

# 不同产地广防风 HPLC 指纹图谱及抗氧化降血糖谱效关系研究

翟明<sup>1,2</sup>, 吴欢<sup>1</sup>, 庄远杯<sup>1,2</sup>, 林大都<sup>1,2</sup>, 张声源<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>嘉应学院 广东省山区特色农业资源保护与精准利用重点实验室, 梅州 514015; <sup>2</sup>嘉应学院医学院 客家药用生物资源研究所, 梅州 514031

**摘要:** 建立广防风药材的 HPLC 指纹图谱并探究其与降血糖、抗氧化活性的谱效关系, 为广防风的质量评价提供依据。采用 HPLC 法建立 10 批广防风特征指纹图谱, 《中药指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》进行相似度评价, 与对照品比对进行共有峰指认, SPSS 25.0 进行聚类分析和主成分分析。以 DPPH 法、ABTS 法评价抗氧化活性, pNPG 法评价降血糖活性, 运用灰色关联分析、双变量相关分析进行谱效关系研究。建立了 10 批广防风药材的 HPLC 指纹图谱, 相似度为 0.767~1.000, 标定 21 个共有峰, 指认了 6 个成分, 10 批广防风 6 个成分含量差异显著, 10 批广防风聚为 3 类, 主成分分析得到 6 个主要因子。10 批广防风均具有体外抗氧化和降血糖活性。灰色关联度显示 21 个共有峰与清除 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基和抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性关联度均大于 0.731。双变量相关性分析显示峰 3、峰 17 与 DPPH 自由基清除活性呈显著正相关, 峰 1、峰 4 与 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力呈显著正相关, 峰 1、峰 4、峰 11 (毛蕊花糖苷) 与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性呈显著正相关。该方法能有效分析不同产地广防风药材的质量, 为广防风抗氧化和降血糖药效物质基础筛选和质量评价提供依据。

**关键词:** 广防风; HPLC; 抗氧化; 降血糖; 谱效关系

中图分类号: R282.5 文献标志码: A

## Establishment of HPLC fingerprint of *Epimeredi Indicae* Herba and its spectrum-effect relationship of antioxidant and hypoglycemic activity

ZHAI Ming<sup>1,2</sup>, WU Huan<sup>1</sup>,

ZHUANG Yuan-bei<sup>1,2</sup>, LIN Da-du<sup>1,2</sup>, ZHANG Sheng-yuan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Conservation and Precision Utilization of Characteristic Agricultural Resources in Mountainous Areas, Jiaying University, Meizhou 514015, China; <sup>2</sup>Institute of Hakka Medicinal Bio-resources, Medical College, Jiaying University, Meizhou 514031, China

**Abstract:** The HPLC fingerprint of *Epimeredi Indicae* Herba was established to study its spectrum-effect relationship with antioxidant and hypoglycemic activities, so as to provide a basis for the quality evaluation of

Epimeredi Indicae Herba. The fingerprints of ten batches of Epimeredi Indicae Herba were established by HPLC. The similarity evaluation system of traditional Chinese medicine fingerprint (2012 edition) was used to evaluate the similarity evaluation. The common peaks were identified by comparison with the reference substance. SPSS 25.0 software was used for cluster analysis and principal component analysis. The antioxidant activity was evaluated by DPPH method and ABTS method, and the hypoglycemic activity was evaluated by pNPG method. Grey correlation analysis and bivariate correlation analysis were used to study the spectrum-effect relationship. The HPLC fingerprints of ten batches of samples were established, and the similarity was 0.767-1.000. Twenty-one common peaks were identified, and six components were identified. The contents of six components in ten batches of samples were significantly different. Ten batches of samples were clustered into three categories, and six main factors were obtained by principal component analysis. Ten batches of Epimeredi Indicae Herba had antioxidant and hypoglycemic activities in vitro. The grey correlation degree showed that the correlation degree of twenty-one common peaks with scavenging DPPH, ABTS<sup>+</sup> free radicals and inhibiting  $\alpha$ -Glucosidase activity was greater than 0.731. Bivariate correlation analysis showed that peak 3 and peak 17 were significantly positively correlated with DPPH free radical scavenging activity, peak 1 and peak 4 were significantly positively correlated with ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging activity, peak 1, peak 4 and peak 11 (verbascoside) were significantly positively correlated with  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity. This method can effectively analyze the quality of Epimeredi Indicae Herba from different producing areas, and provide a basis for the screening of antioxidation and hypoglycemic effective material basis and quality control of Epimeredi Indicae Herba.

**Keywords:** Epimeredi Indicae Herba; High-performance liquid chromatography; oxidation resistance; Hypoglycemic; spectrum-effect relationship

广防风 *Epimeredi indica* (Linn.) Kuntze.为唇形科广防风属草本植物，主要分布在广东、广西、云南、贵州等地，生于林缘、路旁等荒地。广防风始载于清代何克谏的《生草药性备要》，以全草入药。曰：“味苦、臭，性温。止痛，祛风湿，壮筋骨，去毒疮”。为民间常用草药，内服用于治疗胃痛、胃肠炎、感冒发热、风湿关节痛等；外用于神经性皮炎、皮肤湿疹、痈疮肿毒、虫蛇咬伤等<sup>[1]</sup>。

目前对广防风的研究较少，主要集中于生药学鉴别、化学成分及药理作用研究。Liu 等<sup>[2]</sup>、Xue 等<sup>[3]</sup>对广防风基原与鉴别进行了研究；Huang 等<sup>[4]</sup>采用叶绿体基因 *psbA-trnH* 间隔区序列探讨了广藿香及广防风的分子鉴定。广防风属植物含有挥发油、脂肪酸、酚酸类、鞣质、生物碱、黄酮、二萜、三萜以及黄酮苷、苯乙醇苷类等成分<sup>[5-7]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup>在广防风地上部分的化学成分研究中分离得到乌苏酸和迷迭香酸具有较强抗炎活性，为广防风的主要抗炎成分。

Wang 等<sup>[9]</sup>、Wang 等<sup>[10]</sup>等通过柱色谱从广防风水提取物中分离得到 3 个苯乙醇苷类化合物，其中一个新化合物命名为广防风苷 A，并且采用 HPLC 测定单味广防风颗粒中广防风苷 A 的含量。Zhang 等<sup>[11]</sup>建立了广防风药材中木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、异毛蕊花糖苷和毛蕊花糖苷的含量测定方法。

广防风广泛用于治疗风湿感冒、急性肠炎等，市场上以广防风为主药的中成药有广防风颗粒、广防风胶囊、贯防感冒片等。广防风对多种疾病均有作用，在广东各地均有分布且容易采收，目前，广防风未被收入《中华人民共和国药典》，广东省地方标准对收载的标准也仅限于常规检查<sup>[12]</sup>。国内外还未见不同产地广防风 HPLC 指纹图谱及其谱效关系的相关研究。因此，本研究拟建立广防风的 HPLC 指纹图谱，指认共有峰并测定含量，探究共有峰与体外抗氧化、降血糖活性的谱效关系，筛选广防风的抗氧化、降血糖活性成分群，为广防风质量评价体系及为其开发利用提供参考依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BT125D 型电子分析天平（德国赛多利斯有限公司）；Alliance 2695 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；UV-1800 型紫外可见分光光度计（日本岛津公司）；MING-CHE 24UV 型超纯水机（法国 Merck Millipore 公司）；JP-100S 型超声波清洗器（深圳市洁盟清洗设备有限公司）。

### 1.2 材料

对照品香草酸（批号：121-34-6）、阿魏酸（批号：1135-24-6）、异毛蕊花糖苷（批号：61303-13-7）、毛蕊花糖苷（批号：61276-17-3）、迷迭香酸（批号：20283-92-5）和广防风苷 A（批号：111949-201301）对照品（中国标准物质网，含量 $\geq 98\%$ ）；甲醇（色谱纯，上海麦克林生化科技有限公司）；乙腈（色谱纯，赛默飞世尔科技公司）； $\alpha$ -葡萄糖苷酶（批号：088820，纯度 $\geq 10$  U/mg）、2,2-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐（批号：STBB0829V，纯度 $\geq 98\%$ ）、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（批号：STBB0829V，纯度 $\geq 98\%$ ，美国 Sigma 公司）；对-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷（批号：K04F8B28175，上海源叶科技有限公司，纯度 $\geq 99\%$ ）。

10 批广防风样品中野生自采品 6 批，商品药材 4 批（S4、S6、S7、S9），经嘉应学院医学院张声源副教授鉴定为唇形科广防风属植物广防风 *Epimeredi indica* (Linn.) Kuntze. 的全草，样品信息见表 1。在 50 °C 烘干，留样保存于嘉应学院医学院种质资源室（编号：2020101~2020110）。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	收集地点	收集时间	编号	收集地点	收集时间
No.	Collect location	Collect time	No.	Collect location	Collect time
S1	广东省梅州市梅江区黄塘村	2020.11.06	S6	广东省吴川市黄坡镇	2020.08.10
S2	广东省兴宁市坭陂镇王村村	2021.09.15	S7	广东省惠州市博罗县龙溪镇	2020.07.04
S3	广东省兴宁市大坪镇坪联村	2020.08.05	S8	广东省兴宁市叶塘镇苏京村	2020.07.26
S4	广东省河源市龙川县黎咀镇	2020.08.14	S9	广西壮族自治区钦州市钦北区平吉镇	2020.11.25
S5	广东省梅州市梅县区阴那山	2020.11.07	S10	广东省梅州市大埔县帽山	2020.09.12

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

#### 2.1.1 供试品溶液制备

精密称定广防风样品（过二号筛）粉末约 3.0 g，置具塞锥形瓶，加甲醇 40 mL，超声（40 °C，220 W，60 kHz）提取 30 min，冷却，抽滤得滤液。滤渣加 40 mL 甲醇，重复超声提取一次，合并两次滤液，水浴浓缩至无醇，甲醇溶解定容至 10 mL 容量瓶，摇匀，0.45 μL 微孔滤膜过滤，即得。

#### 2.1.2 对照品溶液制备

称定香草酸 0.97 mg、阿魏酸 1.04 mg、毛蕊花糖苷 1.24 mg、异毛蕊花糖苷 1.13 mg、迷迭香酸 1.01 mg、广防风苷 A 0.93 mg，分别置于 25 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，配制成香草酸、阿魏酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、迷迭香酸和广防风苷 A 对照品溶液，质量浓度分别为 0.038 8、0.041 6、0.049 6、0.045 2、0.040 4、0.037 2 mg/mL。分别吸取香草酸 0.4 mL、阿魏酸 1.0 mL、毛蕊花糖苷 3.0 mL、异毛蕊花糖苷 2.0 mL、迷迭香酸 0.5 mL、广防风苷 A 1.0 mL 置 10 mL 容量瓶，加甲醇定容配制成混合对照品溶液。

### 2.2 指纹图谱的建立

#### 2.2.1 色谱条件

采用 Platisil ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，流动相为 0.05% 磷酸盐缓冲液 (A)，乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~5 min, 10% B→13% B; 5~15 min, 13% B→16% B; 15~25 min, 16% B; 25~30 min, 16% B→17% B; 30~40 min, 17% B; 40~50 min, 17% B→20% B; 50~60

min, 20% B; 60~75 min, 20% B→25% B; 75~90 min, 25% B→30% B; 90~105 min, 30% B→10% B; 105~110 min, 10% B), 流速为 0.55 mL/min 流速, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL, 检测波长为 254 nm。

### 2.2.2 方法学考察

取供试品溶液 (S9), 按“2.2.1”项色谱条件, 连续 5 次进样, 以毛蕊花糖苷 (11 号峰) 为参照峰, 计算得各色谱峰的相对峰面积的 RSD 在 0.05%~1.18%之间, 表明仪器精密度良好。取同一产地 (S9) 药材 5 份, 每份精密称取 3.0 g, 按“2.1.1”项方法制得供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件检测, 以毛蕊花糖苷 (11 号峰) 为参照峰, 计算得各色谱峰的相对峰面积的 RSD 在 0.12%~2.2%之间, 表明重复性良好。取供试品溶液 (S9), 分别在 0、3、6、9、12 h 按“2.2.1”项色谱条件检测, 以毛蕊花糖苷 (11 号峰) 为参照峰, 计算得各色谱峰的相对峰面积的 RSD 在 0.011%~0.72%之间, 表明供试品溶液在室温放置 12 h 内稳定性良好。称取已知含量的供试品 (S9) 药材粉末 3.0 g, 按照 1:1 分别加入对照品适量, 加甲醇 40 mL, 超声 (40 °C, 220 W, 60 kHz) 提取 30 min, 冷却, 抽滤得滤液。滤渣加 40 mL 甲醇, 重复超声提取一次, 合并两次滤液, 水浴浓缩至无醇, 甲醇溶解定容至 10 mL 容量瓶, 摇匀, 0.45 μL 微孔滤膜过滤, 按“2.2.1”项色谱条件检测, 得香草酸、阿魏酸、异毛蕊花糖苷、迷迭香酸、广防风苷 A 的平均回收率分别为 99.28%、92.30%、99.74%、98.52%和 97.33%, RSD 均小于 3.0%。

### 2.2.3 指纹图谱的建立及相似度评价

按“2.1.1”项方法制备 10 批广防风供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件检测, 记录色谱图, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012)”软件。以 S3 样品为参照图谱, 经多点校正和自动匹配生成叠加图谱 (见图 1) 和对照指纹图谱 (见图 2), 标定 21 个共有峰。与对照品比对指认 6 号为香草酸, 10 号为阿魏酸, 11 号为毛蕊花糖苷, 13 号为异毛蕊花糖苷, 18 号为迷迭香酸, 21 号为广防风苷 A (见图 3)。10 批广防风样品的相似度范围为 0.767~1.000 (见图 4), 表明各产地的广防风样品指纹图谱相对稳定。

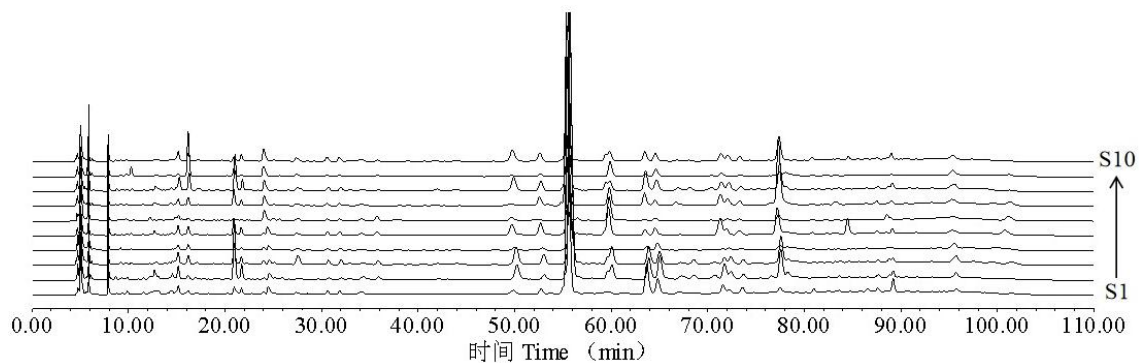


图 1 10 批广防风全草 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of ten batches of Epimeredi Indicae Herba

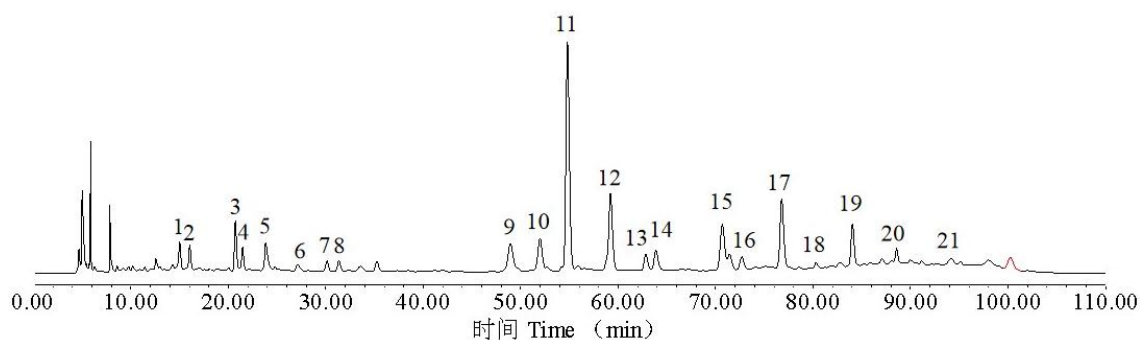


图 2 广防风全草 HPLC 对照图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of Epimeredi Indicae Herba

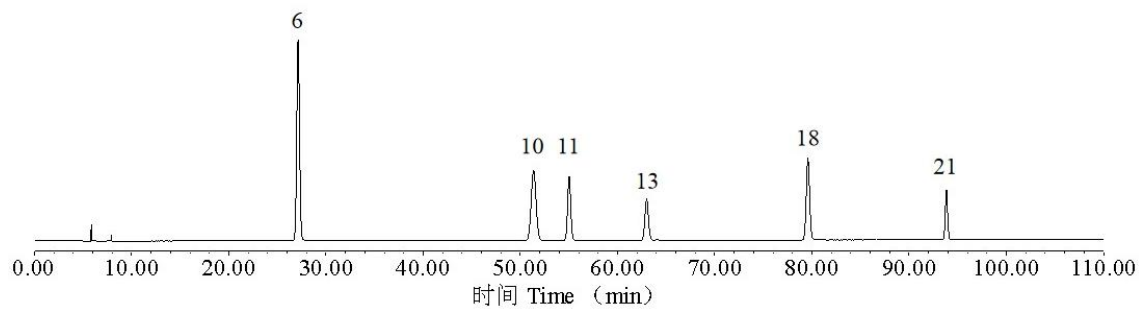


图 3 混合对照品 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed reference substance

注：6.香草酸；10.阿魏酸；11.毛蕊花糖苷；13.异毛蕊花糖苷；18.迷迭香酸；21.广防风苷 A.

Note: 6.Vanillic acid;10Ferulic acid;11.Verbascoiside; 13.Isoacteoside; 18. Rosmarinic acid; 21.Epimeredinoside A.

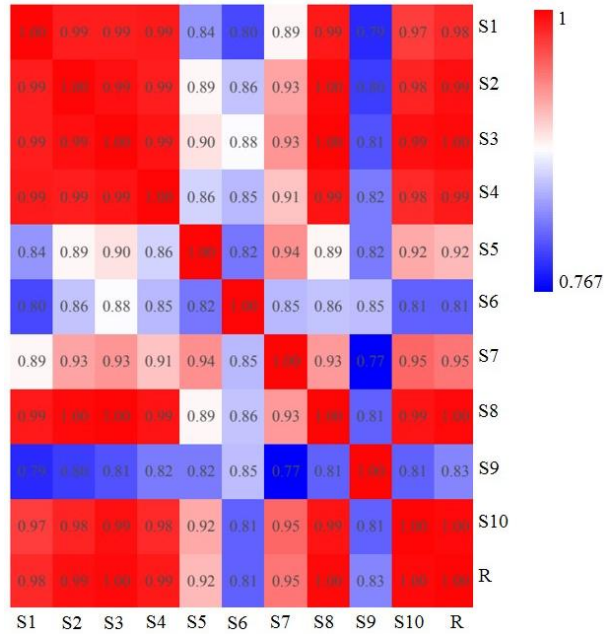


图 4 10 批广防风全草 HPLC 指纹图谱相似度

Fig. 4 HPLC chromatograms similarity of ten batches of Epimeredi Indicae Herba

### 2.3 化学模式识别

#### 2.3.1 聚类分析

采用 SPSS 25.0 以组内连接和平方欧式距离法对 10 批不同产地广防风的指纹图谱中 21 个共有峰的峰面积进行系统聚类分析，结果如图 5 所示。当类间距为 5 时，10 批不同产地的广防风药材可分为 3 类。S1~S3、S8 号样品聚为一类，S7 和 S10 号样品聚为一类，S4~S5、S9 号样品聚为一类。

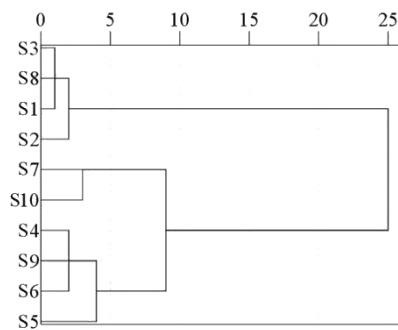


图 5 10 批广防风全草聚类分析图

Fig. 5 Cluster analysis diagram of ten batches of Epimeredi Indicae Herba

#### 2.3.2 主成分分析

在聚类分析的基础上，将量化后的数据导入 SPSS 25.0 软件，进行主成分分析。主成分的特征值、方差贡献率和累计方差贡献率见表 2。以特征值>1.0 为提取标准得到 6 个主成分，累计方差贡献率为 92.377%，代表了广防风指纹图谱的绝大部分信息，可作为广防风药材质

量评价指标。

主成分因子载荷矩阵见表 3，以荷载值的绝对值>0.5 计，第一主成分 ( $X1$ ) 代表 1、6~10 号色谱峰，第二主成分 ( $X2$ ) 代表 3、4、11、13~16 号色谱峰，第三主成分 ( $X3$ ) 代表 13、16、18、20 号色谱峰，第四主成分 ( $X4$ ) 代表 10、12、15、19、21 号色谱峰，第五主成分 ( $X5$ ) 代表 17 号色谱峰，第六主成分 ( $X6$ ) 代表 2、4、5 号色谱峰，可将其作为广防风药材的质量控制指标性成分。

以  $X1$ 、 $X2$ 、 $X3$ 、 $X4$ 、 $X5$ 、 $X6$  作为 10 个广防风样品成分所表达的信息，建立起品质评价模型，计算其  $X_{\text{综合得分}}=(36.605X1+18.068X2+14.410X3+12.023X4+6.308X5+4.963X6)/75.358$ ，得分越高，质量越好。结果显示见表 4，主成分综合得分依次排序为  $S5>S10>S8>S1>S3>S7>S2>S9>S6>S4$ 。

表 2 主成分特征值及其方差

Table 2 Principal component eigenvalues and their variances

成分 Component	初始特征值 Initial eigenvalue		
	总计 Total	方差百分比 Variance percentage (%)	累积百分比 Cumulative percentage (%)
$X1$	7.687	36.605	36.605
$X2$	3.794	18.068	54.673
$X3$	3.026	14.410	69.083
$X4$	2.525	12.023	81.106
$X5$	1.325	6.308	87.414
$X6$	1.042	4.963	92.377

表 3 主成分载荷矩阵

Table 3 Load matrix table of principal components

峰号 Peak No.	$X1$	$X2$	$X3$	$X4$	$X5$	$X6$
1	0.850	0.332	-0.025	0.072	0.228	0.127
2	-0.053	-0.135	-0.070	-0.057	-0.208	0.807
3	-0.118	0.823	-0.276	0.185	0.147	-0.270
4	0.453	0.509	-0.052	-0.098	0.268	0.509
5	-0.333	-0.329	0.489	0.101	0.314	0.517



6	0.896	-0.122	-0.129	-0.195	-0.039	-0.111
7	0.887	0.025	0.412	0.137	0.096	-0.045
8	0.874	0.035	0.433	0.182	0.046	-0.063
9	0.805	0.479	-0.076	0.224	0.034	-0.030
10	0.678	0.100	0.207	0.510	0.445	0.061
11	0.383	0.801	0.300	-0.286	0.182	-0.053
12	0.119	-0.055	-0.418	0.705	0.291	-0.028
13	0.214	0.705	0.559	-0.311	0.149	-0.027
14	0.091	0.959	0.122	-0.152	-0.115	-0.004
15	0.071	0.596	0.179	0.641	0.436	-0.012
16	0.380	0.553	0.588	0.211	0.374	-0.088
17	0.194	0.136	-0.064	0.121	0.921	-0.139
18	0.028	0.070	0.975	0.065	-0.099	-0.048
19	0.146	0.037	0.187	0.941	-0.048	-0.017
20	0.207	0.076	0.957	-0.075	0.007	0.024
21	0.007	0.435	0.068	-0.846	-0.025	0.072

表 4 主成分得分及综合得分排名

Table 4 The principal component scores and comprehensive score ranking

编号 No.	$X1$	$X2$	$X3$	$X4$	$X5$	$X6$	X 综合得分	排序 Sorting
							X comprehensive score	
S1	0.531	-1.630	1.674	1.051	-0.678	0.242	0.256	4
S2	0.491	-0.867	-2.094	1.242	-0.266	0.484	-0.132	7
S3	1.165	0.098	-0.496	-1.795	-0.992	-0.145	0.094	5
S4	-1.100	-0.412	-0.268	-0.758	-1.093	-0.042	-0.734	10
S5	0.543	2.162	0.114	1.022	-0.328	0.985	0.819	1
S6	-1.556	0.330	-0.046	-0.210	-0.490	-0.394	-0.641	9
S7	-0.044	0.310	-0.188	0.737	0.796	-2.446	0.033	6
S8	0.954	-0.418	-0.039	-0.923	1.901	0.321	0.317	3
S9	-1.438	-0.148	0.154	-0.151	1.291	1.195	-0.442	8

## 2.4 多指标含量测定

### 2.4.1 线性关系考察

按“2.1.2”项方法制备对照品溶液，按“2.2.1”项色谱条件检测得 6 个已知成分的色谱峰面积。以峰面积为纵坐标（ $Y$ ），质量浓度为横坐标（ $X$ ）绘制对照品曲线，拟合得线性回归方程和  $R^2$  值，见表 5，相关系数均在 0.999 以上，表明 6 个成分在配置质量浓度范围内线性关系良好。

表 5 6 个成分线性回归方程

Table 5 Linear relationship of six various constituents

成分 Component	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range( $\mu\text{g/mL}$ )
香草酸 Vanillic acid	$Y = 922\ 219 X - 40\ 954$	0.999 3	0.194~1.164
阿魏酸 Ferulic acid	$Y = 112\ 665 X - 15\ 944$	0.999 6	0.208~1.248
毛蕊花糖苷 Verbascoside	$Y = 65\ 409 X - 5\ 999$	0.999 6	0.248~1.488
异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	$Y = 41\ 795 X - 8\ 530$	0.999 6	0.226~1.356
迷迭香酸 Rosmarinic acid	$Y = 91\ 595 X - 51\ 888$	0.999 1	0.202~1.212
广防风苷 A Epimeredinoside A	$Y = 37\ 466 X - 359$	0.999 5	0.186~1.186

### 2.4.2 含量测定结果

含量测定结果见表 6，广防风药材中 6 个成分含量由高到低依次为毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广防风苷 A、阿魏酸、香草酸、迷迭香酸。含量范围，香草酸的为 0.014 7~0.071 9 mg/g，阿魏酸的为 0.023 4~0.148 2 mg/g，毛蕊花糖苷的为 0.284 0~7.839 5 mg/g，异毛蕊花糖苷的为 0.038 3~1.126 8 mg/g，迷迭香酸的为 0.009 0~0.057 6 mg/g，广防风苷 A 的为 0.012 9~0.321 1 mg/g。

表 6 样品含量测定结果

Table 6 Sample content determination results (n=3)

样品 Sample	含量 Content (mg/g)					
	香草酸 Vanillic acid	阿魏酸 Ferulic acid	毛蕊花糖苷 Verbascoside	异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	迷迭香酸 Rosmarinic acid	广防风苷 A Epimeredinoside A

S1	0.014 7	0.074 3	6.803 8	1.126 8	0.057 6	0.308 0
S2	0.016 4	0.067 0	7.839 5	0.807 8	0.014 7	0.266 9
S3	0.071 9	0.148 2	6.107 2	0.606 2	0.016 8	0.291 5
S4	0.020 6	0.038 0	1.905 7	0.127 5	0.012 5	0.230 8
S5	0.019 3	0.191 1	2.005 2	0.188 7	0.024 0	0.158 7
S6	0.018 7	0.023 4	0.284 0	0.038 3	0.009 0	0.129 5
S7	0.019 5	0.116 2	3.746 6	0.445 6	0.017 3	0.184 2
S8	0.033 4	0.132 6	6.484 6	0.756 6	0.014 2	0.321 1
S9	0.019 0	0.031 7	0.998 8	0.074 7	0.015 0	0.198 9
S10	0.031 6	0.127 3	3.758 9	0.365 0	0.036 5	0.130 4
平均值						
Mean	0.026 5	0.094 9	3.993 4	0.453 7	0.021 7	0.222 0

## 2.5 体外抗氧化活性研究

### 2.5.1 DPPH 自由基清除能力

于 10 mL 试管，依次加入不同质量浓度供试品溶液 2.0 mL、0.15 mmol/L DPPH 溶液 2.0 mL，室温避光反应 20 min，517 nm 波长测定吸光度 ( $A_i$ )；同法于 517 nm 测定 DPPH 溶液 2.0 mL 与甲醇 2.0 mL 混合后的吸光度 ( $A_0$ )、甲醇 2.0 mL 与供试样品溶液 2.0 mL 的吸光度 ( $A_j$ )。DPPH 自由基的清除率 ( $R$ ) 根据公式 (1) 计算，质量浓度为横坐标、清除率为纵坐标绘制清除率曲线，拟合，计算半数清除质量浓度 ( $IC_{50}$ )， $IC_{50}$  越低清除能力越强。结果见表 7，10 批次广防风药材均呈现清除 DPPH 自由基的能力，清除能力较强的批次为 S2、S3、S7。

$$R = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

表 7 样品对 DPPH 自由基的清除能力

Table 7 The scavenging ability of the sample to DPPH free radicals

样品 Sample	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient ( $R$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
S1	$Y = 0.245 X + 14.358$	0.974 0	145.122
S2	$Y = 0.828 X + 16.065$	0.997 9	40.984
S3	$Y = 0.555 X + 13.148$	0.994 7	66.376
S4	$Y = 0.528 X + 1.333$	0.968 4	92.085

S5	$Y = 0.501 X + 13.992$	0.985 8	81.814
S6	$Y = 0.045 X + 16.684$	0.993 0	740.355
S7	$Y = 0.779 X + 26.444$	0.979 9	30.227
S8	$Y = 0.108 X + 21.720$	0.986 0	260.165
S9	$Y = 0.190 X + 12.697$	0.989 1	195.816
S10	$Y = 0.113 X + 18.266$	0.992 9	279.348

### 2.5.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力

将等体积 ABTS (7.0 mmol/L) 溶液与过硫酸钾 (2.45 mmol/L) 溶液混合, 室温避光反应 12~16 h, 得 ABTS<sup>+</sup>自由基母液, 用 pH7.4 磷酸缓冲溶液稀释至 734 nm 处吸光度为  $0.70 \pm 0.02$ 。不同质量浓度供试品溶液 0.1 mL 加入 ABTS<sup>+</sup>自由基溶液 3.9 mL, 振荡 30 s, 室温反应 10 min, 734 nm 波长处测量吸光度 ( $A_i$ ); 同法测定 ABTS<sup>+</sup>自由基溶液 3.9 mL 与甲醇溶液 0.1 mL 混合后的吸光度 ( $A_0$ )、磷酸缓冲溶液 3.9 mL 与供试品溶液 1.0 mL 的吸光度 ( $A_j$ )。ABTS<sup>+</sup>自由基的清除率根据公式 (1) 计算出, 以质量浓度为横坐标、清除率为纵坐标绘制清除率曲线, 拟合, 计算半数清除质量浓度 ( $IC_{50}$ ),  $IC_{50}$  越低清除能力越强。结果见表 8, 10 批次广防风药材均呈现清除 ABTS<sup>+</sup>自由基的能力, 清除能力较强的批次为 S8、S10。

表 8 样品对 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除能力

Table 8 The scavenging ability of the sample to ABTS<sup>+</sup> free radicals

样品 Sample	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient ( $R$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
S1	$Y = 1.771 X + 16.310$	0.989 1	19.018
S2	$Y = 0.810 X + 38.864$	0.964 7	13.734
S3	$Y = 3.620 X + 7.088$	0.997 0	11.851
S4	$Y = 0.383 X + 39.482$	0.972 6	27.412
S5	$Y = 1.650 X + 26.014$	0.969 9	14.530
S6	$Y = 25.185 \ln(X) - 34.708$	0.961 4	28.875
S7	$Y = 0.442 X + 30.904$	0.984 1	43.184
S8	$Y = 6.202 X + 34.790$	0.982 1	2.452
S9	$Y = 0.809 X + 34.026$	0.961 6	19.735
S10	$Y = 21.652 \ln(X) - 13.255$	0.990 6	5.457

## 2.6 体外降血糖活性研究

在 96 微孔板依次加入磷酸钾盐缓冲溶液 (pH 6.8) 110  $\mu\text{L}$ , 供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 0.1 U/mL  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液 20  $\mu\text{L}$ , 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 加入 4 mmol/L 对-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG) 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 min, 加入 0.2 mol/L 碳酸钠溶液 80  $\mu\text{L}$ , 405 nm 处测定吸光度值 ( $A_i$ )。同法测定对照组 ( $A_0$ , 缓冲溶液代替供试品溶液), 空白对照组 ( $A_k$ , 缓冲溶液代替供试品和酶溶液), 样品空白组 ( $A_j$ , 缓冲溶液代替酶溶液), 根据式 (2) 计算抑制率 ( $I$ ), 以质量浓度为横坐标、抑制率为纵坐标绘制曲线, 拟合, 计算半数抑制质量浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ),  $\text{IC}_{50}$  越低抑制能力越强。结果见表 9, 10 批次广防风药材均具有一定的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力, 抑制能力较强的批次为 S2、S3、S4、S8。

$$I = [1 - (A_i - A_j) / (A_0 - A_k)] \times 100\% \quad (2)$$

表 9 样品对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力

Table 9  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activity of the sample

样品 Sample	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient ( $R$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
S1	$Y = 23.115 \ln X - 152.000$	0.982 7	6 247.895
S2	$Y = 26.126 \ln X - 160.380$	0.990 6	3 133.795
S3	$Y = 16.062 \ln X - 75.155$	0.984 7	2 416.317
S4	$Y = 8.041 \ln X - 15.070$	0.996 8	3 261.687
S5	$Y = 12.962 \ln X - 69.790$	0.991 2	10 317.533
S6	$Y = 18.831 \ln X - 123.970$	0.984 1	10 280.457
S7	$Y = 18.381 \ln X - 120.490$	0.982 3	10 667.958
S8	$Y = 18.494 \ln X - 90.256$	0.991 5	1 966.479
S9	$Y = 25.079 \ln X - 176.690$	0.997 9	8 425.347
S10	$Y = 15.306 \ln X - 91.626$	0.986 1	10 434.782

## 2.7 谱效关系分析

### 2.7.1 灰关联度分析

将 10 批广防风体外抗氧化、降血糖的  $\text{IC}_{50}$  值的倒数为母系列, 21 个共有峰为子序, 峰面积以初值法进行归一化处理, 计算得到灰色关联度值 (见表 10), 灰色关联度值越大, 与活性之间的相关性越强。可知 21 个特征峰与清除 DPPH、 $\text{ABTS}^+$  自由基和抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的总体关联度均大于 0.731, 说明广防风提取物是通过化学成分群协同作用发挥体外抗

氧化、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。其中与 DPPH 自由基清除能力关联度最强的是峰 3, 与 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力关联度最强的是峰 4, 与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性关联度最强的是峰 1。峰 21 (广防风苷 A) 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶也具有较高的关联度, 达 0.874。

表 10 21 个共有峰与活性的灰色关联度

Table 10 Grey correlation between 21 common peaks and activity

峰号 Peak No.	DPPH	ABTS	$\alpha$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -Glucosidase
1	0.825	0.845	0.885
2	0.763	0.810	0.816
3	0.859	0.763	0.802
4	0.818	0.884	0.841
5	0.747	0.814	0.781
6	0.767	0.821	0.832
7	0.790	0.836	0.857
8	0.790	0.838	0.858
9	0.783	0.844	0.855
10	0.795	0.832	0.825
11	0.808	0.791	0.866
12	0.778	0.754	0.778
13	0.791	0.779	0.847
14	0.838	0.804	0.857
15	0.812	0.788	0.803
16	0.817	0.813	0.835
17	0.854	0.788	0.791
18	0.770	0.847	0.782
19	0.731	0.787	0.746
20	0.756	0.826	0.792
21	0.795	0.762	0.874

### 2.7.2 双变量相关性分析

双变量相关性分析以共有峰峰面积为变量 ( $X$ ),  $IC_{50}$  值的倒数 Z-score 标准化处理后的

结果为变量 (Y)，计算各共有峰与体外降血糖和抗氧化活性的 Pearson 相关系数 (见图 6)。结果显示峰 3、峰 17 与 DPPH 自由基清除活性呈显著正相关 ( $P<0.05$ )，峰 1、峰 4 与 ABTS 自由基清除能力呈显著正相关 ( $P<0.05$ )。峰 1、峰 4、峰 11 (毛蕊花糖苷) 与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性呈显著正相关 ( $P<0.05$ )。

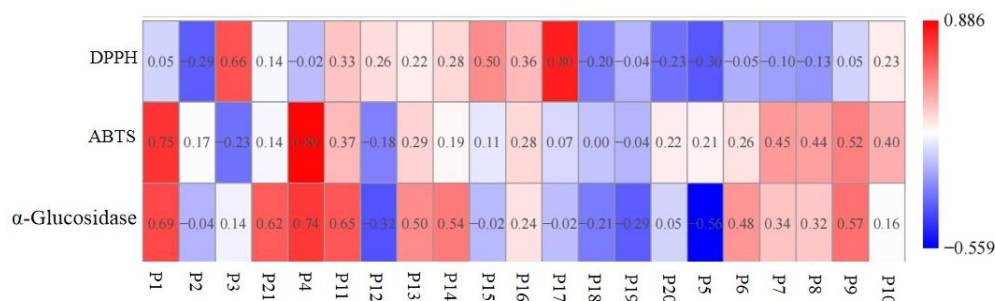


图 6 21 个共有峰与活性的双变量相关性分析

Fig. 6 Bivariate correlation analysis of 21 common peaks area and activity

### 3 讨论与结论

试验考察了甲醇、乙醇超声提取法，结果显示甲醇超声提取的色谱图色谱峰数量丰富、基线平稳度、分离度较好。比较了不同的流动相体系 (甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸溶液)，结果显示乙腈-0.05%磷酸溶液具有较好的峰型。不同产地的广防风样品的香草酸、阿魏酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、迷迭香酸和广防风苷 A 中的含量存在较大差异，可能与其生长环境、生长年限、野生或商品等差异有关<sup>[13]</sup>。主成分分析显示 6 个主成分可反映广防风样品 90% 以上的地区差异性信息。广防风 HPLC 特征图谱显示苯乙醇苷类化合物毛蕊花糖苷具有较高的峰面积占比，达 33%。毛蕊花糖苷结构以苯乙醇和葡萄糖 1 位相连形成  $\alpha$ -羟基苷<sup>[14]</sup>，这可能是其与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶结合从而发挥  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的结构基础。灰关联度分析显示广防风所含的另一苷类成分广防风苷 A 与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性具有较高的关联度，提示苷类物质是广防风发挥  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制的活性物质，该研究发现为以毛蕊花糖苷、广防风苷 A 作为广防风降血糖药效质量标志物提供了参考。灰色关联度分析显示 21 个特征峰与清除 DPPH、ABTS<sup>+</sup> 自由基和抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的总体关联度均大于 0.731，说明广防风提取物是通过化学成分群协同作用发挥体外抗氧化、抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性<sup>[15]</sup>。峰 1、峰 4 同时与 ABTS 自由基清除能力和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性呈显著正相关，提示后续可重点关注这两个成分，进一步探究其抗氧化、降血糖活性机制。

该研究建立了不同产地广防风药材的指纹图谱及其抗氧化、降血糖活性谱效关系，为广防风抗氧化和降血糖活性药效物质成分的筛选及质量控制提供科学依据。

## 参考文献

- 1 Qin L,Hong YW,Liang ZY,et al.Research progress of traditional Chinese medicine[J].Popular Sci Technol(大众科技),2017,19:53-54.
- 2 Liu WQ,Yan H,Dong YJ,et al.Origin and authentication of *Epimeredi indica*[J].J Pharm Anal(药物分析杂志),2015,35:370-376.
- 3 Xue L.Identification of *Pogostemon cablin* and its adulterant *Epimeredi indica*[J].Chin Tradi Herb Drugs(中草药),2001,32:78-79.
- 4 Huang JY,Lu HJ,Xie H,et al.Molecular identification of *Pogostemon cablin*,*Aagastache rugosus* and *Epimeredi indica* based on psbA-trnH intergenic spacer sequences[J].J Guangdong Coll Pharm(广东药学院学报),2014,30:683-687.
- 5 Batish DR,Singh HP,Kaur M,et al.Chemical characterization and phytotoxicity of volatile essential oil from leaves of *Anisomeles indica*(Lamiaceae)[J].Biochem Syst Ecol,2012,41:104-109.
- 6 Yogesh U,Krishnakant P,Navin S.Analysis of fatty acid in *Anisomeles* species by gas chromatography-mass spectrometry[J].J Pharm,2011,3:44-47.
- 7 Choudhary N,Bijjem KRV,Kalia AN.Antiepileptic potential of flavonoids fraction from the leaves of *Anisomeles malabarica*[J].J Ethnopharmacol,2011,135:238-242.
- 8 Chen CH.Chemical investigation of aerial of *Anisomeles indica*[D].Yantai:Ludong University(鲁东大学),2016.
- 9 Wang YL,Luan X.Phenethyl alcohol glycosides in *Epimeredi indica*[J].Chin Tradi Herb Drugs(中草药),2004,35:1325-1327.
- 10 Wang YL,Shi HW,Yi X.Determination of the content of saposnikovoside A in *Epimeredi indica* granules by HPLC[J].Chin Tradit Pat Med(中成药),2004,5:86-87.
- 11 Zhang RL,Xue YX,Lu XK,et al.Determination of three compounds in *Epimeredi indica*(L.) Rothm.by an HPLC dual wavelength method combined with accelerated solvent extraction[J].Chin Pharm Affairs(中国药事),2020,34:335-341.
- 12 Guangdong Food and Drug Administration.Standards for Chinese materia medica in Guangdong province(Volume III)(广东省中药材标准:第三册)[M].Guangzhou:Guangdong Science & Technology Press,2018:114-115.



- 13 Xie J,Qin Y,Tang XY,et al.Quality evaluation of Peucedani Radix based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition and multi-component quantification[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:433-443.
- 14 Guo XH,Gan L,Si J,et al.Research progress on pharmacological effects and mechanism of acteoside[J].Chin Tradit Pat Med(中成药),2020,42:2119-2125.
- 15 Wu MY,Chen HF,Chen RR,et al.Screening of antioxidative material basis of total flavonoids from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* based on the spectrum-effect relationship and its mechanism[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:464-477.

收稿日期: 2024-04-30

接受日期:

基金项目: 2024 年广东省高等教育“冲补强”提升计划重点建设学科(农业资源与环境)建设项目; 2022 年广东省基地嘉应学院客家研究院课题(22KYKT03); 2020 年梅州市医药卫生项目(2020-B-83)

\*通信作者 Tel:13750543826; E-mail: mcdullzhang@yeah.net