

# 啤酒花的HPLC指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究<sup>△</sup>

刘晓燕<sup>1\*</sup>, 蒋益萍<sup>1</sup>, 张嘉宝<sup>1</sup>, 王娜妮<sup>2</sup>, 辛海量<sup>1#</sup>(1.海军军医大学药学院, 上海 200433; 2.浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

中图分类号 R931 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)02-0138-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.02.03

**摘要** 目的:建立啤酒花的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并考察与其抗氧化作用的相关性。方法:色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为358 nm,进样量为2 μL。以黄腐酚峰为参照,绘制11批啤酒花药材样品的HPLC指纹图谱;采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价,确定共有峰;以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率、2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基清除率为抗氧化作用的药效指标,采用SIMCA 14.1软件进行偏最小二乘回归分析以建立谱效关系,并进行体外抗氧化试验验证。结果:11批啤酒花药材样品共有19个共有峰,相似度均大于0.830。共指认出7个成分,分别为黄腐酚、类萹草酮、萹草酮、加萹草酮、类蛇麻酮、蛇麻酮和加蛇麻酮。11批啤酒花均具有清除DPPH和ABTS自由基的作用。谱效关系分析结果显示,啤酒花中黄腐酚、萹草酮、类蛇麻酮峰与其抗氧化能力呈正相关,且变量投影值均大于1。体外抗氧化验证结果显示,0.1 mg/mL黄腐酚与0.01 mg/mL维生素C对DPPH自由基的清除作用相当,但10.0 mg/mL黄腐酚对ABTS自由基清除作用小于0.1 mg/mL维生素C。结论:所建HPLC指纹图谱可用于评价啤酒花的质量;黄腐酚、萹草酮和类蛇麻酮可能是啤酒花具有抗氧化作用的物质基础。

**关键词** 啤酒花;高效液相色谱法;指纹图谱;抗氧化;谱效关系;偏最小二乘法回归分析

## Establishment of HPLC Fingerprint and Its Spectrum-effect Relationship Study of *Humulus lupulus*

LIU Xiaoyan<sup>1</sup>, JIANG Yiping<sup>1</sup>, ZHANG Jiabao<sup>1</sup>, WANG Nani<sup>2</sup>, XIN Hailiang<sup>1</sup>(1. College of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Humulus lupulus*, and to investigate its correlation with the antioxidant activity. METHODS: The determination was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was set at 358 nm, with sample size of 2 μL. Using xanthohumol as reference, HPLC fingerprints of 11 batches of *H. lupulus* were determined. The similarity of 11 batches of samples was evaluated by *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition) to confirm common peaks. Using scavenging rate of DPPH and ABTS free radical as pharmacodynamic indicators of antioxidant effects, SIMCA 14.1 analysis software was used for PLSR to establish the spectra-effect relationship, and validation test of *in vitro* anti-oxidation was carried out. RESULTS: There were 19 common peaks in HPLC fingerprints of 11 batches of sample, the similarity of which was higher than 0.830. Seven components were identified as xanthohumol, cohumulone, humulone, adhumulone, colupulone, lupulus and adlupulus. Eleven batches of *H. lupulus* had the ability to scavenge DPPH and ABTS free radicals. The spectrum-effect relationship showed that xanthohumol, humulone and colupulone peaks were positively associated with its anti-oxidant ability, and variable projection value was greater than 1. *In vitro* antioxidant results showed that scavenging effect of 0.1 mg/mL xanthohumol to DPPH free radicals was similar to that of 0.01 mg/mL vitamin C, but scavenging effect of 10.0 mg/mL xanthohumol to ABTS free radical was less than that of 0.1 mg/mL vitamin C. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint can be used for the quality evaluation of *H. lupulus*; xanthohumol, humulone and colupulone are the main material basis for the antioxidant effect of *H. lupulus*

**KEYWORDS** *Humulus lupulus*; HPLC; Fingerprint; Antioxidant; Spectrum-effect relationship; PLSR

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1603283)

\* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail:nmlxy@163.com

# 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药资源、中药(抗骨质疏松)药理学。电话:021-81871300。E-mail:hailiangxin@163.com

啤酒花(*Humulus lupulus* L.)为桑科葎草属多年生草质蔓生藤本植物,主要分布于我国新疆地区,以未成熟的雌性球穗花序入药,具有健胃消食、安神、利尿等功效,可用于治疗肺结核、瘵病、失眠、膀胱炎等症<sup>[1]</sup>,在我国作为民族药收载于1977年版《中国药典》(一部)、《新

疆药用植物志》和《宁夏中药志》等多部典籍。各典籍均记载了啤酒花的基源和功能主治内容,但仅有药典记载了采用滴定法测定啤酒花浸膏中啤酒花软树脂的含量<sup>[2-4]</sup>。啤酒花含有黄酮类、树脂类、挥发油、多酚类及多糖等多种活性成分<sup>[5]</sup>,而仅靠滴定法不能全面控制啤酒花中多种活性成分的含量,且目前对于啤酒花的研究大多为对其多酚类或黄酮类成分的分离和结构分析,具有一定的局限性<sup>[6-8]</sup>。

中药谱效学是基于解决中药活性成分复杂、药理作用机制不明等问题的一门学科,也是中药学质量和活性研究的一个新方向,其可利用多种数据分析中药药理活性的物质基础<sup>[9]</sup>。啤酒花中的黄酮类成分黄腐酚及多酚类成分均具有抗氧化活性<sup>[10-11]</sup>,但目前尚未见关于啤酒花中各成分与其抗氧化活性的研究。基于此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立了啤酒花的指纹图谱,并对其指纹图谱中的特征峰与清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基作用的相关性进行分析,探讨特征峰与其抗氧化活性的相关性,以阐明其体外抗氧化活性的物质基础,旨在为其质量控制和抗氧化作用谱效关系研究提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20AD型HPLC仪,包括四元梯度系统、二极管阵列检测器、LC-solution色谱工作站(日本岛津株式会社);AG285型万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);DL-1000B型智能超声波清洗仪(上海之信仪器有限公司);ELx 800型多功能酶标仪(美国Biotek公司)。

### 1.2 试剂

黄腐酚对照品(上海历鼎生物技术有限公司,批号:20181103,纯度:≥98%);啤酒花浸膏ICE-3(美国酿造化学家协会,含有类萹草酮、萹草酮、加萹草酮、类蛇麻酮、蛇麻酮、加蛇麻酮等6种成分);维生素C[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:RS0328B4013J,纯度:≥99%];DPPH(批号:STBD2362V)、ABTS(批号:SLBV6099)均由美国Sigma公司提供;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 药材

啤酒花药材(编号:S1~S11)经解放军海军军医大学药学院生药教研室辛海量副教授鉴定为桑科植物啤酒花(*H. lupulus* L.)的雌性球穗花序。药材样品来源信息见表1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Diamondsil C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流

表1 药材样品来源信息

Tab 1 Regions of *H. lupulus*

编号	品种	产地	采集时间
S1	野生	阿勒泰市布尔津县	2017年7月
S2	野生	阿勒泰市云母二矿	2017年7月
S3	栽培	塔城市裕民县	2017年7月
S4	栽培	昌吉市吉木萨尔县红旗农场1	2017年7月
S5	栽培/马克波罗品种	阜康市222团	2017年8月
S6	栽培/萨斯特品种	阜康市222团	2017年8月
S7	栽培	昌吉市吉木萨尔县红旗农场2	2017年7月
S8	栽培	哈密市伊吾县	2017年8月
S9	栽培	昌吉市奇台县	2017年8月
S10	栽培	喀什市乃则尔巴格镇	2017年7月
S11	栽培/乳一品种	昌吉市军户农场	2017年7月

动相:0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min, 20% B→25% B; 10~12 min, 25% B→75% B; 12~30 min, 75% B→78% B; 30~40 min, 78% B→81% B; 40~42 min, 81% B→83% B; 42~60 min, 83% B→90% B);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:358 nm;进样量:2 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取黄腐酚对照品26.46 mg,置于100 mL量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,得黄腐酚对照品贮备液。精密称取啤酒花浸膏ICE-3 466.27 mg,置于100 mL量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,得浸膏贮备液。取上述两种贮备液各5 mL,置于同一10 mL量瓶中,混合均匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取啤酒花药材样品适量,粉碎,称取粉末0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加50%乙醇20 mL,称定质量,超声(功率:300 W,频率:50 kHz)处理30 min,放凉至室温,再次称定质量,用50%乙醇补足减失的质量,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S11)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以黄腐酚峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.13%(n=6),相对峰面积的RSD均小于1.47%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S11)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以黄腐酚峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.37%(n=7),相对峰面积的RSD均小于2.93%(n=7),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取啤酒花药材样品粉末(编号:

S11)0.5 g,共6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以黄腐酚峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.41%( $n=6$ ),相对峰面积的RSD均小于2.17%( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

## 2.4 HPLC 指纹图谱的生成与相似度、共有峰分析

2.4.1 HPLC 指纹图谱的生成 取11批啤酒花药材样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对11批啤酒花药材样品的指纹图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

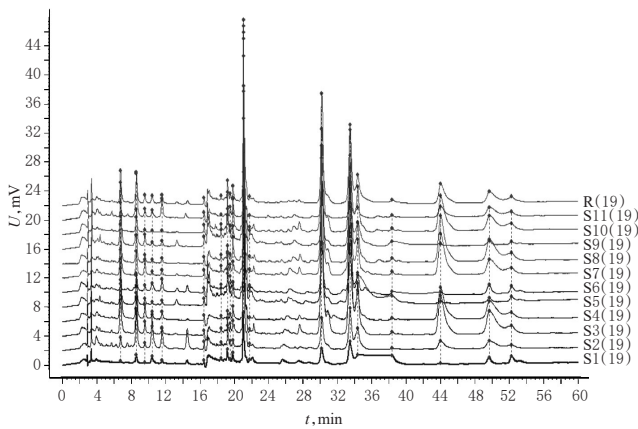


图1 11批啤酒花药材样品的HPLC叠加指纹图谱  
Fig 1 HPLC superimposed fingerprint of 11 batches of *H. lupulus*

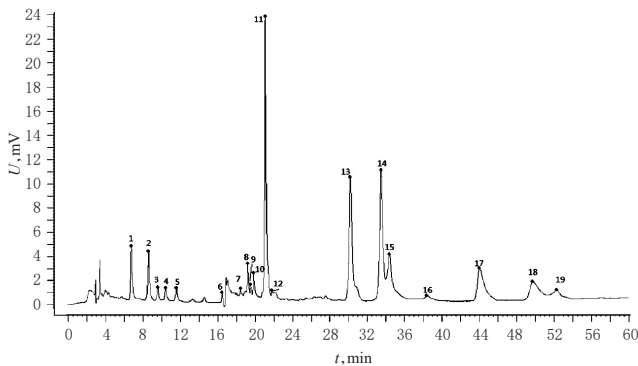


图2 啤酒花药材样品的HPLC对照指纹图谱  
Fig 2 HPLC control fingerprint of *H. lupulus*

2.4.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价。结果,11批啤酒花药材样品的相似度均大于0.830,提示不同产地和不同品种的啤酒花药材样品间的化学成分差异较小。相似度评价结果见表2。

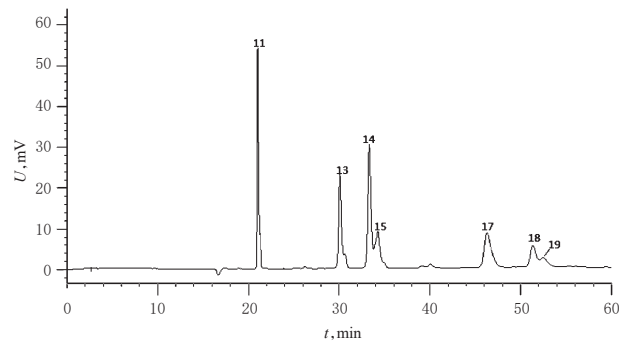
2.4.3 共有峰的指认 11批啤酒花药材样品共有19个共有峰。以S10作为参照图谱,时间窗口为0.1 min,选择指纹图谱中峰形较好的色谱峰进行多点校正,采用平均数法生成对照图谱,同时结合啤酒花药材样品和混合

表2 11批啤酒花药材样品的相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of 11 batches of *H. lupulus*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
S1	1	0.915	0.944	0.960	0.897	0.911	0.928	0.895	0.919	0.929	0.909
S2	0.915	1	0.872	0.965	0.990	0.986	0.897	0.922	0.928	0.994	0.920
S3	0.944	0.872	1	0.957	0.837	0.838	0.980	0.935	0.966	0.881	0.947
S4	0.960	0.965	0.957	1	0.937	0.935	0.954	0.971	0.983	0.963	0.973
S5	0.897	0.990	0.837	0.937	1	0.996	0.865	0.876	0.886	0.993	0.876
S6	0.911	0.986	0.838	0.935	0.996	1	0.858	0.871	0.880	0.994	0.873
S7	0.928	0.897	0.980	0.954	0.865	0.858	1	0.916	0.948	0.897	0.922
S8	0.895	0.922	0.935	0.971	0.876	0.871	0.916	1	0.993	0.908	0.998
S9	0.919	0.928	0.966	0.983	0.886	0.880	0.948	0.993	1	0.921	0.995
S10	0.929	0.994	0.881	0.963	0.993	0.994	0.897	0.908	0.921	1	0.910
S11	0.909	0.920	0.947	0.973	0.876	0.873	0.922	0.998	0.995	0.910	1

对照品的HPLC分析结果,指认出11号峰为黄腐酚、13号峰为类萹草酮、14号峰为萹草酮、15号峰为加萹草酮、17号峰为类蛇麻酮、18号峰为蛇麻酮、19号峰为加蛇麻酮,详见图3。因黄腐酚峰分离度良好、峰面积大且稳定,故以其保留时间和峰面积为参照,计算其他峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表3、表4。



注:11.黄腐酚;13.类萹草酮;14.萹草酮;15.加萹草酮;17.类蛇麻酮;18.蛇麻酮;19.加蛇麻酮

Note: 11. xanthohumol; 13. cohumulone; 14. humulone; 15. adhumulone; 17. colupulone; 18. lupulus; 19. adlupulus

图3 混合对照品的HPLC图

Fig 3 HPLC chromatogram of mixed control

## 2.5 抗氧化作用考察

2.5.1 DPPH 自由基清除率 按“2.2.2”项下方法制备11批供试品溶液(编号:S1~11),每批取1 mL,加50%乙醇稀释制成系列质量浓度的供试品溶液;精密称取DPPH 4 mg,加甲醇溶解并定容至100 mL量瓶中,即得浓度为40  $\mu\text{g/mL}$ 的DPPH自由基溶液。取上述系列质量浓度的供试品溶液各100  $\mu\text{L}$ 、DPPH自由基溶液100  $\mu\text{L}$ ,先后加入至96微孔板中,置于室温避光处反应30 min后,采用酶标仪于540 nm波长处测定DPPH自由基溶液+系列质量浓度供试品溶液的吸光度( $A_s$ );取系列质量浓度的供试品溶液各100  $\mu\text{L}$ 、无水乙醇100  $\mu\text{L}$ ,同法反应并测得系列质量浓度供试品溶液的吸光度( $A_c$ );取DPPH自由基溶液100  $\mu\text{L}$ 、50%乙醇溶液100  $\mu\text{L}$ ,同

表3 11批啤酒花药材样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms for 11 batches of *H. lupulus*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	RSD, %
1	0.325	0.324	0.325	0.324	0.323	0.323	0.323	0.321	0.316	0.316	0.314	0.40
2	0.412	0.412	0.412	0.411	0.411	0.410	0.410	0.406	0.403	0.403	0.401	0.42
3	0.459	0.459	0.459	0.458	0.458	0.457	0.456	0.452	0.448	0.448	0.446	0.50
4	0.499	0.499	0.499	0.498	0.498	0.499	0.497	0.491	0.490	0.488	0.487	0.49
5	0.554	0.554	0.554	0.553	0.552	0.552	0.551	0.545	0.543	0.543	0.541	0.50
6	0.784	0.785	0.784	0.784	0.785	0.785	0.785	0.775	0.784	0.784	0.784	0.30
7	0.876	0.876	0.876	0.877	0.876	0.877	0.877	0.868	0.877	0.877	0.877	0.26
8	0.897	0.911	0.911	0.912	0.911	0.912	0.912	0.905	0.913	0.912	0.912	0.47
9	0.911	0.927	0.927	0.928	0.927	0.928	0.927	0.922	0.928	0.927	0.928	0.50
10	0.941	0.941	0.941	0.942	0.941	0.940	0.941	0.937	0.941	0.941	0.942	0.12
11(对照)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
12	1.047	1.048	1.056	1.056	1.043	1.044	1.056	1.058	1.044	1.056	1.047	0.59
13	1.432	1.433	1.433	1.431	1.433	1.432	1.432	1.436	1.431	1.431	1.431	0.13
14	1.589	1.589	1.588	1.586	1.588	1.588	1.587	1.590	1.586	1.586	1.586	0.14
15	1.619	1.635	1.633	1.631	1.632	1.632	1.632	1.634	1.629	1.630	1.630	0.43
16	1.873	1.872	1.872	1.868	1.869	1.868	1.869	1.868	1.868	1.870	1.868	0.19
17	2.207	2.207	2.207	2.204	2.208	2.206	2.205	2.199	2.205	2.204	2.201	0.29
18	2.446	2.446	2.446	2.444	2.445	2.444	2.444	2.433	2.444	2.443	2.441	0.38
19	2.500	2.504	2.500	2.498	2.491	2.498	2.498	2.485	2.492	2.499	2.497	0.54

表4 11批啤酒花药材样品HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms for 11 batches of *H. lupulus*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	RSD, %
1	0.022	0.074	0.261	0.618	0.151	0.060	0.312	0.199	0.382	0.084	0.164	17.52
2	0.145	0.325	0.210	0.407	0.130	0.165	0.146	0.147	0.240	0.084	0.588	15.01
3	0.013	0.033	0.069	0.114	0.021	0.048	0.092	0.037	0.072	0.009	0.093	3.55
4	0.162	0.311	0.040	0.061	0.010	0.102	0.021	0.014	0.029	0.006	0.095	9.13
5	0.064	0.164	0.035	0.072	0.016	0.120	0.033	0.024	0.034	0.008	0.260	7.74
6	0.075	0.044	0.024	0.045	0.019	0.051	0.032	0.028	0.048	0.039	0.067	1.72
7	0.243	0.056	0.064	0.095	0.065	0.179	0.098	0.018	0.096	0.069	0.078	6.27
8	0.326	0.176	0.094	0.116	0.208	0.205	0.150	0.067	0.329	0.104	0.137	8.80
9	0.099	0.051	0.056	0.061	0.049	0.135	0.062	0.021	0.062	0.034	0.118	3.49
10	0.254	0.085	0.060	0.149	0.102	0.132	0.074	0.107	0.133	0.171	0.222	6.07
11(对照)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
12	0.079	0.037	0.030	0.026	0.064	0.071	0.039	0.023	0.080	0.023	0.027	2.33
13	0.467	0.465	1.250	1.183	0.382	0.822	1.249	1.069	0.543	1.364	0.334	40.17
14	0.835	0.641	1.403	1.286	0.936	1.229	1.238	1.073	0.926	1.117	0.483	28.34
15	0.259	0.533	0.719	0.713	0.298	0.489	0.592	0.583	0.430	0.705	0.325	16.87
16	0.350	0.007	0.025	0.019	0.083	0.044	0.039	0.031	0.074	0.028	0.035	9.67
17	0.015	0.227	0.808	1.196	0.019	0.030	1.047	0.993	0.008	0.850	0.492	47.38
18	0.341	0.183	0.378	0.528	0.054	0.323	0.292	0.364	0.063	0.275	0.338	13.95
19	0.347	0.050	0.121	0.152	0.050	0.156	0.115	0.138	0.042	0.135	0.149	8.34

法反应并测得DPPH自由基溶液的吸光度( $A_0$ )。上述试验均平行操作3次,取平均值,按公式计算DPPH清除率:  $DPPH \text{ 清除率} = [A_0 - (A_s - A_c)] / A_0 \times 100\%$  [12-14]; 采用GraphPad Prism 5 软件进行非线性回归,预测半数抑制浓度( $IC_{50}$ ),结果见表5。由表5可知,11批啤酒花药材样品均具有清除DPPH自由基的能力,其中以昌吉市吉

木萨尔县红旗农场1采集的啤酒花(编号:S4)抗氧化能力最强。

表5 抗氧化活性测定结果

Tab 5 Antioxidant activity results of *H. lupulus*

编号	$IC_{50}$ , mg/mL		编号	$IC_{50}$ , mg/mL	
	清除DPPH自由基	清除ABTS自由基		清除DPPH自由基	清除ABTS自由基
S1	1.14	4.51	S7	0.38	1.31
S2	0.18	0.87	S8	0.42	1.40
S3	0.24	1.10	S9	0.59	2.04
S4	0.22	0.94	S10	0.39	1.51
S5	0.63	1.99	S11	0.35	1.70
S6	0.76	2.71			

2.5.2 ABTS 自由基清除率 精密称取ABTS 38.41 mg,加水溶解并定容至10 mL量瓶中,制成浓度为7 mmol/L的ABTS水溶液,与2.45 mmol/L的过硫酸钾( $K_2S_2O_8$ )水溶液混合,于暗处放置12 h以上,使用前加甲醇稀释,使其在734 nm波长处的吸光度为0.78~0.82,即得ABTS自由基溶液。取“2.5.1”项下系列质量浓度的供试品溶液各10  $\mu$ L、ABTS自由基溶液200  $\mu$ L,先后加入至96微孔板中,置于室温反应10 min,采用酶标仪于734 nm波长处测得ABTS自由基溶液+系列质量浓度供试品溶液的吸光度( $A_s$ );取系列质量浓度的供试品溶液10  $\mu$ L、甲醇200  $\mu$ L,同法反应并测得系列质量浓度供试品溶液的吸光度( $A_c$ );取ABTS自由基溶液200  $\mu$ L、50%乙醇溶液10  $\mu$ L,同法反应并测得ABTS自由基溶液的吸光度 $A_0$ 。上述试验均平行操作3次,取平均值,按“2.5.1”项下公式计算ABTS清除率并预测 $IC_{50}$ ,结果见表5。由表5可知,11批啤酒花药材样品均具有清除ABTS自由基的能力,其中以阿勒泰市云母二矿采集的啤酒花(编号:S2)抗氧化能力最强。

## 2.6 谱效关系分析

以表5中11批啤酒花药材样品的抗氧化活性数据为因变量,峰面积为自变量,采用SIMCA 14.1软件进行偏最小二乘回归分析。结果,啤酒花药材样品HPLC指纹图谱中的4~12、14、16~18号峰面积与其清除DPPH和ABTS自由基的能力呈正相关,即相应成分的相对含量越高,其清除DPPH和ABTS自由基的能力越强,提示该成分是啤酒花清除DPPH和ABTS自由基作用的物质基础,结果见图4。

变量投影(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[15]。以DPPH和ABTS自由基的清除率为药效指标,对VIP进行分析,筛选出对啤酒花药材样品抗氧化能力影响较大的色谱峰(以VIP>1为标准)。结果,啤酒花药材样品对DPPH和ABTS自由基的清除能力从大到小依次分别为黄腐酚(11号峰)>葎草酮(14号峰)>类蛇麻酮(17号峰)和葎草酮(14号峰)>黄腐酚(11号峰)>类蛇麻酮(17号峰),提示相应成分在清除DPPH和ABTS自由基过程中具有重要作用,且与啤酒花抗氧化能力呈正相关,进一

步提示黄腐酚、葎草酮和类蛇麻酮可能是啤酒花具有抗氧化作用的物质基础,结果见图5。

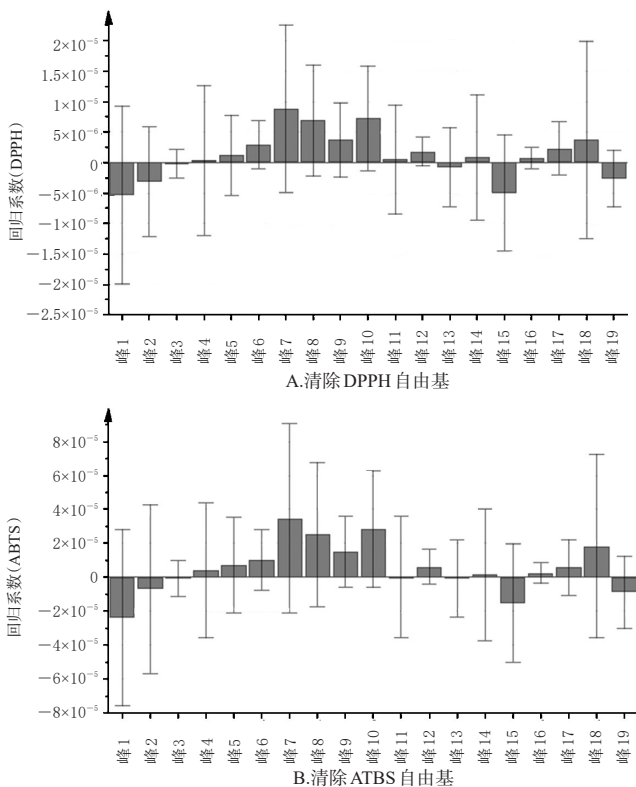


图4 偏最小二乘回归分析谱效关系图

Fig 4 PLSR regression analysis spectral efficiency diagram

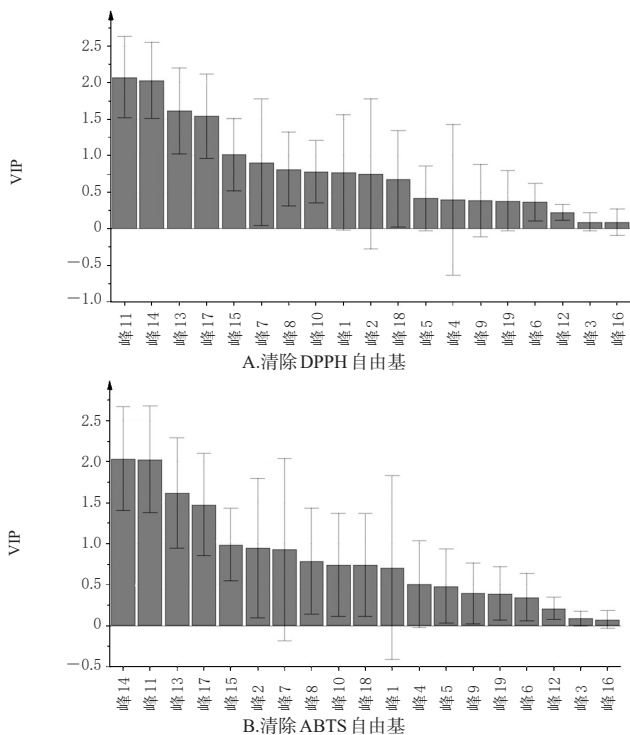


图5 偏最小二乘回归分析药效模型中各共有峰的VIP值

Fig 5 VIP value of common peaks in pharmacodynamic model of PLSR regression analysis

## 2.7 黄腐酚体外抗氧化验证试验

2.7.1 DPPH 自由基清除率 精密称取黄腐酚对照品 50.04 mg,加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中;另取上述溶液适量,再分别用甲醇稀释 10、100 倍,制成质量浓度分别为 10.0、1.0、0.1 mg/mL 的系列工作溶液。精密称取维生素 C 10 mg,加水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,制成质量浓度为 0.01 mg/mL 的维生素 C 溶液。按“2.5.1”项下方法操作并计算黄腐酚和维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率,详见图 6A。由图 6A 可知,黄腐酚在质量浓度 0.1~10.0 mg/mL 范围内对 DPPH 自由基的清除率由 42.6% 增加至 88.8%,且 0.1 mg/mL 黄腐酚与 0.01 mg/mL 维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率相当( $P=0.050$ ),提示黄腐酚具有较强的清除 DPPH 自由基的能力,是啤酒花具有清除 DPPH 自由基作用的主要成分之一。

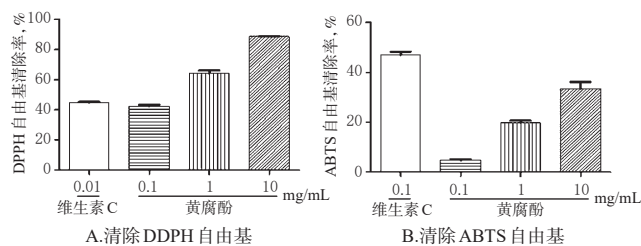


图6 黄腐酚体外抗氧化试验结果

Fig 6 Antioxidant activity results of xanthohumol *in vitro*

2.7.2 ABTS 自由基清除率 取“2.7.1”项下系列工作溶液各适量;另精密称取维生素 C 10.02 mg,加水溶解并定容至 10 mL 量瓶中,制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的维生素 C 溶液。按“2.5.1”项下方法操作计算黄腐酚和维生素 C 对 ABTS 自由基的清除率,详见图 6B。由图 6B 可知,在质量浓度 0.1~10.0 mg/mL 范围内,以 10.0 mg/mL 的黄腐酚对 ABTS 自由基的清除率最高,为 33.5%,但小于 0.1 mg/mL 维生素 C 对 ABTS 自由基的清除率;结合图 5B,提示啤酒花药材样品在清除 ABTS 自由基时葎草酮的作用最大,是其具有清除 ABTS 自由基作用的主要成分之一。

## 3 讨论

本研究采用 HPLC 法建立了啤酒花药材样品的指纹图谱,该方法精密度高、稳定性好、重复性好,能够同时检测啤酒花中的多种有效成分。本研究前期分别考察了乙腈-水、甲醇-水不同流动相系统的分离效果,结果显示,以乙腈-水为流动相时的分离效果优于甲醇-水,但存在色谱峰拖尾现象;随后在水相中加入 0.1% 磷酸后,色谱峰的拖尾现象得到改善。

DPPH 法和 ABTS 法是常用的检测化合物或植物提取物抗氧化活性的方法<sup>[16]</sup>,因此本研究以 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率来评价啤酒花药材样品的抗氧化

能力。结果显示,11批啤酒花药材样品均具有清除DPPH和ABTS自由基的能力,分别以昌吉市吉木萨尔县红旗农场1和阿勒库市云母二矿采集的啤酒花药材样品的抗氧化能力最强。

偏最小二乘回归法主要用于多因变量对多自变量的回归建模<sup>[17]</sup>,能较好地解决样本量少于变量的问题<sup>[18]</sup>。本研究采用偏最小二乘回归法分析了啤酒花药材样品色谱峰与其抗氧化作用的相关性。结果显示,啤酒花药材样品指纹图谱中黄腐酚(11号)、葎草酮(14号)、类蛇麻酮(17号)与DPPH和ABTS自由基清除率呈正相关,推测上述3种成分可能为啤酒花药材样品具有抗氧化作用的潜在药效物质。体外抗氧化验证试验结果显示,0.1 mg/mL黄腐酚与0.01 mg/mL维生素C对DPPH自由基的清除率相当,但10.0 mg/mL黄腐酚对ABTS自由基清除率小于0.1 mg/mL维生素C。

综上所述,本研究所建HPLC指纹图谱可用于评价啤酒花的质量,黄腐酚、葎草酮和类蛇麻酮可能是啤酒花具有抗氧化作用的物质基础。

#### 参考文献

[1] ZANOLI P, ZAVATTI M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(3): 383-396.

[2] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 1977年版. 北京: 人民卫生出版社, 1977: 541-542.

[3] 新疆生物土壤沙漠研究所. 新疆药用植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1977: 12.

[4] 邢世瑞. 宁夏中药志: 上[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 2006: 3.

[5] 林柳悦, 蒋益萍, 张巧艳, 等. 啤酒花化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1830-1836.

[6] TANAKA Y, YANAGIDA A, KOMEYA S, et al. Comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(10): 2198-2206.

[7] GONÇALVES JL, ALVES VL, RODRIGUES FP, et al. A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast ap-

proach for the determination of prenylflavonoids in beers[J]. *J Chromatogr A*, 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.06.D72.

[8] TANIGUCHI Y, MATSUKURA Y, OZAKI H, et al. Identification and quantification of the oxidation products derived from  $\alpha$ -acids and  $\beta$ -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(12): 3121-3130.

[9] 陶慧娟, 乐世俊, 唐于平, 等. 基于主成分分析和多指标综合指数法研究丹参-三七药对活血化瘀作用量效关系[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(17): 2141-2147.

[10] MAIETTI A, BRIGHENTI V, BONETTI G, et al. Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.04.043.

[11] 刘莎, 刘玉梅. 啤酒花多酚提取物的抗氧化活性研究[J]. 酿酒科技, 2010(10): 19-22.

[12] MA YL, ZHU DY, THAKUR K, et al. Antioxidant and antibacterial evaluation of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.154.

[13] WU G, ZHU L, YUAN X, et al. Britanin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inducing the Nrf2 protective pathway [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(11): 754-768.

[14] ATOLANI O, OLATUNJI GA, FABIYI OA, et al. Phytochemicals from *kigelia pinnata* leaves shows antioxidant and anti-cancer potentials on human cancer cell line [J]. *J Med Food*, 2013. DOI: 10.1089/jmf.2012.0249.

[15] 刘森, 黄莹莹, 林梦雅, 等. 黑玛咖不同提取物的抗疲劳作用与谱效关系研究[J]. 中草药, 2018, 49(9): 2090-2096.

[16] GÜLÇİN İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview [J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(3): 345-391.

[17] 周娴, 熊旺平, 周翔, 等. 基于R语言的PLS在中药数据处理的研究与分析[J]. 科技传播, 2015, 7(24): 200-201.

[18] 潘杰, 刘德胜, 颜贵明. 数据分析应用于中药谱效关系中的研究进展[J]. 中医学报, 2018, 46(4): 119-122.

(收稿日期: 2019-06-27 修回日期: 2019-12-10)

(编辑: 陈宏)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅