

基于化学模式识别法的翼核果指纹图谱及抗氧化活性研究

黄建猷^{1,2}, 胡筱希^{1#}, 黄周锋^{1,2}, 陆国寿^{1,2*}, 谭晓¹, 蓝常珍³

1. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西 南宁 530022

2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西 南宁 530022

3. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 基于化学模式识别法建立翼核果 *Ventilago leiocarpa* 指纹图谱与多成分含量测定, 并研究其抗氧化活性, 为其进一步开发利用提供依据。方法 建立 15 批不同产地翼核果 HPLC 指纹图谱, 确定共有峰, 通过对照品比对指认 4 种化学成分并测定样品中含量, 使用 SPSS 19.0、SIMCA 14.1 软件进行聚类分析和主成分分析, DPPH 法测定其抗氧化活性, 并通过灰色关联度分析建立其谱效关系。结果 选取了 8 个色谱峰作为指纹图谱的共有峰, 通过聚类分析可将 15 批翼核果分为 3 类, 主成分分析与聚类分析结果基本一致; 经主成分分析, 3 个主成分因子的累积方差贡献率为 80.505%; 被指认的大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰在 15 批样品中的质量分数分别为 0.06~2.08 mg/g、3.57~17.03 mg/g、0.04~1.53 mg/g、0.10~1.59 mg/g; 15 批样品均具有抗氧化活性, 8 个共有峰与抗氧化活性存在一定的关联度, 关联度在 0.8259~0.6351, 各特征峰所代表的化学成分对其抗氧化活性贡献的大小顺序为 8 号峰>3 号峰>1 号峰>2 号峰>4 号峰>5 号峰>7 号峰>6 号峰。结论 翼核果抗氧化作用为“多成分”共同起效的结果, 翼核果指纹图谱的构建和化学模式识别为其质量控制提供科学依据, 大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚可作为翼核果质量控制的指标性成分。

关键词: 翼核果; 指纹图谱; 大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 抗氧化活性; 化学模式识别; 灰色关联分析

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-5021-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.027

Chromatographic fingerprints and antioxidant activity of *Ventilago leiocarpa* based on chemical pattern recognition

HUANG Jian-you^{1,2}, HU Xiao-xi¹, HUANG Zhou-feng^{1,2}, LU Guo-shou^{1,2}, TAN Xiao¹, LAN Chang-zhen³

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. Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective Based on chemical pattern recognition, the HPLC fingerprints and multi-component content determination of *Ventilago leiocarpa* was established to provide basis for further development and utilization. **Methods** The HPLC fingerprints of 15 batches of *V. leiocarpa* were established to determine the common peaks. Four chemical components were identified and the content of the samples were determined by comparison with the reference materials. Cluster analysis principal component analysis were carried out by SPSS 19.0 and SIMCA 14.1 software. The antioxidant activity was determined by DPPH method, and spectrum-effect relationship was established by gray correlation analysis. **Results** Eight chromatographic peaks were selected as the common peaks of the fingerprint, 15 bathes of *V. leiocarpa* could be divided into three categories by cluster analysis, and the results of principal component analysis and cluster analysis were basically the same; By principal component analysis, the

收稿日期: 2021-01-13

基金项目: 广西科技计划项目(桂科 AD17195002); 广西自然科学基金资助项目(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: 黄建猷(1981—), 男, 副主任药师, 主要从事中药、民族药及复方药效物质基础及质量标准化研究。E-mail: dearhuangjianyou@126.com

*通信作者: 陆国寿(1980—), 男, 副主任药师, 主要从事中药、民族药及复方药效物质基础及质量标准化研究。E-mail: luguoshou@foxmail.com

#并列第一作者: 胡筱希(1991—), 女, 助理研究员, 主要从事天然药物化学及质量标准研究。E-mail: huxiaoxi0124@126.com

cumulative variance contribution rate of the three principal component factors was 80.505%. The content emodin-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside, emodin, chrysophanol and physcion were 0.06—2.08 mg/g, 3.57—17.03 mg/g, 0.04—1.53 mg/g, 0.10—1.59 mg/g. 15 batches of samples all showed antioxidant activities. The correlation between HPLC fingerprint and the antioxidant activity was from 0.8259 to 0.6351. The contribution of chemical compositions represented by each characteristic peak to the antioxidant activity was in the order of peak 8 > peak 3 > peak 1 > peak 2 > peak 4 > peak 5 > peak 7 > peak 6. **Conclusion** The antioxidant activity of *V. leiocarpa* may be the combined effect of a variety of chemical constituents. The establishment of HPLC fingerprint of *V. leiocarpa*. and the application of chemical pattern recognition can provide scientific basis for quality control of *V. leiocarpa*.

Key words: *Ventilago leiocarpa* Benth.; fingerprint; emodin-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside; emodin; chrysophanol; physcion; anti-oxidant activity; chemical pattern recognition; gray correlation analysis

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^[1],“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^[2]。翼核果又名紫九牛,为鼠李科(Rhamnaceae)植物翼核果 *Ventilago leiocarpa* Benth.的根、茎及叶,收载于《中国瑶药学》^[3]、《中国壮药学》^[4]等,别名血风根、血风藤、红蛇根、青筋藤、铁牛入石、拉牛入石;瑶医认为其具有养血祛风、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。现代研究发现,翼核果中含有生物碱、黄酮苷、蒽醌等化学成分^[5-9],翼核果醇提物毒性低,对乙醇肝损伤有防治作用^[10]。长期以来,对翼核果的质量控制研究多以薄层色谱(TLC)^[11]、HPLC及其指纹图谱^[12-16]等指标性成分进行定性或定量检测,但这些研究以单纯的化学分析为主,而与药效结合的整体性、联系性探索较少,也未见对翼核果 HPLC 指纹图谱与其活性相关性的报道。基于此,本实验建立了不同产地翼核果的指纹图谱及对大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 种成分进行了含量测定,应用聚类分析与主成分分析等化学模式识别法对不同产地翼核果药材进行比较分析;通过 DPPH 法测定其抗氧化活性,并利用灰色关联度

分析其特征峰与抗氧化活性的关系,为能更好地开发利用翼核果药材资源提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(2998 PDA Detector, Waters e2695 Separations Module, Empower 3 色谱工作站,美国 Waters 公司);XS-205 型电子天平(瑞士梅特勒公司);KS-3200DE 液晶超声波清洗器(昆山洁力美超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品:大黄素(中国食品药品检定研究院,批号 110756-201913);大黄酚(自制,经 HPLC 检测质量分数大于 98%);大黄素甲醚(中国食品药品检定研究院,批号 110758-201817);大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(成都瑞芬生物科技有限公司,批号 D-018-180802,质量分数大于 98%)。磷酸(广东光华科技股份有限公司,分析纯),甲醇(广东光华科技股份有限公司,分析纯),乙腈(默克股份两合公司,色谱纯),Milli-Q 超纯水系统(美国 Milipore 公司)。

1.3 药材

翼核果分别收集于不同地点,见表 1。经广西中医药研究院卢文杰主任药师鉴定为鼠李科(Rhamnaceae)植物翼核果 *V. leiocarpa* Benth.的根、茎及叶。

表 1 15 批翼核果药材信息

Table 1 Information table of 15 batches of *Ventilago leiocarpa*

编号	来源	时间	编号	来源	时间
S1	采自广西金秀	2016-06	S9	采自广西南宁	2018-04
S2	采自广西金秀	2016-06	S10	采自广东梅州	2018-06
S3	购自广西南宁	2016-11	S11	购自广西玉林	2018-08
S4	采自广西金秀	2017-04	S12	购自广西玉林	2018-08
S5	采自广西金秀	2017-04	S13	采自广东深圳	2018-10
S6	采自广西河池	2017-10	S14	购自广西玉林	2018-10
S7	采自广西河池	2017-10	S15	采自广东江门	2018-11
S8	采自广西南宁	2018-04			

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为27.20、40.08、29.36、21.84 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取翼核果药材(粉碎，过40目筛)0.2 g至25 mL量瓶中，加入20 mL甲醇超声30 min，放冷，用甲醇定容至刻度，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2 色谱条件

Waters SunFire[®] C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；流动相0.1%磷酸(A)-乙腈(B)，梯度洗脱(0~40 min, 85%~75% A; 40~60 min, 75%~65% A; 60~80 min, 65% A; 80~100 min, 65%~50% A; 100~120 min, 50%~30% A; 120~130 min, 30%~10% A; 130~135 min, 10%~85% A; 135~145 min, 85% A)；体积流量1 mL/min；柱温25 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长285 nm；进样量10 μL 。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批翼核果粉末(S1)约0.2 g，精密称定，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件连续进样6次，以5号峰(大黄素)为参照峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD值均小于3%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批翼核果粉末(S1)约0.2 g，精密称定，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，室温下放置，分别在0、3、6、12、18、24 h后按“2.2”项下色谱条件进样分析，以5号峰(大黄素)为参照峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD值均小于3%，表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批翼核果粉末(S1)约0.2 g，精密称定，平行制备6份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样分析，以5号峰(大黄素)为参照峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD值均小于3%，表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 共有峰的标定 取15批不同产地翼核果粉末，分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行测定，得到15批翼核果药材HPLC图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)进行色谱峰匹配，样品(S1)图谱作为参照图谱，共标定8个色谱峰，选择中位数法生成对照图谱(R)，采用多点校正建立指纹图谱，见图1、2。

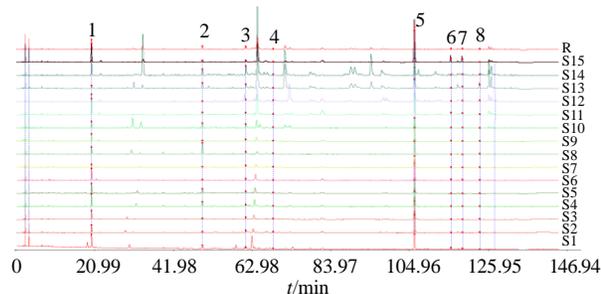


图1 15批翼核果药材HPLC指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprints of 15 batches of *V. leiocarpa*

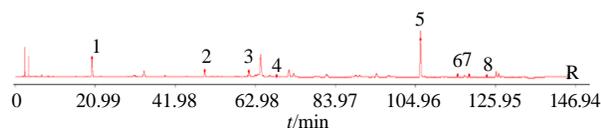


图2 翼核果药材HPLC对照指纹图谱

Fig. 2 Common mode of HPLC fingerprints of *V. leiocarpa*

2.4.2 相对峰面积和相对保留时间 选取峰面积较大，出峰时间较稳定的5号峰(大黄素)作为参照峰(S)。取15批翼核果指纹图谱计算各色谱峰保留时间和峰面积与同一色谱图中S峰的保留时间和峰面积的比值，得到的相对保留时间和相对峰面积，见表2、3。结果表明，各共有峰的相对保留时间RSD值均小于1.0%，说明共有峰出峰时间均较稳定，成分种类相对稳定。

2.4.3 相似度 将得到的15批翼核果指纹图谱导入的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”，进行色谱峰匹配，生成翼核果对照指纹图谱(图2)，并计算不同批次之间的相似度。结果显示，15批样品与对照指纹图谱之间的相似度分别为0.782、0.978、0.973、0.921、0.930、0.947、0.954、0.856、0.965、0.616、0.917、0.608、0.426、0.198、0.875。结果表明，不同产地样品存在较大差异。

表 2 15 批翼核果指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks of 15 batches of *V. leiocarpa*

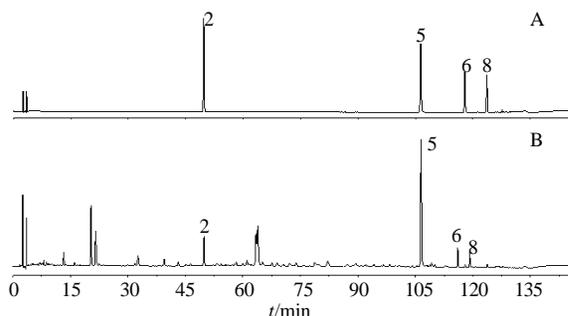
峰号	相对保留时间															RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
1	0.191 6	0.189 0	0.189 1	0.189 3	0.189 4	0.189 4	0.189 2	0.189 3	0.189 3	0.189 7	0.189 5	0.189 2	0.189 2	0.189 3	0.189 1	0.33
2	0.468 7	0.467 4	0.467 3	0.467 4	0.467 5	0.467 4	0.467 2	0.467 2	0.467 1	0.467 7	0.467 5	0.467 3	0.467 2	0.467 4	0.467 6	0.08
3	0.573 0	0.577 3	0.577 8	0.577 6	0.577 5	0.577 6	0.577 6	0.577 1	0.572 4	0.576 7	0.572 9	0.572 7	0.576 5	0.576 7	0.572 8	0.39
4	0.636 5	0.646 6	0.646 2	0.646 4	0.646 5	0.646 5	0.646 6	0.646 7	0.646 6	0.646 5	0.646 8	0.646 2	0.645 9	0.646 1	0.645 9	0.40
5	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
6	1.090 0	1.090 5	1.090 6	1.090 8	1.090 8	1.090 9	1.091 1	1.091 3	1.091 1	1.090 9	1.091 1	1.091 3	1.091 3	1.091 3	1.091 1	0.03
7	1.119 4	1.119 7	1.119 7	1.119 7	1.119 7	1.119 8	1.119 7	1.119 9	1.119 8	1.119 6	1.119 8	1.119 8	1.119 7	1.119 9	1.119 7	0.01
8	1.163 6	1.163 6	1.163 4	1.163 2	1.163 2	1.163 1	1.163 0	1.163 0	1.162 9	1.162 5	1.162 8	1.162 6	1.162 6	1.162 6	1.162 5	0.03

表 3 15 批翼核果指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks of 15 batches of *V. leiocarpa*

峰号	相对峰面积															RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
1	0.362 2	0.172 5	0.180 4	0.338 3	0.309 2	0.283 2	0.090 9	0.214 3	0.204 3	0.247 7	0.172 3	0.049 9	0.035 0	0.455 2	0.215 6	52.24
2	0.216 7	0.045 4	0.045 7	0.316 7	0.367 6	0.039 1	0.041 8	0.952 0	0.024 2	0.441 9	0.045 6	0.015 6	0.122 1	0.356 4	0.053 6	123.64
3	0.038 2	0.011 5	0.032 8	0.023 5	0.008 2	0.007 9	0.006 7	0.068 5	0.009 6	0.096 7	0.014 0	0.239 3	0.035 9	0.310 8	0.004 5	151.60
4	0.029 1	0.018 1	0.022 6	0.030 5	0.029 9	0.006 3	0.007 2	0.006 9	0.006 1	0.033 7	0.006 4	0.117 8	0.014 7	0.058 7	0.004 1	112.78
5	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
6	0.093 7	0.016 8	0.019 9	0.027 0	0.016 2	0.066 6	0.024 6	0.008 6	0.047 1	0.087 7	0.039 8	0.020 2	0.013 0	0.026 8	0.104 1	78.08
7	0.072 3	0.013 0	0.016 4	0.021 8	0.013 6	0.057 6	0.017 5	0.006 6	0.037 5	0.053 0	0.034 7	0.014 5	0.015 2	0.022 0	0.093 1	78.14
8	0.018 4	0.029 7	0.030 9	0.030 1	0.020 8	0.051 2	0.037 5	0.078 3	0.046 0	0.025 4	0.017 4	0.055 5	0.132 6	0.038 1	0.013 0	73.11

2.4.4 主要色谱峰的化学指认 采用对照品对各峰进行指认,按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录 HPLC 图,通过比较各峰保留时间和紫外吸收光谱,对各峰进行指认(图 3)。翼核果样品 HPLC 指纹图谱中 2、5、6、8 号峰得到化学指认,依次为 2-大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。



2-大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 5-大黄素 6-大黄酚 8-大黄素甲醚
2-emodin-8-O-β-D-glucopyranoside 5-emodin 6-chrysophanol 8-phycion

图 3 混合对照品溶液 (A) 和翼核果供试品溶液 (B) HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC of mixed reference solution and *V. leiocarpa* test solution

2.5 HPLC 同时测定翼核果中 4 种有效成分的含量
2.5.1 色谱条件 同“2.2”项色谱条件。

2.5.2 对照品溶液的制备 分别称取大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成含大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 340.00 μg/mL、大黄素 501.00 μg/mL、大黄酚 367.00 μg/mL、大黄素甲醚 273.00 μg/mL 的对照品溶液。分别取各对照品溶液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,然后分别取混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL,均定容至 10 mL,得到不同质量浓度的混合对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 同“2.1.2”项下方法。

2.5.4 线性关系考察 按照“2.2”项下的色谱条件对每个不同质量浓度的对照进行测定并记录峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y),对照品质量浓度为横坐标 (X),进行线性回归,即得回归方程及线性范围。回归方程、线性范围及相关系数分别为大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 $Y=37\ 437 X+10\ 234.2$, 6.80~68.00 μg/mL, $r^2=0.999\ 8$; 大黄素 $Y=18\ 331 X-5\ 852.5$, 10.02~100.20 μg/mL, $r^2=0.999\ 9$; 大黄酚 $Y=16\ 108 X-2\ 128.6$, 7.34~73.40 μg/mL, $r^2=0.999\ 5$; 大黄

素甲醚 $Y=16\ 082\ X-291.8$, $5.46\sim 54.60\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $r^2=0.999\ 8$; 结果表明 4 种成分在上述质量浓度范围内线性关系良好。

2.5.5 精密度试验 取同一混合对照品溶液在“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 计算大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 0.56%、0.38%、0.43%、0.52%, 表明仪器的精密性良好。

2.5.6 稳定性试验 取 S1 批翼核果药材, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0、3、6、12、18、24 h 后按“2.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱峰面积, 计算大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 0.89%、0.96%、1.43%、1.25%。

2.5.7 重复性试验 取 S1 批翼核果药材, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱峰面积, 计算大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 1.62%、1.57%、1.48%、1.55%。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取已测定的翼核果粉末 (S1) 6 份, 每份 0.1 g, 加入混合对照品溶液适量, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱峰面积, 计算回收率。结果表明, 大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 98.33%、100.89%、97.84%、101.67%, RSD 值分别为 1.82%、1.66%、1.48%、1.75%。

2.5.9 样品测定 取 15 批翼核果药材按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 2 份, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 计算各成分含量, 结果见表 4。

2.6 化学模式识别

2.6.1 聚类分析 将 15 批翼核果样品各共有峰的峰面积导入 SPSS 19.0 软件进行系统聚类分析, 采用 Ward 法, 平方 Euclidean 距离聚类, 结果见图 4。结果显示, 当分类距离为 5 时, 15 批样品可分为 3 类, 第 I 类 S1~S10、S14, 第 II 类 S12、S13, 第 III 类 S11、S15。

2.6.2 主成分分析 (PCA) 为评价所有成分样品分辨能力, 运用 SIMCA 14.1 分析软件对其进行 PCA 结果见图 5, 由 PCA 图可以看出, S1~S10、S13~S14 聚为一类; S12 为一类; S11、S15 聚为一

表 4 15 批翼核果多成分含量测定结果 ($n=2$)

Table 4 Determination of four components of 15 batches of *V. leiocarpa* ($n=2$)

编号	质量分数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	大黄素-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
S1	0.58	5.55	0.59	0.14
S2	0.16	6.33	0.12	0.21
S3	0.15	6.69	0.15	0.23
S4	0.83	5.46	0.17	0.18
S5	0.85	4.87	0.09	0.11
S6	0.12	6.28	0.47	0.36
S7	0.08	4.14	0.11	0.17
S8	2.08	4.57	0.04	0.40
S9	0.06	4.85	0.26	0.25
S10	0.75	3.57	0.35	0.10
S11	0.37	17.03	0.76	0.33
S12	0.06	8.26	0.19	0.51
S13	0.63	10.73	0.16	1.59
S14	0.82	4.78	0.15	0.20
S15	0.33	12.59	1.53	0.18

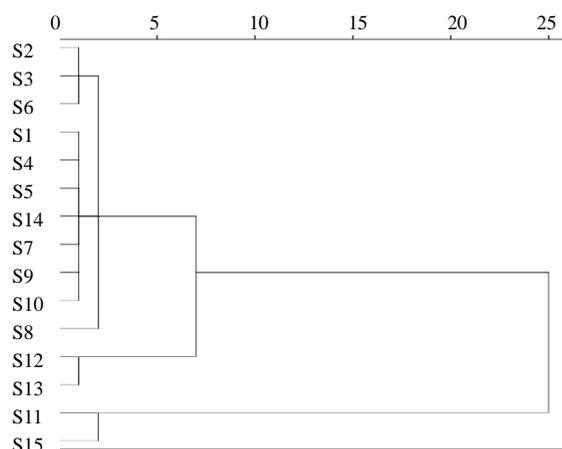


图 4 15 批翼核果聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of 15 batches of *V. leiocarpa*

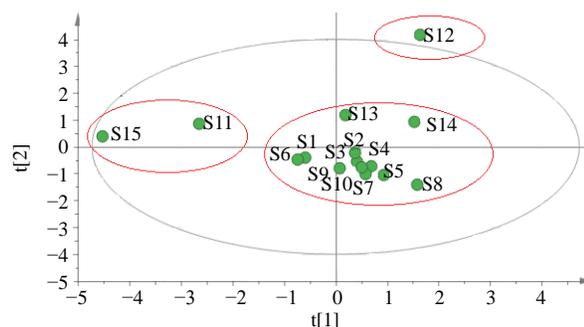


图 5 翼核果 PCA 图

Fig. 5 PCA of *V. leiocarpa*

类, 结果与聚类分析的结果基本一致, 样品之间的离散程度较大, 表明样品差异性较大^[17-18]。

采用 SPSS 19.0 进行主成分因子分析, 相关系数的特征值和方差贡献率见表 5, 以特征值 > 1 为标准, 得到前 3 个主成分因子的累积方差贡献率为 80.505% > 80%。故可采用前 3 个主成分因子为指标对 15 批翼核果样品进行评价。

表 5 3 个主成分因子的特征值和方差贡献率

Table 5 Eigenvalue and variance contribution rate of three main component factors

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	3.290	41.124	41.124
2	1.959	24.494	65.618
3	1.191	14.887	80.505

2.7 DPPH 法测定抗氧化活性

2.7.1 溶液配制 精密称取 DPPH 适量, 加无水乙醇配制成 0.05 mg/mL 溶液, 避光保存。

2.7.2 DPPH 自由基清除作用 参考文献方法^[19], 按“2.1.2”项下方法提取样品, 甲醇稀释成不同质量浓度(相当于生药量)的供试品溶液。取供试品溶液 20 μL 与 180 μL DPPH 溶液置于 96 孔板上, 得样品组; 取供试品溶液 20 μL 与 180 μL 无水乙醇置于 96 孔板上, 得对照组; 取无水乙醇 20 μL, 与 180 μL DPPH 溶液置于 96 孔板上, 得空白组。上述样品组和对照组设 5 个质量浓度梯度, 每个质量浓度梯度设 3 复孔; 空白组也同时设 3 复孔。振荡充分混匀后, 避光条件下反应 1 h, 使用酶标仪在 517 nm 波长处测定, 各质量浓度下的吸光度(A)取平均值。按下式计算自由基清除率。

$$\text{自由基清除率} = 1 - (A_i - A_j) / A_0$$

A_i 为样品组的 A; A_j 为对照组的 A; A₀ 为空白组的 A。

使用 SPSS 19.0 统计软件作 logistic 回归分析, 计算得到半数清除浓度(IC₅₀), 结果见表 6。各样品 IC₅₀ 的大小依次为 S7 > S10 > S4 > S5 > S12 > S9 > S8 > S2 > S14 > S3 > S11 > S6 > S1 > S15 > S13。由此可知, S13 样品在本实验组中 DPPH 自由基清除能力最强, 即抗氧化能力最强。

2.8 翼核果 HPLC 图谱与抗氧化活性的灰色关联分析^[20-21]

2.8.1 原始数据的无量纲化处理 原始数据的变换采用初值化变换法。变换的母序列记为 {X₀(t)}, 子序列记为 {X_i(t)}, 将翼核果不同批次抗氧化活性的药效指标作为母序列, 翼核果不同批次的共有峰

表 6 15 批样品抗氧化活性

Table 6 Antioxidant activities of 15 batches of samples

编号	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	编号	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
S1	2.529	S9	5.031
S2	4.691	S10	8.408
S3	4.072	S11	4.045
S4	6.355	S12	5.459
S5	6.162	S13	1.887
S6	3.486	S14	4.192
S7	12.404	S15	2.501
S8	4.722		

峰面积作为子序列。

2.8.2 绝对差序列及关联系数的计算 在 t=k 时(k 为峰号), 母序列记为 {X₀(k)}, 子序列记为 {X_i(k)}, 母序列与子序列的绝对差序列 Δ_{0i}(k) = |X₀(k) - X_i(k)| (1 ≤ i ≤ m)。计算在 t=k 时母序列与子序列的关联系数 η(k)。

$$\eta(k) = [\min_{i \in \{1, \dots, m\}} |Y_0(k) - Y_i(k)| + \rho \max_{i \in \{1, \dots, m\}} |Y_0(k) - Y_i(k)|] / [|Y_0(k) - Y_i(k)| + \rho \max_{i \in \{1, \dots, m\}} |Y_0(k) - Y_i(k)|]$$

Y₀(k) 为翼核果不同批次抗氧化活性的药效指标; Y_i(k) 为不同批次翼核果特征峰面积归一化数值; k 为峰号; ρ 为分辨系数, 作用是削弱最大绝对差数值的失真, 提高关联系数之间的显著性差异, ρ ∈ (0, 1), 本实验中 ρ 取 0.5; |Y₀(k) - Y_i(k)| 为母序列与子序列的绝对差值; min_i |Y₀(k) - Y_i(k)| 绝对差值的最小值, 又记为 Δ_{min}; max_i |Y₀(k) - Y_i(k)| 为绝对值的最大值, 又记为 Δ_{max}。

2.8.3 关联度 (r) 的计算 r 实质上是对时间序列几何关系的比较, 是母序列与子序列各个时刻的 η 的平均值, 根据“2.8.1”项和“2.8.2”项计算, 峰 1~8 的 η 值依次为 0.689 4、0.679 1、0.698 8、0.670 8、0.668 4、0.635 1、0.640 4、0.825 9。由不同批次翼核果相关峰与其抗氧化作用的关联分析数据可知, 对抗氧化作用药效贡献由大到小的特征峰依次为峰 8 > 峰 3 > 峰 1 > 峰 2 > 峰 4 > 峰 5 > 峰 7 > 峰 6, 并采用对照品对 2、5、6、8 号峰进行指认, 依次为 大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。

3 讨论

翼核果 HPLC 指纹图谱以及 4 种成分的含量测定过程中, 通过 HPLC-PDA 在 210~400 nm 进行全波段扫描, 综合考虑选取 285 nm 作为本实验的检测波长; 分别比较无水乙醇、95%乙醇、60%乙醇、甲醇、60%甲醇等不同溶剂的提取效果及甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液等为流动相的分离效

果, 结果表明甲醇为提取溶剂, 乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相时色谱峰数目最多, 分离效果最佳。

翼核果指纹图谱中, 样品 S14 高达 80 个色谱峰, 样品 S7 只有 25 个色谱峰, 有 2 批样品含有 60~70 个色谱峰, 有 2 批样品含有 50~60 个色谱峰, 有 3 批样品含有 40~50 个色谱峰, 另有 6 批样品含有 30~40 个色谱峰, 显示不同产地样品存在较大差异。翼核果分布于我国广西、广东、福建、台湾等省, 由于地区差异可能导致翼核果的品质存在差异, 进而影响其药效。由聚类分析结果显示, 15 批药材大致分为 3 类, S1~S10、S14 聚为一类, S12、S13 聚为一类, S11、S15 为另外一类。聚类分析结果与产地无明显相关性, 推测可能与加工、储藏、采收期等因素有关, 由于样品数量小、信息量有限, 具体原因还有待进一步研究。PCA 分析结果显示, 15 批 HPLC 指纹图谱共有峰中提取了 3 个主成分, 除 S13 外, 与聚类分析结果较为一致, 2 种分析的方法相互印证。后续又测定大黄素-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 种有效成分的含量, 结果发现不同批次间含量存在较大差异, 为控制不同产地翼核果的质量提供了有效方法。

翼核果在传统上可应用于治疗慢性肝炎、肝硬化^[9]; 现代研究也表明, 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^[10]; 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。本研究采用灰色关联度分析方法将抗氧化药效的细胞模型与不同批次的翼核果药材醇提物的特征峰峰面积进行关联, 说明翼核果抗氧化作用是“化学成分群”共同作用的结果, 并采用对照品对大黄素-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 个成分进行了指认, 但有一些成分尚未明确。究竟是哪些成分起作用, 如何起作用还有待进一步研究。

本实验在建立翼核果 HPLC 指纹图谱的基础上, 采用化学模式识别法对其进行评价; 建立多成分含量测定, 为翼核果的质量控制提供依据; 并研究其抗氧化活性, 并通过灰色关联度分析建立其谱效关系, 为其进一步开发利用提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 郑鑫, 郝二伟, 李杨, 等. 五味子科“钻”类瑶药研究进

展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(13): 24-27.

- [2] 覃迅云, 李彤. 中国瑶医学 [M]. 北京: 民族出版社, 2001: 42.
- [3] 覃迅云. 中国瑶药学 [M]. 北京: 民族出版社, 2002: 52-53.
- [4] 钟鸣, 黄瑞松, 梁启成. 中国壮药学 [M]. 第 2 版. 南宁: 广西民族出版社, 2016: 441.
- [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]. 药理学, 1988, 23(2): 126-129.
- [7] 王晓炜, 徐绥绪, 王喆星, 等. 翼核果中化学成分的研究 I [J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(3): 189-191.
- [8] 徐绥绪, 王红燕, 顾晓华, 等. 翼核果中两个微量新化合物及其生物活性 [J]. 沈阳药科大学学报, 1998, 15(4): 250-253.
- [9] 王晓炜, 徐绥绪, 周春水, 等. 翼核果中的新化合物 [J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(4): 296-297.
- [10] 黄健, 韦亚军, 韦庆宁, 等. 瑶药紫九牛醇提物急性毒性及其对乙醇所致急性肝损伤的影响 [J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(3): 323-325.
- [11] 农云开, 胡筱希, 卢文杰, 等. 瑶药紫九牛的薄层色谱研究 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(19): 112-113.
- [12] 梁冰, 覃兰芳, 赖茂祥, 等. HPLC 法测定广西壮药血风藤中大黄素的含量 [J]. 中医药导报, 2012, 18(6): 68-69.
- [13] 黄维安, 蒙毅, 范卫锋. HPLC 法测定红穿破石中大黄素的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(10): 44-45.
- [14] 蒙毅, 范卫锋, 钟一雄, 等. HPLC 法测定红穿破石中大黄素和大黄素甲醚 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1410-1411.
- [15] 胡筱希, 陆国寿, 黄周锋, 等. 瑶药翼核果中翼核果素和翼核果素-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.
- [16] 刘欢, 陈献. 红穿破石 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(7): 51-52, 100.
- [17] 李生茂, 刘琳, 彭璐, 等. 益智仁 HPLC 指纹图谱与其抗氧化活性 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1319-1324.
- [18] 杨玉莹, 张丹丹, 罗心遥, 等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地青钱柳质量 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 1082-1088.
- [19] 陆国寿, 蒋珍藕, 黄周锋, 等. 两面针果壳的化学成分分析及活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 154-160.
- [20] 林梦雅, 张玉萍, 李雅, 等. 基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3447-3452.
- [21] 李生茂, 曾滨阳, 叶强, 等. 砂仁挥发油抗炎活性谱效关系研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 133-136.

[责任编辑 时圣明]