

究与开发[J]. 化学进展, 2009, 21(1): 77-83.

[3] Sang Z, Qiang X, Li Y, *et al.* Design, synthesis and evaluation of scutellarein-*O*-alkylamines as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 94: 348-366.

[4] Huang P P, Han Z C , Li S Z , *et al.* Sixty-four patients with ischemic diseases of lower limbs treated by combined therapy of *Erigeron breviscapus* injection and heparin [J]. *Chin J Integr Tradit West Med* , 2004, 24(11): 1016-1017.

[5] Chai L J, Guo H, Li H, *et al.* Scutellarin and caffeic acid ester fraction, active components of Dengzhanxin injection, upregulate neurotrophins synthesis and release in hypoxia/reoxygenation rat astrocytes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(1): 100-107.

[6] 俞宏渊, 陈宗莲. 灯盏细辛的家化栽培[J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 115-120.

[7] 董 媛, 陈 彬, 李海山, 等. 灯盏细辛药材 HPLC 指纹特征研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7): 1228-1232.

[8] 高 展, 黄罗生. 灯盏细辛 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 海峡药学, 2005, 17(3): 86-88.

[9] 张 平. 不同产地的灯盏花 HPLC 指纹图谱的比较研究[J]. 中外健康文摘: 临床医师, 2008, 5(7): 80-81.

[10] 王黎明, 梁建宁, 黄晓燕, 等. 灯盏花素分散片及灯盏花素原料的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 77-80.

[11] 郑 林, 王永林, 王爱民, 等. UPLC-PDA 法同时测定灯盏细辛中飞蓬苷、绿原酸和野黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1619-1622.

[12] 耿家玲, 孟 芹. HPLC 法测定灯盏细辛中绿原酸和咖啡酸的含量[J]. 中国药师, 2010, 13(5): 701-702.

[13] 李晓波, 汪瑞波, 沈 勇, 等. HPLC 测定灯盏花不同部位绿原酸、灯盏乙素、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和 4, 5-二咖啡酰奎宁酸含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2237-2240.

益智仁 HPLC 指纹图谱与其抗氧化活性

李生茂¹, 刘 琳¹, 彭 璐², 陈 珍¹, 顾 健³, 谭 睿^{2*}
(1. 川北医学院, 四川 南充 637000; 2. 西南交通大学医学院, 四川 成都 610031; 3. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立益智仁 *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* HPLC 指纹图谱, 并研究其抗氧化活性。方法 HPLC 法建立指纹图谱, 通过相似度分析、聚类分析、主成分分析进行评价, DPPH 法测定其抗氧化活性。**结果** HPLC 指纹图谱中有 24 个共有峰, 相似度在 0.974 以上, 其中 12、19 和 21 号色谱峰确定为白杨素、杨芽黄素和圆柚酮。10 批样品均具有抗氧化活性, 但都弱于维生素 C。**结论** 该方法指纹色谱峰更多, 分离度更高, 而且分离时间更合适。
关键词: 益智仁; HPLC 指纹图谱; 抗氧化活性; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析; DPPH 法
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)06-1319-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.024

HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Alpinia Oxyphyllae Fructus*

LI Sheng-mao¹, LIU Lin¹, PENG Lu², CHEN Zhen¹, GU Jian³, TAN Rui^{2*}
(1. North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 2. College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 3. Institute of National Medicine, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints of *Alpinia Oxyphyllae Fructus* and to study the antioxidant activity. **METHODS** The fingerprints were established by HPLC and evaluated by similarity analysis, clus-

收稿日期: 2015-10-27
基金项目: 国家“重大新药创制”项目(2013ZX09103002014, 2012ZX09304005003); 2014 年四川省科技创新苗子工程项目(2014-105); 川北医学院 2015 年大学生开放性实验项目(2015)
作者简介: 李生茂(1981—), 男, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础及质量标准化研究。Tel: (0817) 3300337, E-mail: lsm9110@163.com
* **通信作者:** 谭 睿(1969—), 女, 博士, 教授, 从事中药、民族药及复方药效物质基础及质量标准化研究。Tel: (028) 87601764, E-mail: tanrui@swjut.edu.cn

ter analysis and principal component analysis. The antioxidant activity was determined by DPPH method. **RESULTS** There were twenty-four common peaks in the HPLC fingerprints, whose similarties were more than 0.974. Among them, peaks 12, 19 and 21 were identified as chrysin, tectochrysin and nootkatone, respectively. Ten batches of samples all showed antioxidant activities, which were weaker than that of vitamin C. **CONCLUSION** This method has the advantages of more chromatographic peaks, higher resolution and more proper separation time.

KEY WORDS: *Alpinia oxyphyllae Fructus*; HPLC fingerprints; antioxidant activity; similarity analysis; cluster analysis; principal component analysis; DPPH method

益智仁为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq 的干燥成熟果实^[1],主产于海南、广东、广西等地,为“四大南药”之一,也是2002年卫生部公布的药食同源植物之一^[2],具有暖肾固精缩尿,温脾止泻摄唾的功效。现代研究发现,益智仁中含有黄酮类、萜类、二苯庚烷类等化学成分,具有神经保护、提高学习记忆、抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、抗炎、强心和镇静催眠等作用^[3-6],其中抗氧化为其重要的活性之一,与神经保护、提高学习记忆和抗衰老等作用关系密切^[3],但目前关于其抗氧化活性成分研究的报道较少,相关成分不太明确^[4,7]。长期以来,对益智的质量控制研究大多采用UV、HPLC等技术以总黄酮^[8]、总多糖^[9]或部分有效成分为指标的定量测定^[10-14],或以TLC^[15]、IR^[16]、GC-MS^[17]、HPLC^[18]和UPLC^[19]指纹图谱定性检测为主,但这些研究以单纯的化学分析居多,而与药效结合的整体性、联系性探索较少,也未见有对益智仁HPLC指纹图谱与其活性相关性的报道。基于此,本实验对不同来源的益智仁进行了HPLC指纹图谱研究,并以其抗氧化活性为切入点,采用灰色关联度分析法研究指纹图谱色谱峰与清除DPPH自由基作用的关系,以期初步探寻其抗氧化物质基础,并为更好地控制益智仁质量提供一定依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1220 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Sartorius BP211D AG 电子天平(德国赛多利斯公司);KQ3200 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Epoch 微孔板分光光度计(美国BioTek公司)。

1.2 试药 圆柚酮、1,1-二苯基苦基苯肼(美国Sigma公司,批号分别为101340870、034K1071,含量>99%);白杨素(中国食品药品检定研究院,批号111701-200501);杨芽黄素(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号Y-193-150703,含量>

98%);维生素C(成都科龙化学试剂厂,批号20130516,含量≥99.7%)。磷酸、甲醇为分析纯;乙腈为色谱纯;水为超纯水(自制)。

1.3 药材 益智仁分别购自海南益智种植基地(编号s1~s3,s5)以及四川或广东的药厂(s4,s6~s10),经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq 的干燥成熟果实,具体见表1。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

样品	来源	样品	来源
s1	海南万宁	s6	B药厂(产地海南)
s2	海南琼中	s7	B药厂(产地广东)
s3	海南万宁	s8	C药厂(产地海南)
s4	A药厂(产地海南)	s9	B药厂(产地广西)
s5	海南屯昌	s10	D药厂(产地广西)

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 精密称取益智药材粗粉1g,置于具塞锥形瓶中,精密加入20mL甲醇,称定质量,超声30min,放冷,甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取白杨素、杨芽黄素和圆柚酮对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为0.462、2.189和16.128μg/mL的混合对照品溶液,即得。

2.2 指纹图谱建立

2.2.1 HPLC 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6mm×250mm,5μm);流动相乙腈(A)-0.4%磷酸水(B),梯度洗脱(0~15min,35%A;15~32min,35%~70%A;32~48min,70%~77%A);体积流量0.6mL/min;柱温35℃;检测波长250nm;进样量20μL。

2.2.2 方法学考察

2.2.2.1 精密度试验 取s1样品,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条

件下连续进样6次，以圆柚酮色谱峰（S）为参照峰，测得各主要色谱峰相对保留时间和峰面积RSD值均小于5%，表明仪器精密度良好。

2.2.2.2 稳定性试验 取 s1 样品，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，于0、2、4、8、12、24 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样，以圆柚酮色谱峰（S）为参照峰，测得各主要色谱峰相对保留时间和峰面积RSD值均小于5%，表明溶液在24 h 内稳定。

2.2.2.3 重复性试验 取 s1 样品，按“2.1.1”项

下方法制备5份供试品溶液，以圆柚酮色谱峰（S）为参照峰，测得各主要色谱峰相对保留时间和峰面积RSD值均小于5%，表明该方法重复性良好。

2.2.3 指纹图谱测定 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，分别吸取各供试品和对照品混合溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定，记录48 min 内色谱图，采用国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统（2004A）》软件，选取中位数法手动匹配，得到10批益智仁HPLC指纹图谱间的相似度及对照指纹图谱，结果见表2~3、图1~2。

表 2 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积

Tab. 2 Peak areas of common peaks of HPLC fingerprints

峰号	<i>t_R</i> /min	s1	s2	s3	s4	s5	s6	s7	s8	s9	s10
1	7.099	731.46	396.99	720.47	801.36	720.75	986.52	869.63	994.17	748.36	982.17
2	7.781	706.29	359.95	714.12	796.65	730.64	544.60	466.63	857.48	616.28	638.59
3	10.068	455.55	273.16	470.18	521.17	482.14	339.10	279.91	468.09	383.38	379.40
4	10.829	850.03	589.82	814.04	911.29	861.44	775.53	668.19	853.93	416.94	765.90
5	12.719	576.22	392.07	571.30	637.05	581.31	663.06	573.76	703.78	509.66	676.42
6	13.858	336.66	256.33	325.72	361.67	329.95	441.56	386.37	435.73	316.37	486.40
7	16.464	975.33	586.83	864.02	1 033.33	864.50	1 046.19	860.91	968.31	809.55	937.93
8	21.963	300.33	219.82	295.45	335.21	300.90	352.93	299.63	394.12	284.16	385.40
9	27.218	284.61	199.07	284.85	328.56	286.39	328.92	279.70	344.40	360.41	398.97
10	27.820	253.08	166.68	241.13	266.62	244.43	289.34	259.32	311.29	239.82	327.62
11	29.403	463.42	314.43	384.25	413.62	384.09	474.74	405.09	252.86	163.94	309.72
12	30.041	235.32	258.94	250.60	274.90	254.20	171.00	147.94	341.95	177.57	116.98
13	30.537	322.32	208.76	306.47	341.89	306.64	450.39	436.55	386.62	355.38	530.16
14	30.814	316.35	222.09	311.06	356.76	319.10	375.51	378.30	391.82	338.28	450.55
15	31.192	335.95	211.49	323.82	366.50	349.24	226.72	247.08	259.95	222.13	167.18
16	33.550	296.42	244.78	291.13	330.22	289.36	296.75	263.65	335.88	237.31	287.13
17	37.737	389.13	321.52	420.41	455.73	411.46	266.37	231.36	523.74	159.44	222.33
18	38.115	257.72	359.19	271.85	296.64	275.19	218.19	202.51	514.10	194.93	201.04
19	39.015	368.95	354.59	385.06	423.62	380.92	346.36	297.49	475.03	295.42	351.81
20	39.634	1 144.31	874.89	1 137.38	1 297.47	1 183.97	970.20	804.48	1 268.30	848.97	1 012.46
21	40.370	8 499.67	5 812.34	8 205.26	9 156.04	8 392.00	8 358.91	7 444.48	9 347.18	7 058.87	8 352.29
22	41.557	1 176.68	1 994.93	3 929.79	3 118.80	3 335.45	1 475.10	1 147.25	3 175.54	2 040.19	1 613.95
23	42.367	1 273.69	1 258.89	1 751.92	2 218.98	1 795.24	1 262.88	801.82	1 768.40	1 140.40	1 232.71
24	44.374	683.86	476.48	655.67	769.22	712.84	611.96	525.95	737.47	298.50	577.15

表 3 HPLC 指纹图谱相似度

Tab. 3 Similarities of HPLC fingerprints

样品	相似度	样品	相似度
s1	0.983	s6	0.977
s2	0.992	s7	0.974
s3	0.979	s8	0.995
s4	0.993	s9	0.997
s5	0.989	s10	0.997

2.2.4 聚类分析 将10批HPLC指纹图谱中各峰的峰面积导入SPSS13.0软件，采用Ward法，Squared Euclidean distance聚类。结果，10批样品聚为两类，第一类包括s1~s5，第二类包括s6~s10，见图3。

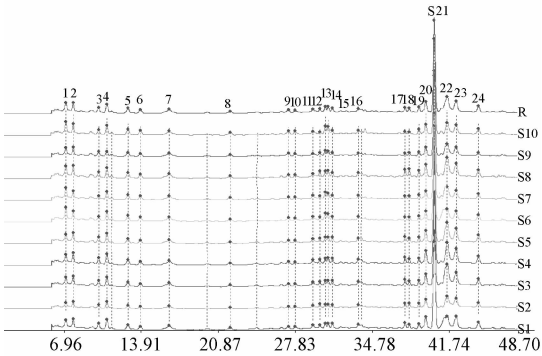
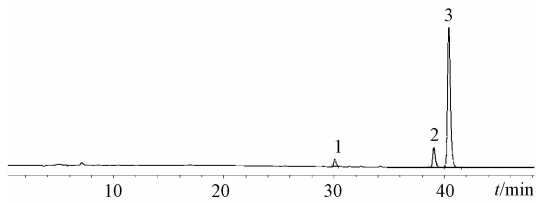


图 1 10 批样品指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of samples



1. 白杨素 2. 杨芽黄素 3. 圆柚酮
1. chrysin 2. tectochrysin 3. nootkatone

图 2 对照品 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of reference substances

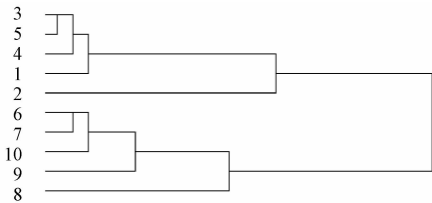


图 3 聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis

2.2.5 主成分分析 以 10 批 HPLC 指纹图谱中的 24 个共有峰的峰面积为变量^[20]，采用 SPSS13.0 软件对其进行原始数据标准化处理及主成分分析。结果显示，第一主成分的特征值 λ_1 为 11.914，方差贡献率为 49.641%；第二主成分的特征值 λ_2 为 7.586，方差贡献率为 31.308%；第三主成分的特征值 λ_3 为 2.157，方差贡献率为 8.986%；第四主成分的特征值 λ_4 为 1.409，方差贡献率为 5.876%。前 3 个主成分的累积方差贡献率已达到 90.235%（大于 85%），故可用这 3 个新变量替代原有的 24 个变量。

将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值，并开平方根，得到两个主成分中每个指标所对应的系数。经计算，得主成分的模型为

$$F_1 = 0.184\ 5X_1 + 0.256\ 4X_2 + 0.228\ 3X_3 + 0.246\ 0X_4 + 0.250\ 6X_5 + 0.164\ 0X_6 + 0.234\ 7X_7 + 0.231\ 8X_8 + 0.142\ 8X_9 + 0.270\ 4X_{10} + 0.017\ 3X_{11} + 0.125\ 7X_{12} + 0.091\ 6X_{13} + 0.156\ 7X_{14} + 0.136\ 5X_{15} + 0.280\ 8X_{16} + 0.202\ 8X_{17} + 0.114\ 7X_{18} + 0.232\ 1X_{19} + 0.256\ 4X_{20} + 0.283\ 3X_{21} + 0.134\ 7X_{22} + 0.203\ 7X_{23} + 0.246\ 8X_{24}。$$

$$F_2 = 0.266\ 5X_1 - 0.059\ 2X_2 - 0.137\ 2X_3 - 0.080\ 6X_4 + 0.177\ 5X_5 + 0.282\ 1X_6 + 0.142\ 3X_7 + 0.202\ 6X_8 + 0.255\ 2X_9 + 0.249\ 1X_{10} - 0.026\ 5X_{11} - 0.291\ 9X_{12} + 0.341\ 3X_{13} + 0.295\ 5X_{14} - 0.233\ 8X_{15} -$$

$$0.038\ 5X_{16} - 0.244\ 7X_{17} - 0.191\ 7X_{18} - 0.165\ 9X_{19} - 0.156\ 1X_{20} + 0.042\ 1X_{21} - 0.217\ 8X_{22} - 0.207\ 3X_{23} - 0.115\ 8X_{24}。$$

$$F_3 = -0.030\ 0X_1 - 0.140\ 9X_2 - 0.033\ 4X_3 + 0.273\ 7X_4 + 0.008\ 9X_5 - 0.027\ 9X_6 + 0.202\ 9X_7 - 0.117\ 8X_8 - 0.234\ 2X_9 - 0.066\ 1X_{10} + 0.641\ 4X_{11} - 0.191\ 3X_{12} + 0.014\ 3X_{13} - 0.070\ 1X_{14} + 0.278\ 5X_{15} + 0.055\ 8X_{16} - 0.012\ 9X_{17} - 0.334\ 3X_{18} - 0.167\ 5X_{19} - 0.004\ 8X_{20} + 0.062\ 6X_{21} - 0.230\ 8X_{22} - 0.076\ 9X_{23} + 0.225\ 4X_{24}。$$

其中， X_1 、 X_2 、 \cdots 、 X_{24} 为指纹图谱对应共有色谱峰 x_1 、 x_2 、 \cdots 、 x_{24} 峰面积的标准化值。

在 3 个主成分中，第一主成分特征值最大，贡献率最高，信息量最全面。其中，21 号色谱峰（圆柚酮）的系数最大，表明其在益智仁质量控制中有相对重要的作用，结合文献 [4]，可以将其作为益智仁质量控制的指标之一。

根据 3 个主成分模型，分别计算 10 批益智仁主成分得分，得到 3 维图，见图 4。

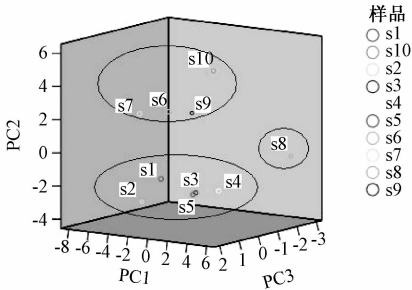


图 4 PCA 得分图
Fig. 4 PCA score plot

2.3 DPPH 法测定抗氧化活性

2.3.1 溶液配制 称取 DPPH 适量，加甲醇配成 110 $\mu\text{mol/L}$ 溶液，避光保存。再精密称取维生素 C 适量，加甲醇制成 50 $\mu\text{g/mL}$ 溶液，避光保存。

2.3.2 DPPH 自由基清除作用 参考文献 [21]，按“2.1.1”项下方法提取样品，甲醇稀释成不同质量浓度（相当于生药量）的供试品溶液。取 0.15 mL，与 0.15 mL DPPH 溶液置于 96 孔板上，混匀后室温避光放置 60 min，517 nm 波长处测定吸收度 A_i ，同时测定 0.15 mL 甲醇与 0.15 mL DPPH 溶液 A_0 ，设置 6 个复孔，计算清除率，公式为清除率 = $(1 - A_i/A_0) \times 100\%$ 。以清除率 (Y) 对药物质量浓度 (X) 进行回归，求出清除率为 50% 时药物的质量浓度 (IC_{50})，结果见表 5。

另取阳性对照维生素 C 母液，分别稀释成 1、2、3、4 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 溶液，同法测得清除率分别为 8.97%、30.04%、50.07%、69.51% 和 88.94%。并以清除率（ Y ）对药物质量浓度（ X ）进行方程

回归，求得阳性对照维生素 C 的 IC_{50} 值为 3.025 $\mu\text{g/mL}$ 。

从结果来看，10 批益智样品均具有清除 DPPH 自由基的活性，但均低于维生素 C。

表 5 10 批样品抗氧化活性

Tab. 5 Antioxidant activities of ten batches of samples

样品	清除率/%										$\text{IC}_{50}/$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
	2.500 mg/mL	1.250 mg/mL	0.833 mg/mL	0.625 mg/mL	0.417 mg/mL	0.313 mg/mL	0.208 mg/mL	0.156 mg/mL	0.125 mg/mL	0.104 mg/mL	
s1	—	—	—	—	80.69	64.14	43.84	31.86	28.60	20.11	0.220
s2	—	—	—	91.24	80.03	68.12	45.78	35.33	26.80	—	0.218
s3	—	—	—	—	89.32	68.56	47.2	35.73	27.36	21.49	0.202
s4	—	—	—	—	92.29	80.82	54.52	42.91	35.27	30.06	0.172
s5	92.34	67.41	49.11	39.06	28.94	21.65	—	—	—	—	0.778
s6	90.63	65.48	48.59	39.73	28.42	22.54	—	—	—	—	0.791
s7	89.98	61.7	45.94	35.79	23.53	21.42	—	—	—	—	0.858
s8	—	91.64	85.81	66.47	49.59	39.43	26.29	—	—	—	0.396
s9	—	79.69	63.93	55.56	40.78	30.17	19.12	—	—	—	0.538
s10	—	86.15	73.77	62.43	42.65	31.82	20.77	—	—	—	0.473

2.4 灰色关联度分析 参考文献 [22]，以益智仁清除 DPPH 自由基活性 IC_{50} 为母序列，HPLC 指纹图谱各共有峰峰面积为子序列，分辨系数 ρ 取 0.5，进行灰色关联度分析。结果，各色谱峰对清除 DPPH 自由基的贡献大小依次为 $x_{13} > x_1 > x_9 > x_7 > x_{14} > x_{21} > x_5 > x_{10} > x_2 > x_6 > x_8 > x_{16} > x_3 > x_4 > x_{11} > x_{20} > x_{22} > x_{19} > x_{15} > x_{24} > x_{23} > x_{18} > x_{12} > x_{17}$ ，见表 6。

表 6 灰色关联度分析结果

Tab. 6 Results of grey relational grade analysis

关联序	色谱峰	关联度	关联序	色谱峰	关联度
1	x_{13}	0.638	13	x_3	0.593
2	x_1	0.636	14	x_4	0.586
3	x_9	0.632	15	x_{11}	0.586
4	x_7	0.625	16	x_{20}	0.578
5	x_{14}	0.618	17	x_{22}	0.577
6	x_{21}	0.610	18	x_{19}	0.570
7	x_5	0.608	19	x_{15}	0.570
8	x_{10}	0.607	20	x_{24}	0.568
9	x_2	0.605	21	x_{23}	0.559
10	x_6	0.604	22	x_{18}	0.510
11	x_8	0.600	23	x_{12}	0.504
12	x_{16}	0.595	24	x_{17}	0.499

3 讨论

益智化学成分复杂，富含萜类、二苯庚烷类等小极性成分，分析难度较大^[3,4]。因此，本实验重点考察了影响 HPLC 分离效果的几个主要因素，如流动相（甲醇-水、甲醇-0.4% 磷酸水、乙腈-水和乙腈-0.4% 磷酸水）、体积流量（0.6、0.8 和 1 mL/min ）、柱温（25、30、35 和 40 $^{\circ}\text{C}$ ）。最后

确定，以柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ，流动相乙腈-0.4% 磷酸水，体积流量 0.6 mL/min 梯度洗脱，此时指纹图谱中色谱峰数量多，主要色谱峰分离度好，而且分析时间合适。

建立了 10 批益智仁指纹图谱，并确定了 24 个共有峰。相似度分析显示，10 批指纹图谱整体面貌相似（相似度在 0.970 以上），内在质量相对一致，仅成分含有量有差异。聚类分析结果显示，10 批益智仁大致分为 2 类，其中采集于海南万宁（s1、s2）、海南琼中（s4）、海南昌屯（s5）与购于 A 药厂（s4）的样品聚为一类，而购自 B 药厂（s6、s7 和 s9）、C 药厂（s8）以及 D 药厂（s10）聚为另外一类。聚类结果与产地无明显相关性，推测可能与加工、储藏等因素有关，但由于样品数量较少、信息量有限，具体原因值得进一步研究。PCA 分析结果显示，10 批 HPLC 指纹图谱 24 个共有峰中提取了 3 个主成分，其投影除 s8 外，与聚类分析结果较为一致，两种分析方法相互印证。

目前，中药谱效关系的分析方法很多^[23-24]，尚不统一，如主成分分析、相关分析、典型相关分析、多元线性回归分析、逐步回归分析、灰色关联度分析、聚类分析等等。其中，灰色关联度分析为最常用的方法之一，是根据因素之间发展趋势的相似或相异程度，亦即“灰色关联度”，作为衡量因素间关联程度的一种方法，可描述系统发展过程中因素间相对变化的情况，如果两者在发展过程中的相对变化基本一致，则认为关联度大，反之则关联

度小^[23-24]。

采用灰色关联度分析法,研究了益智仁 HPLC 指纹图谱共有色谱峰与抗氧化活性之间的关系,发现均有不同程度的关联度,在 0.636~0.499 之间,表明益智仁抗氧化作用是多成分共同起效的结果。其中,12、19 和 21 号色谱峰分别是白杨素、杨芽黄素和圆柚酮,但其他成分,特别是对益智仁抗氧化活性贡献较大的 13、1、9、7 和 14 号色谱峰各代表什么成分,究竟起到了怎样的作用,还有待于进一步研究。

本实验在建立益智仁 HPLC 指纹图谱的基础上,采用化学计量学方法对其进行了评价,并进一步采用灰色关联度分析法研究了其化学信息“谱”和抗氧化活性信息“效”之间的关系,为寻找益智仁抗氧化活性的物质基础以及其质量综合评价提供了一定的科学依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 291.

[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知 [EB/OL]. (2002.02.28) [2002-03-11]. <http://www.moh.gov.cn/zhuzhan/wsbmgz/201304/e33435ce0d894051b15490aa3219cd c4.shtml>.

[3] 陈 萍, 王培培, 焦泽沼, 等. 益智仁的化学成分及药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 617-623.

[4] 张俊清, 王 勇, 陈 峰, 等. 益智的化学成分与药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 280-287.

[5] 谢彬彬, 侯 蕾, 郭宝林, 等. 中药益智正丁醇萃取部位的化学成分研究[J]. 药学报, 2014, 49(11): 1569-1573.

[6] 刘 冰, 于宏伟, 李 梅, 等. 益智仁镇静催眠活性部位的筛选[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 53-55.

[7] 樊 伟. 益智仁抗氧化和抗肿瘤成分的分离与活性研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2014.

[8] 吴德玲, 金传山, 刘金旗, 等. 益智仁中总黄酮含量测定

[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(6): 38-40.

[9] 吴德玲, 金传山, 马 凯, 等. 益智仁中多糖的含量测定 [J]. 安徽医药, 2007, 11(3): 218-219.

[10] 吕秀香, 侯 蕾, 黄文华, 等. 益智中 2 种倍半萜类成分的含量研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2589-2593.

[11] 李兴华, 胡昌江, 李文兵, 等. 益智药材中圆柚酮含量的高效液相色谱法测定 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 49-50.

[12] 李永辉, 赖伟勇, 黄莎莎, 等. RP-HPLC 法测定不同生长期益智药材中圆柚酮和益智酮甲的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 808-811.

[13] 王俊芳, 赖伟勇, 蔡红蝶, 等. SPE-HPLC 法测定益智果实中 3 种化合物的含量 [J]. 海南医学院学报, 2014, 20(10): 1316-1319.

[14] 常艳波, 黄 凌, 朱 毅. 气相色谱法测定益智挥发油中 *p*-聚伞花烃的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1333-1335.

[15] 龙兰艳, 胡昌江, 李文兵, 等. 益智仁挥发油薄层指纹图谱研究[J]. 成都中医药大学学报, 2012, 35(1): 58-59, 73.

[16] 刘 红, 韩长日, 刘红霞, 等. 益智红外指纹图谱的研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(11): 2557-2560.

[17] 刘 红, 邹 童, 张连华, 等. 益智挥发油的气相指纹图谱的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(36): 15961-15962, 15997.

[18] 李文兵, 胡昌江, 李兴华, 等. 益智仁盐炙前后指纹图谱对比研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 305-306.

[19] 刘 冰, 蒋 波, 廖争争, 等. 益智仁的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2015, 46(6): 906-911.

[20] 潘伟东, 杜义龙, 赵胜男, 等. 韩信草的高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 250-254.

[21] 恽祥惠, 邢丽娜, 李 云, 等. 建立基于 96 孔板检测的 FRAP 法和 DPPH 法及其在橘核抗氧化活性研究中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(5): 1275-1278.

[22] 李生茂, 曾滨阳, 叶 强, 等. 砂仁挥发油抗炎活性谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 133-136.

[23] 秦昆明, 郑礼娟, 沈保家, 等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1): 26-31.

[24] 张 慧, 海广范, 栗志勇, 等. 白芷中抗内毒素血症有效组分的谱效关系 [J]. 中成药, 2014, 36(12): 2491-2497.