 9	
0 446 5			3 859 4		1 682 2			0 637 6		0 131 9
0 461 8	9 275 9	6 919 5	6 210 5	5 887 4	5 989 3	1 931 8	1 362 2	1 192 8	1 116 0	1 140 2
0 482 6			5 539 8	2 348 8				1 033 4	0 285 9	
0 501 7			7 385 3	4 661 2	3 908 4			1 474 0	0 825 9	0 649 1
0 543 1	6 449 4	7 806 2	3 782 4	3 371 5	3 678 1	1 249 8	1 575 3	0 619 6	0 523 6	0 595 2
0 567 1	7 912 7	3 165 7			4 908 1	1 601 0	0 475 6			0 884 0
0 600 4	16 067 4	11 431 7		1 1926 4	7 192 8	3 634 7	2 462 2		2 585 2	1 427 7
0 621 2			3 165 4					0 475 5		
0 636 2	2 848 8	3 483 6		6 206 5	5 536 4	0 329 5	0 549 7		1 191 9	1 032 6
0 669 7	3 053 1	2 707 6		2 000 9	2 627 7	0 449 4	0 369 1		0 205 4	0 350 5
0 695 5	2 508 7	2 097 7	2 132 3			0 322 9	0 227 8	0 235 8		
0 755 4	9 045 5	5 515 8		5 027 0	1 1452 8	1 875 7	1 027 8		0 912 1	2 467 4
0 790 7	6 974 8	3 924 3	1 1910 4	2 608 6	6 152 5	1 375 5	0 652 8	2 581 2	0 346 1	1 179 0
0 827 7				1 969 9	2 880 2				0 198 3	0 409 2
0 842 5			8 533 9					1 751 3		
0 882 9	2 308 8	3 088 7	5 590 1	4 803 2		0 276 6	0 457 7	1 045 4	0 859 3	
0 920 5	2 340 3	2 434 3				0 283 9	0 305 7			
0 947 8				6 164 8	1 9339 5				1 182 0	4 490 6
0 958 0				5 520 2					1 028 8	
1 000 0			内标					内标		
1 050 6					1 159 6					0 011 7
1 113 2		4 290 0			7 921 1		0 738 5			1 603 1
总计						18 890 8	14 497 2	69 920 0	14 924 3	19 051 1

S1-山里红叶, S2-山楂叶, S3-野山楂叶, S4-单于山楂叶, S5-云南山楂叶

S1-leaves of *C. pinnatifida* var. *major*, S2-leaves of *C. pinnatifida*, S3-leaves of *C. cuneata*, S4-leaves of *C. monogyna*, S5-leaves of *C. scabrifolia*

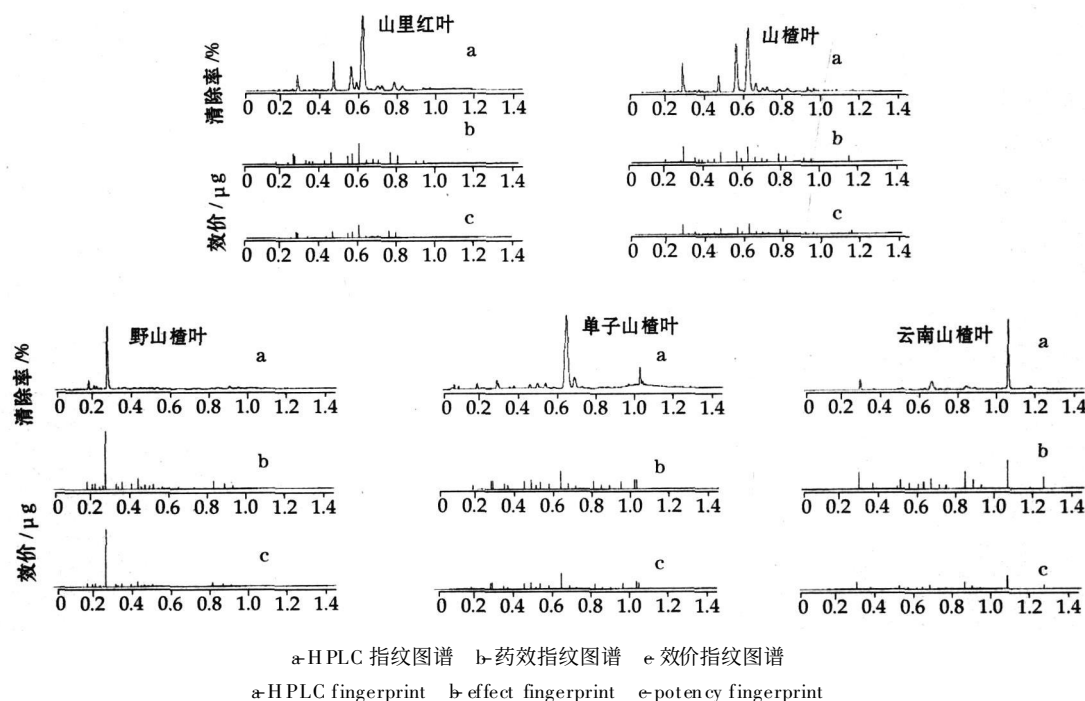


图 3 5 种山楂叶的生物活性指纹图谱

Fig 3 Bioactive fingerprint in five species of *Grataegi Folium*

3.1.6 实验结果分析

3.1.6.1 结果的可信度分析: 将各山楂叶样品效价指纹图谱的总效价值经芦丁量效关系数学模型换算成抗 $O_2^{\cdot -}$ 的总药效值; 再测出不同山楂叶的实际抗 $O_2^{\cdot -}$ 活性。用 SPSS 软件对这两组数据进行相关性分析, 根据相关系数判断该实验方法的可信度。结果表明, 两者成显著正相关, 相关系数为 $r = 0.846$, $P < 0.05$, 见表 3。说明本实验结果可信度高。

3.1.6.2 方法的可行性分析: 生物活性指纹图谱计算出来的总药效值与实验测得的药效值的比值(贡献率)可反映指纹峰选择的合理性和实验方法可行性。结果表明, 5 个样品的贡献率均在 70% 以上(表 3)。说明本实验建立的方法科学, 有一定实用价值和推广意义。

表 3 生物指纹图谱的总效价、总药效、总贡献率以及实验测定值

Table 3 Total potency, effect, percentage of bioactive fingerprint and their practical results

样品	总效价 计算值	总药效 计算值 / %	实际药效 实验值 / %	(贡献率计算 值 / 实验值) / %
山里红叶	18.29	60.37	70.87	85.18
山楂叶	14.50	51.34	69.75	73.61
野山楂叶	69.92	94.09	93.69	100.40
单子山楂叶	14.92	52.42	61.42	85.35
云南山楂叶	19.05	61.99	86.26	71.86

4 中药质量评价新模式的建立

以山楂叶清除 $O_2^{\cdot -}$ 生物活性与 HPLC 特征相

关指纹图谱为例, 建立中药质量评价新模式。

4.1 品种亲缘关系鉴定: 生物活性与化学特征相关指纹图谱(生物活性指纹图谱)是建立于 HPLC 指纹图谱的基础之上的, 因此具有 HPLC 指纹图谱相同的功能和特性, 将各山楂叶生物活性指纹图谱的药效指纹或效价指纹代替 HPLC 指纹峰面积, 通过相似度分析, 同样可以对中药品种进行亲缘关系鉴定。

4.2 主要活性峰的确定: 从图 2 和表 2 中可以清楚地看到各指纹峰的活性大小, 从而找出每种山楂叶样品的生物活性 8 强峰。如山楂叶的生物活性 8 强峰 A 为 0.272 6, 0.280 2, 0.461 8, 0.543 1, 0.567 1, 0.600 4, 0.755 4, 0.790 7; 山里红叶的生物活性 8 强峰 A 为 0.272 6, 0.461 8, 0.543 1, 0.600 4, 0.636 2, 0.755 4, 0.790 7, 1.113 2。从而确定不同种山楂叶的抗 $O_2^{\cdot -}$ 主要活性峰。

4.3 指纹峰活性强弱比较: 通过比较指纹峰效积比(指纹峰效价值 / HPLC 峰面积)大小, 可以衡量指纹峰的活性强弱。经过对这 34 个指纹峰的效积比进行比较, 从中找出了 8 个活性最强(效积比最大)的峰, A 分别为 0.272 6, 0.333 8, 0.428 7, 0.461 8, 0.567 1, 0.755 4, 0.790 7, 1.113 2。需要说明的是一个峰的效积比不是固定不变的, 而是遵循峰效关系数学模型发生变化。然而, 对某一个峰来说, 效积比的变化也有一定的范围, 这就为比较指纹峰的活性强弱提供了可能。

4.4 种间、产地间及不同采收期生物活性比较: 罗文等^[2]为有效控制山楂(果实)药材质量,建立了10批山楂药材的HPLC指纹图谱。在本实验中,比较不同山楂叶效价指纹峰的总效价值,可以更客观地反映中药的质量。如表3所示,山楂叶、山里红叶、野山楂叶、单叶山楂叶和云南山楂叶的总效价值分析为181.29、141.50、691.92、141.92和191.05。说明其抗O₂^A活性大小为:野山楂叶>云南山楂叶>山楂叶>单叶山楂叶>山里红叶,结果与实验测得结果一致。

参考文献:

- [1] Rigelsky J M, Sweet B V Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses [J] *Am J Health Syst Pharm*, 2002, 59 (5): 417-422
- [2] Beier A, Konigstein R P, Samec V Clinical experiences with a crataegus pentaerythrit-tetranitrate combination drug in heart diseases due to coronary sclerosis in old age [J] *Wien Med Wochenschr*, 1974, 124(24): 378-381
- [3] Taskov M On the coronary and cardiotonic action of crataegon [J] *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 1977, 3(4): 53-57
- [4] 杨宇杰, 林静, 王春民, 等1 山楂叶总黄酮对大鼠高脂血症

- 早期干预的实验研究 [J] *中草药*, 2008, 39(12): 1848-1850
- [5] Granger D N, Hollowath M E, Parks D A Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals [J] *Acta Physiol Scand*, 1986, 548(suppl): 471
- [6] Zweier J L, Flaherty J T, Weisfeldt M L Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemia myocardium [J] *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 476
- [7] Periera da Silva A, Rocha R, Silva C M, et al Antioxidants in medicinal plant extracts: A research study of the antioxidant capacity of *Crataegus*, *Hamamelis* and *Hydrastis* [J] *Phytother Res*, 2000, 14(8): 612-616
- [8] Bahorun T, Gressier B, Trotin F, et al Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations [J] *Arzneimittelforschung*, 1996, 46(11): 1086-1089
- [9] 刘荣华, 陈兰英, 朱根华, 等1 单叶山楂叶中多元酚类成分及其抗氧化活性研究 [J] *中草药*, 2007, 38(10): 1541-1544
- [10] 刘荣华, 余伯阳, 陈兰英, 等1 山楂叶抗大鼠 PMN 呼吸爆发谱效关系研究 [J] *中国中药杂志*, 2008, 33(15): 1884-1889
- [11] 刘荣华, 余伯阳, 邱声祥, 等1 山楂叶中多元酚类成分抗超氧阴离子活性研究及构效关系分析 [J] *中国药理学杂志*, 2005, 40(14): 1066-1069
- [12] 罗文, 刘斌, 王伟, 等1 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究 [J] *现代药物与临床*, 2009, 24(1): 39-42

北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析

隋春¹, 战晴晴^{1,2}, 魏建和^{1*}, 陈怀琼¹, 杨成民¹, 郑亭亭¹

(1 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 克隆北柴胡皂苷生物合成途径关键酶异戊烯基焦磷酸异构酶(EC 51.31.3.2, isopentenyl diphosphate isomerase, IPPI) 的全长 cDNA, 为研究柴胡皂苷的生物合成与基因调控奠定基础。方法 PCR 矩阵法快速筛选北柴胡全长 cDNA 文库。结果 获得了北柴胡 IPPI 的全长 cDNA (GenBank No. GQ433719), 其核苷酸序列长 1117 bp, 编码 319 个氨基酸的蛋白。NCBI Blastx 结果显示与胡萝卜 *Daucus carota* subsp. *sativus* (ab52064) 的 IPPI 氨基酸序列相似性最高, 一致性为 92%, 相似度为 97%。保守结构域搜索显示含有 IPPI 共有的催化活性位点、金属结合位点及 Nudix 基序。TargetP 1.1 和 SignalP 3.0 分析表明北柴胡 IPPI N 端含有长 26 bp 的叶绿体信号肽。结论 首次克隆了北柴胡 IPPI 的全长 cDNA, 将促进后续北柴胡 IPPI 基因表达特性及其在柴胡皂苷合成代谢中功能的研究。

关键词: 北柴胡; 柴胡皂苷; 异戊烯基焦磷酸异构酶(IPPI); cDNA 文库; PCR 矩阵法

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1178-07

Full-length cDNA cloning and sequence analysis of isopentenyl diphosphate isomerase involved in saikosaponin biosynthesis pathway of *Bupleurum chinense*

SUI Chun¹, ZHAN Qing-qing^{1,2}, WEI Jian-he¹, CHEN Huai-qiong¹,
YANG Cheng-min¹, ZHENG Ting-ting¹

(1 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2 College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

* 收稿日期: 2009-09-18

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目(2006BA109B01); 中央级院所所长科研基金项目(YZ-1-10)

作者简介: 隋春(1976), 女, 吉林敦化人, 博士, 主要从事药用植物次生代谢方面的研究。

* 通讯作者 魏建和 Tel: (010)62818841 E-mail: wjianh@263.net