

# 黄连花茎 HPLC 指纹图谱的建立及其抗氧化和抑菌作用谱效关系研究<sup>Δ</sup>

杨 慧<sup>1\*</sup>, 张 佳<sup>1</sup>, 刘博文<sup>2</sup>, 刘 钱<sup>2</sup>, 李松洋<sup>3</sup>, 吴 磊<sup>1</sup>, 徐玉玲<sup>1#</sup>, 刘 涛<sup>1</sup>(1. 成都大学食品与生物工程学院, 成都 610106; 2. 成都大学四川抗菌素工业研究所, 成都 610106; 3. 成都大学张澜学院, 成都 610106)

中图分类号 R284.1; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)05-0559-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.05.09

**摘要** 目的: 建立黄连花茎的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并研究其与抗氧化和抑菌作用的谱效关系。方法: 以14批不同产地的黄连花茎为对象, 采用HPLC法测定。色谱柱为Supersil C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 柱温为25 ℃, 检测波长为329 nm, 进样量为10 μL。采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)建立14批黄连花茎的指纹图谱并进行相似度评价和共有峰指认。以DPPH自由基清除率和羟自由基清除率为抗氧化作用指标, 以相对抑菌活性(大肠埃希菌)为抑菌作用指标, 利用SPSS 21.0软件对黄连花茎共有峰与上述两种药效指标进行Pearson相关性分析, 建立谱效关系模型, 并进行验证。结果: 黄连花茎的HPLC指纹图谱中共得到7个共有峰, 相似度均不低于0.916, 并指认5号峰为盐酸小檗碱。7个共有峰均与DPPH自由基清除率呈正相关; 1~3、4、6、7号峰与羟自由基清除率呈正相关, 5号峰与羟自由基清除率呈负相关; 5号峰与相对抑菌活性呈正相关。经验证, 黄连花茎样品的DPPH自由基清除率、羟自由基清除率、相对抑菌活性的预测值与测量值的相对误差为0.92%~14.5%。结论: 所建立的谱效关系模型可用于黄连花茎抗氧化、抑菌作用的评价; 1、2、3、4、6、7号峰所代表化学成分是黄连花茎抗氧化作用的物质基础, 盐酸小檗碱是其抑菌作用的物质基础。

**关键词** 黄连花茎; 高效液相色谱; 指纹图谱; 抗氧化作用; 抑菌作用; 物质基础

## Establishment of HPLC Fingerprint of *Coptis chinensis* Inflorescence and Its Spectrum-effect Relationship with Antioxidant and Antibacterial Effects

YANG Hui<sup>1</sup>, ZHANG Jia<sup>1</sup>, LIU Bowen<sup>2</sup>, LIU Qian<sup>2</sup>, LI Songyang<sup>3</sup>, WU Lei<sup>1</sup>, XU Yuling<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>1</sup>(1. School of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2. Sichuan Institute of Antibiotics Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 3. Zhanglan College, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Coptis chinensis* inflorescence, and study its spectrum-effect relationship with antioxidant and antibacterial effects. METHODS: Taking 14 batches of *C. chinensis* inflorescence from different producing areas as the object, HPLC method was adopted. The determination was performed on Supersil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 25 ℃. The detection wavelength was set at 329 nm, and sample size was 10 μL. The fingerprints of 14 batches of *C. chinensis* inflorescence were established by *Similarity Evaluation System of TCM Fingerprint* (2012 A edition), and the similarity evaluation and common peak identification were carried out. Taking DPPH free radical scavenging rate and hydroxyl radical scavenging rate as antioxidant effects index, relative antibacterial activity (*Escherichia coli*) as antibacterial effect index, SPSS 21.0 software was adopted to analyze the Pearson correlation between common peaks of *C. chinensis* inflorescence and above efficacy indexes; their spectrum-effect relationship was established and validated. RESULTS: A total of 7 common peaks were obtained in HPLC fingerprint of *C. chinensis* inflorescence, and the similarity was no less than 0.916. No. 5 peak was identified as berberine hydrochloride. Seven common peaks were positively correlated with DPPH free radical scavenging rate; No. 1-3, 4, 6, 7 peaks were positively correlated with hydroxyl radical scavenging rate, while No. 5 peak was negatively correlated with hydroxyl radical scavenging rate. There was a positive correlation between No. 5 peak and antibacterial activity *in vitro*. After validation, relative error between the predicted values and the measured values of DPPH free radical scavenging rate, hydroxyl radical scavenging rate and relative antibacterial activity was 0.92% - 14.5%. CONCLUSIONS: The established spectrum-effect relationship model can be used to evaluate antioxidant and antibacterial effects of *C. chinensis* inflorescence. The chemical

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (No.2017YFC1701902)

\* 本科生。研究方向: 中成药再评价及中药资源综合利用。电话: 028-64616063。E-mail: 2316359352@qq.com

# 通信作者: 副教授, 硕士生导师。研究方向: 中成药新药及质量再评价。电话: 028-61302236。E-mail: xuyuling@cdu.edu.cn

components represented by No. 1, 2, 3, 4, 6, 7 peaks are the material basis of antioxidant effect of *C. chinensis* inflorescence, and berberine hydrochloride is the material basis of antibacterial effect.

**KEYWORDS** *Coptis chinensis* inflorescence; HPLC; Fingerprint; Antioxidant activity; Antibacterial activity; Material basis

黄连花茎系毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall. 所开的花。经现代药理研究发现,黄连花茎的化学活性物质在体内外具有清热解毒、抗炎、抗病毒、保护胃肠道、抗肿瘤、降血糖、降血脂、降血压等药理作用<sup>[1]</sup>。屠大伟等<sup>[2]</sup>测定黄连花茎的抗氧化能力时发现,黄连花茎水浸出物具有清除羟自由基、超氧自由基和过氧化氢的能力。相关研究显示,黄连花茎中盐酸小檗碱和黄酮类成分含量较高,其中盐酸小檗碱具有明显的抑菌作用<sup>[3-4]</sup>。但黄连花茎具体是哪种成分发挥抗氧化、抑菌作用目前尚不明确,基于此,本课题组采用高效液相色谱法(HPLC)建立黄连花茎的指纹图谱,对其指纹图谱中的共有峰与其抗氧化作用和抑菌作用进行相关性分析,建立谱效关系,以期为其药效物质基础的明确和质量评价提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有: Waters 2695 型 HPLC 仪(美国 Waters 公司)、SQP 型万分之一电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)、PS-40 型超声波清洗器(深圳市深华泰超声洗净设备有限公司)、TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、JJ-CJ-2FD 型洁净工作台(苏州市金净净化设备科技有限公司)、DH3006A 型电热恒温培养箱(西安禾普生物科技有限公司)、XFS-280 型手提式压力蒸汽灭菌器(浙江新丰医疗器械有限公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究所用黄连花茎采自不同的黄连种植基地(样品信息见表 1),经成都大学药学与生物工程学院刘涛教授鉴定为毛茛科植物黄连 *C. chinensis* Franch. 所开的花;其它药品与试剂有:盐酸小檗碱对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 wkq18020208,纯度 $\geq 98\%$ ), DPPH(上海麦克林生化科技有限公司,批号 201424),阿莫西林胶囊(国药集团汕头金石制药有限公司,批号 170616,规格 0.25 g),无水乙醇、水杨酸、七水硫酸亚铁、30%  $H_2O_2$ (成都市科隆化学品有限公司,批号分别为 2018071701、2017021001、2019040201、2019032101),牛肉浸膏(北京双旋微生物培养基制品厂,批号 20160303),蛋白胨、营养肉汤(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号分别为 20181022、20170108),甲醇、乙腈(色谱纯),纯净水。

### 1.3 菌种

本研究所用大肠埃希菌由成都大学附属医院提供。

表 1 黄连花茎样品信息

Tab 1 Information of of *C. chinensis* inflorescence

编号	产地	批号
S1	重庆市石柱县中益乡建峰村莲花组	20180310-1-1
S2	重庆市石柱县中益乡建峰村莲花组	20180310-1-2
S3	重庆市石柱县中益乡建峰村莲花组	20180310-1-3
S4	重庆市石柱县中益乡建峰村莲花组	20180310-1-4
S5	重庆市石柱县黄水镇万胜坝村田湾组	20180310-2-1
S6	重庆市石柱县黄水镇万胜坝村田湾组	20180310-2-2
S7	重庆市石柱县黄水镇万胜坝村田湾组	20180310-3-2
S8	重庆市石柱县黄水镇万胜坝村田湾组	20180310-3-3
S9	重庆市石柱县沙子镇龙源村源河组	20180310-4-1
S10	重庆市石柱县沙子镇龙源村源河组	20180310-4-2
S11	重庆市石柱县冷水乡华龙村双坪组	20180310-4-3
S12	重庆市石柱县冷水乡华龙村双坪组	20180310-5-2
S13	四川省乐山市沙湾区范店乡先锋村	20180310-6-2
S14	四川省乐山市沙湾区范店乡先锋村	20180310-6-3

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Supersil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(每 1 000 mL 中含有 20 μL 三乙胺,B), 梯度洗脱(0~18 min, 18% A→21% A; 18~40 min, 21% A→27% A; 40~58 min, 27% A→60% A; 58~65 min, 60% A→18% A; 65~70 min, 18% A); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 25 ℃; 检测波长为 329 nm; 进样量为 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取黄连花茎粉末(过二号筛,下同)0.2 g 置于锥形瓶内,精密加入甲醇 24.6 mL、盐酸 0.4 mL,摇匀,称定质量,静置 12 h 后,超声(频率 40 kHz,功率 240 W,下同)30 min 后冷却至室温,以甲醇补足减失的质量,过滤,取续滤液适量,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为 1.037 mg/mL 的对照品溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密密度试验 取黄连花茎粉末(编号 S1)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次。以 5 号峰(盐酸小檗碱,因其峰分离度良好、峰面积大且稳定,故以其峰面积为参照)的峰面积和保留时间为参照,记录各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,7 个共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 4.0%,相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%,表明仪器精密密度良好。

2.3.2 重复性试验 取黄连花茎粉末(编号 S1)适量,共

6份,按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。以5号峰的峰面积和保留时间为参照,记录各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,7个共有峰的相对峰面积的RSD均小于5.0%,相对保留时间的RSD均小于2.5%,表明本方法的重复性良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取黄连花萼粉末(编号S1)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、10、24 h后,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。以5号峰的峰面积和保留时间为参照,记录各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,7个共有峰的相对峰面积的RSD均小于7.0%,相对保留时间的RSD均小于2.5%,表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

## 2.4 黄连花萼HPLC指纹图谱的生成、相似度评价和共有峰指认

**2.4.1 HPLC指纹图谱的生成** 取14批黄连花萼粉末适量,分别按“2.2.1”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14批黄连花萼样品的指纹图谱进行分析,得黄连花萼样品HPLC对照指纹图谱(R)和叠加指纹图谱,详见图1、图2。

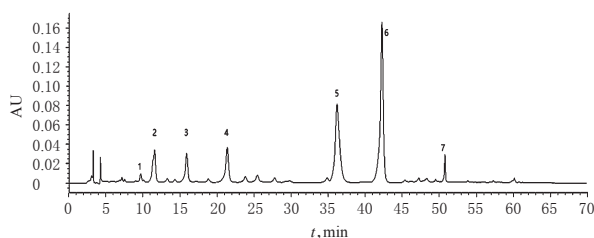


图1 黄连花萼样品的HPLC对照指纹图谱(R)

Fig 1 HPLC control fingerprint (R) of *C. chinensis* inflorescence

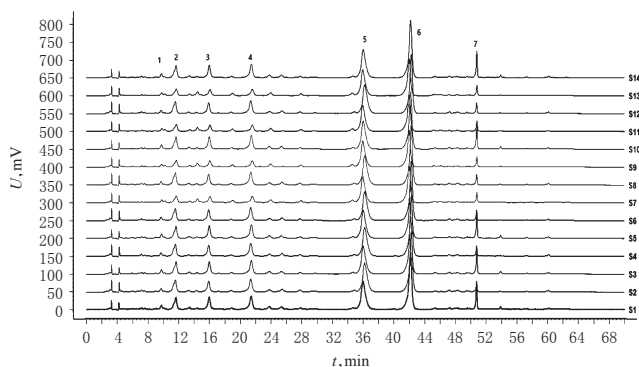


图2 14批黄连花萼样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 2 HPLC superimposed fingerprint of 14 batches of *C. chinensis* inflorescence

**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,14批黄连花萼样品的相似度均不低于0.916,提示不同产地的黄连

花萼样品间的化学成分差异较小,详见表2。

表2 14批黄连花萼样品HPLC指纹图谱相似度评价结果

Tab 2 Evaluation results of the similarity of HPLC fingerprints of 14 batches of *C. chinensis* inflorescence

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
S1	1.000	0.948	0.967	0.938	0.995	0.994	0.969	0.997	0.927	0.958	0.963	0.957	0.920	0.916
S2	0.948	1.000	0.991	0.990	0.962	0.964	0.996	0.968	0.994	0.997	0.996	0.998	0.994	0.992
S3	0.967	0.991	1.000	0.994	0.969	0.969	0.996	0.984	0.986	0.996	0.998	0.996	0.985	0.984
S4	0.938	0.990	0.994	1.000	0.941	0.942	0.989	0.962	0.991	0.991	0.995	0.994	0.995	0.995
S5	0.995	0.962	0.969	0.941	1.000	0.999	0.978	0.994	0.942	0.967	0.969	0.966	0.932	0.928
S6	0.994	0.964	0.969	0.942	0.999	1.000	0.977	0.993	0.941	0.969	0.970	0.966	0.934	0.929
S7	0.969	0.996	0.996	0.989	0.978	0.977	1.000	0.984	0.991	0.997	0.998	0.999	0.986	0.984
S8	0.997	0.968	0.984	0.962	0.994	0.993	0.984	1.000	0.952	0.976	0.981	0.976	0.947	0.944
S9	0.927	0.994	0.986	0.991	0.942	0.941	0.991	0.952	1.000	0.992	0.989	0.995	0.993	0.994
S10	0.958	0.997	0.996	0.991	0.967	0.969	0.997	0.976	0.992	1.000	0.996	0.998	0.990	0.989
S11	0.963	0.996	0.998	0.995	0.969	0.970	0.998	0.981	0.989	0.996	1.000	0.998	0.990	0.989
S12	0.957	0.998	0.996	0.994	0.966	0.966	0.999	0.976	0.995	0.998	0.998	1.000	0.991	0.991
S13	0.920	0.994	0.985	0.995	0.932	0.934	0.986	0.947	0.993	0.990	0.990	0.991	1.000	1.000
S14	0.916	0.992	0.984	0.995	0.928	0.929	0.984	0.944	0.994	0.989	0.989	0.991	1.000	1.000

**2.4.3 共有峰的指认** 以14批黄连花萼的HPLC指纹图谱为研究对象,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)软件,设置时间窗口为0.1 min,选择指纹图谱中峰形较好的色谱峰进行多点校正,采用中位数法生成对照图谱,可知其共有7个共有峰;结合对照品的HPLC图谱,指认出5号峰为盐酸小檗碱,详见图3。以盐酸小檗碱峰面积为参照,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表3、表4。

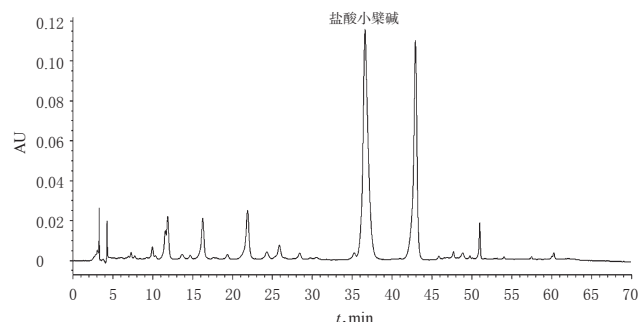


图3 对照品的HPLC图

Fig 3 HPLC chromatogram of substance control

## 2.5 黄连花萼抗氧化作用考察

**2.5.1 DPPH自由基清除率测定** 精密称取黄连花萼粉末0.12 g于锥形瓶内,精密加入水100 mL,超声提取30 min后,冷却至室温,快速滤过;取其续滤液3.3 mL于10 mL量瓶中,加水稀释至刻度,制成质量浓度为0.4 mg/mL的样品溶液。精密移取样品溶液2 mL和DPPH溶液2 mL于25 mL比色管中避光反应20 min后,采用紫外分光光度计于517 nm波长下测定吸光度值 $A_1$ ;另移取样品溶液2 mL和水2 mL于25 mL比色管中避光反应20 min,于相同波长下测定吸光度值 $A_2$ ;另移取DPPH溶液2 mL与水2 mL于25 mL比色管中避光反应20 min,于

表3 14批黄连花萼样品各共有峰的相对保留时间测定结果

Tab 3 Relative retention time of common peaks of 14 batches of *C. chinensis* inflorescence

批号	1峰号	2峰号	3峰号	4峰号	5峰号	6峰号	7峰号
S1	0.248	0.353	0.448	0.623	1.000	1.157	1.409
S2	0.264	0.363	0.463	0.654	1.000	1.152	1.402
S3	0.262	0.361	0.450	0.622	1.000	1.142	1.364
S4	0.260	0.364	0.463	0.633	1.000	1.162	1.398
S5	0.249	0.348	0.478	0.640	1.000	1.167	1.399
S6	0.256	0.340	0.456	0.623	1.000	1.151	1.345
S7	0.274	0.355	0.418	0.614	1.000	1.142	1.377
S8	0.288	0.369	0.466	0.623	1.000	1.153	1.392
S9	0.267	0.378	0.447	0.634	1.000	1.203	1.405
S10	0.262	0.346	0.442	0.606	1.000	1.149	1.372
S11	0.249	0.395	0.446	0.656	1.000	1.181	1.429
S12	0.285	0.396	0.473	0.656	1.000	1.176	1.440
S13	0.268	0.340	0.435	0.621	1.000	1.160	1.368
S14	0.274	0.348	0.455	0.615	1.000	1.157	1.396

表4 14批黄连花萼样品各共有峰相对峰面积测定结果

Tab 4 Relative peak area of common peaks of 14 batches of *C. chinensis* inflorescence

批号	1峰号	2峰号	3峰号	4峰号	5峰号	6峰号	7峰号
S1	0.04	0.22	0.15	0.25	1.00	0.80	0.06
S2	0.08	0.46	0.48	0.42	1.00	2.55	0.13
S3	0.05	0.27	0.24	0.31	1.00	1.14	0.04
S4	0.04	0.25	0.16	0.25	1.00	1.33	0.06
S5	0.07	0.07	0.36	0.42	1.00	2.57	0.15
S6	0.05	0.31	0.27	0.32	1.00	1.51	0.12
S7	0.05	0.27	0.21	0.30	1.00	1.42	0.09
S8	0.06	0.30	0.24	0.32	1.00	1.36	0.12
S9	0.05	0.17	0.15	0.17	1.00	1.10	0.11
S10	0.06	0.27	0.26	0.33	1.00	1.47	0.25
S11	0.11	0.41	0.44	0.41	1.00	2.22	0.35
S12	0.06	0.25	0.21	0.28	1.00	1.42	0.21
S13	0.05	0.18	0.16	0.18	1.00	1.06	0.11
S14	0.06	0.22	0.19	0.26	1.00	1.18	0.23

相同波长下测定吸光度值 $A_c$ 。上述试验平行操作3次,取平均值,并计算DPPH自由基清除率, DPPH清除率 $= [1 - (A_c - A_0) / A_c] \times 100\%$ 。根据文献[5]方法,对DPPH自由基清除率结果进行回归分析,预测半数抑制浓度( $IC_{50}$ ),结果见表5。

2.5.2 羟自由基清除率测定 精密称取黄连花萼粉末0.12 g于锥形瓶内,按“2.5.1”项下“精密量取水100 mL……0.4 mg/mL样品溶液”方法操作,然后移取样品溶液2 mL和6 mmol/L  $FeSO_4$ 溶液2 mL于25 mL比色管中,加入6 mmol/L  $H_2O_2$ 溶液2 mL,摇匀后静置10 min,加入6 mmol/L水杨酸溶液2 mL,摇匀后静置30 min,采用紫外分光光度计于510 nm波长下测定吸光度值 $A_1$ ;另移取6 mmol/L  $FeSO_4$ 溶液2 mL和水2 mL于25 mL比色管中,加入6 mmol/L  $H_2O_2$ 溶液2 mL,摇匀后静置10 min,加入6 mmol/L水杨酸溶液2 mL,摇匀后静置30 min,于上述相同波长下测定吸光度值 $A_0$ ;另移取样品溶液2 mL和6 mmol/L  $FeSO_4$ 溶液2 mL于25 mL比色管中,加入6

mmol/L  $H_2O_2$ 溶液2 mL,摇匀后静置10 min,加入无水乙醇溶液2 mL,摇匀后静置30 min,于上述相同波长下测定吸光度值 $A_1$ 。上述试验平行操作3次,取平均值,并计算羟自由基清除率,羟自由基清除率 $= [1 - (\bar{A}_1 - \bar{A}_0) / \bar{A}_0] \times 100\%$ 。根据文献[5]方法,对黄连花萼羟自由基清除率结果进行回归分析,预测 $IC_{50}$ ,结果见表5。

表5 黄连花萼抗氧化作用测定结果

Tab 5 Antioxidant effect of 14 batches of *C. chinensis* inflorescence

批号	清除率, %		$IC_{50}$ , mg/mL	
	DPPH 自由基	羟自由基	清除DPPH 自由基	清除羟自由基
S1	51	44	0.36	0.39
S2	60	42	0.39	0.38
S3	48	55	0.38	0.40
S4	56	51	0.38	0.40
S5	54	51	0.39	0.38
S6	52	59	0.37	0.40
S7	55	53	0.37	0.39
S8	53	52	0.37	0.39
S9	55	45	0.37	0.37
S10	57	56	0.38	0.37
S11	59	50	0.39	0.40
S12	53	49	0.37	0.37
S13	56	41	0.38	0.38
S14	54	51	0.38	0.37

## 2.6 黄连花萼抑菌作用考察

2.6.1 供试品溶液的制备 精密称定黄连花萼粉末适量于锥形瓶内,加水50 mL,称定质量,超声30 min后冷却至室温,滤过;再加水50 mL于残渣中,超声30 min,过滤;合并2次滤液,冷冻12 h后,进行干燥,即得黄连花萼浸膏。临用时,取浸膏适量置于10 mL量瓶中,以水稀释至刻度,即得供试品溶液。

2.6.2 细菌培养 取大肠埃希菌菌种适量加入无菌水中摇匀,涂布于牛肉膏蛋白胨平板上,于37 °C培养24 h后备用。

2.6.3 抑菌试验 精密称取黄连花萼粉末4.0 g,按“2.6.1”项下方法制备供试品溶液。取“2.6.2”项下大肠埃希菌以水调整成密度为 $1 \times 10^8$ 个/mL的菌悬液,涂布于牛肉膏蛋白胨平板上,采用牛津杯法<sup>[6]</sup>分别将黄连花萼浸膏供试品溶液、0.90 mg/mL阿莫西林溶液(阳性对照)、水(空白对照)各80  $\mu$ L点样于同一平板,于37 °C培养24 h后,测定抑菌圈横竖直径,计算抑菌圈面积大小及相对抑菌活性(相对抑菌活性 $=$ 黄连花萼样品抑菌圈面积 $\times 0.9$ /阿莫西林抑菌圈面积 $\times 100\%$ ),结果见表6。

## 2.7 黄连花萼谱效关系分析

以14批黄连花萼药材样品的抗氧化活性指标(DPPH自由基清除率和羟自由基清除率,见表5)和相对抑菌活性(见表6)为因变量,HPLC指纹图谱共有峰面积为自变量,采用SPSS 21.0软件进行Pearson相关性分析。结果表明,黄连花萼样品HPLC指纹图谱中的7个共有峰与DPPH自由基清除率呈正相关;1、2、3、4、6、7

表6 14批黄连花萼抗菌作用测定结果

Tab 6 Antibacterial effect of 14 batches of *C. chinensis* inflorescence

批号	黄连花萼样品抑菌圈面积,mm <sup>2</sup>	阿莫西林抑菌圈面积,mm <sup>2</sup>	相对抑菌活性,%
S1	212.1	557.5	35
S2	153.6	488.6	28
S3	177.1	450.2	35
S4	131.5	345.8	34
S5	113.7	414.9	25
S6	116.8	332.4	31
S7	137.9	454.0	28
S8	120.8	374.6	29
S9	120.5	482.0	23
S10	146.1	551.6	24
S11	106.9	496.7	20
S12	145.8	571.8	23
S13	164.4	575.0	26
S14	150.2	450.2	35

号峰与羟自由基清除率呈正相关,5号峰与羟自由基清除率呈负相关;5号峰与相对抑菌活性呈正相关。这提示1、2、3、4、6、7号峰对应的化学成分是黄连花萼清除DPPH和羟自由基的主要物质基础,5号峰对应的盐酸小檗碱是黄连花萼抗菌作用的主要物质基础,详见表7、表8。

表7 黄连花萼共有峰与抗氧化作用指标的相关性分析结果

Tab 7 Correlation analysis result of common peak with antioxidant effect index of *C. chinensis* inflorescence

峰号	相关系数	
	DPPH自由基清除率	羟自由基清除率
1	0.325	0.003
2	0.721	0.115
3	0.451	0.376
4	0.569	0.124
5	0.177	-0.278
6	0.330	0.466
7	0.008	0.281

表8 黄连花萼共有峰与相对抑菌活性的相关性分析结果

Tab 8 Correlation analysis result between common peak with antioxidant effect index of *C. chinensis* inflorescence

峰号	相关系数	峰号	相关系数
1	-0.492	5	0.803
2	0.391	6	0.031
3	-0.241	7	-0.729
4	0.378		

### 2.8 谱效关系模型的构建

参考文献[7]进行模型构建,采用SPSS 21.0软件中“Regression”下的“Linear”选项,以黄连花萼共有峰峰面积为 $X$ ,分别以DPPH清除率、羟自由基清除率、相对抑菌

活性为 $Y$ ,采用多重线性回归建立谱效关系模型。结果,回归方程分别为 $Y_{DPPH\text{自由基清除率}} = -(6.568 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}1} + (1.660 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}2} - (8.565 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}3} + (3.838 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}4} - (1.780 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}5} + (4.959 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}6} + (2.211 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}7} + 0.989$ ;  $Y_{\text{羟自由基清除率}} = -(5.781 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}1} - (5.246 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}2} + (8.075 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}3} - (2.474 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}4} + (1.454 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}5} - (2.443 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}6} - (7.071 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}7} - 0.025$ ;  $Y_{\text{相对抑菌活性}} = (4.820 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}1} + (3.184 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}2} - (6.107 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}3} + (5.287 \times 2.72 - 7)X_{\text{峰}4} - (9.272 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}5} - (1.751 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}6} - (5.162 \times 2.72 - 8)X_{\text{峰}7} + 0.523$ 。

### 2.9 黄连花萼谱效关系模型的验证

另取7批黄连花萼粉末(编号S1、S3、S4、S5、S9、S11、S14),分别测定各批次样品的共有峰峰面积、DPPH清除率、羟自由基清除率、相对抑菌活性后,将这7批样品的共有峰峰面积代入“2.8”项下回归方程中,即得 $Y$ 的预测值,并将其与测量值进行比较。结果,黄连花萼样品DPPH自由基清除率、羟自由基清除率、相对抑菌活性的预测值与测量值的相对误差为0.92%~14.5%,表明所建立的谱效关系模型可用于黄连花萼抗氧化作用、抗菌作用的预测与评价,详见表9。

表9 黄连花萼谱效关系验证结果

Tab 9 Spectral-effect correlation validation result of *C. chinensis* inflorescence

批号	DPPH自由基清除率,%			羟自由基清除率,%			相对抑菌活性,%		
	测量值	预测值	相对误差	测量值	预测值	相对误差	测量值	预测值	相对误差
S1	54	51	2.85	46	44	2.22	30	35	7.69
S3	52	48	4.00	50	55	4.76	28	35	11.11
S4	50	56	5.66	49	51	2.00	38	34	5.56
S5	57	54	2.70	50	51	0.99	30	25	9.09
S9	53	55	1.85	53	55	1.85	29	23	11.54
S11	63	59	3.28	55	59	3.50	25	20	11.11
S14	55	54	0.92	50	54	3.84	26	35	14.75

### 3 讨论

目前,中药质量控制方法多以化学成分的定性和定量分析为主,包括HPLC指纹图谱在内的多种分析方法已被广泛地应用于中药整体质量控制中,其中指纹图谱包括相似度、相对保留时间和相对峰面积以及共有峰和非共有峰的数量等,但是这些指标仅能间接地控制药材的质量,不能明确控制其与临床药效的相关性<sup>[8]</sup>。

本研究以不同产地的黄连花萼作为研究对象,采用HPLC法建立指纹图谱,并以抗氧化作用(DPPH自由基清除率和羟自由基清除率)及抑菌作用作为药效指标,将黄连花萼样品的指纹图谱数据和药效指标数据进行谱效关系分析。结果,共确定7个共有峰,并指认5号峰为盐酸小檗碱;经相关性分析后,发现1、2、3、4、6、7号峰与抗氧化活性具有相关性,盐酸小檗碱与抑菌活性具有

# 茯苓水提物 UPLC 指纹图谱的建立及其镇静催眠作用的谱效关系研究<sup>△</sup>

王天合<sup>1\*</sup>, 李慧君<sup>1</sup>, 张丹丹<sup>1</sup>, 罗心遥<sup>1</sup>, 夏和元<sup>1</sup>, 韩思婕<sup>1</sup>, 潘翔<sup>1</sup>, 万明<sup>2</sup>, 叶晓川<sup>1#</sup>(1.湖北中医药大学药学院中药资源与中药化学省级重点实验室, 武汉 430065; 2.湖北省中医药研究院/湖北省中医院药事部, 武汉 430061)

中图分类号 R284.1; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)05-0564-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.05.10

**摘要** 目的:建立茯苓水提物的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并考察其与镇静催眠作用的谱效关系。方法:将10批不同产地茯苓经水提后得水提物。采用UPLC法测定该水提物,色谱柱为Waters HSS-C<sub>18</sub>,流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈-甲醇(梯度洗脱),流速为0.4~0.2 mL/min,检测波长为210、242 nm,柱温为40 ℃,进样量为2 μL。采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)建立10批茯苓水提物的指纹图谱并进行共有峰指认。以小鼠的入睡率、入睡潜伏期和睡眠持续时间为单一药效指标,考察戊巴比妥钠协同作用下10批不同产地茯苓水提物的镇静催眠作用;将单一药效指标和总药效(由单一指标经层次分析法计算而得)进行数据转化后,采用灰色关联度分析法分析茯苓水提物指纹图谱中各共有峰与单一药效及总药效的关联度。结果:10批茯苓水提物共有24个共有峰,指认出11个成分,分别为16-羟基松苓新酸(6号峰)、16α-hydroxytrametendic acid(7号峰)、茯苓酸B(9号峰)、去氢土莫酸(10号峰)、茯苓酸A(12号峰)、猪苓酸C(15号峰)、3-O-乙酰基-16α-羟基松苓新酸(17号峰)、去氢茯苓酸(20号峰)、茯苓酸(21号峰)、松苓新酸(22号峰)、脱氢齿孔酸(24号峰)。经灰色关联度分析发现,24个峰与睡眠持续时间的关联度均大于0.6(0.611 5~0.811 8),与入睡潜伏期的关联度除14、24、2号峰外,其余均大于0.6(0.605 9~0.790 4);与入睡率的关联度除23、19、17、5号峰外,其余均大于0.6(0.606 4~0.721 6);与总药效的关联度除2、5、19号峰外,其余均大于0.6(0.619 0~0.781 2);与总药效关联度排名前10位的色谱峰分别为15号峰(猪苓酸C)、16号峰、8号峰、11号峰、12号峰(茯苓酸A)、1号峰、7号峰(16α-hydroxytrametendic acid)、3号峰、9号峰(茯苓酸B)、20号峰(去氢茯苓酸)。结论:本研究建立了茯苓水提物的UPLC指纹图谱,指认了11个共有峰成分;猪苓酸C等10种成分与镇静催眠总药效关联较大,初步揭示了茯苓镇静催眠作用的药效物质基础。  
**关键词** 茯苓;超高效液相色谱;指纹图谱;镇静;催眠;谱效关系;灰色关联度分析;小鼠

相关性,且与文献报道一致<sup>[3]</sup>。经验证后发现,预测值和实测值的相对误差未超过15%,表明本研究建立的谱-效关系模型可较好地预测和评价黄连花萼的抗氧化、抑菌作用。

综上所述,本研究建立的谱-效相关性模型可用于预测和评价黄连花萼的抗氧化、抑菌作用,1、2、3、4、6、7号峰所代表化学成分是黄连花萼抗氧化作用的物质基础,盐酸小檗碱是其抑菌作用的物质基础。

## 参考文献

- [1] 魏华波,董洋,谭兵,等.黄连花萼化学成分和药理作用的研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(27):5342-5344.
- [2] 屠大伟,张保顺,李学刚.黄连花茶加工工艺及其抗氧化作用研究[J].食品工业科技,2007(5):165-167.

<sup>△</sup> 基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2017YFC1703004);湖北省科技计划项目(No.2019ACA121)

\* 硕士研究生。研究方向:中药新制剂、新剂型。E-mail:1417926751@qq.com

# 通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药及其制剂的物质基础。E-mail:yxxcc1965@163.com

- [3] 尹良军,周振旗,绍元,等.盐酸小檗碱、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、黄芩苷及绿原酸对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J].医学综述,2016,22(24):4969-4972.
- [4] 伍利华,杨慧,等.反相高效液相色谱法及紫外-可见分光光度法测定黄连花萼的含量[J].时珍国医国药,2019,30(6):1330-1332.
- [5] 李琛,张婷,罗安伟,等.8种猕猴桃抗氧化活性评价及基于HPLC与FT-IR指纹分析的品种区分[J].现代食品科技,2016,32(6):288-297.
- [6] 李海华,郭蔚冰,陈志强,等.45味中药对多重耐药大肠杆菌的抑菌效果[J].中国现代中药,2019,21(6):791-796.
- [7] 李鹏,李祥,陈建伟,等.桃红四物汤干预痛经模型小鼠有效部位的谱效关系研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):144-149.
- [8] 伍利华,张佳,邓燕君,等.基于酶活性的丹参茎叶活血活性谱-效模型[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):133-138.

(收稿日期:2020-09-15 修回日期:2021-01-16)

(编辑:唐晓莲)