

山楂叶标准汤剂指纹图谱及抗氧化活性谱效关系研究

王子怡,穆文成,李艳荣,洪霞,潘海峰*

承德医学院河北省中药研究与开发重点实验室,承德 067000

摘要:研究山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱及其抗氧化活性的相关谱效关系。本文采用 HPLC 测定 16 批不同产地山楂叶标准汤剂指纹图谱, DPPH 自由基清除法和 ABTS 自由基清除法测定其体外抗氧化活性, 灰关联度法研究不同产地山楂叶标准汤剂谱效关系。山楂叶标准汤剂 18 个共有峰抗氧化活性较高, 且与清除自由基的关联度较高, 关联系数均大于 0.72, 已知成分牡荆素葡萄糖苷的关联度最高。本文成功建立了山楂叶标准汤剂的指纹图谱及其抗氧化活性谱效关系, 可用于山楂叶标准汤剂质量标准的有效控制。

关键词:山楂叶; 标准汤剂; 灰关联度法; 谱效关系

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)4-0557-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.4.003

Study on fingerprint and activity relationship of hawthorn leaf standard decoction

WANG Zi-yi, MU Wen-cheng, LI Yan-rong, HONG Xia, PAN Hai-feng*

Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Abstract: To study the relationship between the HPLC fingerprint and the antioxidant activity of the hawthorn leaf standard decoction. In this paper, HPLC was used to determine the fingerprint of 16 batches of hawthorn leaf standard decoction from different producing areas, DPPH free radical scavenging method and ABTS free radical scavenging method were used to determine its antioxidant activity *in vitro*, and the spectrum effect relationship of hawthorn leaf standard decoction from different producing areas was studied by grey relational degree method. The results showed that hawthorn leaf standard decoction had good antioxidant activity, and the 18 common peaks of hawthorn leaf standard decoction had a high correlation with free radical scavenging, with the correlation coefficient higher than 0.72, the correlation of vitexin glucoside was the highest. In this paper, the fingerprint of hawthorn leaf standard decoction and its antioxidant activity spectral effect relationship were successfully established, which can be used to effectively control the quality standard of hawthorn leaf standard decoction.

Key words: hawthorn leaf; standard decoction; grey relational degree method; spectrum-effect relationship

山楂叶是蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥叶, 具有活血化瘀, 化浊降脂的功效^[1]。山楂叶标准汤剂是参考现代提取方法, 经标准化工艺制备成的单味山楂叶饮片水煎剂^[2]。研究表明, 山楂叶的主要生理活性成分为黄酮类^[3-7], 黄酮类化合物可能是除维生素 C 之外的另一类天然抗氧化剂^[8,9]。由于山楂叶标准汤剂主要为极性成分, 其抗氧化活性较强, 清除自由基的能力是评价

其抗氧化能力的一个重要指标^[10]。关于抗氧化的化学分析方法主要包括 ABTS 自由基清除法和 DPPH 自由基清除法, 通过化学法能够确定天然产物清除自由基或对抑制脂类物质氧化的能力, 从而评价天然产物的抗氧化活性。运用 ABTS 自由基清除法是因为该方法操作简单, 不需要复杂的反应步骤及难以实现的反应条件, 并且去除了测试物质中含有的过氧化物对 ABTS 自由基清除自由基的影响, 能够准确确定多组分混合物的抗氧化能力, 因此它更多地用于评价天然产物的抗氧化活性^[11,12]。DPPH 自由基清除实验是一种简单、有效且经济的方法, 测出的结果重复性较好, 受环境因素的影响较小^[13], 同其它抗氧化活性的测定方法相比, 该方法具有较高的灵敏度,

收稿日期: 2019-10-28 接受日期: 2020-04-16

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究重点项目 (ZD2015097); 承德医学院自然科学研究计划重点项目 (201811); 河北省高校重点学科建设项目 (冀教高[2013]4)

* 通信作者 Tel: 86-314-2291186; E-mail: phf2301@163.com

没有伴随复杂反应,并能够与色谱分离法相结合,常用于在线检测天然产物的抗氧化活性^[14]。

由于中药标准汤剂大多具有作用机制复杂,作用靶点多等特点,需要对其进行整体质量控制,通过共有峰标定和相似度评价等手段能够较全面体现中药整体性的指纹图谱是符合标准汤剂特点的方法之一^[15]。另一方面,中药药效的发挥有赖于多个成分的协同作用,指纹图谱虽能标示中药中的多种成分,但这些化学成分的标示与中药药效的发挥可能不完全一致,因此仅仅研究中药的化学指纹图谱还远远不够,只有将中药的化学指纹图谱与中药的药效紧密结合起来,建立具有实际意义的谱-效关系,才能为中药质量控制提供更科学的依据^[16]。

目前关于山楂叶标准汤剂及其抗氧化活性谱效关系的研究未见报道,本文通过 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除法评估山楂叶标准汤剂黄酮类成分抗氧化活性,分析标准汤剂抗氧化作用,并采用灰关联度法研究其 HPLC 指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系,为山楂叶标准汤剂的质量标准制定提供有效依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公

司),JA2003 上皿天平(上海精科天平),电热套(通州市申通电热器厂),AG-245 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利公司),HC-2062 高速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),酶标仪(Thermo Fisher Scientific),KQ-2200DE 超声波清洗器(哈尔滨东明医疗仪器厂)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯,Fisher 科技有限公司),其他试剂均为分析纯,水(杭州娃哈哈有限公司),DP-PH 自由基(464RB-GE,上海化成工业发展有限公司),ABTS 自由基(M0403A,泽浩公司),维生素 C(J1024A,泽浩公司)。

1.3 对照品

绿原酸(161217,成都普菲得生物技术有限公司),牡荆素葡萄糖苷(171403,成都普菲得生物技术有限公司),芦丁(120226,上海融禾医药科技有限公司),金丝桃苷(161231,上海融禾医药科技有限公司),牡荆素鼠李糖苷(111668-2000602,中国药品生物制品检定所)。

1.4 材料

16 批山楂叶药材由承德民族师范学院董建新教授鉴定为蔷薇科植物山楂叶。样品标本存放在承德医学院中药研究所。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号 No.	来源 Source	采收时间 Gathering time	编号 No.	来源 Source	采收时间 Gathering time
S1	山东泰安	2018	S9	浙江	2017
S2	河北保定	2018	S10	山东潍坊	2017
S3	河北博野	2017	S11	安徽亳州	2017
S4	山东东营	2018	S12	河北承德	2017
S5	四川遂宁	2017	S13	湖北蕪州	2017
S6	辽宁	2017	S14	河南禹州	2017
S7	山西	2017	S15	山东临沂	2017
S8	江苏	2017	S16	山西运城降县	2017

2 方法

2.1 色谱条件

采用 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 0.2% 甲酸水-乙腈(A-B)梯度洗脱;流速设定为 0.8 mL/min;进样量 10 μL;检测波长为

320 nm;柱温为 30 °C,洗脱梯度见表 2。

2.2 溶液的制备

2.2.1 标准汤剂的制备^[2]

精密称定山楂叶粗粉 100 g,置于圆底烧瓶中,加入蒸馏水 1 200 mL 浸泡 30 min,用电热套以 1 d/s

表 2 洗脱梯度
Table 2 Elution gradient

T(min)	0	10	20	60	70	90
A(%)	92	92	85	65	40	10
B(%)	8	8	15	35	60	90

的滴速加热回流,第 1 次 30 min,回流完毕趁热用 3 层纱布过滤,残渣加 1 000 mL 蒸馏水第 2 次回流 20 min,回流完毕趁热用 3 层纱布过滤,合并 2 次滤液,采用冷凝水循环装置水浴蒸发 45 ℃ 减压浓缩至 500 mL,即得棕色或绿色浓度为 0.2 g/mL 的山楂叶标准汤剂。

2.2.2.2 供试品溶液的制备

取山楂叶标准汤剂 1 mL 与 16% 乙腈 1 mL 混匀,以 12 000 rpm 超速离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液作供试品溶液。

2.2.2.3 阳性对照维生素 C 溶液的制备

精密称取维生素 C,以蒸馏水溶解,配制成 1.928 mg/mL 的 Vc 溶液。

2.2.2.4 DPPH 自由基溶液的制备

精密称取 DPPH 自由基 12.00 mg,放置于 100 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇定容至刻度线,即得 0.12 mg/mL 的 DPPH 自由基溶液,避光备用。

2.2.2.5 ABTS 自由基溶液的制备

精密称取 ABTS 自由基 38.40 mg,用蒸馏水定容至 10 mL 容量瓶,即得 3.84 mg/mL 的 ABTS 自由基初始溶液。精密称取过硫酸钾 13.40 mg,放置于 10 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度线即得过硫酸钾溶液。ABTS 自由基初始溶液和过硫酸钾溶液各取 2.5 mL,放置于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度线即得 ABTS 自由基溶液,避光放置 12 ~ 16 h 备用。

2.2.2.6 数据处理

IC₅₀ 值计算时,由于各提取液对自由基的清除率与浓度不呈线性关系,因此使用 SPSS19.0 中 Probit 方法进行回归分析,拟合得相应的方程 Probit (p) = Intercept + Bx,再通过卡方检验后得到 IC₅₀ 值 (Probit = 0.50 时提取液的生药浓度),IC₅₀ 值越小表示提取液的抗氧化能力越强。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 方法学考察

2.3.1.1 稳定性试验

取山楂叶标准汤剂的供试品溶液,按“2.1”项色谱条件,在不同的时间点(0、4、6、8、10、24 h)分别进样,计算 18 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,得出 RSD 分别为小于 1.5% 和小于 2.0%。表明山楂叶标准汤剂在 24 h 内稳定。

2.3.1.2 精密度试验

取“2.2.1”项制得的标准汤剂,按上述方法连续进样 6 次样品,以牡荆素葡萄糖苷的峰面积和保留时间为参照计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别小于 0.8% 和小于 1.0%。表明仪器精密度良好。

2.3.1.3 重复性试验

取同一标准汤剂 6 份,按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液进行测定,计算 18 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别低于 0.8% 和低于 1.0%。表明该方法重复性良好。

2.3.2 样品指纹图谱的确定

将 16 批山楂叶标准汤剂 HPLC 色谱图输入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》进行数据处理,设 S₁ 为参照图谱,时间窗宽度 0.40。以中位数法生成对照图谱,可得山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱色谱叠加图。

2.4 不同产地山楂叶标准汤剂抗氧化活性

2.4.1 不同产地山楂叶标准汤剂对 DPPH 自由基的清除能力

参考文献^[19]的方法,并进行改进。将 16 批山楂叶标准汤剂稀释成系列浓度的溶液,以 Vc 溶液作为阳性对照。测定测试液对 DPPH 自由基清除率的方法同“2.2.4”,测完清除率后按照“2.2.6”中的方法计算 IC₅₀ 值。

2.4.2 不同产地山楂叶标准汤剂对 ABTS 自由基的清除能力

参考“2.4.1”的方法,测定测试液对 ABTS 自由基清除率的及 IC₅₀ 值。

2.5 灰关联度分析

对 16 批不同产地山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹

图谱共有峰面积与 DPPH 自由基 IC_{50} 值、ABTS 自由基 IC_{50} 值进行灰关联度分析^[17], 研究其相关性。将不同批次的山楂叶标准汤剂清除 DPPH 自由基活性 IC_{50} 、山楂叶标准汤剂清除 ABTS 自由基活性 IC_{50} 设为母序列, 18 个共有峰设为子序列共有峰分别用 $X_1 \sim X_{18}$ 表示。参考文献^[18,19]方法和步骤, 首先求绝对差序列, 最后求关联系数并计算关联度, 其中分辨系数选取 0.5。

2.5.1 排关联顺序

将 18 个子序列对同一母序列的关联度按大小顺序排列起来, 便组成关联序, 记为 x , 它直接反映各个子序列对母序列的“贡献”的大小。据此可寻找指纹图谱共有峰对应的化学成分与抗氧化活性间的联系。

2.5.2 谱效相关性分析

对山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱中各共有峰面积数据与抗氧化活性进行灰色关联度及关联序分析。依据相对关联度的大小, 确定了各成分对抗氧化作用贡献的大小顺序。

3 实验结果

3.1 山楂叶标准汤剂指纹图谱结果

16 批山楂叶标准汤剂指纹图谱相似度除 S1、S3 批次外均大于 0.94, 共标记 18 个共有峰, 见图 3。通过对照品及保留时间对对照图谱中的色谱峰进行

指认, 指认出 5 个共有峰为绿原酸(6 号峰)、牡荆素葡萄糖苷(11 号峰)、牡荆素鼠李糖苷(12 号峰)、芦丁(13 号峰)及金丝桃苷(14 号峰), 见图 1 和图 2。

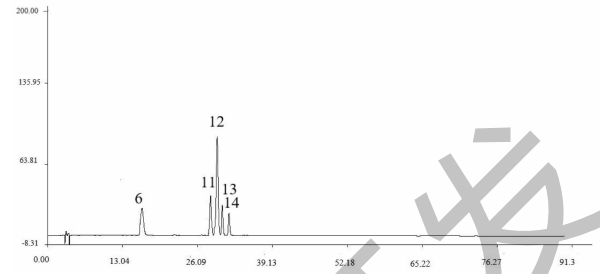


图 1 混合对照品溶液的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC spectrum of mixed reference solution

注: 6. 绿原酸; 11. 牡荆素葡萄糖苷; 12. 牡荆素鼠李糖苷; 13. 芦丁; 14. 金丝桃苷。Note: 6. Chlorogenic acid; 11. Vitexin glucoside; 12. Vitexin rhamnoside; 13. Rutin; 14. Hypericin.

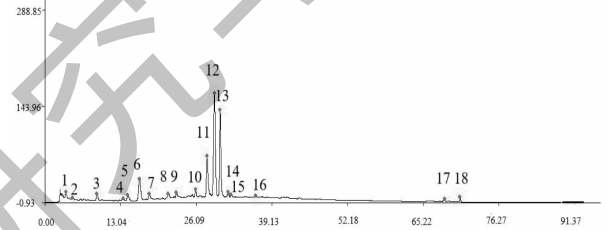


图 2 山楂叶标准汤剂指纹图谱共有模式

Fig. 2 Common pattern of fingerprint of hawthorn leaf standard decoction

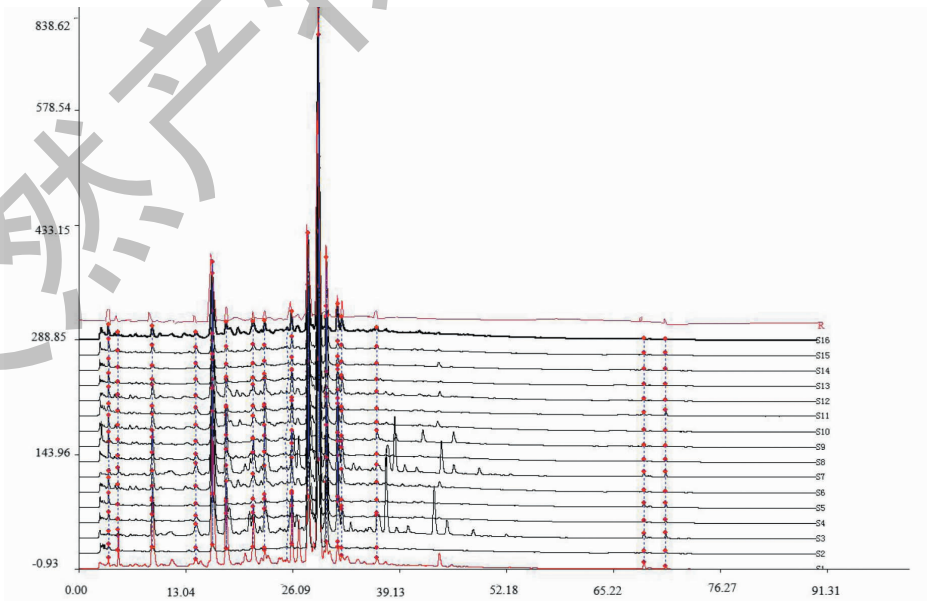


图 3 山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱色谱叠加图

Fig. 3 HPLC fingerprint chromatographic superposition of hawthorn leaf standard decoction

3.2 不同产地山楂叶标准汤剂对 DPPH 自由基的清除能力结果

16 批山楂叶标准汤剂对 DPPH 自由基的清除能力结果结果见表 3 和图 4。

表 3 16 批山楂叶药材标准汤剂对 DPPH 自由基的清除率和半抑制率
Table 3 Clearance rate and semi-inhibition rate of DPPH free radical of 16 batches of hawthorn leaf medicinal materials standard decoction

编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
Vc	6.03	13.75	0.0168	S9	0.39	18.39	3.20
	12.05	30.68			0.50	26.28	
	16.06	48.46			0.67	38.51	
	19.28	60.60			1.56	51.24	
	24.10	72.56			3.13	58.33	
	48.20	80.17			6.25	63.00	
S1	0.39	21.97	3.21	S10	0.20	24.41	2.14
	0.78	31.47			0.39	33.71	
	1.25	34.32			0.50	42.42	
	1.56	37.00			0.78	57.83	
	3.13	53.21			1.56	60.06	
	6.25	72.15			6.25	65.26	
S2	0.25	25.21	0.55	S11	0.20	23.73	0.47
	0.39	40.05			0.25	30.15	
	0.50	49.34			0.39	45.42	
	0.67	62.85			0.50	83.6	
	0.78	70.45			0.67	62.24	
	1.25	76.84			1.56	75.00	
S3	0.39	23.4	2.68	S12	0.39	25.15	1.60
	0.78	28.09			0.50	27.40	
	1.25	39.07			0.67	30.56	
	1.56	45.01			0.78	34.68	
	3.13	66.27			1.56	54.50	
	6.25	71.74			3.13	75.52	
S4	0.39	24.47	2.505	S13	0.39	14.19	1.71
	0.78	30.17			0.50	24.77	
	1.56	45.37			0.67	30.86	
	2	48.52			0.78	32.06	
	3.13	69.18			1.56	52.93	
	6.25	71.38			3.13	75.38	
S5	0.39	28.42	2.31	S14	0.20	27.06	0.50
	1	38.54			0.39	45.35	
	1.56	43.11			0.50	52.70	

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
S6	2	58.23	0.84	S15	0.67	62.91	1.05
	3.13	64.15			0.78	70.79	
	6.25	68.84			1.56	76.35	
	0.25	11.08			0.20	22.13	
	0.39	21.92			0.39	30.18	
	0.50	29.21			0.78	33.93	
	0.67	41.06			1.00	48.48	
	0.78	51.69			1.25	53.72	
S7	1.25	71.14	2.34	S16	1.56	73.42	0.36
	0.39	22.39			0.20	32.25	
	0.78	33.91			0.25	38.00	
	1.56	45.61			0.39	57.06	
	2.00	51.66			0.50	66.22	
	3.13	70.13			0.67	76.65	
S8	6.25	73.10	3.10	S16	0.78	78.15	0.36
	0.39	19.00			0.20	32.25	
	1.00	28.74			0.25	38.00	
	1.25	33.19			0.39	57.06	
	1.56	37.77			0.50	66.22	
	3.13	56.53			0.67	76.65	
	6.25	74.82			0.78	78.15	

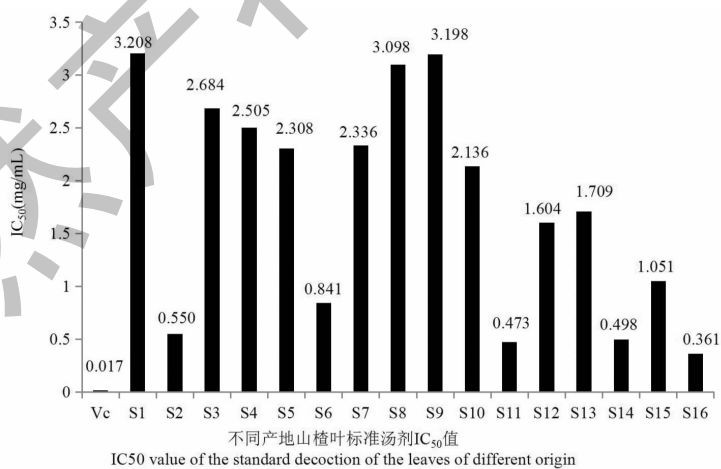


图 4 16 批山楂叶药材标准汤剂对 DPPH 自由基清除能力的比较

Fig. 4 Comparison of DPPH free radical scavenging ability of 16 batches of hawthorn leaf standard decoction

3.3 不同产地山楂叶标准汤剂对 ABTS 自由基的清除能力结果

16 批山楂叶标准汤剂对 ABTS 自由基的清除能力结果见表 4 和图 5。

表 4 16 批山楂叶药材标准汤剂对 ABTS 自由基的清除率和半抑制率

Table 4 Clearance rate and semi-inhibition rate of ABTS free radical in 16 batches of hawthorn leaf medicinal materials standard decoction

编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
Vc	12.05	4.70	0.0247	S9	0.20	28.87	0.4
	16.06	21.70			0.25	35.99	
	19.28	30.2			0.39	50.42	
	24.10	60.89			0.5	63.8	
	40.10	78.26			0.78	82.38	
	48.20	84.80			1.56	89.28	
S1	0.25	12.34	1.65	S10	0.17	23.06	0.35
	0.50	20.54			0.20	34.39	
	0.78	33.17			0.25	41.61	
	1.25	42.03			0.39	58.6	
	1.56	60.66			0.50	69.11	
	3.13	74.67			0.78	86.52	
S2	0.2	8.52	0.55	S11	0.2	20.59	0.41
	0.25	33.41			0.25	32.06	
	0.39	40.79			0.39	48.3	
	0.50	52.59			0.50	72.51	
	0.78	73.48			0.78	85.67	
	1.56	92.13			1.56	89.92	
S3	0.25	14.23	1.94	S12	0.25	15.71	0.96
	0.50	24.47			0.39	23.35	
	0.78	30.71			0.50	29.09	
	1.25	44.93			0.78	45.22	
	1.56	59.29			1.25	65.87	
	6.25	92.4			1.56	74.84	
S4	0.20	13.00	0.90	S13	0.25	15.71	1.02
	0.25	14.35			0.39	23.35	
	0.39	22.94			0.50	29.09	
	0.50	31.76			0.78	45.22	
	0.78	50.47			1.25	55.52	
	1.56	78.47			1.56	74.84	
S5	0.20	16.24	0.72	S14	0.17	20.19	0.33
	0.25	23.88			0.20	35.64	
	0.39	31.18			0.25	45.23	
	0.50	43.29			0.39	62.67	
	0.78	56.94			0.50	70.47	
	1.56	85.65			0.78	87.27	
S6	0.20	24.09	0.56	S15	0.25	23.27	0.62

续表 5 (Continued Tab. 5)

编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	编号 No.	生药浓度 Crude drug concentration (mg/mL)	清除率 Clearance (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
S7	0.25	25.05	1.05	S16	0.39	38.75	0.25
	0.39	38.39			0.50	45.21	
	0.50	45.68			0.67	51.23	
	0.67	48.28			0.78	67.57	
	0.78	74.57			1.56	87.18	
	0.20	11.78			0.17	25.79	
	0.39	22.75			0.20	42.45	
	0.50	26.45			0.25	54.85	
	0.78	45.01			0.39	76.16	
	1.25	53.43			0.50	84.53	
1.56	74.12	0.78	89.3				
S8	0.39	18.96	1.67				
	0.50	25.65					
	0.78	36.33					
	1.25	48.64					
	1.56	62.28					
	6.25	91.96					

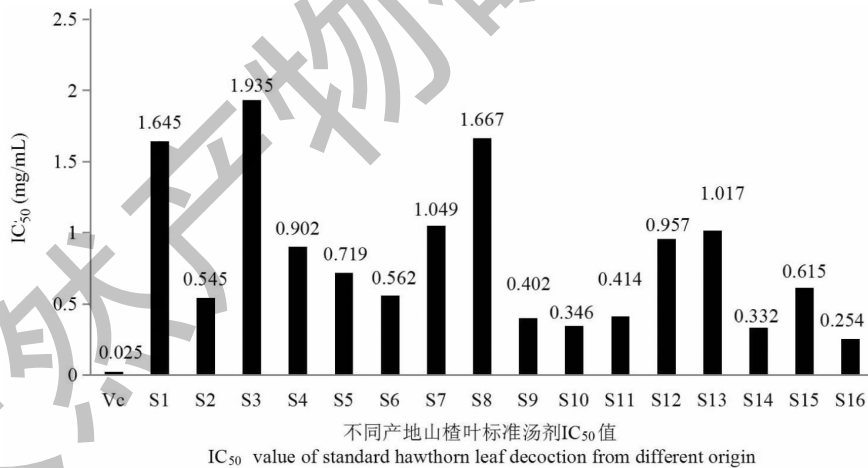


图 5 16 批山楂叶药材标准汤剂对 ABTS 自由基清除能力的比较

Fig. 5 Comparison of ABTS free radical scavenging ability of 16 batches of hawthorn leaf medicinal standard decoction

3.4 灰关联度结果

DPPH 自由基: X₁₁ > X₁₇ > X₁₂ > X₁₃ > X₁₀ > X₄ > X₁₈ > X₁₆ > X₇ > X₉ > X₃ > X₅ > X₂ > X₁₅ > X₁ > X₁₄ > X₆ > X₈。根“2.3”指认的对照品,确立牡荆素葡萄糖苷 > 牡荆素鼠李糖苷 > 芦丁 > 金丝桃苷 > 绿原酸,关联度数据见表 5。

ABTS 自由基: X₄ > X₁₇ > X₁₁ > X₁₃ > X₁₂ > X₁₀ > X₁₈ > X₇ > X₉ > X₃ > X₅ > X₆ > X₂ > X₁₅ > X₁₆ > X₁ > X₁₄ > X₈。根据“2.3”指认的对照品,确立牡荆素葡萄糖苷 > 芦丁 > 牡荆素鼠李糖苷 > 金丝桃苷 > 绿原酸,关联度数据见表 6。

表5 山楂叶标准汤剂指纹图谱与 DPPH 自由基抗氧化活性关联度

Table 5 Correlation between fingerprint of hawthorn leaf standard decoction and DPPH free radical antioxidant activity

峰数 Peak	关联度 Correlation	峰数 Peak	关联度 Correlation	峰数 Peak	关联度 Correlation
X ₁₁	0.814	X ₁₈	0.769	X ₂	0.748
X ₁₇	0.808	X ₁₆	0.768	X ₁₅	0.745
X ₁₂	0.802	X ₇	0.767	X ₁	0.740
X ₁₃	0.796	X ₉	0.761	X ₁₄	0.735
X ₁₀	0.784	X ₃	0.756	X ₆	0.735
X ₄	0.784	X ₅	0.748	X ₈	0.729

表6 山楂叶标准汤剂指纹图谱与 ABTS 自由基抗氧化活性关联度

Table 6 Correlation between fingerprint of hawthorn leaf standard decoction and ABTS free radical antioxidant activity

峰数 Peak	关联度 Correlation	峰数 Peak	关联度 Correlation	峰数 Peak	关联度 Correlation
X ₄	0.837	X ₁₈	0.803	X ₂	0.761
X ₁₇	0.833	X ₇	0.789	X ₁₅	0.758
X ₁₁	0.827	X ₉	0.780	X ₁₆	0.757
X ₁₃	0.813	X ₃	0.778	X ₁	0.753
X ₁₂	0.807	X ₅	0.775	X ₁₄	0.744
X ₁₀	0.805	X ₆	0.763	X ₈	0.741

4 讨论

4.1 色谱条件的优化

本试验进行了色谱柱、流动相检测波长等条件的优化。其中考察了色谱柱 Agilent ZORBOX-SB C₁₈及 Agilent Extend C₁₈;考察了 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B), 0.2% 甲酸水(A)-乙腈(B)和 0.2% 甲酸水(A)-乙腈(B)-四氢呋喃(C);并考察了 280 及 320 nm 检测波长,最终确定了色谱柱 Agilent Extend

C₁₈、320 nm 波长、0.2% 甲酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱,样品分离效果较好,样品峰较多且基线较平稳。

4.2 山楂叶标准汤剂指纹图谱结果分析

由表7相似度结果可得除 S1 和 S3 批次外各批次山楂叶标准汤剂相似度均大于 0.94。结合课题组前期对 16 批次山楂叶标准汤剂指纹图谱主成分及聚类分析结果,可将 16 批样品分成两类:S1 和 S3 批次为一类,其他批次为另一类。

表7 相似度分析结果

Table 7 Similarity analysis result

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.894	S9	0.979
S2	0.964	S10	0.951
S3	0.832	S11	0.965
S4	0.994	S12	0.940
S5	0.977	S13	0.997
S6	0.940	S14	0.994
S7	0.959	S15	0.992
S8	0.995	S16	0.973

4.3 山楂叶标准汤剂对 DPPH、ABTS 自由基抗氧化活性分析

以 Vc 作为阳性对照,通过图 3,4 显然可见,河北保定(S2)、辽宁(S6)、安徽亳州(S11)、河南禹州(S14)、山东临沂(S15)和山西运城降县(S16)的 IC_{50} 值较小,即这些产地的山楂叶药材标准汤剂抗氧化活性较高,而山东泰安(S1)、河北博野(S3)的 IC_{50} 值为 3.21 和 1.94,其 IC_{50} 值为最高,此产地山楂叶药材的标准汤剂对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力最弱,抗氧化活性也就最低。16 批不同产地山楂叶标准汤剂指纹图谱分析结果与其抗氧化活性一致,即 S2、S4 ~ S16 批次相似度高且抗氧化活性高,后续可对 S2、S4 ~ S16 批次山楂叶标准汤剂进行进一步讨论。S1 和 S3 批次在 HPLC 色谱图表现为同其他批次相比峰多且高;在供试品颜色方面表现为绿色;在化学成分方面可能与其抗氧化活性相关。山楂叶作为一种常用药材,分布范围极为广阔,北到内蒙古,南至广西,产地的不同,其光照、海拔、温度、湿度、土壤等生态因素也会存在较大的不同,可能会导致其有效成分的药效和含量存在一定的差异。山楂叶标准汤剂抗氧化活性较强可能与其黄酮结构有关,黄酮类化合物的抗氧化作用主要通过直接捕捉和清除氧自由基来实现,另外其抗氧化活性也与调节和提高体内抗氧化酶活性相关。本文对 16 批不同产地的山楂叶药材标准汤剂的体外抗氧化作用进行了初步研究,可山楂叶药材的质量分析评价、谱效关系研究等提供参考依据。

4.4 灰关联分析结果

本文考察了山楂叶标准汤剂指纹图谱与其抗氧化活性的相关谱效关系,山楂叶标准汤剂 HPLC 指纹图谱中相似度数据与 DPPH 自由基、ABTS 自由基抗氧化活性结果大致相似,16 批山楂叶标准汤剂指纹图谱共有峰对 DPPH 自由基与 ABTS 自由基的 IC_{50} 值的相对关联度均大于 0.720。

前期考察了偏最小二乘法、多元线性回归分析等数据分析方法,结果均不理想。而灰关联度分析作为常用的谱效关系研究方法,是一种适用于系统信息较少的多因素分析方法,能够较大程度上体现各成分间的相互作用。通过对山楂叶标准汤剂指纹图谱共有峰峰面积及 IC_{50} 值相关度进行排序,所需样本量及计算量较小,且分析结果准确度高。灰关联度分析结果可以说明山楂叶标准汤剂抗氧化活性是多组分共同起作用。其中牡荆素葡萄糖苷作用最

强,可能与其羟基连接位置相关。

本文将山楂叶标准汤剂化学分析及体外活性结合,从谱效关联性角度,为山楂叶标准汤剂的质量控制提供科学依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 32.
- 2 Chen SL, Liu A, Li Q, et al. Study strategy on standard decoction of Chinese medicine decoction [J]. Chin J China Master Med(中国中药杂志), 2016, 41: 1367-1375.
- 3 Gao DY, Liu J, Li WP, et al. Study on the protective effect and mechanism of total flavonoids from hawthorn leaf on myocardial ischemic injury in rats [J]. Chin Med Pharm Clin(中药药理与临床), 2012, 28(5): 64-66.
- 4 Li H, Zhang S, Ji YS, et al. Protective effect of hawthorn leaf flavonoids on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2012, 32: 995-997.
- 5 Min Q, Bai YT, Yu W, et al. Study on the protective effect and mechanism of total flavonoids from hawthorn leaf on myocardial cells induced by hypoxia and reoxygenation [J]. Chin Med Pharm Clin(中药药理与临床), 2011, 27(1): 30-33.
- 6 Yang H, Zhang ZG, Li XH, et al. Effects of hawthorn leaf flavonoids on blood lipid and hemorrheology in hyperlipidemia rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(12): 257-259.
- 7 Qi SF, Zhao XL, Wang YX, et al. Effect of total flavonoids from hawthorn leaf on TGF- β 1/Smad4 signal transduction pathway in diabetic rats [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34: 1795-1797.
- 8 Hu DB, Wu XX, Chen WJ, et al. DFT study on antioxidant activity of 4 flavonoids in alfalfa [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1666-1670.
- 9 Ren QR, Wang YN, Wang Y, et al. Study on antioxidant and antitumor activity of *Elsholtzia densa* in vitro [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29(1): 14-21.
- 10 Cheng XY, Cui X, Liu CZ, et al. Research progress on antioxidant activity of Chinese herbal medicine [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006, 18: 514-518.
- 11 Kang WY, Wang JM. In vitro antioxidant properties and in vivo lowering blood lipid of Forsythia suspense leaves [J]. Med Chem Res, 2010, 19: 617-628.