

本文引用:王志辉,周新茹,成惠珍,王智,童巧珍,周日宝,刘湘丹. 基于多元统计分析的山银花抗氧化与抑菌质量标志物预测[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(7): 1105-1111.

基于多元统计分析的山银花抗氧化与 抑菌质量标志物预测

王志辉^{1,2},周新茹^{1,2},成惠珍¹,王智^{1,2},童巧珍^{1,2},周日宝^{1,2,3*},刘湘丹^{1,2,3*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点研究室,湖南长沙410208;
3.湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室,湖南长沙410208)

〔摘要〕目的 建立灰毡毛忍冬抗氧化和抑菌谱-效关系质量评价系统,初步筛选出与抗氧化和抑菌药效相关的质量标志物。方法 收集湖南各产地灰毡毛忍冬样品共20份,采用HPLC建立指纹图谱,并测定各样品的抗氧化和抑菌效果,通过SPSS 23.0软件对药效指标和共有峰面积进行偏最小二乘法回归、灰色关联度和相关性分析。结果 关联度法分析得出3、12号峰与抗氧化和抑菌均有很强的相关性,偏最小二乘法回归系数可知2、3号峰与抗氧化效果相关性强,2、3、5、7、9、13、17、18号峰成分与抑菌效果相关性强,由双变量相关性分析可知3号峰与抗氧化效果显著相关,4、11和12号峰与抑菌效果显著相关,经对照品指认3号峰为绿原酸,7号峰为咖啡酸,11号峰为异绿原酸B,12号峰为异绿原酸A,17号峰为灰毡毛忍冬皂苷甲,18号峰为川续断皂苷乙,2、5、9、13号峰成分有待进一步确认。结论 多种分析方法分析了山银花抗氧化和抑菌的“谱-效”和“量-效”关系,结果一致,预测有机酸类为抗氧化药效的质量标志物,皂苷和有机酸类为抑菌的质量标志物。

〔关键词〕 灰毡毛忍冬;抗氧化;抑菌;谱-效关系;量-效关系;质量标志物

〔中图分类号〕R284.1 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.009

Prediction of antioxidant and antibacterial quality markers of *Flos Ionicerae* based on multivariate statistical analysis

WANG Zhihui^{1,2}, ZHOU Xinru^{1,2}, CHENG Huizhen¹, WANG Zhi^{1,2}, TONG Qiaozhen^{1,2}, ZHOU Ribao^{1,2,3*}, LIU Xiangdan^{1,2,3*}

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Research Office of Germplasm Resources and Standardized Planting of Medicinal Materials of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China;
3. Key Laboratory of Modern Research of TCM, Education Department of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 **Objective** To establish a quality evaluation system for the antioxidant and antibacterial spectrum-effect relationship of *Ionicera macrocarpa*, and preliminarily screen the quality markers related to antioxidant and antibacterial. **Methods** A total of 20 samples of *Ionicera macrocarpa* from various places in Hunan were collected. HPLC fingerprints were established, and the antioxidant and antibacterial effects of each sample were determined. The pharmacodynamic indexes and common peak areas were analyzed by partial least square regression, grey correlation and correlation analysis using SPSS software. **Results** The correlation degree analysis showed that peaks 3 and 12 were strongly correlated with antioxidant and antibacterial. The

〔收稿日期〕2021-12-01

〔基金项目〕国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-21);湖南省现代农业产业技术体系建设项目;2022湖南省中医药科研计划项目(D2022138);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30479,2021JJ30515);2020年湖南省一流专业建设点:中药资源与开发;2020中药学一流学科开放基金(2020ZYX02);湖南省中医药管理局湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点实验室;湖南省科技创新平台与人才计划-科技特派员创新创业项目(2020NK4231)。

〔第一作者〕王志辉,女,助教,硕士,主要从事中药资源与质量评价研究。

〔通信作者〕*刘湘丹,女,副教授,博士,E-mail:513387919@qq.com;周日宝,男,教授,博士,E-mail:1057323510@qq.com。

regression coefficient of partial least square regression showed that peaks 2 and 3 were strongly correlated with antioxidant effect, and the components of peaks 2, 3, 5, 7, 9, 13, 17 and 18 were strongly correlated with antibacterial effect. The bivariate correlation analysis showed that peak 3 was significantly correlated with antioxidant effect, and peaks 4, 11 and 12 were significantly correlated with antibacterial effect. According to the reference substance, peak 3 was chlorogenic acid, peak 7 was caffeic acid, peak 11 was isochlorogenic acid B, peak 12 was isochlorogenic acid A, peak 17 was lonicera macranthoides saponin A, peak 18 was dipsacus saponin B, and the components of peaks 2, 5, 9 and 13 needed to be further confirmed. **Conclusion** The "spectrum-effect" and "dose-effect" relationships between antioxidant and antibacterial of Flos lonicerae are analyzed by various analytical methods. The results are consistent and mutually confirmed. It is predicted that organic acids are the quality markers of antioxidant, saponins and organic acids are the quality markers of antibacterial.

[**Keywords**] lonicera macranthoides; antioxidant; antibacterial; spectrum-effect relationship; dose-effect relationship; quality marker

山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.)、红腺忍冬(*Lonicera hypoglauca* Miq.)、华南忍冬(*Lonicera confusa* DC.)、黄褐毛忍冬(*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S.C.Cheng)的干燥花蕾或带初开的花^[1]。山银花具有清热解毒、疏散风热的功效,含有有机酸、黄酮类和皂苷等多种化学成分,现代药理研究表明其具有抗氧化、抑菌、保肝和抗炎等多种生理活性^[2],其中抗氧化和抑菌是山银花的主要现代药理作用,用于治疗痈肿疮毒、热毒血痢、风热感冒等症,是银翘解毒片、银花口服液、维C银翘片等多种中成药的主要原料^[3-6]。近年来,山银花还广泛应用于食品、饮料、保健品、化妆品和兽药等方面,市场前景广阔。灰毡毛忍冬于2010版《中华人民共和国药典》首次收藏在山银花项下^[7],是湖南省山银花药材种植的主要品种,湖南山银花年产量已达1.5万吨,占全国山银花总产量的75%。但目前对山银花的研究大多集中在药效成分和药理作用方面,缺乏针对其多靶点药效作用的质量控制标准^[8-10],这在很大程度上制约了湖南省山银花产业的发展。

2009年,肖小河研究员在中国药学会学术年会提出了中药“大质量观”概念,强调生物评价在中药质量评价方面的重要性^[11]。2016年,刘昌孝院士提出中药质量标志物的新概念,针对中药的生物属性、制造过程等自身医药体系的特点,中药材质量标准应以体现药效的物质成分为基础,从而更科学地反映药材内在质量的差别^[12]。因此,药效评价将成为更科学、更前沿的中药材质量评价方法^[13]。

高效液相指纹图谱克服了用单一指标评价质量的局限性,实现了较全面的化学组分分析,是目前最常用的质量控制方法之一^[14-16],本文拟建立湘产山银花指纹图谱和抗氧化、抑菌药效评价体系,结合灰色关联度法、偏最小二乘回归分析和双变量相关分

析等多元统计方法^[17-18]分析湘产山银花发挥抗氧化和抑菌药效的物质基础,以期为山银花的临床用药、药材质量标准的制定提供科学依据。

1 材料

1.1 供试材料

山银花样品经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为灰毡毛忍冬的干燥花蕾,共20份。具体样品信息见表1。

表1 山银花样品信息

编号	来源	编号	来源
1	市售	11	隆回
2	市售	12	隆回
3	市售	13	溆浦
4	市售	14	溆浦
5	市售	15	溆浦
6	市售	16	溆浦
7	市售	17	溆浦
8	市售	18	溆浦
9	隆回	19	溆浦
10	隆回	20	溆浦

1.2 仪器与试剂

Agilent 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司, Agilent Technologies 1260 Infinity, G1314F 紫外检测器, G1239B 自动进样器); 色谱柱(Agilent ZORBAX SB-phenyl 4.6 mm×250 mm, 5-Micron); 数控超声波清洗器(宁波新芝生物科技有限公司, 型号:SB25-12DT); 超纯水机(山东京申分析仪器有限公司, UPA-20); 紫外分光光度计(上海棱光技术有限公司, 722SP); 生化培养箱(青岛景弘环保科技有限公司, 型号:JH-100A); 高速万能粉碎机(型号:FW-100, 北京科伟永兴仪器有限公司); 分析天平(型号:PL203, 梅特勒-托利多仪器有限公司); 电热恒温鼓风烘干箱(型号:DH-420AB, 北京中兴伟

业仪器有限公司)。

绿原酸(批号:18071907)、新绿原酸(批号:19081403)、木犀草苷(批号:20060301)、灰毡毛忍冬皂苷乙(批号:20072203)、川续断皂苷乙(批号:19120601)、灰毡毛忍冬皂苷甲(批号:18120403)、咖啡酸(批号:20110501)、异绿原酸A(批号:21032304)、异绿原酸B(批号:21022308)纯度均 $\geq 98\%$,均购自成都普非德生物技术有限公司。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(合肥巴斯夫生物科技有限公司);金黄色葡萄球菌CMCC(B)26003(北京索莱宝科技有限公司);乙腈、磷酸、甲醇均为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 指纹图谱

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密吸取绿原酸、新绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、木犀草苷、咖啡酸、灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙、獐牙菜苷,分别置于10个5 mL量瓶中,以70%甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得各系列混合对照品溶液:绿原酸(1.830 mg/mL)、新绿原酸(0.012 mg/mL)、异绿原酸A(1.050 mg/mL)、异绿原酸B(0.108 mg/mL)、木犀草苷(0.049 mg/mL)、咖啡酸(0.120 mg/mL)、灰毡毛忍冬皂苷甲(0.300 mg/mL)、灰毡毛忍冬皂苷乙(0.500 mg/mL)、川续断皂苷乙(1.900 mg/mL)、獐牙菜苷(1.060 mg/mL)。

2.1.2 供试品溶液的制备 取灰毡毛忍冬粉末约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,密封,称定重量,静置12 h,超声处理30 min(20 ℃,频率40 kHz),放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.3 色谱条件 以乙腈为流动相A,0.4%磷酸水为流动相B,梯度洗脱(0~15 min,10% A; 15~17 min,10%~12% A;17~20 min,12%~15.4% A;20~22 min,15.4%~21.4% A;22~34 min,21.4%~21.8% A; 34~40 min,21.8%~30% A;40~60 min,30% A);流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL ;柱温为25 ℃;检测波长为210 nm。

2.1.4 精密度试验 同一供试品连续进样6次,按“2.1.3”项色谱条件测定。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,按“2.1.3”项色谱条件,分别于0、2、4、8、12、16、20、24 h测定。

2.1.6 重复性试验 取同一供试品制备6份供试品溶液,按“2.1.3”项色谱条件测定。

2.1.7 指纹图谱分析 按照“2.1.2”项下方法制备20批灰毡毛忍冬供试品溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件对样品依次进行检测,记录指纹图谱,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)建立20批灰毡毛忍冬特征图谱,并进行相似度分析。

2.2 体外药效实验

2.2.1 抑菌活性试验 将金黄色葡萄球菌菌液20 μL 注入平板培养基中,混合均匀,倾注平板20 mL,水平静置凝固后备用,抑菌用供试溶液同“2.1.2”项制备方法,用已灭菌的钢管在实验平板上打孔,往孔中注入50 μL 供试品溶液,以青霉素为阳性对照组,70%甲醇为空白对照组,每组重复3次,4 ℃预扩散2 h,37 ℃培养24 h,取出培养好的平板,用游标卡尺测量抑菌圈直径,抑菌效果以抑菌圈直径大小表示。

2.2.2 抗氧化活性测定 精密移取1 mL供试品溶液与4 mL DPPH溶液于试管中,摇匀,避光处理30 min,于517 nm波长处测定吸光度值 A_1 。同法测得供试品溶液与60%乙醇吸光度值 A_1 、60%乙醇与4 mL DPPH溶液吸光度值 A_0 。计算清除率 $[1-(A_1-A_0)/A_0]$ 。分别测得各样品的抗氧化活性,以DPPH清除率表示。

2.3 数据处理与统计学分析

2.3.1 谱效关系分析 采用SPSS 23.0在线分析软件对20批灰毡毛忍冬的18个指纹图谱共有峰的相对峰面积数据和抑菌率药效指标值进行灰色关联分析,研究两者之间的相关性。通过计算子序列(灰毡毛忍冬各化学成分)与母序列(抗氧化率和抑菌圈直径)之间的关联度来确定灰毡毛忍冬提取物各成分对DPPH清除率和金黄色葡萄球菌的抑制作用影响程度;以共有峰面积为自变量(X),DPPH清除率、抑菌圈直径为因变量(Y),采用偏最小二乘法回归分析对二者进行谱效关系分析。

2.3.2 相关性分析 采用SPSS 23.0软件中双变量相关分析处理方法,计算20批灰毡毛忍冬提取物的18个指纹图谱共有峰的相对峰面积和抑菌率药效指标值的Pearson相关系数。

2.4 含量测定

分别取“2.1.1”项下10个不同对照品溶液,加甲醇稀释制得6个不同质量浓度的对照品溶液,以峰面积为纵坐标、质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标建立线性回归方程。

3 结果与分析

3.1 方法学考察

同一供试品连续进样6次,各峰面积RSD在

0.009 5%~0.228 7%之间,说明仪器精密度良好,同一供试品分别于 0、2、4、8、12、16、20、24 h 进样,测定各峰面积 RSD 在 0.004 0%~0.194 6%之间,表明供试品在 24 h 之内稳定,同一供试品重复制备 6 份,测定各峰面积 RSD 在 0.003 8%~0.136 5%之间,表明本方法重复性良好。

3.2 HPLC 指纹图谱的建立

采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)建立 20 批山银花指纹图谱,结果见图 1。选取时间宽度为 0.1 min,以平均数生成对照图谱,经过多点校正后自动匹配,确定 18 个特征峰作为评价的变量指标(X)。并用混合对照品(图 2)对特征峰进行指认,确定 1、3、7、8、10、11、12、16、17、18 号峰分别为新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、獐芽菜苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、灰毡毛忍冬皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙。

3.3 体外药效结果

70%甲醇的抑菌圈为直径 0 mm,青霉素的抑菌圈为直径 12.67 mm,灰毡毛忍冬抑菌圈直径在 7.39~

11.40 mm 之间,说明灰毡毛忍冬具有抑菌作用,DPPH 清除率在 65.11%~78.1%之间。详见表 2。

3.4 山银花抗氧化、抑菌“谱-效”关系分析

3.4.1 灰色关联度分析 使用关联度值针对 20 个评价对象进行排序;关联度值介于 0~1 之间,该值越大代表其与“参考值”(母序列)之间的相关性越强。从表 3 可知:针对本次 18 个色谱峰评价项,抗氧化药效关联度中有两个色谱峰关联度大于 0.5,其中 3 号峰的综合评价最高(关联度为 0.980),其次是 12 号峰(关联度为 0.699)。抑菌谱效关联度有两个色谱峰关联度大于 0.5,其中 3 号峰的综合评价最高(关联度为 0.764),其次是 12 号峰(关联度为 0.615)。由此推测绿原酸与异绿原酸 A 是抗氧化活性和抑菌的主要活性成分。

3.4.2 PLS 回归分析 以共有峰面积为自变量(X),DPPH 清除率、抑菌圈直径为因变量(Y),采用偏最小二乘法回归分析对二者进行谱效关系分析,得出自变量 X 关于因变量 Y 的回方程。

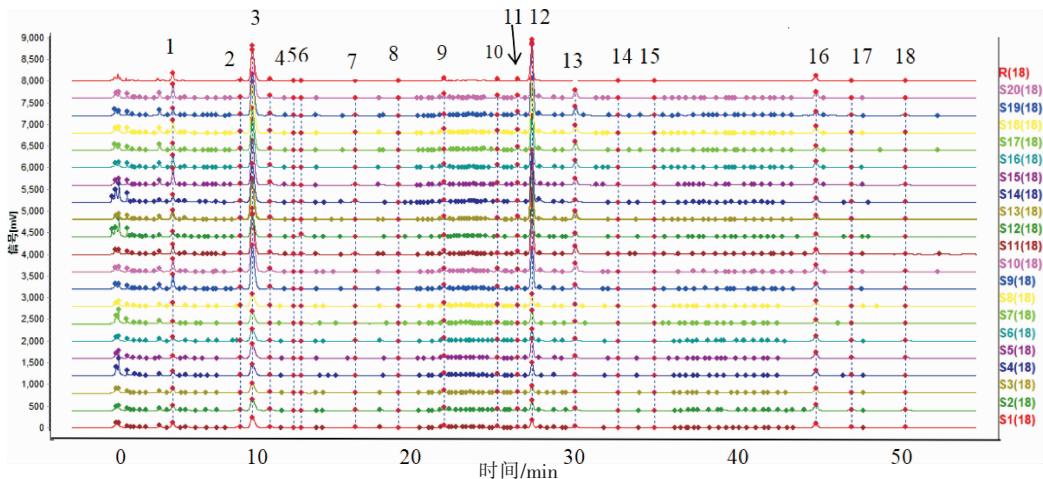


图 1 20 批山银花指纹图谱

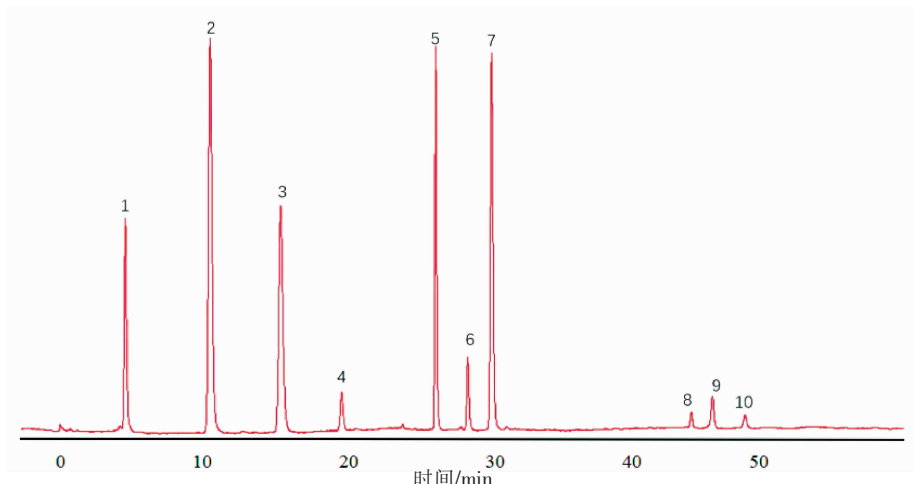


图 2 混合对照品 HPLC 图谱

注:1.新绿原酸;2.绿原酸;3.咖啡酸;4.獐芽菜苷;5.木犀草苷;6.异绿原酸 B;7.异绿原酸 A;8.灰毡毛忍冬皂苷乙;9.灰毡毛忍冬皂苷甲;10.川续断皂苷乙。

表2 灰毡毛忍冬抗氧化、抑菌效果($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品编号	DPPH 清除率/%	抑菌圈直径/mm
1	67.77±0.02	8.58±0.00
2	68.88±0.01	8.39±0.02
3	66.81±0.10	7.55±0.01
4	67.30±0.03	9.19±0.02
5	76.17±0.01	9.12±0.03
6	68.88±0.05	10.03±0.24
7	69.84±0.12	9.54±0.00
8	66.82±0.11	7.39±0.02
9	70.54±0.10	8.56±0.14
10	73.80±0.13	7.88±0.00
11	65.11±0.01	8.32±0.00
12	67.58±0.02	9.00±0.00
13	65.60±0.03	11.40±0.01
14	74.25±0.02	10.51±0.00
15	67.73±0.14	9.70±0.20
16	76.84±0.05	8.24±0.00
17	67.28±0.11	10.59±0.18
18	78.52±0.06	10.50±0.14
19	71.62±0.09	9.84±0.34
20	78.10±0.03	9.10±0.00

表3 体外药效与色谱图谱的关联度

色谱峰 编号	抗氧化		抑菌		成分
	关联度	排名	关联度	排名	
1	0.421	3	0.446	3	新绿原酸
2	0.383	8	0.415	8	—
3	0.980	1	0.764	1	绿原酸
4	0.383	7	0.416	6	—
5	0.369	15	0.404	15	—
6	0.370	14	0.405	14	—
7	0.373	11	0.407	11	咖啡酸
8	0.367	17	0.403	17	獐牙菜苷
9	0.384	6	0.416	7	—
10	0.378	9	0.411	9	—
11	0.375	10	0.410	10	异绿原酸 B
12	0.699	2	0.615	2	异绿原酸 A
13	0.397	5	0.427	5	—
14	0.367	18	0.403	18	—
15	0.368	16	0.403	16	—
16	0.416	4	0.440	4	灰毡毛忍冬皂苷乙
17	0.371	13	0.406	13	灰毡毛忍冬皂苷甲
18	0.372	12	0.407	12	川续断皂苷乙

DPPH清除率(Y)= $-2.196 \times X_1 + 1.013 \times X_2 + 5.571 \times X_3 - 0.208 \times X_4 - 0.262 \times X_5 + 0.028 \times X_6 + 0.306 \times X_7 + 0.118 \times X_8 + 0.879 \times X_9 - 2.115 \times X_{10} + 0.566 \times X_{11} - 5.709 \times X_{12} + 0.995 \times X_{13} + 0.776 \times X_{14} - 0.101 \times X_{15} + 0.859 \times X_{16} - 0.205 \times X_{17} - 0.293 \times X_{18}$,由图2可知,共有峰2、

3、6、7、8、9、11、13、14、16的回归系数为正数,表明以上成分与抗氧化效果呈正相关。其中2号和3号峰回归系数大于1,说明其与抗氧化效率显著相关。

抑菌圈(Y)= $-3.907 \times X_1 + 8.980 \times X_2 + 23.283 \times X_3 - 10.041 \times X_4 + 2.602 \times X_5 + 0.670 \times X_6 + 1.510 \times X_7 - 0.629 \times X_8 + 2.123 \times X_9 - 7.516 \times X_{10} + 0.879 \times X_{11} - 38.807 \times X_{12} + 22.171 \times X_{13} - 0.980 \times X_{14} + 0.609 \times X_{15} - 0.386 \times X_{16} - 1.486 \times X_{17} + 1.939 \times X_{18}$,可知,共有峰2、3、5、6、7、9、11、13、15、18回归系数为正数,表明以上成分与抑菌效果呈正相关。其中,2、3、5、7、9、13、18号峰回归系数大于1,说明其与抑菌效果显著相关。

3.4.3 色谱峰与药效双变量相关分析 由表4可知,3号峰与抗氧化率呈显著相关($P < 0.05$),4、11和12号峰与抑菌效果呈显著相关($P < 0.05$),其中12号峰呈正相关,4、11号峰呈负相关。

表4 山银花特征峰与药效相关性及偏最小二乘法回归系数

色谱峰编号	Pearson 相关系数	
	DPPH 清除率	抑菌圈直径
1	-0.299	-0.425
2	-0.371	-0.263
3	0.486*	0.066
4	-0.246	-0.450*
5	-0.371	-0.167
6	-0.189	-0.043
7	-0.146	-0.29
8	0.139	-0.036
9	-0.222	-0.263
10	-0.271	-0.377
11	0.102	-0.523*
12	0.201	0.517*
13	0.011	0.292
14	0.039	0.240
15	-0.202	0.293
16	-0.160	-0.304
17	-0.105	-0.185
18	-0.239	-0.333

注:*表示在0.05级别(双尾),相关性显著。

3.5 山银花抗氧化、抑菌“量-效”关系分析

3.5.1 山银花主要化学成分的含量测定 在指纹图谱的色谱条件下,测定20批山银花中10种化学成分的含量,线性关系及方法学考察结果见表5。由表5可知各标准曲线线性关系良好,方法稳定可靠。由表6可知,山银花中绿原酸含量为0.863%~7.142%,不同样品中绿原酸含量差异较大,木犀草苷含量为0.031%~0.092%,灰毡毛忍冬皂苷甲含量为0.007%~

0.103%,新绿原酸含量为1.162%~13.516%,咖啡酸含量为0.007%~0.161%,川续断皂苷乙含量为0.830%~6.791%,灰毡毛忍冬皂苷乙含量为0.350%~10.750%,异绿原酸A含量为0.562%~4.963%,异绿原酸B含量为0.054%~0.201%。

3.5.2 山银花各成分含量与抗氧化、抑菌药效相关性分析 由表7可知,绿原酸与抗氧化药效呈显著正相关,川续断皂苷乙和异绿原酸A与抑菌药效呈显著正相关。

4 讨论

4.1 指纹图谱的建立

2020版《中华人民共和国药典》规定灰毡毛忍冬(山银花)的质控成分为绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙,其中绿原酸检测波长为330 nm,皂苷使用蒸发光检测器。本文通过优化洗脱条件,最终确定在紫外检测器下选择210 nm波长,建立比较全面的可同时反应有机酸、黄酮、皂苷等化学成

表5 绿原酸等成分线性关系与方法学考察

编号	组分	标准曲线	R^2	稳定性 RSD/%	重复性 RSD/%	精密性 RSD/%	加样回收率/%
1	绿原酸	$Y=15\ 692\ 496.41X-436\ 515.33$	1.00	0.44	1.86	0.32	96.44
2	木犀草苷	$Y=18\ 893\ 490X-15\ 796.81$	1.00	2.76	2.76	2.55	96.35
3	灰毡毛忍冬皂苷甲	$Y=1\ 264\ 309.38X-1\ 231.41$	1.00	1.80	2.80	1.18	100.12
4	新绿原酸	$Y=16\ 408\ 151.97X-126\ 134.71$	1.00	2.99	1.98	2.42	102.84
5	咖啡酸	$Y=34\ 710\ 086.91X-4\ 634.20$	1.00	2.20	1.56	0.99	100.68
6	川续断皂苷乙	$Y=37\ 318\ 950.65X-79\ 128.67$	0.99	0.92	1.22	0.93	100.38
7	异绿原酸A	$Y=31\ 551\ 286.31X-71\ 041.21$	1.00	0.37	1.47	0.24	99.79
8	异绿原酸B	$Y=24\ 520\ 201.82X-19\ 831.80$	1.00	2.65	2.52	2.34	101.97
9	灰毡毛忍冬皂苷乙	$Y=701\ 721X-2\ 981.60$	0.99	1.83	2.29	1.45	99.71
10	獐牙菜苷	$Y=3\ 094\ 253.6595X+4\ 638.83$	0.99	2.47	2.26	1.18	100.28

表6 20批山银花样品中绿原酸等成分的含量(%)

编号	绿原酸	木犀草苷	灰毡毛忍冬皂苷甲	新绿原酸	咖啡酸	川续断皂苷乙	灰毡毛忍冬皂苷乙	异绿原酸A	异绿原酸B	獐牙菜苷
1	2.743	0.052	0.047	5.363	0.012	0.967	7.334	0.562	0.058	0.390
2	2.821	0.035	0.066	5.802	0.007	1.264	10.750	0.757	0.063	0.310
3	2.671	0.045	0.056	5.552	0.009	1.076	8.480	0.568	0.062	0.330
4	2.883	0.049	0.101	4.878	0.011	1.247	9.754	0.971	0.091	0.054
5	2.345	0.031	0.103	2.869	0.008	1.456	10.232	1.467	0.054	0.147
6	2.024	0.051	0.070	4.270	0.012	1.039	9.357	1.864	0.093	0.352
7	1.988	0.044	0.093	3.245	0.010	0.915	6.316	1.037	0.055	0.153
8	1.968	0.051	0.072	3.925	0.012	1.317	9.128	0.927	0.067	0.281
9	5.536	0.074	0.078	11.720	0.010	1.232	8.944	1.835	0.121	0.353
10	7.142	0.092	0.114	10.840	0.009	1.143	10.584	3.523	0.147	0.396
11	5.074	0.058	0.096	11.732	0.022	1.222	10.554	3.482	0.139	0.332
12	3.075	0.034	0.059	5.236	0.161	0.830	4.579	2.244	0.057	0.152
13	1.863	0.047	0.039	1.162	0.015	6.791	9.443	3.323	0.080	0.063
14	4.880	0.048	0.007	6.832	0.030	0.991	7.190	3.300	0.060	1.076
15	5.551	0.071	0.061	13.516	0.009	1.066	8.181	2.444	0.148	0.341
16	6.008	0.071	0.083	9.924	0.011	1.091	10.339	3.644	0.149	0.433
17	5.308	0.038	0.062	5.719	0.015	1.034	6.703	4.963	0.191	0.393
28	6.449	0.077	0.088	3.411	0.012	1.189	10.779	4.020	0.171	0.417
19	5.258	0.039	0.063	5.759	0.007	0.986	6.834	5.131	0.201	0.378
20	6.597	0.078	0.092	10.782	0.013	1.174	3.324	4.103	0.168	0.478

表7 绿原酸等成分含量与药效的相关性分析(Pearson 相关系数)

药效	绿原酸	木犀草苷	灰毡毛忍冬皂苷甲	新绿原酸	咖啡酸	川续断皂苷乙	灰毡毛忍冬皂苷乙	异绿原酸A	异绿原酸B	獐牙菜苷
抗氧化	0.557*	0.438	0.280	0.128	0.162	0.243	0.022	0.389	0.326	0.410
抑菌	0.012	0.182	0.388	0.352	0.015	0.444*	0.186	0.476*	0.211	0.113

注:*表示在0.05级别(双尾),相关性显著。

分的指纹图谱。本次由于山银花采收时间的原因,收集的样品数量相对较少,后续实验将增加样品数量,细化不同产地、不同加工方法和不同来源等样品信息,不断完善山银花特征图谱,以期如山银花全面的质量评价提供理论依据和数据支撑。

4.2 数据分析方法的选择

本文通过灰色关联分析、偏最小二乘回归分析和双变量相关分析进行“谱-效”关联分析^[19-20],3种方法结果一致,初步筛选出与药效相关的基础物质。灰色关联度分析法作为对模糊系统分析的有效手段,是构建谱-效关系的常用方法之一。偏最小二乘回归是一种多元统计回归建模方法,主要研究的是多自变量对多因变量的回归建模,能在样本数较少情况下建立精度较高的回归模型。双变量相关分析是研究随机变量之间密切程度的一种数据统计分析方法,Pearson 相关系数绝对值越大,两变量之间的相关性越强,通过将指纹图谱共有峰的相对峰面积与抗氧化和抑菌药效指标进行相关性分析,从而得出各色谱峰成分与药效指标的相关系数,从而为研究两者之间的线性相关密切程度提供依据。

4.3 质量标志物的预测

“谱-效”关系的研究在于揭示中药的药效物质基础,通过对照品指认了部分共有峰成分,并选择合理的数据分析方法来评价灰毡毛忍冬的化学成分与药效之间的相互关系,采用灰色关联度法和最小偏二乘法回归分析建立了灰毡毛忍冬抗氧化和抑菌的“谱-效”关系。采用相关性分析计算共有峰和药效的相关系数,根据关联度法分析得出绿原酸、异绿原酸 A 与抗氧化和抑菌均有很强相关性,由偏最小二乘法回归系数可知 2 号峰和绿原酸与抗氧化效果相关性强,绿原酸、咖啡酸、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、2 号峰、5 号峰、9 号峰和 1 号峰成分与抑菌效果相关性强,由双变量相关性分析可知绿原酸与抗氧化效果显著相关,4 号峰成分、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 与抑菌效果显著相关。为进一步确定成分-药效的相关性,通过测定样品中绿原酸等 10 种成分的含量,与药效进行“量-效”相关性分析,发现绿原酸与抗氧化药效显著相关,川续断皂苷乙和异绿原酸 A 与抑菌药效显著相关。故本研究预测抗氧化药效的质量标志物为绿原酸和异绿原酸等有机酸类,抑菌药效的质量标志物为皂苷和有机酸类,但还需进一步体内药效分析验证。另外,山银花还具有抗病毒和抗肿瘤等药理作用,后续研究可采

用 GC-MS、UV 等分析方法建立多元化指纹图谱,进一步挖掘灰毡毛忍冬药效物质,完善“谱-效”关系,从源头提升灰毡毛忍冬产品质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 徐望龙.山银花黄酮粗提物抗氧化与抗肿瘤药理作用的研究[D].衡阳:南华大学,2014:10.
- [3] 周游宇.山银花配方颗粒制备工艺与质量标准研究[D].长沙:湖南中医药大学,2019.
- [4] 刘文,钟晓红,郑钦方,等.银花保健甜茶的工艺研究[J].安徽农学通报,2017,23(8):132-134.
- [5] 姚小华,匡艳辉,张一凡,等.不同厂家口炎清产品中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量比较[J].广东药学院学报,2016,32(5):596-600.
- [6] 郑文燕,李哲,冯启宏,等.HPLC 和 UPLC-MS/MS 法考察清热解毒口服液中金银花投料规范性[J].中国药师,2022,25(1):189-193.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- [8] 冯华,王祥培,王世俊,等.贵州遵义山银花药材高效液相色谱指纹图谱研究[J].甘肃中医药大学学报,2018,35(5):37-41.
- [9] 谢谊,刘浩,杨瑛,等.湖南产不同种质、采收期、加工方法的山银花质量对比研究[J].湖南中医药大学学报,2013,33(11):36-39.
- [10] 李曼钊,敖冬梅,陈君,等.山银花鉴定及质量评价研究进展[J].中国医药导报,2020,17(8):29-32.
- [11] 肖小河,鄢丹,袁海龙,等.基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建[J].中草药,2009,40(9):1345-1488.
- [12] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等.中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J].中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [13] 陈丽华,肖发林,黄诗雨,等.中药质量评价研究思路及创新发展趋势[J].中草药,2021,52(9):2541-2547.
- [14] 万丹,张水寒,沈冰冰,等.基于相关性分析的金银花和山银花正丁醇提取物的抗肿瘤活性谱-效关系研究[J].分析科学学报,2020,36(1):37-41.
- [15] 晏薇娜.贵州金银花和山银花指纹图谱的研究[D].贵阳:贵州大学,2018.
- [16] 符海郊,张倩睿,熊蕊,等.指纹图谱结合一测多评模式在中药质量评价中的应用进展[J].中国药师,2022,25(5):861-867.
- [17] 邢冬梅,刘洁丽,邓淑芳,等.当归挥发油抗氧化谱效关系研究[J].化学世界,2020,61(4):280-286.
- [18] 刘月新,林艳,谢菁琛,等.基于夏枯草不同生长发育时期化学成分的动态监测阐释“夏枯质优”的科学内涵[J].中草药,2021,52(7):2082-2090.
- [19] 蔡靓,张倩,杨丰庆.中药谱效学的应用进展[J].中草药,2017,48(23):5005-5011.
- [20] 曾令军,林兵,宋洪涛.中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J].中国中药杂志,2015,40(8):1425-1432.