

基于HPLC-DAD指纹图谱和化学计量法分析的红药子抗氧化活性谱效关联研究

曹阳洋, 张亚杰, 崔方, 李文, 王楠, 徐巧红, 胡芳弟* (兰州大学药学院, 功能有机分子化学国家重点实验室, 兰州大学陇药协同创新中心, 兰州 730000)

摘要 目的: 建立红药子药材醇提物的HPLC-DAD指纹图谱, 分析指纹图谱与抗氧化作用的关联性, 挖掘红药子抗氧化的物质基础, 为控制红药子的质量提供依据。方法: 通过HPLC-DAD法建立10批红药子醇提物的指纹图谱, 以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)清除活性、超氧阴离子自由基清除活性、羟自由基清除活性为指标评价红药子药材的抗氧化活性, 并采用偏最小二乘法(PLS)分析HPLC-DAD指纹图谱与抗氧化活性关系, 筛选红药子药材指标性成分。结果: 10批红药子的指纹图谱共匹配出21个共有峰, 其相似度均大于0.90。通过化学计量学方法分析, 综合相关系数和VIP值两个指标, 确定9个共有峰与DPPH自由基清除活性呈正相关且VIP值均大于1, 3个共有峰与超氧阴离子清除活性呈正相关且VIP值均大于1, 8个共有峰与羟自由基清除活性呈正相关且VIP值均大于1。最后经HPLC-Q-TOF-MS鉴别了红药子药材指纹图谱中10个峰, 共鉴定出7个共有特征峰, 3个非共有峰。其中, 与抗氧化活性最相关的三个峰10、12、14分别为绿原酸、岩白菜素、隐绿原酸。结论: 建立的红药子药材的指纹图谱方法简单可行, 通过谱效关系分析筛选出抗氧化活性的重要成分, 为明确红药子抗氧化作用提供物质基础, 为整体控制红药子质量提供依据。

关键词: 红药子; 指纹图谱; 抗氧化活性; 谱效关系; 化学计量法

中图分类号: R9 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)08-0943-11

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.08.012

Study on Spectral-Effect Antioxidant Activity Profiles of *Rodgersia Aesculifolia* Batalin Based on HPLC-DAD Fingerprinting and Stoichiometric Analysis

Cao Yangyang, Zhang Yajie, Cui Fang, Li Wen, Wang Nan, Xu Qiaohong, Hu Fangdi* (School of Pharmacy, State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Collaborative Innovation Center for Northwestern Chinese Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC-DAD fingerprint spectrum for the alcohol extraction of *Rodgersia aesculifolia* Batalin, analyze the correlation between the fingerprint spectrum and the antioxidant effect, explore the antioxidant material basis of *Rodgersia aesculifolia* Batalin in order to lay a basis for the quality control of *Rodgersia aesculifolia* Batalin. **Methods:** Fingerprint spectrums of alcohol extraction from 10 batches of *Rodgersia aesculifolia* Batalin were established by using the HPLC-DAD method. The antioxidant activity of

基金项目: 甘肃省重大项目(212D4FA013); “十三五”国家重点研发计划重点专项(编号2018YFC1706300、2018YFC17063003); 甘肃省技术创新引导计划-民生专项(编号20CX4FK014); 兰州市人才创新创业项目(编号2017-RC115、2020-RC-41)

作者简介: 曹阳洋 Tel: 15291665405; E-mail: caoyy16@lzu.edu.cn

通信作者: 胡芳弟 Tel: 13919780068; E-mail: hufd@lzu.edu.cn

Rodgersia aesculifolia Batalin were evaluated based on DPPH radical scavenging activity, superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging activity, and hydroxyl radical ($\cdot OH$) scavenging activity. The relationship between HPLC-DAD fingerprint spectrums and antioxidant activity was analyzed by PLS, and the index components of *Rodgersia aesculifolia* Batalin were screened. **Results:** 21 common peaks were matched from the fingerprint spectrums of 10 batches of *Rodgersia aesculifolia* Batalin and their similarities were all greater than 0.90. Through the chemometric analysis, the comprehensive correlation coefficient and VIP value of two indicators, 9 common peaks were determined in positive correlation with DPPH free radical scavenging activity and the VIP values were greater than 1. 3 common peaks were positively correlated with superoxide anion scavenging activity and the VIP values were greater than 1. 8 common peaks were positively correlated with hydroxyl radical scavenging activity and the VIP values were greater than 1. Finally, 10 peaks in the fingerprint spectrum of *Rodgersia aesculifolia* Batalin were identified by HPLC-Q-TOF-MS with 7 peaks of common characteristics and 3 non-common peaks. Among them, the three peaks (10, 12 and 14) most related to the antioxidant activity were chlorogenic acid, bergenin and cryptochlorogenic acid. **Conclusion:** The established method for the fingerprint spectrum of *Rodgersia aesculifolia* Batalin is simple and feasible, and the important components of antioxidant activity were screened out by the analysis of spectrum-effect relationship, which will lay a material basis for clarifying the antioxidant effects and controlling the quality of *Rodgersia aesculifolia* Batalin.

Keywords: *Rodgersia aesculifolia* Batalin; fingerprint spectrums; antioxidant activity; spectrum-effect relationship; Stoichiometry

根据《甘肃省中药材标准》(2009年版),甘肃地方药材红药子为虎耳草科植物鬼灯檠 *Rodgersia aesculifolia* Batalin 的干燥根茎,具有清热解暑、凉血止血、消肿和收敛的功效,可用于治疗咽喉肿痛、腹泻等^[1]。其化学成分包含多酚类、黄酮类化合物,其中岩白菜素为其主要化学成分,含量约为3.0%~6.0%^[2-3],主要药理作用包括抑菌^[4]、抗氧化^[5-6]、抗炎^[7]等。其中,抗氧化活性是多种保健作用的基础^[8],氧化损伤可导致心血管病、癌症等多种慢性疾病,而清除自由基成为阻止氧化损伤的突破口^[9]。

研究表明,红药子中的多酚^[10]、岩白菜素^[5-6]均具有抗氧化作用,但目前红药子药材的研究主要集中在岩白菜素的提取、化学成分分离及药理活性的研究方面,如何整体全面地控制红药子的质量并反映探索红药子的抗氧化作用物质基础是当前研究的难点。为了明确红药子抗氧化作用的物质基础,本实验采用HPLC-DAD建立10批红药子药材的指纹图谱,通过DPPH自由基(2,2-联苯基-1-苦基肼基)清除活性、羟自由基清除活性、超氧阴离子清除活性,综合评价红药子药材的抗氧化活性,运用化学计量法研究其谱效关系,为红药子抗氧化作用的临床应用及质量控制

提供有效依据。

1 仪器与材料

1.1 材料

10批红药子药材均为自购或自采,经兰州大学药学院生药研究所李建银老师及甘肃省药品检验研究院杨静老师鉴定为虎耳草科植物鬼灯檠 *Rodgersia aesculifolia* Batalin 的干燥根茎,样品信息见表1。

DPPH自由基(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)溶液,上海阳光生物科技有限公司),邻苯三酚(天津市大茂化学试剂厂),过氧化氢(天津市张大科技发展有限公司),硫酸亚铁(天津市大茂化学试剂厂),水杨酸(天津市大茂化学试剂厂),岩白菜素(中国食品药检定研究院,批号111532-201604,含量以94.1%计)。

1.2 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1260 II型,配有DAD检测器,安捷伦科技中国有限公司);安捷伦6560 UPLC-IM-QTOF-MS(美国安捷伦科技公司);分析天平(赛多利斯科学仪器倍镜有限公司);分析电子天平(FA2004型,上海度单仪器仪表有限公司);紫外仪(北京六一生物科

技术有限公司)；高功率数控超声波清洗器(KQ-400KDE型, 昆山市超声仪器有限公司)；油浴锅(OSB-2100型, 上海爱朗仪器有限公司)；旋转蒸发仪(N-110型, 上海爱朗仪器有限公司)；电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)；

摇摆式高速万能粉碎机(DFY-600型, 温岭市林大机械有限公司)；马弗炉(KSL-1200X型, 合肥科晶材料技术有限公司)；紫外-可见分光光度计(UV-1700, 岛津公司)。

表1 红药子药材信息表

样品	产地	采集/收集日期	基原
S1	贵州省毕节市纳雍县	20190720	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S2	陕西省商洛市丹凤县商贸街	20190721	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S3	四川省凉山彝族自治州德昌县乐跃镇	20190722	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S4	甘肃省陇南市康县阳坝镇上坝村	20190722	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S5	甘肃省陇南市	20190725	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S6	四川省乐山市金口河区和平彝族乡	20190722	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S7	四川省雅安市石棉县	20190806	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S8	大理白族自治州鹤庆县龙开口镇中江	20190809	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S9	甘肃省陇南市	20190811	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin
S10	甘肃省陇南市	20190813	<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batalin

2 方法与结果

2.1 红药子HPLC-DAD指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱为Hedera ODS-2 (5 μ m, C18-A 250 mm \times 4.6 mm)；流动相为乙腈(A)-0.2%乙酸(B) 0~5 min, 2%A \rightarrow 5%A；5~25 min, 5%A \rightarrow 14%A；25~50 min, 14%A \rightarrow 18%A；50~53 min, 18%A \rightarrow 2%A；53~55 min, 2%A；检测波长为310 nm；柱温为30 $^{\circ}$ C；流速为1 mL \cdot min $^{-1}$ ；进样量为10 μ L。

2.1.2 样品溶液的制备

精密称取红药子药材粉末1.0 g (过40目筛)于锥形瓶中, 加入15 mL 50%甲醇, 超声提取(240 W, 40 kHz) 30 min, 超声前后称定重量, 并用相应溶剂补足损失重量。摇匀, 滤过, 滤液过0.22 μ m滤膜, 取续滤液, 即得^[11]。

2.1.3 指纹图谱方法学考察

2.1.3.1 精密密度实验

精密吸取同一样品溶液(批次2), 按照“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次。得到各单位共有峰峰面积RSD为0.28%~4.79%, 表明仪器精密良好。

2.1.3.2 重复性实验

按照“2.1.2”项下样品溶液的制备方法平行制备6份红药子样品溶液(批次2), 按“2.1.1”项下色谱条件进样。得到各样品岩白菜素含量RSD为0.91%~5.44%, 表明该方法重复性良好。

2.1.3.3 稳定性实验

精密吸取同一供试品溶液(批次2), 分别于0、2、4、6、8、10、12 h按“2.1.1”项下色谱条件进样, 得到各单位共有峰峰面积RSD值为0.16%~5.41%, 表明样品溶液在12 h内较为稳定。

2.1.4 HPLC-DAD指纹图谱相似度、共有峰分析

10批红药子样品溶液按“2.1.1”项下进样, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对红药子样品进行分析, 得到10批红药子药

材的指纹图谱。以S1(样品1)为参照图谱,采用“平均数”法生成对照图谱R(图1),共选取21个分辨率较好的峰作为共有峰,占总峰面积的90%以上。采用相关系数法计算10批红药子药材的相似度。结果表明,10批红药子药材相似度均大于

0.9,说明10批红药子样品色谱模式相似,其化学成分一致性较好。以峰12为对照,计算各色谱峰的相对峰面积。相似度评价结果及红药子指纹图谱见表2及图2。

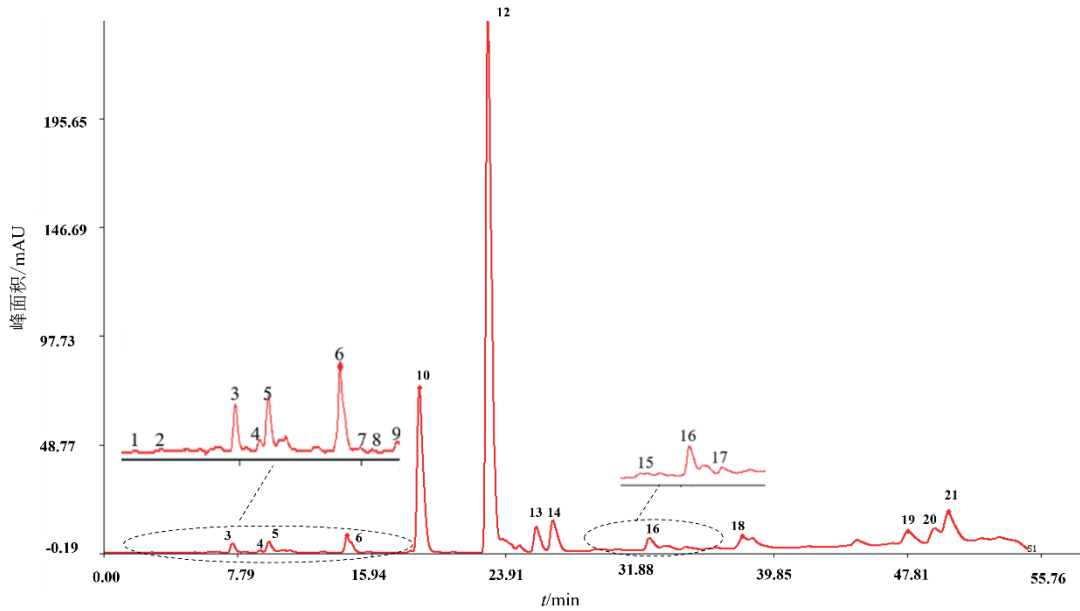


图1 红药子指纹图谱 R- 对照图谱

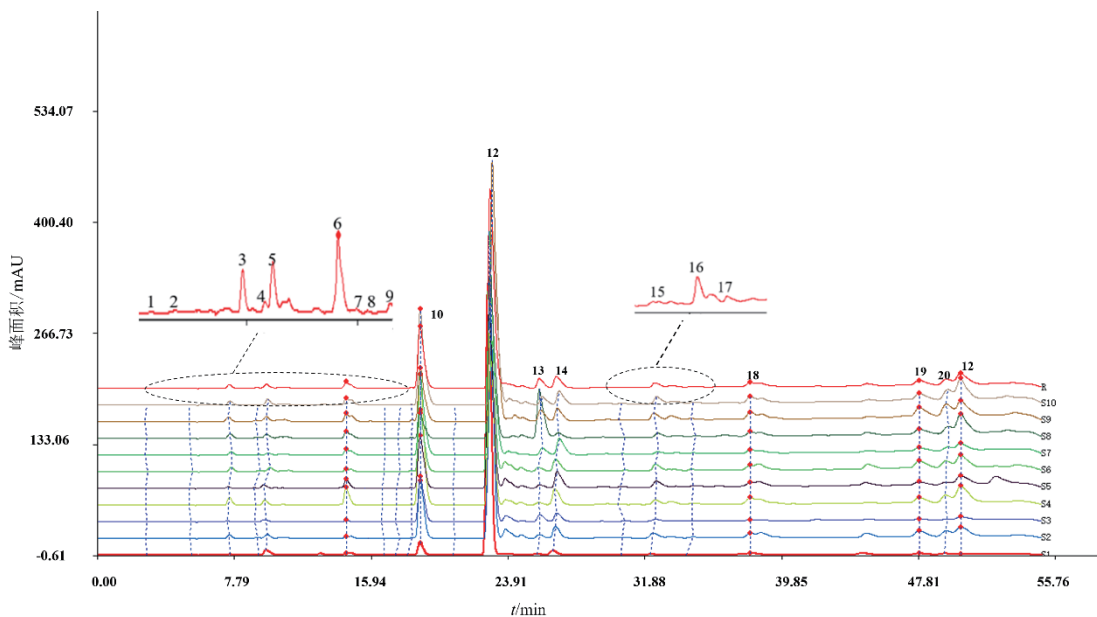


图2 红药子指纹图谱叠加图(R-对照图谱;S1-S10为样品)

表2 红药子相似度分析

NO.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.956	0.995	0.994	0.944	0.984	0.996	0.947	0.942	0.993	0.976

2.2 红药子体外抗氧化活性的测定

2.2.1 样品溶液的制备

精密称取红药子粉末(过40目筛)1.0 g(每份样品平行2份)于锥形瓶中,加入25 mL 50%甲醇溶液,超声处理(240 W, 40k HZ) 30 min,超声前后称定重量,并用50%甲醇补足损失重量。摇匀,过滤,得到浓度为40 mg·mL⁻¹样品溶液。

2.2.2 试剂的配制

DPPH溶液的制备:精密称取DPPH适量,无水乙醇定容至500 mL。

Tris-HCL溶液的制备:精密称取适量Tris-Base,用水定容至1000 mL,得到浓度为0.1 mol·L⁻¹的Tris-base溶液。精密量取36%~38% HCL溶液适量,用水定容得到浓度为0.1 mol·L⁻¹的HCL溶液。取Tris-base溶液500 mL, 0.1 mol·L⁻¹ HCL溶液229 mL,用水定容至1000 mL,得到浓度为50 mmol·L⁻¹的Tris-HCL (PH=8.2) 缓冲液。

10 mmol·L⁻¹邻苯三酚溶液的制备:精密称取邻苯三酚适量,用10 mmol·L⁻¹ HCL定容至100 mL,得到10 mmol·L⁻¹的邻苯三酚溶液。

8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 溶液的制备:量取0.95 mL的30% H₂O₂,加水稀释即得。

9 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 溶液的制备:精密称取FeSO₄适量,用水定容至250 mL,得到浓度为9 mmol·L⁻¹的FeSO₄溶液。

9 mmol·L⁻¹水杨酸乙醇溶液的制备:精密称取水杨酸样品适量,用无水乙醇定容至250 mL,得到浓度为9 mmol·L⁻¹的水杨酸乙醇溶液。

2.2.3 测定方法

2.2.3.1 DPPH自由基清除活性的测定

精密量取红药子样品溶液(40 mg·mL⁻¹) 0.5 mL, 50%甲醇定容至10 mL,再取0.2 mL样品溶液定容至10 mL,得到浓度为0.04 mg·mL⁻¹的红药子样品溶液,再取100、200、400、800、1000 μL浓度为0.04 mg·mL⁻¹的红药子样品溶液于10 mL具塞试管中,用50%甲醇补足至1 mL,再分别加入1 mL的DPPH溶液(浓度为8.91%),摇匀,于暗处静置30 min,在517 nm处测定吸光度值A。

DPPH自由基清除率%=[1-(A₁/A₀)]×100

其中,A₀:空白组(2 mL 50%甲醇溶液+2 mL DPPH溶液);A₁:样品组(2 mL样品溶液+2 mL DPPH溶液)。

2.2.3.2 超氧阴离子自由基清除活性的测定

精密量取红药子样品储备液(40 mg·mL⁻¹) 1 mL定容至10 mL,得到浓度为4 mg·mL⁻¹的红药子样品溶液。量取0.1、0.2、0.5、1.0 mL红药子样品溶液(4 mg·mL⁻¹)、0.2 mL红药子样品储备溶液(40 mg·mL⁻¹)于10 mL具塞试管中,定容至1 mL,加入3.8 mL 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCL缓冲液,0.1 mL 10 mol·L⁻¹ 邻苯三酚溶液,静置30 min,于320 nm下测定吸光度。

超氧阴离子清除率%=[1-(A₁-A₂)/A₃]×100

其中,A₁:样品溶液的吸光度值(3.8 mL Tris-HCL+0.1 mL邻苯三酚+1 mL样品储备液);A₂:样品空白溶液的吸光度值(3.8 mL Tris-HCL+0.1 mL H₂O+1 mL样品储备液);A₃:试剂空白溶液的吸光度值(3.8 mL Tris-HCL+0.1 mL邻苯三酚+1 mL蒸馏水)。

2.2.3.3 羟自由基清除活性的测定

精密量取红药子样品储备液(40 mg·mL⁻¹) 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0于10 mL具塞试管中,并用甲醇补足至1 mL,依次向其中加入1 mL 9 mmol·L⁻¹的FeSO₄溶液,1 mL 9 mmol·L⁻¹的水杨酸乙醇溶液,1 mL 8.8 mmol·L⁻¹的H₂O₂,摇匀后于37℃水浴中反应30 min,510 nm处测定吸光度值。

羟自由基清除率%=[1-(A₁-A₂)/A₀]×100

其中,A₀:试剂空白溶液(1 mL甲醇+1 mL 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄+1 mL 9 mmol·L⁻¹水杨酸+1 mL 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂);A₁:样品溶液(1 mL样品+1 mL 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄+1 mL 9 mmol·L⁻¹水杨酸+1 mL 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂);A₂:样品空白溶液(1 mL样品+1 mL 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄+1 mL 9 mmol·L⁻¹水杨酸+1 mL甲醇)。

2.2.4 测定结果

2.2.4.1 DPPH自由基清除能力

以维生素C为阳性对照,IC₅₀值均<0.0142 mg·mL⁻¹,表明实验过程无误。10批红药子药材DPPH自由基清除活性具有一定差异,S7(四川)样品DPPH自由基清除活性最弱,IC₅₀值最高为0.04644 mg·mL⁻¹,S9(甘肃)样品活性最强,IC₅₀值最低为0.020 08 mg·mL⁻¹。

2.2.4.2 超氧阴离子自由基清除活性

以维生素C为阳性对照,IC₅₀值均<0.1424 mg·mL⁻¹,表明实验过程无误。10批红药子药材

超氧阴离子清除活性具有一定差异, S8(大理)样品超氧阴离子清除活性最弱, 其 IC_{50} 值最高为 $12.878 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, S4(甘肃)样品超氧阴离子清除活性最强, 其 IC_{50} 值最低为 $3.282 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.4.3 羟自由基清除活性

以维生素C为阳性对照, IC_{50} 值均 $<0.9281 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明实验过程无误。10批红药子药材羟自由基清除活性具有一定差异, S1(贵州)样品清除活性最弱, 其 IC_{50} 值最高为 $81.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, S4(甘肃)样品清除活性最强, 其 IC_{50} 值最低为 $7.57 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.5 数据处理

运用SPSS 22.0软件处理数据。

2.3 谱效关系分析

2.3.1 基于DPPH自由基清除活性的谱效关系研究

以10批红药子药材样品的DPPH自由基清除活性 IC_{50} 值为因变量, 峰面积为自变量, 采用Oringin8.0软件进行偏最小二乘法(PLS)分析。各共有峰与DPPH自由基清除活性相关性的分析表明, 12个共有峰与DPPH自由基清除率 IC_{50} 值呈负相关, 即与DPPH自由基清除活性呈正相关, 相关性大小依次为: 12、2、5、9、16、7、4、19、17、18、20、11。9个共有峰与DPPH自由基清除率 IC_{50} 值呈正相关, 即与DPPH自由基清除活性呈负相

关, 相关性大小依次为: 14、15、6、10、8、13、3、1、21, 如图3所示。

结果表明, 这些成分是红药子清除DPPH自由基作用的物质基础。变量投影(Variable Influence on Projection, VIP)可解释自变量对因变量的贡献程度, VIP值越大, 说明该自变量对因变量的贡献越大, $VIP > 1$ 时表示对因变量有显著贡献。以DPPH自由基的清除率为药效指标, 对VIP进行分析, 筛选出对红药子药材样品抗氧化能力影响较大的色谱峰(以 $VIP > 1$ 为标准)。最后, 对各色谱峰的VIP值进行分析, 结果表明色谱峰12、9、5、19、20、4、16、14、18、11、10对DPPH自由基清除活性贡献较高, 如图4所示。综合相关系数和VIP值2个指标, 发现峰12、9、5、19、20、16、4、18、11与DPPH自由基清除活性呈正相关且VIP值均大于1。

对所构建的谱效关系模型进行检验, 交叉检验结果表明, 所建模型的 R^2 为99.78%, Q^2 为93.20%, 表明所建模型的拟合程度及预测能力较好^[12]。其次置换检验结果表明, 当置换次数为200次时, R^2 、 Q^2 回归线斜率均为正值, 且 Q^2 回归线的截距为负值-0.346, 表明所建模型未出现过拟合, 预测能力较好^[13], 如图5所示。

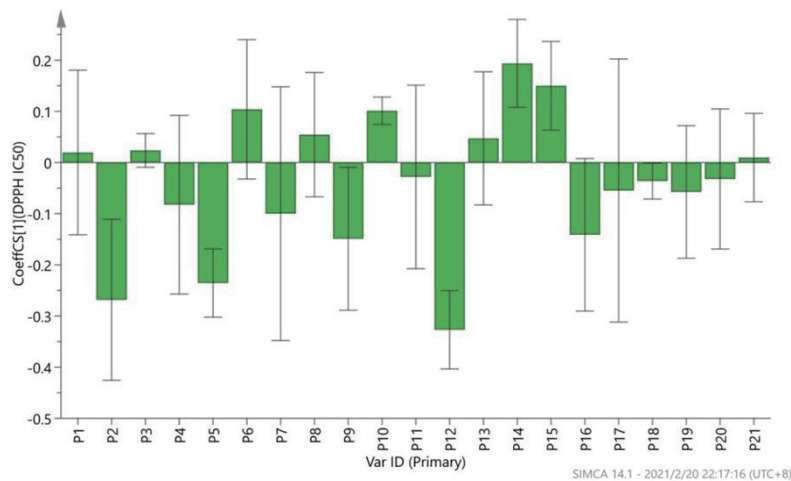


图3 标准化回归系数图

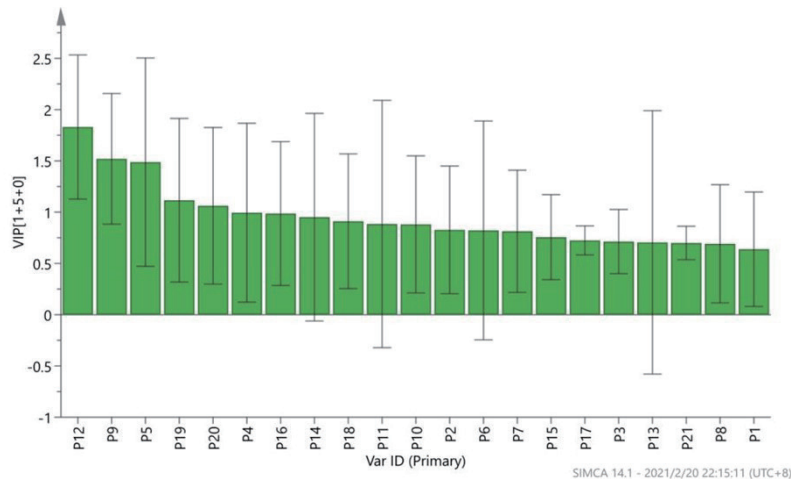


图4 共有峰指纹图谱与 DPPH 自由基清除活性的 VIP 值图

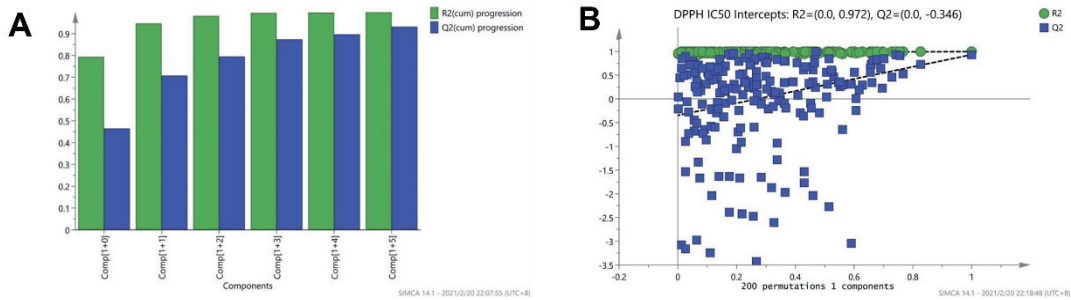


图5 基于 DPPH 自由基清除活性的谱效关系研究 (A 交叉检验图, B 置换检验图)

2.3.2 基于超氧阴离子自由基清除活性的谱效关系研究

以10批红药子药材样品的超氧阴离子清除活性 IC_{50} 值为因变量,峰面积为自变量,采用Oringin8.0软件进行PLS分析。而对各共有峰与超氧阴离子自由基清除活性相关性的分析表明,11个共有峰与超氧阴离子清除活性 IC_{50} 值呈负相关,即与超氧阴离子清除活性呈正相关,相关性大小依次为:14、10、2、19、8、20、11、15、1、8、16。10个共有峰与超氧阴离子清除活性 IC_{50} 值呈正相关,即与超氧阴离子清除活性呈负相关,相关性大小依次为:13、4、7、6、21、3、5、9、17、12。如图6所示。

结果表明,这些成分是红药子清除超氧阴离子自由基作用的物质基础。以超氧阴离子的清除率

为药效指标,对VIP进行分析,筛选出对红药子药材样品抗氧化能力影响较大的色谱峰(以 $VIP > 1$ 为标准)。最后,对各色谱峰的VIP值进行分析,结果表明色谱峰13、10、14、2、4对超氧阴离子清除活性贡献较高,结果如图7所示。综合相关系数和VIP值2个指标,发现峰10、14、2与超氧阴离子清除活性成正相关且VIP值均大于1。

对所构建的谱效关系模型进行检验。交叉检验结果表明,所建模型的 R^2 为99.99%, Q^2 为63.20%,表明所建模型的拟合程度及预测能力较好。其次置换检验结果表明,当置换次数为200次时,位于最右侧的 R^2 、 Q^2 值均高于左侧,且 Q^2 回归线的截距为负值-0.278,表明所建模型未出现过度拟合,预测能力较好,如图8所示。

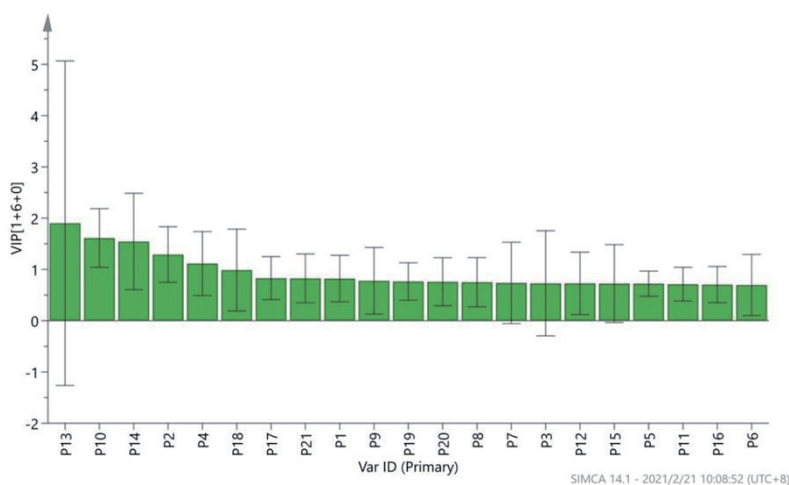


图6 标准化回归系数图

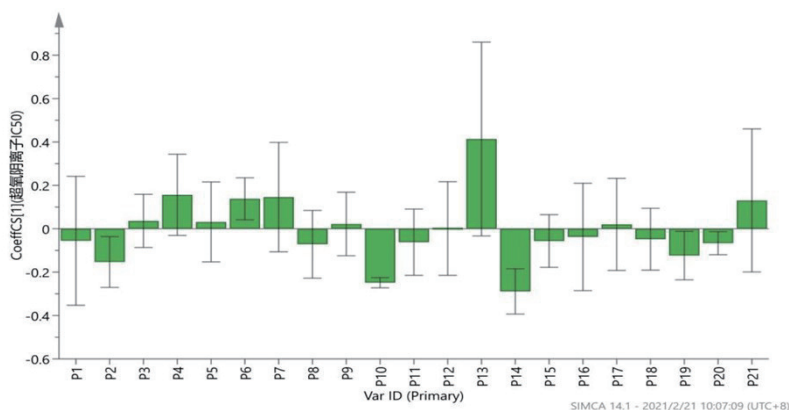


图7 共有峰指纹图谱与超氧阴离子自由基清除活性的VIP值图

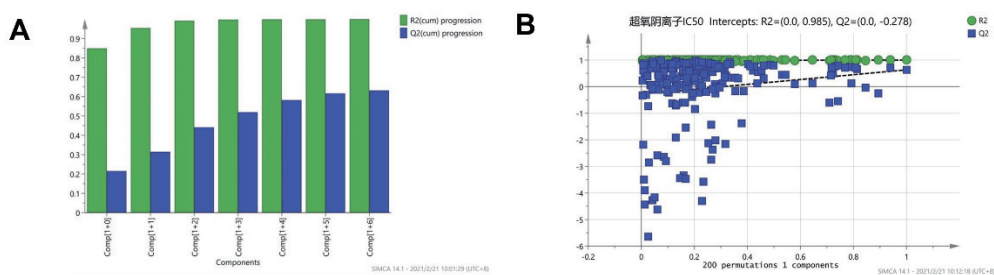


图8 基于超氧阴离子自由基清除活性的谱效关系研究(A交叉检验图, B置换检验图)

2.3.3 基于羟自由基清除活性的谱效关系研究

以10批红药子药材样品的羟自由基清除活性 IC_{50} 值为因变量,峰面积为自变量,采用Oringin8.0软件进行PLS分析。对各共有峰与羟自由基清除活性的相关性的分析表明,11个共有峰与羟自由基清除活性 IC_{50} 值呈负相关,即与羟自由基清除活性呈正相关,相关性大小依次为:16、14、10、7、

19、15、20、17、21、18、3;10个共有峰与羟自由基清除活性 IC_{50} 值呈正相关,即与羟自由基清除活性呈负相关,相关性大小依次为:1、5、12、13、8、9、6、11、4、2,如图9所示。

结果表明,这些成分是红药子清除羟自由基作用的物质基础。以羟自由基的清除率为药效指标,对VIP进行分析,筛选出对红药子药材样品

抗氧化能力影响较大的色谱峰（以VIP>1为标准）。最后，对各色谱峰的VIP值进行分析，结果表明色谱峰14、10、17、16、3、19、15、20对羟自由基清除活性贡献较高，结果如图10所示。综合相关系数和VIP值两个指标，14、10、17、16、3、19、15、20共8个峰与羟自由基清除活性呈正相关，且VIP值均大于1。

对所构建的谱效关系模型进行检验，交叉检验结果表明，所建模型的R²为99.99%，Q²为64.50%，表明所建模型的拟合程度及预测能力较好。其次置换检验结果表明，当置换次数为200次时，位于最右侧的R²、Q²值均高于左侧，且Q²回归线的截距为负值-0.195，表明所建模型未出现过度拟合，预测能力较好，如图11所示。

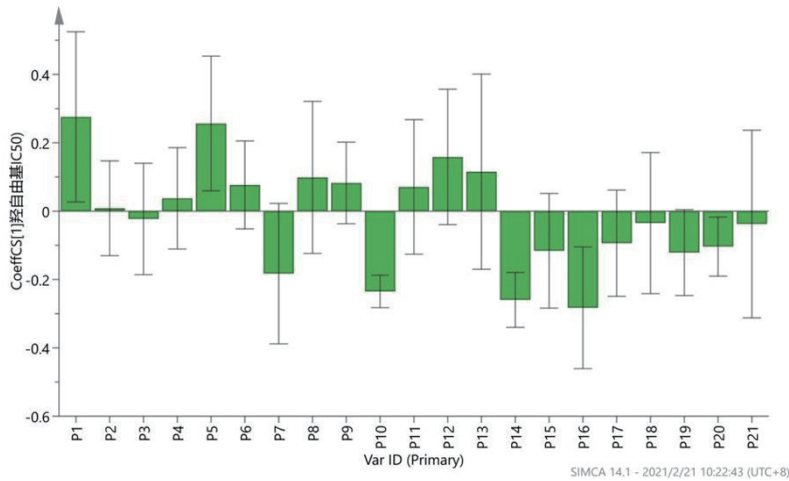


图9 标准化回归系数图

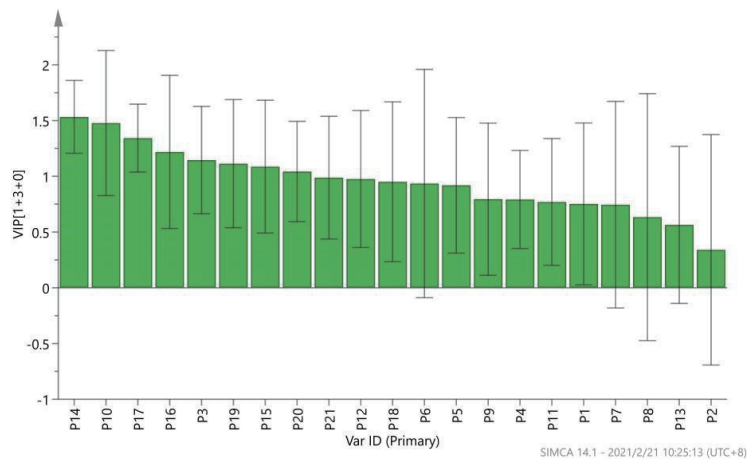


图10 共有峰指纹图谱与羟自由基清除活性的VIP值图

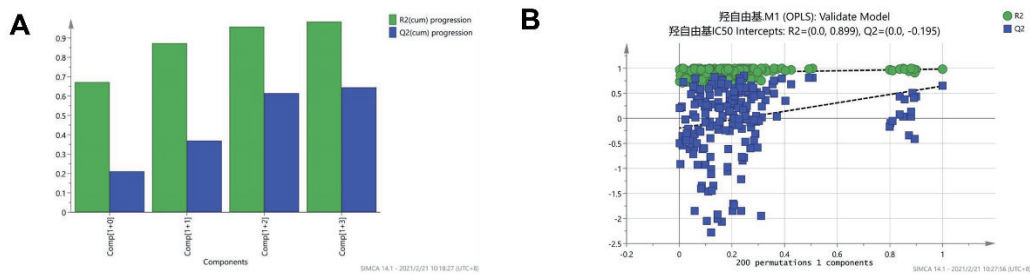


图11 基于羟自由基清除活性的谱效关系研究（A交叉检验图，B置换检验图）

2.4 红药子中活性相关成分的鉴定

2.4.1 HPLC-Q-TOF-MS条件

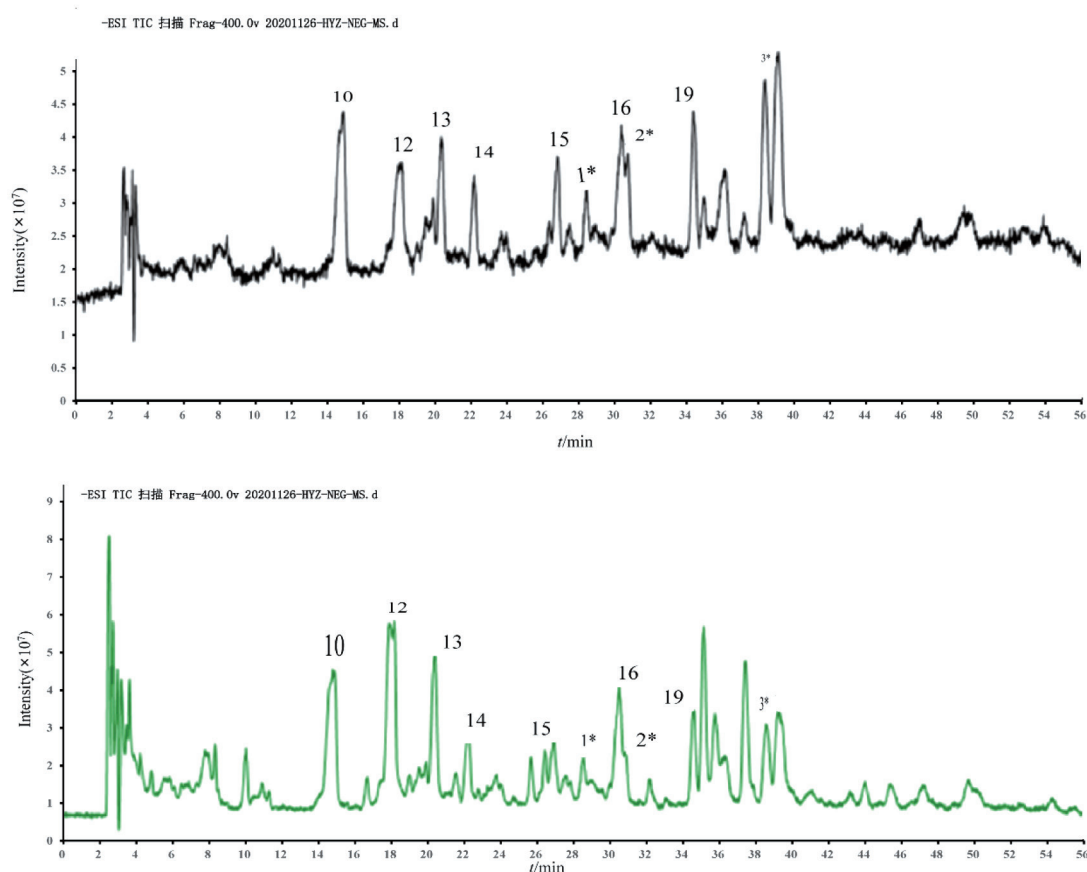
色谱条件：同指纹图谱条件项下条件。质谱条件：模式：ESI，正、负离子，扫描范围： m/z 50~1700，离子源温度：150 °C，毛细管电压：3400 V，碎裂电压（Fragmentor）：400 V，锥孔电压：65 V，喷雾器压力：35 psi，干燥氮温度：300 °C，干燥氮流速：8 L·min⁻¹。

2.4.2 样品溶液的制备

同“2.1.2”项下样品溶液的制备方法，制备红药子样品溶液（批次2）。

2.4.3 HPLC-Q-TOF-MS对色谱峰的归属

红药子总离子流图如图12所示，通过参考文献^[14-15]、对照品及紫外光谱信息比对，共指认了10个化合物，化合物10、12、13、14、15、16、19为10批药材的共有成分分别为：绿原酸（3-Caffeoylquinic acid）、岩白菜素（Bengein）、新绿原酸（5-Caffeoylquinic Acid）、隐绿原酸（4-Caffeoylquinic Acid）、Tri-O-Galloylglucose Isomeride、3-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素。1*、2*、3*为非共有成分分别为Tri-O-galloylglucose Isomeride、Tri-O-Galloylglucose Isomeride、7-O-没食子酰儿茶素。



注：编号与图1一致，“*”为非共有峰

图12 红药子总离子流图

3 讨论

本研究对10批红药子药材进行了HPLC-DAD指纹图谱分析，根据色谱峰峰面积共匹配出21个共有峰，其相似度均大于0.90，说明10批红药子样品色

谱模式相似，其化学成分一致性较好。经方法学验证所建立指纹图谱的色谱条件简单可行，具有一定的灵敏度。

不同的评价体系由于测定原理不同，抗氧化

结果具有一定的差异,本文综合DPPH自由基清除活性、羟自由基清除活性、超氧阴离子清除活性3个指标共同确定红药子的抗氧化活性更加科学、准确。PLS法主要用于多因变量对多自变量的回归建模,能较好地解决样本量少于变量的问题。本研究采用PLS法分析红药子药材的指纹图谱峰面积与其抗氧化活性的相关性,以相关系数和VIP值2个指标确定活性相关成分,结果显示,峰12、9、5、19、20、16、4、18、11共9个峰与DPPH自由基清除活性呈正相关且VIP值均大于1;峰10、14、2共3个峰与超氧阴离子清除活性呈正相关且VIP值均大于1;峰14、10、17、16、3、19、15、20共8个峰与羟自由基清除活性呈正相关且VIP值均大于1。

对红药子提取物进行HPLC-Q-TOF-MS分析,共鉴定出7个共有特征峰,3个非共有峰,其中,与DPPH自由基清除活性最相关的12号峰,与超氧阴离子清除活性最相关的10号峰,与羟自由基清除活性最相关的14号峰分别为岩白菜素、绿原酸、隐绿原酸。

本实验将常规的化学分析方法与体外抗氧化活性结合,将化学信息的“谱”与活性信息的“效”进行关联研究,在有效体外活性物质群中寻找与体外活性相关的成分,从而为明确红药子抗氧化作用提供物质基础、整体控制红药子质量提供依据。

参考文献:

- [1] 甘肃省食品药品监督管理局. 甘肃省中药材标准[S]. 2009: 175-176.
- [2] 夏从龙,段新瑜,何华斌,等. 民族药岩陀药材中岩白菜素的高效液相色谱定量分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 289-290.
- [3] 罗定强,张国跃,李涛,等. HPLC法测定七叶鬼灯檠不同部位岩白菜素的含量[J]. 安徽医药, 2008, 12(12): 1153-1154.
- [4] 陈雯,孟珍贵,杨生超,等. 云南鬼灯檠属植物中岩白菜素含量比较[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10):

5767-5769.

- [5] 闫梦茹. 索骨丹化学成分及其生物活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2016.
- [6] 王健,黄慧,王喆之,等. 七叶鬼灯檠挥发油及不同提取物抑菌活性的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 74-76, 84.
- [7] 王晓梅,徐秋萍,成巧娜,等. 索骨丹提取物抑制黄嘌呤氧化酶活性及抗氧化作用[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2769-2770.
- [8] 杨雪梅,赵建锐,刘莹亮,等. 不同年份普洱生茶体外抗氧化活性与生化成分相关性分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(5): 32-37.
- [9] 林锦铭,蔡尤林,李俊健,等. 美藤果壳多酚物质的提纯及其抗氧化性[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(5): 106-112.
- [10] 尚小娇,马惠玲,叶占洋,等. 七叶鬼灯檠根中总多酚的提取及抗氧化活性的研究[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(2): 201-205.
- [11] 张亚杰,海娟,闫巧,等. 红药子质量标准研究[J]. 兰州大学学报(医学版), 2021, 47(1): 28-33.
- [12] 陈丹,李红婷,谢国勇,等. 基于稀疏偏最小二乘回归分析及抗氧化谱效关系[J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(11): 1-6.
- [13] 姜文文. 参枝苓口服液的质量分析方法研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [14] 任慧,崔小敏,胡静,等. 秦岭岩白菜根茎化学成分的UPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 19(11): 20.
- [15] Yuxia Q, Chenning Z, Runhua L, et al. Rapid Characterization the Chemical Constituents of *Bergenia Purpurascens* and Explore Potential Mechanism in Treating Osteoarthritis by Ultra-performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry Combined with Network Pharmacology [J]. *Journal of Separation Science*, 2020, 43(16): 3333-3348.

(收稿日期 2022年2月14日 编辑 李亚微)