

# 地稔醇提物抗氧化活性的谱效关系研究<sup>△</sup>

钱松\*, 刘琴, 麻秀萍#, 杨菁, 陈滕, 刘静, 刘林莉(贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R284.1;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)16-1969-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.16.09



**摘要** 目的:建立地稔醇提物的指纹图谱,研究其抗氧化活性的谱效关系。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)和《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立15批地稔醇提物的指纹图谱并进行相似度评价;与对照品比对,指认共有峰。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除法、2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除法和总抗氧化能力测定法(FRAP)评价15批地稔醇提物的体外抗氧化活性。采用主成分分析、双变量相关性分析和偏最小二乘回归分析研究地稔醇提物抗氧化活性的谱效关系。结果:从15批地稔醇提物HPLC指纹图谱中确定共有峰20个,与对照指纹图谱的相似度均不低于0.831;指认出峰3为没食子酸、峰13为牡荆素、峰17为芦丁、峰19为鞣花酸。15批地稔醇提物的DPPH自由基清除法的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为21.98~57.87 μg/mL, ABTS自由基清除法的IC<sub>50</sub>值为40.94~101.88 μg/mL, FRAP法所得结果为0.19~0.48 mg/mL。主成分分析显示, DPPH法的IC<sub>50</sub>值的方差贡献率达80.77%;双变量相关性分析显示,峰2(呈正相关)和峰11(呈负相关)的峰面积与抗氧化活性均有显著的相关性( $P < 0.05$ );偏最小二乘回归法分析显示,变量重要性投影(VIP)值排序为峰11 > 峰2 > 峰16 > 峰15 > 峰12 > 峰13 > 峰18,均大于1;且峰2、13、15、16、18与抗氧化活性呈正相关,峰11、12与抗氧化活性呈负相关,其标准化回归系数的绝对值均大于0.1。结论:15批地稔醇提物均有体外抗氧化活性,其共有峰2、11、12、13、15、16、18对应的化合物可能是地稔醇提物抗氧化活性的物质基础。

**关键词** 地稔;醇提物;指纹图谱;抗氧化活性;谱效关系

## Study on the Spectrum-effect Relationship of Antioxidant Activity of Ethanol Extract from *Melastoma dodecandrum*

QIAN Song, LIU Qin, MA Xiuping, YANG Jing, CHEN Teng, LIU Jing, LIU Linli (School of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the fingerprint of the ethanol extract from *Melastoma dodecandrum*, to study spectrum-effect relationship of its antioxidant activity. METHODS: HPLC method and *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition) were used to establish the fingerprints of 15 batches of ethanol extracts from *M. dodecandrum*, and their similarity was evaluated. The common peaks were identified by comparing with substance control. DPPH free radical scavenging method, ABTS free radical scavenging method and total antioxidant capacity determination method (FRAP) were used to determine antioxidant activity *in vitro* of 15 batches of ethanol extracts from *M. dodecandrum*. Principal component analysis, bivariate correlation analysis and partial least squares regression analysis were used to study the spectrum-effect relationship of the antioxidant activity of the ethanol extracts from *M. dodecandrum*. RESULTS: Totally 20 common peaks were identified in HPLC fingerprints of 15 batches of ethanol extracts from *M. dodecandrum*; its similarity with the control fingerprint was not less than 0.831; it was identified that peak 3 was gallic acid, peak 13 was vitexin, peak 17 was rutin and peak 19 was ellagic acid. The IC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging method of 15 batches of ethanol extracts from *M. dodecandrum* were 21.98-57.87 μg/mL, that of ABTS radical scavenging method were 40.94-101.88 μg/mL, the results of FRAP method were 0.19-0.48 mg/mL. Principal component analysis showed that the contribution rate of IC<sub>50</sub> variance of DPPH was 80.77%. Bivariate correlation analysis showed that the peak areas of peak 2 (positive correlation) and peak 11 (negative correlation) were significantly correlated with antioxidant activity ( $P < 0.05$ ); partial least squares regression analysis showed that, the variable projection importance (VIP) in descending order was peak 11 > peak 2 > peak 16 > peak 15 > peak 12 > peak 13 > peak 18, and their VIP values were greater than 1. Peaks 2, 13, 15, 16 and 18 were positively correlated with antioxidant activity, and peaks 11 and 12 were negatively correlated with antioxidant activity, and the absolute value of standardized regression coefficient were

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860695);贵州省药物新剂型新工艺科技创新人才团队项目(No.黔科合平台人才[2017]5655)

\* 硕士研究生。研究方向:中药及民族药质量控制及新药研发。E-mail:2371229201@qq.com

# 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药及民族药质量控制及新药研发。E-mail:mxp001130@sina.com

greater than 0.1. CONCLUSIONS: Fifteen batches of ethanol extracts of *M. dodecandrum* have antioxidant activity *in vitro*. The compounds corresponding to common peaks 2, 11, 12, 13, 15, 16 and 18 may be the material basis of antioxidant activity of *M. dodecandrum*.

**KEYWORDS** *Melastoma dodecandrum*; Ethanol extract; Fingerprint; Antioxidant activity; Spectrum-effect relationship

地稔为野牡丹科植物地稔 *Melastoma dodecandrum* Lour. 的新鲜或干燥全草, 又名地荃、铺地锦、嘎狗噜、地枇杷等。该药主要分布在我国广东、贵州、浙江、福建等地区<sup>[1-2]</sup>, 具有活血止血、清热解毒等功效, 民间常用于治疗痛经、产后腹痛、子宫出血、崩漏、痈肿、痔疮、盆腔炎、肝炎等病症<sup>[3]</sup>。现代药理研究表明, 地稔止血与抗炎作用显著, 并具有抗衰老、降血糖、降血脂、抗肿瘤等活性<sup>[4-6]</sup>。地稔含有多种化学成分, 以黄酮类、多糖类、三萜类、有机酸类等成分为主<sup>[7-10]</sup>。有研究报道, 适当服用抗氧化剂可以清除体内过多的自由基, 有利于人类的身体健康和疾病的预防与控制, 而植物中含有大量的天然抗氧化活性成分, 具有抗氧化活性强、副作用小等特点, 已成为当前研究的热点之一<sup>[11-12]</sup>。因此, 对地稔药材中的抗氧化活性成分进行研究具有一定的意义。

中药谱效关系研究是将中药指纹图谱信息与药效学指标相结合, 采用相应的数据分析技术进行关联、分析, 从而揭示化学成分与生物活性之间的相关性, 阐明活性物质基础, 建立符合中医学理论和中医药实践基础的质量评价模式。该研究手段能快速反映植物提取物的主要化学特征, 已被世界卫生组织认可为药用植物质量评价的一种策略<sup>[13-15]</sup>。为此, 本研究在前期实验基础上, 采用高效液相色谱法(HPLC)建立15批不同产地地稔醇提取物(预实验示抗氧化活性较强)的指纹图谱, 采用1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除法、2, 2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除法和总抗氧化能力测定法(FRAP)评价其抗氧化活性, 采用主成分分析、双变量相关性分析、偏最小二乘回归分析研究地稔醇提取物指纹图谱共有峰与抗氧化活性的谱效关系, 以期为进一步阐明该药抗氧化活性的药效物质基础提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-2030C 3D型HPLC仪(包括二极管阵列检测器, 日本Shimadzu公司)、KQ-300DB型数控超声清洗波(昆山市超声仪器有限公司)、UV-5900型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)、FA2204N型万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司)、1530型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

牡荆素对照品(批号111687-201704, 纯度 $\geq 94.9\%$ )、没食子酸对照品(批号110831-201605, 纯度 $\geq 91.5\%$ )、鞣花酸对照品(批号111959-201903, 纯度88.8%)均购

自中国食品药品检定研究院; 芦丁对照品(批号153-18-4, 纯度 $\geq 98.0\%$ )购自成都植标化纯生物技术有限公司; DPPH(批号C11386826)、ABTS(批号C11838739)均购自上海麦克林生化科技有限公司; 2, 4, 6-三(2-吡啶)-1, 3, 5-三嗪(TPTZ, 批号BCCD2024)购自西格玛奥德里奇贸易有限公司; 甲醇(色谱纯)购自美国TEDIA公司; 福林酚试剂购自上海蓝季生物有限公司; 其余试剂均为分析纯, 水为纯净水。

15批地稔药材采收自贵州不同自然生长区, 由贵州中医药大学药学院生药实验室孙庆文教授鉴定, 均为野牡丹科植物地稔 *M. dodecandrum* Lour. 的全草, 其凭证标本存放于贵州中医药大学药学重点实验室。15批地稔药材的来源信息见表1。

表1 15批地稔药材的来源信息

Tab 1 Source information of 15 batches of *M. dodecandrum*

编号	产地	采收时间	编号	产地	采收时间
S1	贵州花溪高坡乡	2020年7月	S9	贵州惠水县三都镇	2018年8月
S2	贵州惠水县司蒙村	2020年8月	S10	贵州惠水县高镇	2018年7月
S3	贵州长顺县代化镇	2020年8月	S11	贵州榕江县古州镇	2018年8月
S4	贵州龙里县	2019年7月	S12	贵州惠水县摆榜乡	2020年11月
S5	贵州黔南贵定县	2019年8月	S13	贵州惠水县米丹	2020年11月
S6	贵州黔南贵定县	2020年8月	S14	贵州惠水县米安寨	2020年11月
S7	贵州长顺县鼓扬镇	2020年7月	S15	贵州惠水县水围村	2020年11月
S8	贵州惠水县羨塘乡	2020年9月			

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取没食子酸、牡荆素、芦丁对照品各适量, 分别溶解于甲醇中, 再精密量取1 mL, 置于同一10 mL量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 摇匀, 制成上述成分质量浓度分别为10.17、8.73、14.00  $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。另精密称取鞣花酸对照品适量, 加甲醇溶解、稀释并定容, 摇匀, 制成质量浓度为8.00  $\mu\text{g/mL}$ 的单一对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 分别称取15批地稔药材粉末(过二号筛)各15 g, 分别加入12、10倍量(mL/g, 下同)的50%乙醇回流提取2次, 每次1.5 h, 合并滤液, 浓缩, 得浸膏(得率为16.56%~28.21%)。精密称取上述浸膏0.05 g, 置于10 mL量瓶中, 加入50%甲醇溶解、稀释并定容, 摇匀, 过0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 即得指纹图谱用供试品溶液。另精密称取上述浸膏0.05 g, 置于25 mL量瓶中, 加入50%乙醇溶解、稀释并定容, 摇匀, 即得抗氧化活性用供试品溶液。

### 2.2 色谱条件

以ChromCore™ AQ C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )为

色谱柱,以甲醇为流动相A、0.1%磷酸溶液为流动相B进行梯度洗脱(0~10 min,98%A;10~15 min,98%A→95%A;15~55 min,95%A→75%A;55~60 min,75%A;60~75 min,75%A→65%A;75~90 min,65%A→55%A;90~95 min,55%A→50%A;95~100 min,50%A→98%A;流速为1.0 mL/min,检测波长为260 nm;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 精密度试验** 取地稔药材(编号S6)适量,按“2.1.2”项下方法制备指纹图谱用供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件连续进样6次。以没食子酸峰(峰3,该峰分离度良好、峰面积相对较大且稳定)为参照,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,20个共有峰相对峰面积的RSD均不高于1.69%( $n=6$ ),相对保留时间的RSD均不高于0.71%( $n=6$ ),表明方法精密度良好。

**2.3.2 重复性试验** 取地稔药材(编号S6)适量,共6份,按“2.1.2”项下方法制备指纹图谱用供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定。以没食子酸峰为参照,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,20个共有峰相对峰面积的RSD均不高于2.16%( $n=6$ ),相对保留时间的RSD均不高于0.63%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取地稔药材(编号S6)适量,按“2.1.2”项下方法制备指纹图谱用供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、10、24 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定。以没食子酸峰为参照,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,20个共有峰相对峰面积的RSD均不高于2.49%( $n=6$ ),相对保留时间的RSD均不高于1.48%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

### 2.4 地稔醇提取物HPLC指纹图谱的建立、相似度评价和共有峰指认

**2.4.1 HPLC指纹图谱的建立** 按“2.1.2”项下方法制备15批地稔药材的指纹图谱用供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以S1样品图谱为参照图谱,将时间窗宽度设为0.3 min,采用多点校正法进行峰匹配生成叠加指纹图谱,采用中位数法生成对照指纹图谱(R),详见图1。

**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)》对15批地稔醇提取物样品的指纹图谱进行相似度评价。结果,15批地稔醇提取物样品图谱与对照指纹图谱的相似度均不低于0.831,详见表2。

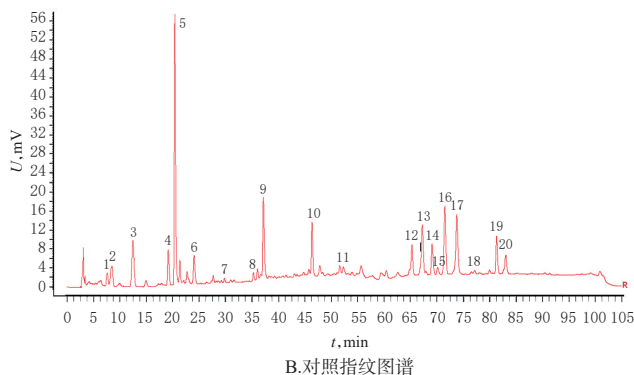
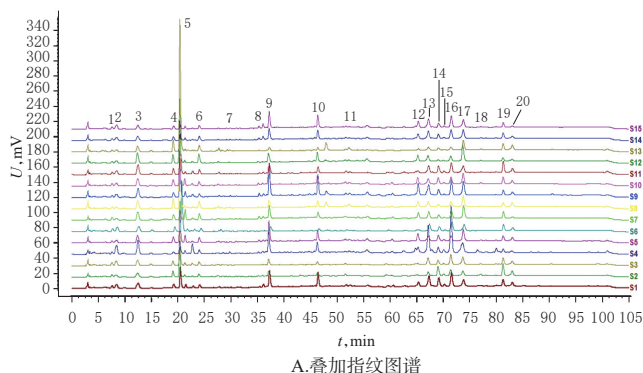


图1 15批地稔醇提取物的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprint and control fingerprint of 15 batches of ethanol extracts from *M. dodecandrum*

表2 15批地稔醇提取物的相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation of 15 batches of ethanol extract from *M. dodecandrum*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.830	0.925	0.889	0.889	0.914	0.873	0.844	0.955	0.923	0.917	0.788	0.780	0.970	0.978	0.962
S2	0.830	1.000	0.873	0.650	0.785	0.873	0.792	0.733	0.717	0.853	0.922	0.647	0.807	0.809	0.752	0.831
S3	0.925	0.873	1.000	0.897	0.871	0.999	0.939	0.896	0.887	0.926	0.969	0.839	0.902	0.949	0.910	0.974
S4	0.889	0.650	0.897	1.000	0.702	0.896	0.777	0.738	0.846	0.763	0.810	0.675	0.655	0.872	0.892	0.885
S5	0.889	0.785	0.871	0.702	1.000	0.857	0.966	0.973	0.948	0.989	0.901	0.953	0.914	0.937	0.905	0.945
S6	0.914	0.873	0.999	0.896	0.857	1.000	0.931	0.888	0.870	0.916	0.968	0.829	0.898	0.936	0.895	0.966
S7	0.873	0.792	0.939	0.777	0.966	0.931	1.000	0.992	0.927	0.977	0.932	0.969	0.967	0.948	0.900	0.969
S8	0.844	0.733	0.896	0.738	0.973	0.888	0.992	1.000	0.922	0.968	0.902	0.988	0.953	0.922	0.877	0.947
S9	0.955	0.717	0.887	0.846	0.948	0.870	0.927	0.922	1.000	0.949	0.868	0.898	0.822	0.979	0.987	0.966
S10	0.923	0.853	0.926	0.763	0.989	0.916	0.977	0.968	0.949	1.000	0.949	0.931	0.929	0.959	0.925	0.973
S11	0.917	0.922	0.969	0.810	0.901	0.968	0.932	0.902	0.868	0.949	1.000	0.839	0.914	0.920	0.875	0.957
S12	0.788	0.647	0.839	0.675	0.953	0.829	0.969	0.988	0.898	0.931	0.839	1.000	0.941	0.884	0.838	0.904
S13	0.780	0.807	0.902	0.655	0.914	0.898	0.967	0.953	0.822	0.929	0.914	0.941	1.000	0.872	0.794	0.902
S14	0.970	0.809	0.949	0.872	0.937	0.936	0.948	0.922	0.979	0.959	0.920	0.884	0.872	1.000	0.987	0.988
S15	0.978	0.752	0.910	0.892	0.905	0.895	0.900	0.877	0.987	0.925	0.875	0.838	0.794	0.987	1.000	0.967
R	0.962	0.831	0.974	0.885	0.945	0.966	0.969	0.947	0.966	0.973	0.957	0.904	0.902	0.988	0.967	1.000

**2.4.3 共有峰指认** 从15批地稔醇提取物样品的指纹图谱中确定共有峰20个,通过与对照品色谱图(“2.1.1”项下对照品溶液同法进样测定所得,见图2)进行比对,指认出峰3为没食子酸、峰13为牡荆素、峰17为芦丁、峰19为鞣花酸。

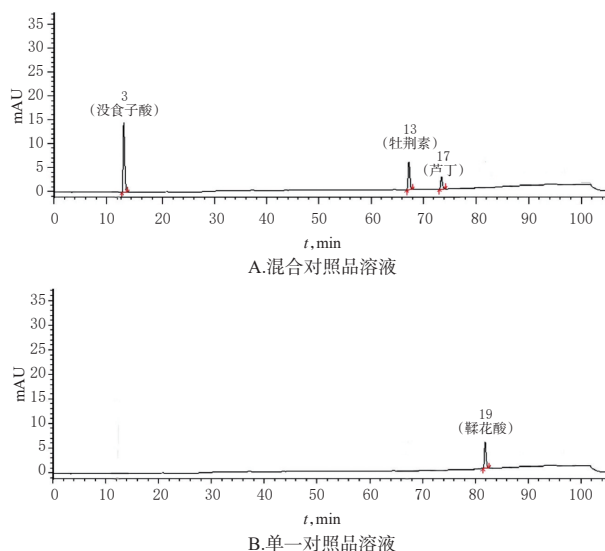


图2 混合对照品溶液和单一对照品溶液的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of mixed control and single control solution

## 2.5 抗氧化活性的评价

**2.5.1 DPPH 自由基清除法** 参考文献[16]方法,精密称取 DPPH 16.51 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇,超声(功率 420 W,频率 40 kHz)使其溶解,冷却至室温后以无水乙醇定容,即得 DPPH 工作液。分别取 50% 乙醇 100  $\mu$ L+DPPH 工作液 100  $\mu$ L(空白组)、不同质量浓度的抗氧化活性用供试品溶液(分别取“2.1.2”项下抗氧化活性用供试品溶液 1、2、3、4、5、6、7、8 mL,用 50% 乙醇定容至 25 mL 量瓶中,下同)各 100  $\mu$ L+DPPH 工作液 100  $\mu$ L(样品组)以及上述质量浓度的抗氧化活性用供试品溶液各 100  $\mu$ L+无水乙醇 100  $\mu$ L(对照组),置于 96 孔板中,于室温下静置 15 min,置于酶标仪中振荡 10 min,于 517 nm 波长处分别测定其吸光度,依次记为  $A_0$ (空白组)、 $A_1$ (样品组)和  $A_2$ (对照组)。按下式计算自由基清除率: 自由基清除率(%) =  $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$ ,采用 SPSS 25.0 软件计算 15 批地稔醇提取物对 DPPH 自由基的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )。每组设 3 个平行样,结果见表 3。

**2.5.2 ABTS 自由基清除法** 参考文献[17]方法,精密称取 ABTS 38.41 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度;另精密称取过硫酸钾 66.10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度。将上述 ABTS 溶液与过硫酸钾溶液等体积混合,避光储存 12~16 h 后,用水稀释,使其在 734 nm 波长处的吸光度为  $0.70 \pm 0.02$ ,即得 ABTS 工作液。分别取 50% 乙醇 20  $\mu$ L+ABTS 工作液 180  $\mu$ L(空白组)、“2.5.1”项下不同质量浓度的抗氧化活性用供试品溶液各 20  $\mu$ L+ABTS 工作液

表 3 15 批地稔醇提取物体外抗氧化活性的测定结果 ( $n=3$ )

Tab 3 Antioxidant activity *in vitro* of 15 batches of ethanol extracts from *M. dodecandrum*( $n=3$ )

编号	DPPH法的 $IC_{50}$ , $\mu$ g/mL	ABTS法的 $IC_{50}$ , $\mu$ g/mL	FRAP值,mg/mL
S1	39.42	65.97	0.29
S2	39.06	71.96	0.29
S3	46.98	57.67	0.36
S4	35.32	67.18	0.35
S5	43.91	60.29	0.28
S6	57.87	101.88	0.19
S7	21.98	40.94	0.48
S8	38.52	66.63	0.28
S9	29.58	55.63	0.36
S10	32.70	56.33	0.33
S11	44.00	74.78	0.29
S12	34.34	57.93	0.33
S13	40.37	85.99	0.23
S14	37.95	63.74	0.31
S15	37.02	57.33	0.30

180  $\mu$ L(样品组)、“2.5.1”项下不同质量浓度的抗氧化活性用供试品溶液各 20  $\mu$ L+水 180  $\mu$ L(对照组),置于 96 孔板中,于室温下静置 30 min,置于酶标仪中振荡 6 min,于 734 nm 波长处分别测定其吸光度,依次记为  $A_0$ (空白组)、 $A_1$ (样品组)和  $A_2$ (对照组)。按“2.5.1”项下方法计算 15 批地稔醇提取物对 ABTS 自由基的  $IC_{50}$ 。每组设 3 个平行样,结果见表 3。

**2.5.3 FRAP 法** 参考文献[18]方法,取 FRAP 工作液[精密吸取 300 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.6) 2.5 mL、10 mmol/L TPTZ 溶液(以 40 mmol/L 的盐酸为溶剂)250  $\mu$ L、20 mmol/L 氯化铁溶液 250  $\mu$ L,混匀]180  $\mu$ L,置于 96 孔板中,加入 0.2 mg/mL(用 50% 乙醇稀释)的抗氧化活性用供试品溶液 20  $\mu$ L,置于酶标仪中,在 37  $^{\circ}$ C 下静置 10 min 后,于 593 nm 波长处测定其吸光度,记为  $A$ 。另分别配制质量浓度为 0.019 3、0.038 6、0.058 0、0.077 3、0.096 6、0.159 2 mg/mL 的硫酸亚铁溶液,按上述方法测定吸光度后绘制标准曲线。将供试品溶液的  $A$  值代入标准曲线方程计算总抗氧化能力(以硫酸亚铁质量浓度计,后简称为“FRAP 值”)。每组设 3 个平行样,结果见表 3。

## 2.6 谱效关系分析

**2.6.1 主成分分析** 采用 SPSS 25.0 软件,对共有峰峰面积与 DPPH 法的  $IC_{50}$  值( $Y_1$ )、ABTS 法的  $IC_{50}$  值( $Y_2$ )、FRAP 值( $Y_3$ )进行 Z 标准化处理,计算主成分特征值、方差贡献率等参数。结果,主成分  $Y_1$  的方差贡献率达 80.77%,提示其能较大程度地反映地稔醇提取物的抗氧化活性,详见表 4。因此,本研究选用 DPPH 法的  $IC_{50}$  值作为抗氧化活性的变量进行后续分析。

表4 地稔醇提取物抗氧化活性中3个主成分的特征值和方差贡献率

Tab 4 Eigen value and variance contribution rate of 3 main components for antioxidant capacity of ethanol extract from *M. dodecandrum*

主成分	初始特征值			提取特征值		
	特征根	方差贡献率, %	累积方差贡献率, %	特征根	方差贡献率, %	累积方差贡献率, %
$Y_1$	2.42	80.77	80.77	2.42	80.77	80.77
$Y_2$	0.46	15.24	96.01			
$Y_3$	0.12	3.99	100.00			

2.6.2 双变量相关性分析 采用SPSS 25.0软件,以DPPH法的 $IC_{50}$ 值为变量( $Y$ )、各共有峰峰面积为变量( $X$ )进行双变量相关性分析,计算共有峰峰面积与抗氧化活性的Pearson相关系数。结果,峰2和峰11的峰面积与抗氧化活性均显著相关( $P < 0.05$ ),其中峰2呈正相关、峰11呈负相关( $P < 0.05$ ),详见表5。

表5 15批地稔醇提取物指纹图谱共有峰峰面积与抗氧化活性的双变量相关性分析结果

Tab 5 Bivariate correlation analysis between common peak area of fingerprint and antioxidant activity of 15 batches of ethanol extracts from *M. dodecandrum*

峰号	Pearson 相关系数	$P$	峰号	Pearson 相关系数	$P$
1	0.253	0.363	11	-0.636*	0.011
2	0.583*	0.023	12	-0.428	0.111
3	0.139	0.621	13	0.419	0.120
4	-0.295	0.286	14	0.134	0.635
5	0.034	0.904	15	0.443	0.098
6	-0.317	0.249	16	0.501	0.057
7	-0.265	0.341	17	-0.221	0.428
8	-0.312	0.258	18	0.406	0.133
9	-0.189	0.501	19	-0.024	0.932
10	-0.243	0.382	20	0.149	0.597

注:“\*”表示在0.05水平(双侧)上显著相关

Note: “\*” represents a significant correlation at the 0.05 level (bilateral)

2.6.3 偏最小二乘回归分析 利用SIMCA 14.1软件,以DPPH法的 $IC_{50}$ 值为因变量( $Y$ )、各共有峰峰面积( $X$ )为自变量进行偏最小二乘回归分析,并计算标准化回归系数和变量重要性投影(VIP)值。标准化回归系数越大表明该自变量对药效影响越大,并且系数为正值说明其与药效呈正相关,为负值则表示与药效呈负相关<sup>[19]</sup>。VIP值是反映自变量对因变量解释能力的重要指标,其值越大说明该自变量对因变量的解释能力越强,一般认为当VIP值 $> 1$ 时,自变量在解释因变量时具有显著重要性<sup>[20]</sup>。结果,得回归方程为 $Y = 0.064 0X_1 + 0.147 6X_2 + 0.035 3X_3 - 0.074 7X_4 + 0.008 6X_5 - 0.080 3X_6 - 0.067 0X_7 - 0.079 0X_8 - 0.047 8X_9 - 0.061 6X_{10} - 0.161 0X_{11} - 0.108 5X_{12} + 0.106 0X_{13} + 0.033 8X_{14} + 0.112 1X_{15} + 0.126 9X_{16} - 0.056 0X_{17} +$

$0.102 8X_{18} - 0.006 1X_{19} + 0.037 6X_{20}$ 。VIP值结果显示,峰2、11、12、13、15、16、18的VIP值均大于1,排序为峰11 $>$ 峰2 $>$ 峰16 $>$ 峰15 $>$ 峰12 $>$ 峰13 $>$ 峰18,详见图3。其中,峰2、13、15、16、18与抗氧化活性呈正相关,其标准化回归系数亦均大于0.1,提示当其对对应成分的含量增加时,地稔醇提取物的抗氧化活性会显著增强;峰11、12与抗氧化活性呈负相关,其标准化回归系数的绝对值亦均大于0.1,提示当其对对应成分的含量增加时,地稔醇提取物的抗氧化活性会减弱。

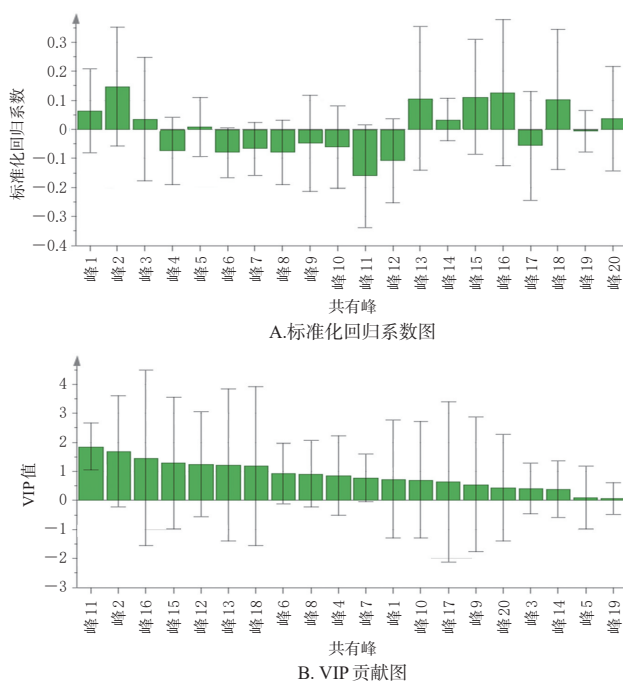


图3 15批地稔醇提取物的标准回归系数图和VIP贡献图  
Fig 3 PLSR standardized regression coefficient diagram and VIP contribution diagram of 15 batches of ethanol extract from *M. dodecandrum*

### 3 讨论

本课题组前期考察了不同提取溶剂(水、50%乙醇、95%乙醇)对地稔提取物体外抗氧化活性的影响,结果显示,50%乙醇提取物对DPPH、ABTS自由基的清除能力最强,因此选用50%乙醇作为提取溶剂。同时,本课题组采用二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围内对地稔醇提取物进行全波长扫描,结果显示,在260 nm波长处色谱峰数量较多,整体基线较平稳,因此选用260 nm作为检测波长。

在指纹图谱分析中,确定了15批地稔醇提取物中有20个共有峰,与对照指纹图谱的相似度均不低于0.831,说明共有峰具有代表性。同时,15批地稔醇提取物样品均具有体外抗氧化活性。本文采用主成分分析、双变量相关性分析和偏最小二乘回归分析探讨了地稔醇提取物

HPLC 指纹图谱共有峰峰面积与抗氧化活性之间的关系。结果显示,地稔醇提取物中峰2、11、12、13、15、16、18与其抗氧化活性(以 DPPH 法的 IC<sub>50</sub> 值衡量)均有重要相关性。由此可见,地稔的抗氧化活性并非是某一具体成分的作用,而是多成分协同起效的结果。

目前已有学者初步确定了地稔的抗氧化活性主要来自其酚类成分中的单宁等化合物<sup>[21]</sup>。本研究通过与对照品比对,仅指出4个色谱峰,且与抗氧化活性显著相关的色谱峰指认较少。在后续研究中,本课题组将通过高分辨质谱分析等研究手段对地稔醇提取物中与抗氧化活性呈正相关的色谱峰所对应的成分进行结构鉴定,以确定地稔抗氧化活性的物质基础,为完善其质量评价及后续深入开发提供参考。

### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第53卷:第1分册[M].北京:科学出版社,1984:154.
- [2] 唐新霖,唐建平.地稔栽培技术及开发前景[J].特种经济动植物,2007,10(6):27.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:628.
- [4] 李丽,罗泽萍,周焕第,等.地苿正丁醇萃取物对链脉佐菌素致糖尿病模型小鼠的影响[J].医药导报,2014,33(2):173-176.
- [5] 李丽,罗泽萍,周焕第,等.地苿乙酸乙酯提取部位对糖尿病小鼠血糖、血脂及抗氧化作用的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(12):3250-3252.
- [6] 周芳,张兴桑,张旖箫,等.地稔水煎液镇痛抗炎药效学的实验研究[J].时珍国医国药,2007,18(10):2370-2371.
- [7] 张超,方岩雄.中药地苿黄酮类成分的分离与鉴定[J].中国药学杂志,2003,38(4):256-258.
- [8] 林绥,李援朝,郭玉瑜,等.地稔的化学成分研究: II [J].中草药,2009,40(8):1192-1195.
- [9] 唐迈,廖宝珍,林迈,等.地稔的化学成分研究[J].中草药,2008,39(8):1149-1151.
- [10] 石冬梅,林友文,李柱来.地苿果实红色素的分离及组成初步鉴定[J].天然产物研究与开发,2003,15(3):235-238.
- [11] SONG H F, ZHANG Q B, ZHANG Z S, et al. In vitro an-tioxidant activity of polysaccharides extracted from Bryopsisplumose[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(4):1057-1061.
- [12] SCHERER R, GODOY H T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3):654-658.
- [13] 邓书鸿,聂磊.中药谱效关系的分析方法及数据处理技术研究进展[J].中药材,2010,33(11):1819-1823.
- [14] WU Q Y, ZHOU Y, JIN X, et al. Chromatographic fingerprint and the simultaneous determination of five bioactive components of Geranium carolinianum L. water extract by high performance liquid chromatography[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(12):8740-8749.
- [15] ZHANG H, WANG J N, CHEN Y, et al. Establishing the chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine standard decoction based on quality by design approach: a case study of Licorice[J]. J Sep Sci, 2019, 42(6):1144-1154.
- [16] AIYEGORO O, OKOH A. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of Helichrysum pedunculatum[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(11):4990-5001.
- [17] ROBERTA R E, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Bio Med, 1999, 26(9):1231-1237.
- [18] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Analy Biochem, 1996, 239(1):70-76.
- [19] 姜红,史亚军,赵生玉,等.基于偏最小二乘法对三果汤抗氧化作用谱-效关系的分析[J].中国实验方剂学杂志, 2018,24(3):8-12.
- [20] 刘淼,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.
- [21] TONG Y P, JIANG Y, CHEN X B, et al. Extraction, enrichment, and quantification of main antioxidant aglycones of flavonoids and tannins from Melastoma dodecandrum Lour.: guided by UPLC-ESI-MS/MS[J]. J Chem, 2019, 2019:1-12.

(收稿日期:2021-04-22 修回日期:2021-07-21)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅