

大叶冬青药材的黄嘌呤氧化酶抑制作用的谱效关系研究

姚 兰^{1,2}, 焦安妮³, 冯琳琳³, 于 敏², 张 晶^{1*}, 焦连庆^{2*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130012

3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

摘要: 目的 研究不同产地 10 批次大叶冬青药材的 HPLC 指纹图谱与其黄嘌呤氧化酶 (XOD) 抑制作用的谱效关系, 初步揭示大叶冬青药材的药效物质基础。方法 HPLC 法测定了 10 批次不同产地的大叶冬青药材样品, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版评价, 建立共有模式, 并进行主成分分析。采用 HPLC 法建立酶-底物反应体系, 对不同批次的大叶冬青药材的 XOD 抑制活性进行研究, 基于谱效关系, 采用 SPSS 软件对数据进行相关性分析。采用氧嗪酸钾诱导建立小鼠高尿酸血症模型, 检测小鼠血清中以及肝组织中尿酸 (UC)、XOD 水平变化。结果 10 批次不同产地的大叶冬青药材 HPLC 指纹图谱中共有 15 个特征峰, 其中峰 11 (苦丁茶冬青皂苷 E)、14 (苦丁冬青皂苷 F) 与 XOD 抑制作用呈中等程度相关, 峰 5 (未鉴定)、6 (山奈酚-3-O-β-D-芸香糖苷)、7 (异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷)、10 (大叶冬青皂苷 C)、13 (大叶冬青皂苷 D) 相关性最强。由主成分分析可知, 峰 9 (大叶冬青皂苷 H) 的量在大叶冬青药材质量控制中起到至关重要的作用。体内实验结果表明, 大叶冬青提取物高、中、低剂量组均能显著降低小鼠血清 UC 和 XOD 水平, 抑制肝组织中 XOD 活性, 并呈现一定的量效关系。结论 10 批不同产地的大叶冬青药材对 XOD 均有较强的抑制作用, HPLC 指纹图谱显示出 7 个共有峰对应的化合物与该药效存在一定的相关性。

关键词: 大叶冬青; 指纹图谱; 主成分分析; 谱效关系; 黄嘌呤氧化酶

中图分类号: 284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)20-4838-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.020

Spectrum-activity relationship of extract from *Ilex latifolia* on inhibition of xanthine oxidase

YAO Lan^{1,2}, JIAO An-ni³, FENG Lin-lin³, YU Min², ZHANG Jing¹, JIAO Lian-qing²

1. School of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Jilin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China

3. School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China

Abstract: Objective To investigate the spectrum-activity relationship between HPLC fingerprint of *Ilex latifolia* from 10 batches in different regions and its inhibition of xanthine oxidase (XOD) efficacy and to reveal the material basis of *I. latifolia*. **Methods** The samples from 10 batch different regions were determined with the HPLC method. The similarity of the representative standard fingerprint was evaluated using the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2004A). The common pattern was established for the principal component analysis (PCA). The HPLC method was used to establish the enzyme-substrate reaction system, and the inhibitory activity of XOD of 10 batches of *I. latifolia* produced in different areas was studied. The SPSS analysis correlation was used to conduct correlation analysis based on spectrum-activity relationship. The model of mouse hyperuricemia were induced by potassium oxonate, and the levels of UC and XOD in plasma and liver were detected. **Results** Fifteen common peaks in HPLC-fingerprint of *I. latifolia* were obtained. It was tentatively concluded that peak 11 (ilekudinoside E) and peak 14 (kudinoside F) had the moderate correlation with the inhibitory effect of XOD in the fifteen characteristic peaks. Peaks 5, 6 (kaempferol-3-O-β-D-rutinoside), 7 (isorhamnetin-3-O-β-D-rutinoside), 10 (latifolioside C), and 13

收稿日期: 2018-03-13

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20150311037YY); 吉林省卫生计生科研计划项目 (2014Z206); 吉林省中医药科技项目 (2014-ZD28)

作者简介: 姚 兰, 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。Tel: 13843028226 E-mail: ycl_0510@163.com

*通信作者 张 晶, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: zhjing0701@163.com

焦连庆, 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: jiaolq2017@163.com

(latifolioside D) had the strongest correlation. The quality of *I. latifolia* was influenced by the concentration of latifolioside H (peak 9) obtained by PCA. In the vivo experiment of hyperuricemia model mice, the levels of plasma UC and XOD of the mice in different doses of *I. latifolia* extracts groups were reduced, and the activities of XOD in livers tissue were also reduced. **Conclusion** Ten batches of samples from different habitats had potent inhibitory effects on XOD. There may be a certain relationship between seven compounds showed in HPLC fingerprint and its inhibitory effect on XOD.

Key words: *Ilex latifolia* Thunb.; fingerprint; principal component analysis; spectrum-activity relationship; xanthine oxidase

大叶冬青 *Ilex latifolia* Thunb. 为冬青科冬青属常绿乔木, 又名宽叶冬青, 药用其叶, 又称大叶茶, 为苦丁茶的基原植物之一^[1-2]。其富含三萜及三萜皂苷类、黄酮类、多酚类、多糖类等多种活性成分^[3-5], 具有调血脂、降血糖、防治心血管疾病、抗氧化、抗衰老等药用及保健功效^[6-10]。

痛风是人体嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄减少所致的一组综合征, 目前临床上对痛风多采用嘌呤类似物别嘌呤醇等化学药物治疗, 其主要是通过抑制黄嘌呤氧化酶(XOD)的活性, 阻止其与黄嘌呤反应生成尿酸, 从而减少尿酸的生成。但长期用药可导致诸多不良反应, 如皮疹、肝肾功能异常甚至骨髓抑制^[11-13], 探索低毒高效的中药及中药复方制剂逐渐成为研究热点。本实验借助相关统计学方法, 将大叶冬青指纹图谱与药效信息进行整合分析, 并确定大叶冬青中各成分对药效的贡献大小, 为阐明大叶冬青对 XOD 抑制作用的药效物质基础提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 分析型高效液相色谱仪、SPD-M20A 二极管阵列检测器, 日本岛津公司; BT25S 型十万分之一电子天平, 德国赛多利斯科学仪器有限公司; ELSD-2000 蒸发光散射检测器, 美国奥泰公司; XWK-3A 型空气发生器, 天津市津分分析仪器制造有限公司; UV-1801 紫外分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司。

1.2 药材与试剂

大叶冬青药材均由吉林省中医药科学院牛志多研究员鉴定为冬青科冬青属植物大叶冬青 *Ilex latifolia* Thunb. 的干燥叶, 浙江产 4 批(编号 S1~S4), 江西产 3 批(编号 S5~S7), 安徽产 3 批(编号 S8~S10)。对照品山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、苦丁茶冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 F 为实验室自制, 经 HPLC 法检测质量分数均大于 98%; 绿原酸(质

量分数 98%, 批号 150227, 北京科量技术有限公司) XOD(规格 8 U/mg, CAS9002-17-9)、别嘌呤醇(规格 25 g, 质量分数>99%, CAS315-30-0)、氧嗪酸钾(规格 5 g, 质量分数>98%, CAS2207-75-2)均购自大连美仑生物技术有限公司; 尿酸(UC)试剂盒(批号 20171110)、XOD 试剂盒(批号 20171109)均购自南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

6~8 周龄 ICR 雄性小鼠, SPF 级, 体质量(20 $\pm$ 2) g, 购于长春亿斯实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK(吉)-2016-0003。

2 方法与结果

2.1 大叶冬青药材 HPLC 指纹图谱的构建与分析

2.1.1 色谱条件^[14-15] 色谱柱为岛津 C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈(A)-水(B), 二元梯度洗脱条件: 0~15 min, 15% A; 15~65 min, 15%~42% A; 65~72 min, 42% A; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μ L。

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取绿原酸、山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、苦丁茶冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 F 适量置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇配成含绿原酸 177 μ g/mL、山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷 156 μ g/mL、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷 20 μ g/mL、大叶冬青皂苷 C 347 μ g/mL、大叶冬青皂苷 D 170 μ g/mL、大叶冬青皂苷 F 220 μ g/mL、大叶冬青皂苷 H 168 μ g/mL、苦丁冬青皂苷 E 190 μ g/mL、苦丁冬青皂苷 F 80 μ g/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 分别精密称取 10 批大叶冬青药材粉末(过 60 目筛) 10.0 g, 加入 70%乙醇 500 mL, 超声提取 1 h, 加 70%乙醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 大叶冬青药材指纹图谱的建立 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版, 对不同产

地的 10 批大叶冬青药材供试品的谱图进行处理,生成对照指纹图谱,见图 1。

2.1.5 HPLC 共有指纹峰的归属 用相对保留时间标定共有指纹峰,在 HPLC 指纹图谱中确定了 15 个共有峰,对比混合对照品的 HPLC 谱图,鉴定出 9 个色谱峰,1 号峰为绿原酸、6 号峰为山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、7 号峰为异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、8 号峰为大叶冬青皂苷 F、9 号峰为大叶冬青皂苷 H、10 号峰为大叶冬青皂苷 C、11 号峰为苦丁茶冬青皂苷 E、13 号峰为大叶冬青皂苷 D、14 号峰为苦丁冬青皂苷 F,见图 1。

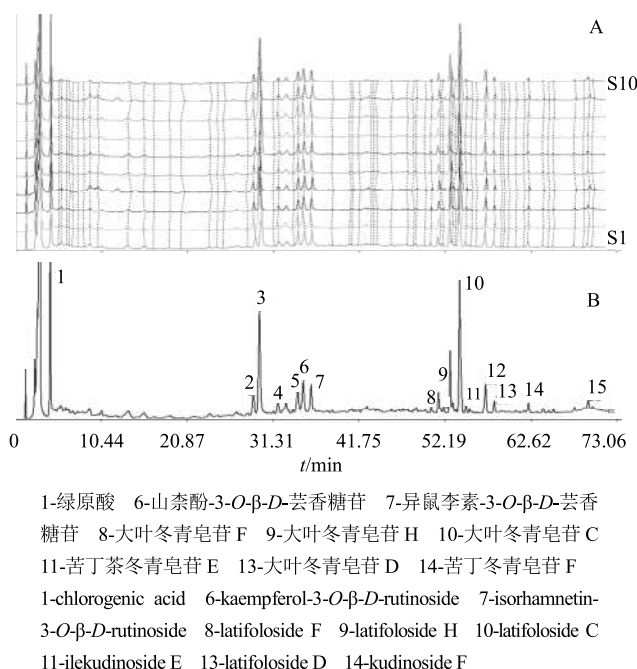


图 1 不同产地大叶冬青药材的 HPLC 指纹图谱 (A) 及对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 HPLC fingerprint of *I. latifolia* samples from different regions (A) and reference fingerprint (B)

2.1.6 大叶冬青药材指纹图谱主成分分析 (PCA)

PCA 是一种分析、简化数据集的技术,通过重新组合与原来变量互相无关的几个综合变量,来尽可能多地反映原来变量所包含的信息的统计方法。本实验运用 SPSS 22.0 统计分析软件进行 PCA,得到主成分方差以及起始因子载荷矩阵,结果见表 1。由表 1 可知,主成分 1 的贡献率最大为 62.406%,主成分 2 和 3 的贡献率次之,分别为 15.920% 和 7.751%,其他成分的贡献率很小,系统自动提取了前 3 个特征根大于 1 的主成分,其累积方差贡献率高达 86.077%,所以,可以用这 3 个主成分作为新变量代替原有变量。相关系数由主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征根值的平方根计算得到,主成分模型: $F_1 = 0.261 X_1 + 0.245 X_2 + 0.313 X_3 + 0.171 X_4 + 0.317 X_5 + 0.309 X_6 + 0.302 X_7 + 0.316 X_8 + 0.521 X_9 + 0.409 X_{10} + 0.101 X_{11} + 0.315 X_{12} + 0.252 X_{13} + 0.111 X_{14} + 0.022 X_{15}$; $F_2 = 0.039 X_1 + 0.364 X_2 - 0.044 X_3 - 0.087 X_4 + 0.077 X_5 - 0.069 X_6 + 0.026 X_7 + 0.051 X_8 - 0.015 X_9 - 0.108 X_{10} + 0.481 X_{11} - 0.046 X_{12} - 0.25 X_{13} - 0.375 X_{14} + 0.628 X_{15}$; $F_3 = 0.475 X_1 - 0.066 X_2 - 0.080 X_3 - 0.493 X_4 - 0.063 X_5 - 0.169 X_6 + 0.191 X_7 + 0.012 X_8 + 0.018 X_9 - 0.141 X_{10} + 0.233 X_{11} - 0.124 X_{12} - 0.096 X_{13} + 0.593 X_{14} + 0.032 X_{15}$ 。其中, F_1 、 F_2 、 F_3 表示 3 个主成分, X_1 、 X_2 …… X_{15} 表示共有色谱峰 1、2……15 相对于参照峰 (峰 10) 的相对峰面积。在 3 个主成分中, F_1 是最主要的特征指标, F_1 模型中, X_9 的系数最大,表明峰 9 所对应的化合物在大叶冬青药材的质量控制中起到非常重要的作用。峰 9 所对应的化合物为大叶冬青皂苷 H,也就是说,大叶冬青皂苷 H 可以作为大叶冬青药材质量评价控制的重要依据。

表 1 大叶冬青指纹图谱 PCA 贡献率及累积方差贡献率

Table 1 Contribution rate and cumulative contribution rate of PCA in *I. latifolia*

主成分	起始特征值			提取特征值		
	特征根	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征根	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.361	62.406	62.406	9.361	62.406	62.406
2	2.388	15.920	78.326	2.388	15.920	78.326
3	1.163	7.751	86.077	1.163	7.751	86.077

2.2 大叶冬青提取液对 XOD 的抑制作用研究

2.2.1 XOD 测定的色谱条件^[16-18] 参考文献优化色谱条件,流动相为 20 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (含甲醇 2%), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 254

nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μ L。

2.2.2 不同质量浓度的大叶冬青提取液对 XOD 的抑制作用 取 200 μ L 不同质量浓度的大叶冬青提取液 (S1 批样品制得), 加入 450 μ L 100 U/L 的 XOD

溶液,混合物在 37 ℃ 恒温水浴 15 min,加入 200 μ L 1 mmol/L 黄嘌呤底物溶液开始反应,混合物在 37 ℃ 恒温水浴 30 min 后,加入 500 μ L 1% 盐酸溶液终止反应,加入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)定容至 2 mL,得到供试品溶液,每个样品平行测定 3 次。同时设置空白对照和阳性对照,即分别用 PBS 溶液和不同质量浓度的别嘌呤醇溶液代替大叶冬青提取液。结果见表 2。可知,阳性药别嘌呤醇和大叶冬青提取液对 XOD 均具有抑制作用,且呈质量浓度依赖性,其中大叶冬青药材提取液质量浓度为 25 mg/mL 时对 XOD 的抑制效果最好。

表 2 不同质量浓度的大叶冬青提取液对 XOD 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Dose-dependent inhibition of XOD by extracts of *I. latifolia* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ /(mg·mL ⁻¹)	抑制率/%
空白对照	—	0.834 1 $\pm$ 0.007 9
别嘌呤醇	0.100	0.312 5 $\pm$ 0.053 9*
	0.150	8.989 0 $\pm$ 0.103 8**
	0.175	30.357 6 $\pm$ 0.089 5**
	0.200	71.969 3 $\pm$ 0.099 1**
	0.225	82.598 5 $\pm$ 1.035 0**
	0.300	93.474 0 $\pm$ 0.068 7**
	0.400	96.002 2 $\pm$ 0.091 3**
	0.391	2.117 5 $\pm$ 0.040 2*
大叶冬青提取液	0.781	5.199 4 $\pm$ 0.073 4**
	1.563	13.503 2 $\pm$ 0.053 7**
	3.125	25.279 3 $\pm$ 0.093 3**
	6.250	33.882 2 $\pm$ 0.029 5**
	12.500	49.614 2 $\pm$ 0.102 6**
	25.000	56.628 0 $\pm$ 0.079 8**

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank control group

2.2.3 不同产地大叶冬青提取液对 XOD 的抑制作用 取 10 批不同产地的大叶冬青药材,按“2.1.3”项下方法制备大叶冬青提取液后减压浓缩,得到固体,配成 25 mg/mL 的大叶冬青提取液,按“2.2.2”项下方法进行操作,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,每个样品平行测定 3 次。结果见表 3。可知,10 批次不同产地的大叶冬青药材对 XOD 均有抑制作用,其中,样品 S3(浙江)的抑制效果最好。

2.3 大叶冬青药材谱效关系分析^[19-20]

10 批不同产地的大叶冬青药材指纹图谱中,大叶冬青皂苷 C 结构稳定,且分离度好,所以选择大叶冬青皂苷 C(峰 10)作为参照峰,其相对峰面积

表 3 不同产地大叶冬青药材提取液对 XOD 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Inhibition of *I. latifolia* extracts from different regions on XOD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	抑制率/%	样品	抑制率/%
别嘌呤醇	95.891 7 $\pm$ 0.066 2	S6	53.710 9 $\pm$ 0.092 3
S1	56.190 3 $\pm$ 0.085 2	S7	57.020 8 $\pm$ 0.087 7
S2	53.378 1 $\pm$ 0.061 2	S8	56.113 3 $\pm$ 0.060 9
S3	58.019 6 $\pm$ 0.073 9	S9	55.980 9 $\pm$ 0.076 3
S4	57.360 1 $\pm$ 0.048 6	S10	53.294 7 $\pm$ 0.100 2
S5	54.193 6 $\pm$ 0.053 9		

比值计为 1,计算大叶冬青药材 HPLC 中共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。采用 SPSS 22.0 软件进行相关性分析,计算各个共有峰与 XOD 抑制作用的相关系数(pearson),结果见表 4。可知,1、2、3、4、5、7、13、15 号峰的峰面积与 XOD 的抑制作用呈正相关,其余各峰呈负相关。峰 11、14 呈中等程度相关,峰 5、6、7、10、13 相关性最强。

2.4 大叶冬青提取液对小鼠高尿酸血症的影响^[21-24]

2.4.1 实验动物模型的制备 取 60 只健康小鼠于动物实验室内正常喂养 1 周以适应环境后随机分为 6 组,即对照组、模型组、阳性对照(别嘌呤醇,10 mg/kg)组及大叶冬青提取物高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组,每组 10 只。参照文献方法稍作改动制备小鼠高尿酸血症模型,第 1~7 天,阳性对照组每天 ig 给予别嘌呤醇,给药组 ig 给予大叶冬青提取物,对照组和模型组 ig 生理盐水。第 7 天各组给药 1 h 后,除对照组外,其他各组小鼠 ip 氧嗪酸钾溶液(300 mg/kg)。

2.4.2 指标检测 给药第 7 天,ip 氧嗪酸钾 1 h 后,小鼠眼球取血,室温下放置 1 h 后 2 500 r/min 离心 10 min,分离得到血清,按照试剂盒规定操作,检测血清中 UC、XOD 水平。取出小鼠肝脏,迅速置于-80 ℃ 保存待测。肝脏样本解冻后与生理盐水 1:9 混合,匀浆,制成 10%肝组织匀浆液,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行小鼠肝脏 XOD 水平测定。

2.4.3 大叶冬青提取液对小鼠血清中 UC、XOD 水平及肝脏 XOD 水平的影响 如表 5 所示,与对照组相比,模型组小鼠血清中 UC、XOD 水平明显升高($P < 0.01$),肝组织 XOD 水平明显升高($P < 0.05$),表明小鼠高尿酸血症模型成立。与模型组相比,阳性药组和高、中、低剂量大叶冬青提取液组

表 4 不同产地大叶冬青药材指纹图谱共有峰的相对峰面积及与 XOD 抑制率的相关系数

Table 4 Relative peak area of common peaks and correlation coefficients of *I. latifolia* samples from different regions

峰号	相对峰面积										相关系数
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	1.898	2.096	1.960	2.280	1.677	1.638	1.538	2.196	2.157	1.960	0.089
2	0.218	0.185	0.184	0.243	0.175	0.188	0.188	0.185	0.154	0.164	0.201
3	1.124	1.187	1.321	1.567	0.953	0.945	0.945	0.898	0.827	0.844	0.382
4	0.099	0.139	0.099	0.131	0.103	0.101	0.101	0.109	0.082	0.087	0.330
5	0.256	0.288	0.243	0.289	0.154	0.147	0.150	0.281	0.269	0.273	0.934**
6	0.298	0.293	0.292	0.281	0.343	0.355	0.325	0.243	0.272	0.252	-0.804**
7	0.232	0.247	0.249	0.236	0.188	0.163	0.154	0.207	0.236	0.210	0.794**
8	0.046	0.050	0.053	0.046	0.048	0.047	0.047	0.040	0.036	0.035	-0.326
9	0.038	0.042	0.030	0.043	0.038	0.038	0.038	0.027	0.028	0.030	-0.222
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-0.729**
11	0.045	0.040	0.046	0.046	0.056	0.055	0.050	0.046	0.046	0.040	-0.651*
12	0.269	0.230	0.258	0.243	0.218	0.215	0.214	0.159	0.161	0.188	-0.194
13	0.081	0.088	0.075	0.076	0.064	0.053	0.055	0.079	0.076	0.076	0.811**
14	0.068	0.073	0.078	0.067	0.091	0.087	0.075	0.063	0.067	0.066	-0.725*
15	0.058	0.062	0.096	0.069	0.055	0.055	0.055	0.062	0.069	0.096	0.339

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 表 5 各组小鼠血清中 UC、XOD 水平以及肝组织中 XOD 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Levels of plasma UC and XOD and levels of XOD in liver of mice in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝脏 XOD/(U·g ⁻¹)	血清	
			UC/(mg·L ⁻¹)	XOD/(U·L ⁻¹)
对照	—	22.23 ± 9.15	65.95 ± 8.04	18.85 ± 5.92
模型	—	39.53 ± 9.22*	129.34 ± 9.64**	32.43 ± 6.73**
别嘌呤醇	10	17.62 ± 12.64 ^{△△}	54.02 ± 10.35 [△]	17.68 ± 8.82 ^{△△}
大叶冬青提取液	400	18.17 ± 8.09 ^{△△}	62.37 ± 7.51 ^{△△}	18.10 ± 7.08 ^{△△}
	200	21.35 ± 8.23 ^{△△}	89.92 ± 9.79 [△]	21.41 ± 9.71 [△]
	100	25.45 ± 10.39 [△]	109.63 ± 8.07	24.24 ± 7.22

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

小鼠血清中 UC、XOD 水平以及肝组织中 XOD 水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05, 0.01$), 且随着给药浓度的升高, 小鼠血清 UC、XOD 水平降低呈剂量依赖关系。其中, 阳性药组与大叶冬青提取液高剂量组最接近, 表明其效果最显著。

3 讨论

本研究建立了大叶冬青药材的指纹图谱, 标定了 15 个共有色谱峰, 课题组相关研究表明^[14-15], 大叶冬青中多酚类物质保留时间在 10 min 前, 黄酮类物质保留时间在 20~40 min, 而皂苷类物质保留时间主要在 50 min 之后。大叶冬青中三萜皂苷类化合物含量最高, 在波长 210 nm 色谱信息最全面, 故选择波长 210 nm 作为最佳扫描波长。

对大叶冬青指纹图谱中标定的 15 个共有峰进行 PCA, 得出峰 9 (大叶冬青皂苷 H) 的量在大叶

冬青药材的质量控制中起到非常重要的作用。同时, 系统地比较了不同质量浓度的大叶冬青对 XOD 的抑制作用, 筛选出 25 mg/mL 的大叶冬青提取液对 XOD 作用最强, 并针对该质量浓度进行了 10 批不同产地的大叶冬青的酶促反应, 采用 pearson 相关系数进行相关性数据分析研究。结果表明, 10 批次不同产地的大叶冬青均对 XOD 表现出了抑制作用, 其中 S3 批次 (浙江) 的抑制效果最好。15 个共有峰中, 峰 1、2、3、4、5、7、13、15 的峰面积与 XOD 的抑制作用呈正相关, 其余各峰呈负相关; 峰 11 (苦丁茶冬青皂苷 E)、14 (苦丁冬青皂苷 F) 与 XOD 抑制作用呈中等程度相关, 峰 5、6 (山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷)、7 (7-异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷)、10 (大叶冬青皂苷 C)、13 (大叶冬青皂苷 D) 相关性最强。

本研究有进行了体内实验验证,以氧嗪酸钾致小鼠高尿酸血症为模型,结果表明,大叶冬青提取物(批次 S3)高、中、低剂量分别为 400、200、100 mg/kg,均能显著降低小鼠血清 UC 水平,抑制肝组织中 XOD 水平,并呈现一定的量效关系。这也验证了大叶冬青对 XOD 具有抑制作用的结果。

综上结果可知,大叶冬青对 XOD 的抑制作用是多种成分共同作用的结果,通过阐明指纹图谱特征与药效的关系,确定相应药效物质基础,从而构建谱效学关系能更有针对性地控制大叶冬青药材质量。

参考文献

- [1] 贺震旦,彭勇,肖培根.苦丁茶研究与开发[M].北京:科学出版社,2010.
- [2] 张永田.苦丁茶的原植物[J].植物分类学报,1994,32(1): 100.
- [3] 刘祖生,梁月荣,徐月荣,等.苦丁茶化学成分研究—黄酮类化合物的 HPLC 分离鉴定[J].浙江农业大学学报,1992,18(增刊): 66-69.
- [4] 伍彬,郑曦孜.大叶冬青化学成分研究[J].药物研究,2009,18(10): 17-18.
- [5] 易帆,彭勇,许利嘉,等.大叶苦丁茶的研究进展[J].中国现代中药,2013,15(8): 710-717.
- [6] 王存琴,张艳华.大叶冬青的化学成分及药理活性研究进展[J].中国药房,2014,25(11): 1052-1054.
- [7] 李晓储,蒋继宏,方德兰,等.大叶冬青叶若干生化指标测定及抗菌活性研究[J].扬州大学学报: 农业与生命科学版,2006,27(1): 91-94.
- [8] 陈凤美,李晓储,杨守辉,等.大叶冬青叶抗肿瘤活性初步研究[J].林业科技开发,2007,21(5): 30-31.
- [9] 谭银丰,李海龙,王群,等.大叶冬青降血脂作用及多糖含量测定研究[J].海南医学院学报,2011,17(1): 24-26.
- [10] 金亚香,孙晶,李洪军.大叶苦丁茶抗氧化成分的提取及活性的比较研究[J].食品工业科技,2015,36(4): 151-153.
- [11] Emmerson B T. The management of gout [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(7): 445-451.
- [12] Wang H H, Lei B T, Zhang Y. Febuxostat: A new type selective inhibitor of xanthine oxidas [J]. *China Pharm*, 2010, 13(1): 133-136.
- [13] Baldwin W, McRae S, Marek G, *et al.* Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome [J]. *Diabetes*, 2011, 60(4): 1258-1269.
- [14] 冯琳琳.苦丁茶冬青及大叶冬青的质量控制研究[D].长春: 吉林大学,2017.
- [15] 关玥,冯琳琳,于敏,等. HPLC 法同时测定大叶冬青中 6 种三萜皂苷成分的量[J].中草药,2017,48(11): 2296-2299.
- [16] 孙永丽,赵焕新,白虹. HPLC 法体外筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂[J].药物分析杂志,2014,34(8): 1391-1396.
- [17] Li L, Dai L Z, Yang J. Study on xanthine oxidase inhibitory activity of the extracts from Chinese herbal medicines [J]. *J Wuhan Inst Technol*, 2010, 32(3): 44-46.
- [18] 许洪波,周瑞,谢培,等. 27 种中草药的黄嘌呤氧化酶抑制活性筛选[J].时珍国医国药,2017,28(3): 547-548.
- [19] 肖云芝,于超,刘朝勇,等.鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究[J].中草药,2014,45(17): 2506-2510.
- [20] 陈宇,薛志远,师志强,等.红芪活性组分抗骨质疏松作用的谱效关系研究[J].中草药,2018,49(1): 160-166.
- [21] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9): 1069-1072.
- [22] 樊海瑞,赵岩,傅警龙,等.痛风宁胶囊对小鼠高尿酸血症和肾脏功能的改善作用[J].吉林大学学报: 医学版,2017,43(5): 893-896.
- [23] 许光辉,赵淑飞,黄亦琦,等.金线莲提取物对黄嘌呤氧化酶活性及高尿酸血症小鼠的影响[J].海峡药学,2017,29(7): 12-14.
- [24] 于舒雁.金钱草总黄酮对高尿酸血症动物模型的影响[D].郑州: 河南中医学院,2014.