

畲药柳叶蜡梅质量评价和谱效关系研究

杜文俊¹, 潘俊杰², 程科军², 金叶^{3*} (1.金华市中心医院, 浙江 金华 321000; 2.丽水市农林科学研究院, 浙江 丽水 323000; 3.丽水学院生态学院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 评价不同产地及不同采收时间的柳叶蜡梅药材质量, 建立谱效关系模型, 挖掘与抗氧化活性有显著相关的色谱特征峰。方法 建立可同时定量多种成分(芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚)的液相色谱指纹图谱方法, 测定不同来源柳叶蜡梅中总黄酮含量, 并采用 DPPH 法测定柳叶蜡梅样本的清除率 SR 及 IC₅₀ 值, 建立基于灰色关联度和相似度算法的谱效关系模型, 辨别与抗氧化活性有显著相关的色谱特征峰。结果 不同产地柳叶蜡梅样本的总黄酮及其单体成分含量、抗氧化活性等指标存在较大差异, 但同一基地来源的质量差异较小, 松阳标准化基地样本 IC₅₀ 值 < 4.5 mg·mL⁻¹, RSD 值 < 20%, 显示整体抗氧化能力较强。7—8 月份的柳叶蜡梅样本黄酮类物质累积最多且抗氧化能力最强, 尤其是山柰酚-3-O-芸香糖苷含量最高, 最高可达 0.87%。此外, 基于色谱数据的三维主成分分析结果显示, 松阳和开化标准化种植基地的柳叶蜡梅质量属性较为接近, 而与来自莲都地区的野生样本差距较大。通过灰色关联度和相关系数分析算法构建的谱效关系结果显示, 山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮苷、异槲皮苷、芦丁等黄酮成分均与抗氧化活性显著相关。结论 本研究明确了柳叶蜡梅最佳采摘期以及产地对药材质量的影响, 初步明确山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮苷、异槲皮苷、芦丁与抗氧化活性关联度较强, 为柳叶蜡梅质量综合评价和药效物质基础研究提供参考。

关键词: 畲药; 柳叶蜡梅; 液相指纹图谱; 抗氧化活性; 谱效关系

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)04-0500-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.04.011

引用本文: 杜文俊, 潘俊杰, 程科军, 等. 畲药柳叶蜡梅质量评价和谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(4): 500-506.

Study on Quality Assessment and Fingerprint-effect Relationship of She Medicine—*Chimonanthus Salicifolius* S. Y. Hu

DU Wenjun¹, PAN Junjie², CHENG Kejun², JIN Ye^{3*} (1. Jinhua Municipal Central Hospital, Jinhua 321000, China; 2. Lishui Institute of Agricultural and Forestry Sciences, Lishui 323000, China; 3. College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the quality of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu from different habitats and harvest time, establishing fingerprint-effect relationship models and assessing characteristic peaks significantly related to antioxidant activity. **METHODS** The HPLC fingerprint method was developed to quantitative determine rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-O-rutinoside, quercitrin, quercetin and kaempferol, and the total flavonoid contents of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu leaves from different habitats were measured. The SR and IC₅₀ values of the *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples were determined by DPPH assay. The fingerprint-effect relationship model based on grey relationship analysis and correlation coefficient method was investigated, to identify the characteristic chromatographic peaks which were significantly associated with antioxidant activity. **RESULTS** The contents of total flavonoid and its monomer components and antioxidant activities of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu from different habitats displayed marked differences. However, the quality differences of the samples from the same cultivation base had little difference. The IC₅₀ and RSD values of the samples from Songyang standardized cultivation base was < 4.5 mg·mL⁻¹ and 20% respectively, indicating overall strong antioxidant capacities. For different harvest time, raw materials harvested in July and August exhibited highest values of flavonoids and antioxidant capacity, especially kaempferol-3-O-rutinoside, the highest content attainable was 0.87%. In addition, the results of three-dimensional principal component analysis based on chromatographic data showed that, *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples from Songyang and Kaihua standardized cultivation bases had similar quality attributes, however, there was a big gap between the quality of wild samples from Liandu and the samples harvested from Songyang and Kaihua standardized cultivation bases. The results of spectral efficiency relationship constructed by grey correlation degree and correlation coefficient analysis algorithm showed that, kaempferol-3-O-rutinoside, quercitrin, isoquercitrin and rutin displayed a substantial correlation with antioxidant activities. **CONCLUSION** This study reveal the appropriate harvest time and the influence of habitats on the quality of *Chimonanthus*

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGC19B050002); 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02058-4); 丽水市重点研发计划项目(2020ZDYF04); 金华市中心医院基础研究专项课题(JY2020-6-09)

作者简介: 杜文俊, 女, 硕士, 药师 E-mail: phar2009@163.com *通信作者: 金叶, 女, 博士, 讲师 E-mail: jinye@lsu.edu.cn

salicifolius S. Y. Hu. It is preliminarily confirmed that kaempferol-3-*O*-rutinoside, quercitrin, isoquercitrin and rutin display a substantial correlation with antioxidant activities. The results provide certain scientific basis for quality evaluation and effective substances of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu.

KEYWORDS: She medicine; *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu; HPLC fingerprint; antioxidant activity; fingerprint-effect relationship

柳叶蜡梅(*Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu)为蜡梅科蜡梅属半常绿灌木,其叶又名食凉茶^[1],在畲族民间多作茶饮品,兼具药用,具解表祛风、清热解毒等功能,被誉为“畲药第一味”^[2]。2014年国家卫健委根据《中华人民共和国食品安全法》和《新食品原料安全性审查管理办法》有关规定,批准了柳叶蜡梅叶为新食品原料。《浙江省中药炮制规范》2015年版收录了柳叶蜡梅叶作为畲药食凉茶的植物基原之一^[3]。作为药食同源的畲族常用药用植物,柳叶蜡梅规模化种植和深加工开发的发展空间巨大。

目前关于柳叶蜡梅化学成分的研究较少,主要集中于挥发油成分的研究,少量文献报道了柳叶蜡梅中含有黄酮类、香豆素类、生物碱类、萜类等非挥发性化学成分和多种维生素、微量元素等营养成分^[4-9]。药理学研究则表明,柳叶蜡梅具有抗氧化、抗菌、抗炎、止泻、降糖降脂、抗肿瘤等活性^[10-13]。柳叶蜡梅作为药食同源的天然植物,具有多种生物活性,含有大量黄酮类、酚类成分,具有较好的清除抗氧化活性自由基的作用,可作为研究开发抗氧化药物或食品的新资源^[14]。

针对柳叶蜡梅质量评价体系和药效物质基础等研究薄弱的现状,本研究拟对不同产地不同采收时间的柳叶蜡梅开展多指标、整体的综合评价研究,通过中药指纹图谱^[15],较为全面地观察柳叶蜡梅化学成分的种类和数量,进而有效地控制其质量,对柳叶蜡梅的规范化栽培、种植和生产及进一步研究其作用机理、物质基础和量效关系,提高其质量都有重要意义。由于中药指纹图谱反映的是化学信息,不能直接体现柳叶蜡梅的药理活性等信息,为了探寻符合柳叶蜡梅特点的药效物质辨识模式,借鉴谱效关系研究策略^[16],将指纹图谱的化学成分信息与药物活性关联,应用化学计量学方法,建立柳叶蜡梅指纹图谱和抗氧化活性之间的多变量模型,尝试揭示具有抗氧化贡献的成分群,初步探索基于谱效关系的柳叶蜡梅药效物质辨识模式。

本研究从化学成分(总黄酮、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚)、

抗氧化活性等多方面评价不同产地及不同采收时间的柳叶蜡梅药材质量;利用化学计量学方法,建立基于液相色谱数据与抗氧化活性之间的谱效关系模型,挖掘与抗氧化活性显著相关的色谱特征峰,为柳叶蜡梅的质量控制和药效物质辨识提供科学、合理、有价值的参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪,包括 Chemstation 色谱管理软件、四元泵、自动进样器、在线脱气和 DAD 检测器(美国 Agilent 公司); UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本 SHIMADZU)。

芦丁(批号:100080-201610;含量:100%)、异槲皮苷(批号:111809-201403;含量:92.9%)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(批号:112007-201602;含量:90.8%)、槲皮苷(批号:115220-201307;含量:99.1%)、槲皮素(批号:100081-201408;含量:99.1%)、山柰酚(批号:110861-201310;含量:93.2%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇和乙腈均为色谱纯(北京百灵威科技有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(美国 Sigma);其他试剂均为国产分析纯。

不同产地、不同采收时间的柳叶蜡梅叶样本由丽水市农业科学研究院提供,经丽水市农业科学研究院程科军研究员鉴定为柳叶蜡梅(*Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu),共计 57 份样本,其中松阳(SY)和开化(KH)产地为柳叶蜡梅标准化种植基地,分别采集了 24 个和 10 个样本;产地莲都(LD)共 23 个样本,均为野生,具体采收时间和批号见表 1。以上样本粉碎过 80 目筛。

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件用于指纹图谱分析;Origin pro 2018 (OriginLab Corporation)用于灰色关联度、相关系数计算和主成分分析等。

2 方法与结果

2.1 HPLC 定量分析

2.1.1 供试品溶液制备 取柳叶蜡梅粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,超声 60 min,摇匀,离心,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

表 1 柳叶蜡梅样本的产地和采收时间

Tab. 1 Habitats and harvest time of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples

编号	产地	采收时间	批号	编号	产地	采收时间	批号
1	开化	2016-07-21	KH20160721	30	莲都	2017-09-17	LD20170917
2	开化	2017-02-04	KH20170204	31	莲都	2017-11-07	LD20171107
3	开化	2017-06-10	KH20170610	32	莲都	2018-01-01	LD20180101
4	开化	2017-07-10	KH20170710	33	莲都	2018-05-01	LD20180501
5	开化	2017-08-14	KH20170814	34	松阳	2014-05-01	SY20140501
6	开化	2017-09-02	KH20170902	35	松阳	2014-06-01	SY20140601
7	开化	2017-09-28	KH20170928	36	松阳	2014-07-01	SY20140701
8	开化	2017-10-13	KH20171013	37	松阳	2015-08-01	SY20150801
9	开化	2017-10-27	KH20171027	38	松阳	2016-06-21	SY20160621
10	开化	2017-11-14	KH20171114	39	松阳	2016-07-23	SY20160723
11	莲都	2014-09-23	LD20140923	40	松阳	2017-05-01	SY20170501-1
12	莲都	2016-02-03	LD20160203	41	松阳	2017-05-01	SY20170501-2
13	莲都	2016-03-03	LD20160303	42	松阳	2017-06-01	SY20170601
14	莲都	2016-04-01	LD20160401	43	松阳	2017-07-01	SY20170701
15	莲都	2016-04-05	LD20160405	44	松阳	2017-08-18	SY20170818
16	莲都	2016-05-03	LD20160503	45	松阳	2017-09-01	SY20170901
17	莲都	2016-06-05	LD20160605	46	松阳	2017-10-01	SY20171001
18	莲都	2016-06-21	LD20160621	47	松阳	2017-11-10	SY20171110
19	莲都	2016-07-03	LD20160703	48	松阳	2018-05-01	SY20180501
20	莲都	2016-07-05	LD20160705	49	松阳	2018-06-10	SY20180610
21	莲都	2016-07-07	LD20160707	50	松阳	2018-06-20	SY20180620
22	莲都	2016-08-05	LD20160805	51	松阳	2018-06-27	SY20180627
23	莲都	2016-10-01	LD20161001	52	松阳	2018-07-16	SY20180716-1
24	莲都	2016-11-01	LD20161101	53	松阳	2018-07-16	SY20180716-2
25	莲都	2016-12-01	LD20161201	54	松阳	2018-07-16	SY20180716-3
26	莲都	2017-07-08	LD20170708	55	松阳	2018-08-01	SY20180801-1
27	莲都	2017-08-25	LD20170825-1	56	松阳	2018-08-01	SY20180801-2
28	莲都	2017-08-25	LD20170825-2	57	松阳	2018-08-01	SY20180801-3
29	莲都	2017-08-25	LD20170825-3				

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚对照品各 2.5, 2.7, 2.0, 2.3, 2.4, 2.2 mg 于 25 mL 量瓶中, 用 70%甲醇溶解定容, 作为对照品储备液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Waters Sunfire C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流速 0.8 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL; 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1%磷酸水溶液; 梯度洗脱程序为 0~45 min, 5%→20%A, 45~75 min, 20%→45%A; 检测波长为 360 nm。

2.1.4 线性、仪器精密度和重复性考察 线性考察: 取对照品储备液, 按梯度进行稀释, 配成 9

个不同浓度的溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析。以色谱峰面积(*Y*)对进样浓度(*X*)进行线性回归, 相关系数 *R* 均>0.999。

仪器精密度试验: 取“2.1.2”项下对照品储备液, 按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚 6 个成分峰面积 RSD 值均<1.01%。

重复性试验: 取柳叶蜡梅样本(批号: LD20160203), 按照“2.1.1”项下方法制备 6 份供试品溶液, 以“2.1.3”项下色谱条件进样分析, 6 个成分的峰面积 RSD 值均<1.91%。表明该方法的线性、精密度和重复性考察良好。

2.1.5 稳定性和加样回收率考察 取柳叶蜡梅样

本(批号: LD20160203), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 以“2.1.3”项下色谱条件分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样分析, 芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚 6 个成分峰面积的 RSD 值均<1.91%, 表明样本在 24 h 内稳定。

取柳叶蜡梅样本(批号: LD20160203)9 份, 3 份 1 组, 样本中芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚含量已知, 分别精密加入 0.5, 1.0, 1.5 倍已知含量的对照品溶液(每组 3 份), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 以“2.1.3”项下色谱条件进样分析, 计算回收率。结果表明, 6 种成分的回收率为 96.2%~104.6%, 且 RSD 均<1.83%。

2.2 HPLC 指纹图谱方法学考察

2.2.1 仪器精密度试验 取柳叶蜡梅样本(批号: LD20160203), 精密称定, 按“2.1.1”项下制备方法制备供试品溶液, 重复进样 6 次, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 以 15 号峰芦丁为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。结果表明共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均<1.56%, 表明仪器具有良好的精密度。

2.2.2 稳定性试验 取柳叶蜡梅样本(批号: LD20160203), 精密称定, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后的 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 注入液相色谱仪按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 以 15 号峰芦丁为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。

结果表明共有峰的相对保留和相对峰面积的 RSD 值均<1.52%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.3 重复性试验 取柳叶蜡梅样本(批号: LD20160203), 精密称定 6 份, 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 以 15 号峰芦丁为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均<1.65%, 表明该方法重复性良好。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立及特征峰指认

采用已优化的液相指纹图谱条件分析不同产地和不同采收时间的柳叶蜡梅样本, 典型柳叶蜡梅样本(批号: LD20160203)的液相色谱图和色谱峰指认结果见图 1。选定 23 个特征峰, 分别用数字 1~23 号表示。根据对照品比对、加样回收试验、峰纯度计算结果以及参考文献^[17-18], 指认 15, 16, 18, 19, 22, 23 号峰分别为芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚。

2.4 总黄酮含量测定

黄酮提取液制备: 取柳叶蜡梅粉末约 1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加适量的石油醚回流提取至无色, 取出包有样本的滤纸, 挥干, 按料液比 1 g : 25 mL 加入 70%甲醇, 在 60℃超声条件下提取 35 min, 离心, 取上清液待测。

标准曲线的绘制: 精确称取芦丁对照品适量, 用 70%甲醇溶解, 配成对照品储备液。将对照品储备液稀释至不同浓度, 加入 5%亚硝酸钠 1 mL, 混匀, 静置 6 min, 加 10%硝酸铝 1 mL, 混匀, 静置 6 min, 加 4%氢氧化钠 10 mL, 用 70%甲醇

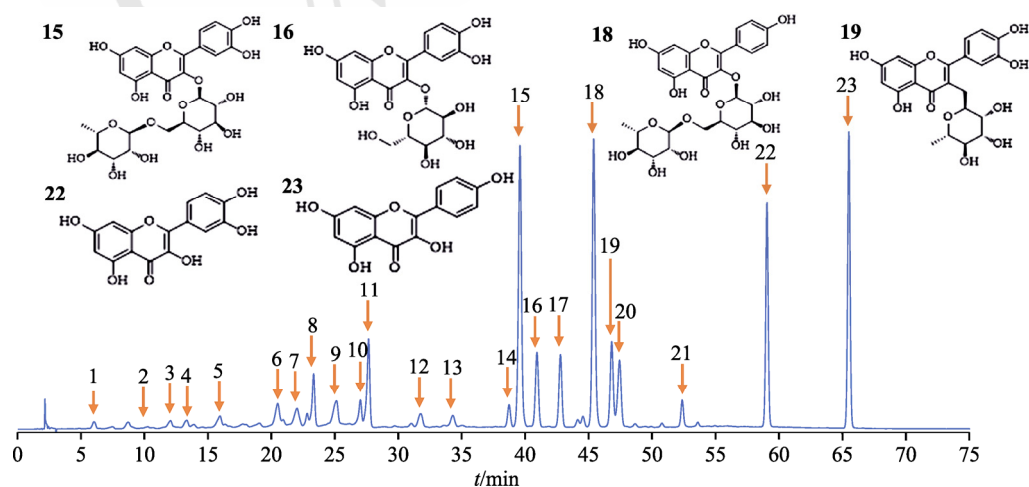


图 1 典型柳叶蜡梅样本(批号: LD20160203)液相色谱图和色谱峰指认结果

Fig. 1 Typical HPLC chromatogram of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu sample (batch No.: LD20160203) and chromatographic peak identification results

定容, 静置 15 min。以 70%甲醇作为空白对照, 分别用全波长扫描得到吸收图谱, 结果显示对照品溶液在 510 nm 波长处有最大吸收度, 故选择 510 nm 为检测波长, 绘制校准曲线。

总黄酮含量测定: 取柳叶蜡梅黄酮提取液 1 mL 置于 25 mL 量瓶中, 采用上述亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法, 通过全波长扫描的吸收图谱显示在 510 nm 波长处有最大吸收, 于 510 nm 处测定样本溶液吸光度, 计算总黄酮含量。

2.5 抗氧化性测定

按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 精密移取 1 mL 续滤液, 加 70 %甲醇, 按此方法, 反复进行, 2 倍逐步稀释, 配制成 6 个系列浓度的样本溶液。DPPH 标准曲线的绘制: 精密称定 15 mg DPPH 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为储备液。将 DPPH 储备液依次稀释, 得到 6 个不同浓度的 DPPH 对照品溶液, 以甲醇为空白溶液, 于 517 nm 波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。

抗氧化活性测定: 精密移取 6 个系列浓度的样本溶液各 0.2 mL, 分别加入 DPPH 溶液 ($0.020 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 4.8 mL, 摇匀, 遮光放置 45 min, 以 4.8 mL 甲醇与 0.2 mL 70 %甲醇为空白溶液, 在 517 nm 处测定吸光度(A_1); 另取 DPPH 溶液 4.8 mL 与 0.2 mL 70%甲醇混合, 以 4.8 mL 甲醇与 0.2 mL 70%甲醇为空白溶液, 在 517 nm 处测定吸光度(A_0); 再取 4.8 mL 甲醇与 0.2 mL 各浓度样本溶液混合, 以 4.8 mL 甲醇与 0.2 mL 70%甲醇为空白溶液, 在 517 nm 波长处测定吸光度(A_2), 计算各浓度清除率(SR)及 IC_{50} 值。SR 计算公式为 $\text{SR} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$ 。以 SR 为纵坐标, 样本溶液的浓度为横坐标, 绘制量效曲线, 计算 IC_{50} 值, 即

SR 为 50%时样本的浓度。每个样本重复测定 3 次, 取平均值。

2.6 不同来源药材质量评价

不同产地、不同采收时间的柳叶蜡梅样本(共计 57 份)中芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚、总黄酮含量和抗氧化活性统计结果见表 2~3。从表中可以看出, 不同来源样本的各个指标存在较大差异, 以抗氧化活性为例: IC_{50} 值越小, 表明该样本有越强的清除自由基能力, 抗氧化活性越强, 来自莲都产地的野生样本(批号: LD20170825-3)的 IC_{50} 值高达 $17.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低值样本来自松阳标准化种植基地(批号: SY20180627), 为 $1.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且松阳基地样本 IC_{50} 值均 $\leq 4.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 显示整体抗氧化能力较强。

不同产地同一月份(以 7 月份为例)的柳叶蜡梅的指纹图谱见图 2, 显示松阳和开化标准化种植基地的样本成分较为接近, 而莲都产地的样本普遍在保留时间 20~30 min 出峰较多。同一产地不同采收时间(松阳基地为例)的指纹图谱见图 3, 40~50 min 的特征峰的峰面积从 5 月到 8 月逐渐增加, 8 月到 10 月逐渐减少。

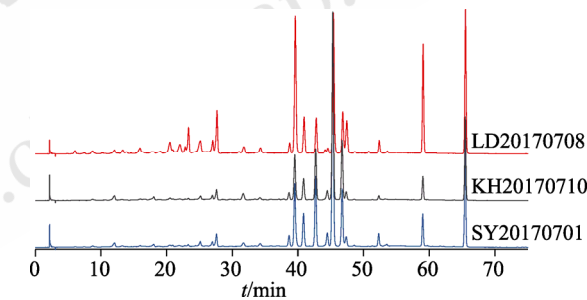


图 2 不同产地柳叶蜡梅样本指纹图谱
Fig. 2 Fingerprints of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples from different habitats

表 2 不同产地的柳叶蜡梅样本的化学成分含量检测结果

Tab. 2 Quantitative results of chemical constituents content of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples from different habitats

指标	开化样本 最大值	开化样本 最小值	开化样本相对 标准偏差	莲都样本 最大值	莲都样本 最小值	莲都样本相 对标准偏差	松阳样本 最大值	松阳样本 最小值	松阳样本相 对标准偏差
芦丁	1.10	0.04	77.22	0.43	0.06	47.42	0.38	0.04	55.12
异槲皮苷	0.23	0.01	76.02	0.14	0.02	46.21	0.16	0.01	69.33
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	1.36	0.15	46.53	1.83	0.17	52.90	1.45	0.21	42.52
槲皮苷	0.28	0.02	56.82	0.35	0.02	62.78	0.40	0.03	63.13
槲皮素	0.06	0.01	71.40	0.13	0.00	76.78	0.06	0.01	60.91
山柰酚	0.10	0.03	60.55	0.34	0.02	66.03	0.41	0.03	67.59
总黄酮	0.77	0.22	12.09	0.89	0.19	37.77	0.95	0.42	18.52

表 3 不同产地的柳叶蜡梅样本的抗氧化活性指标 IC₅₀ 的检测结果

Tab. 3 Detection result of antioxidant activity index IC₅₀ values of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples from different habitats

产地	IC ₅₀ 最大值/ mg·mL ⁻¹	IC ₅₀ 最小值/ mg·mL ⁻¹	相对标准偏差/%
开化样本	11.20	3.60	36.80
莲都样本	17.80	1.50	86.12
松阳样本	4.50	1.30	19.61

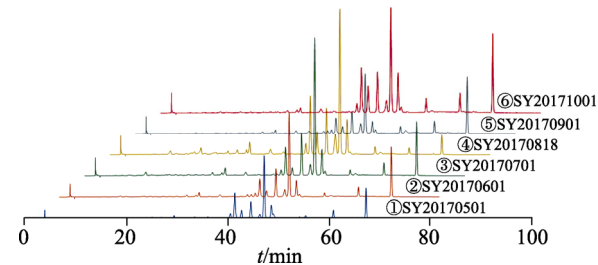


图 3 松阳基地不同采收时间柳叶蜡梅样本指纹图谱
Fig. 3 Fingerprints of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples collected at different harvest time at Songyang base

松阳基地的柳叶蜡梅不同采收时间的总黄酮和抗氧化能力见表 4，不同月份采收样本的芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚、总黄酮含量和抗氧化活性在 7—8 月份达到顶峰，且优势明显，尤其以 8 月份山柰酚-3-O-芸香糖苷含量最高，可达 0.87%。

为了更加立体地观察不同产地柳叶蜡梅的质量差异，本研究通过简化色谱多维矩阵，应用 Origin Pro 2018 软件对特征峰峰面积进行主成分分析，以呈现一个可视化三维空间中的数据聚类趋势^[19]。来自松阳、开化标准化种植基地和产地莲都的柳叶蜡梅色谱数据三维主成分分析结果见图 4。主成分分析是一种数据降维方法，将数量较多的原始变量通过线性组合形成数量较少的新变量，且尽可能多地表征原始变量的数据结构特征，由特征峰峰面积原始变量线性组合而成的新变量被称为主成分。根据色谱数据累计方差贡献率大

小，排名前 3 位的主成分数称为主成分 1，2，3，能够解释 98%以上色谱数据差异。从图中可以看出，来自 3 个产地的样本部分重叠，但标准化种植基地松阳和开化的柳叶蜡梅具有明显聚类分布的倾向，可见来自不同产地的柳叶蜡梅质量存一定差异。

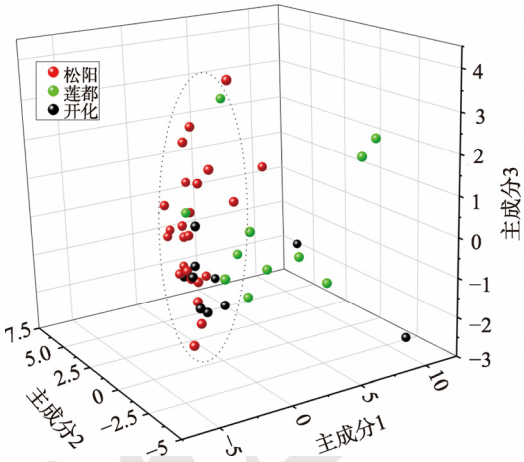


图 4 不同产地柳叶蜡梅主成分得分图
Fig. 4 Score plots of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples from different habitats

2.7 指纹图谱和抗氧化活性谱效关系

为初步考察指纹图谱中每个色谱峰与抗氧化药效指标之间的密切程度和关联性大小，将柳叶蜡梅提取物清除 DPPH 自由基活性的 IC₅₀ 为参考序列，HPLC 指纹图谱各特征峰峰面积为比较序列，分辨系数取 0.5，按照参考文献^[20]的方法和步骤。依据相对关联度的大小，确定了各特征峰对抗氧化作用的贡献大小为 X15>X18>X19>X17>X16>X21>X11>X14>X8>X23>X3>X10>X12>X9>X13>X7>X22>X4>X20>X2>X6>X5>X1，其中关联度较强的前 10 个特征峰中，15，18，19，16 号峰分别为芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮苷、异槲皮苷，均为黄酮类成分，可见黄酮类成分是柳叶蜡梅抗氧化活性的主要有效成分。

表 4 松阳基地不同采收时间的柳叶蜡梅样本化学成分含量和抗氧化活性指标 IC₅₀ 的检测结果

Tab. 4 Quantitative results of chemical constituents content and antioxidant activity index IC₅₀ values of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu samples from Songyang cultivation base at different harvest time

批号	时间	芦丁/%	异槲皮苷/%	山柰酚-3-O-芸香糖苷/%	槲皮苷/%	槲皮素	山柰素/%	总黄酮/%	抗氧化活性评价指标 (IC ₅₀)/mg·mL ⁻¹
SY20170501-1	2017-05-01	0.10	0.03	0.37	0.06	0.01	0.05	0.51	4.5
SY20170601	2017-06-01	0.07	0.02	0.49	0.07	0.01	0.09	0.84	4.4
SY20170701	2017-07-01	0.11	0.03	0.80	0.11	0.02	0.09	0.95	3.5
SY20170818	2017-08-18	0.22	0.09	0.87	0.15	0.01	0.03	0.89	3.9
SY20170901	2017-09-01	0.06	0.03	0.35	0.05	0.02	0.10	0.77	4.1
SY20171001	2017-10-01	0.18	0.11	0.68	0.18	0.03	0.14	0.73	4.5
RSD/%		53.38	72.60	37.30	49.42	41.76	43.70	19.83	9.27

3 讨论

不同产地柳叶蜡梅药材成分差别较大,其中芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚、总黄酮含量和抗氧化活性存在较大差异,不利于柳叶蜡梅的栽培种植和深加工。不同采收时间对柳叶蜡梅药材的总黄酮含量和抗氧化性有较大影响,统计结果显示 7—8 月份抗氧化能力和黄酮类物质累积达到最高。基于灰色关联度和相关系数法的谱效关系研究结果表明,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮苷、异槲皮苷、芦丁与抗氧化活性关联度较强,明确了柳叶蜡梅中黄酮含量具有较好的清除 DPPH 自由基活性。相关文献的研究也表明上述 4 个成分与抗氧化活性相关性较高^[21-24]。为了验证灰色关联度算法的计算结果,将柳叶蜡梅指纹图谱吸光度信号和抗氧化活性变量引入 Origin Pro 2018 软件,通过计算 2 组变量之间的相关系数,找出并确证与药效显著相关且关系密切的特征峰^[25-26]。抗氧化活性相关系数计算结果显示相关系数较高的信息量主要集中于保留时间 37~53 min,该区域出峰成分大部分为黄酮类成分,特别是 15, 17, 18, 14, 21, 19, 16 号峰较为突出,计算结果能够与灰色关联度分析结果相互呼应。

REFERENCES

- [1] LI Y, LI B T. Cladistic analysis of Calycanthaceae[J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2000, 8(4): 275-281.
- [2] 程科军, 李水福. 整合药理学研究[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [3] 浙江省药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016.
- [4] PAN X H, SHI X J, ZHANG X F, et al. Constituents of *Chimonanthus salicifolius* and their antioxidant activity[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(1): 99-102.
- [5] XU J B, PAN J J, LYU Q D, et al. Research advances on chemical constituents from Calycanthaceae plants and their pharmacological activities[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(10): 1957-1968.
- [6] ZHANG Y, HUA J W, WANG X Y, et al. Chemical constituents of chloroform fraction from leaves of *Chimonanthus salicifolius*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(16): 2661-2664.
- [7] MA G L, YANG G X, XIONG J, et al. Salicifoxazines A and B, new cytotoxic tetrahydro-1,2-oxazine-containing tryptamine-derived alkaloids from the leaves of *Chimonanthus salicifolius* [J]. Tetrahedron Lett, 2015, 56(27): 4071-4075.
- [8] XU J B, CHENG K J. Studies on the alkaloids of the Calycanthaceae and their syntheses[J]. Molecules, 2015, 20(4): 6715-6738.
- [9] MA S J, LV Q, ZHOU H, et al. Identification of traditional she medicine Shi-Liang tea species and closely related species using the ITS2 barcode[J]. Appl Sci, 2017, 7(3): 195.
- [10] CHEN X Y, BI S F, YAO Y, et al. Antioxidant activity of volatile oil from leaves of *Chimonanthus salicifolius* Hu in vitro[J]. Chin J Spectrosc Lab(光谱实验室), 2013, 30(3): 1484-1487.
- [11] 杨林波, 江伟华, 巴东娇, 等. 柳叶蜡梅灌剂对慢性盆腔炎大鼠子宫病理形态学的影响[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(4): 344-345.
- [12] WEN H P, XIAO J Z, LEI W M, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Chimonanthus salicifolius* S. Y. H by HPLC combined with response surface methodology and its antibacterial activity[J]. Acta Agric Zhejiangensis(浙江农业学报), 2018, 30(2): 298-306.
- [13] LIU Z D, YUAN Z X, ZHANG Z J, et al. Inhibitory effect of extract of *Chimonanthus salicifolius* on SGC-7901 cell and the possible mechanism[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2011, 26(10): 2420-2422.
- [14] WU Y X, WANG X, JIANG H T, et al. Study on total polyphenol content and antioxidant, antimicrobial activities of different polarity fractions of *Chimonanthus salicifolius* Hu leaves[J]. Food Mach(食品与机械), 2017, 33(8): 150-154.
- [15] LI N N, MENG X S, BAO Y R, et al. Simultaneous quantitative determination of five active chemical compositions in oroxyli semen by QAMS based on full-time multi-wavelength fusion method[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(7): 943-947.
- [16] FANG J, WU X N, JIANG J P, et al. Related analysis between antioxidant activities and HPLC fingerprint of flavonoids in *Citrus Changshan-huyou* Y. B. peels[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(10): 1489-1493.
- [17] WANG W Y, MAO J H, WANG F Y, et al. Study on dynamic change of flavonoids in traditional SHE medicine-Shiliang tea by quantitative analysis of multi-components by single-marker[J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2017, 48(12): 2532-2537.
- [18] LIU H T, CAO M P, ZHANG X F, et al. HPLC fingerprints establishment of chemical constituents in genus *Chimonanthus* leaves[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(10): 1560-1563.
- [19] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 2 版. 北京: 中国石化出版社, 2007.
- [20] YU P, LI K. Grey correlation analysis of data on microsoft excel[J]. Microcomput Appl(微型电脑应用), 2011, 27(3): 29-30, 37, 5.
- [21] WEI C S, WU C, HU C, et al. Chemical constituents, cytotoxic and antioxidant activities of flavonoids from *Phyllanthus urinaria*[J]. Nat Prod Res Develop(天然产物研究与开发), 2017, 29(12): 2056-2062.
- [22] XU C J. Study on *in-vitro* antioxidant activities of ethanol extracts of the leaves of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm and purification technology of quercitrin[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [23] LI J Y, YU H, SHI B Y, et al. Antioxidant activity of isoquercitrin and caffeoylquinic acid derivatives from sweet potato stems and leaves[J]. Food Sci(食品科学), 2013, 34(7): 111-114.
- [24] TU W Q, LI N, ZHANG L J, et al. Comparison of contents and antioxidant activity of eight components in *Eucommia ulmoides* leaves processed by different methods[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(16): 1863-1867.
- [25] WU W, WALCZAK B, MASSART D L, et al. Spectral transformation and wavelength selection in near-infrared spectra classification[J]. Anal Chimica Acta, 1995, 315(3): 243-255.
- [26] JIN Y, WU Z Z, LIU X S, et al. Near infrared spectroscopy in combination with chemometrics as a process analytical technology (PAT) tool for on-line quantitative monitoring of alcohol precipitation[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013(77): 32-39.

收稿日期: 2020-12-19

(本文责编: 曹粤锋)