

# 木棉花不同部位 UPLC 指纹图谱建立及抗氧化谱效关系研究

余欣彤, 曹嵌, 张兰兰, 汪凯东, 陈灶树, 潘玲, 张正\* (广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东佛山 528244)

**摘要:**目的 比较木棉花不同部位水提取物抗氧化活性并建立超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱, 研究谱效关系, 揭示其抗氧化活性质量标志物。方法 以 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)与 1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基(DPPH)自由基清除率为指标, 采用 UPLC 法建立 12 批木棉花不同部位(花瓣、花萼、雄蕊)指纹图谱, 进行相似度分析, 结合灰色关联度分析(GRA)、斯皮尔曼(Spearman)分析、逐步回归分析、偏最小二乘回归(PLSR)分析对抗氧化谱效关系进行研究。结果 12 批木棉花不同部位水提取物指纹图谱共标定并指认 8 个色谱峰。芒果苷、槲皮苷、芦丁、牡荆苷等化合物为木棉花药材及其不同部位抗氧化活性的主要有效成分。结论 木棉花药材及其不同部位抗氧化活性是多组分共同联合效应的结果, 本研究可为木棉花药材及其不同部位抗氧化活性物质基础及质量控制提供参考。

**关键词:**木棉花; 抗氧化; 指纹图谱; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐; 1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基; 谱效关系

doi:10.11669/cpj.2024.22.005 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)22-2132-08

## Establishment of UPLC Fingerprint of Different Parts of Gossampim Flos and Study on Spectrum Effect Relationship

YU Xintong, CAO Qian, ZHANG Lanlan, WANG Kaidong, CHEN Zaoshu, PAN Ling, ZHANG Zheng\* (Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine the antioxidant activities of Gossampim Flos water extracts, establish UPLC fingerprints and study the spectral effect relationship. **METHODS** Based on the scavenging rates of 2, 2-diazo-di (3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), the fingerprint of different parts (petal, calyx and stamen) of 12 batches of Gossampim Flos were established by UPLC method, and similarity analysis were carried out. Grey correlation analysis (GRA), Spearman analysis, stepwise regression analysis and partial least squares regression (PLSR) analysis were used to study the relationship between antioxidant spectrum effect. **RESULTS** Eight chromatographic peaks were identified by fingerprint identification of water extracts from different parts of 12 batches of Gossampim Flos. Mangiferin, quercetin, rutin, vitexin and other compounds were the main active components of Gossampim Flos and its different parts for antioxidant activities. **CONCLUSION** The antioxidant activity of Gossampim Flos and its different parts are the result of the combined effect of multiple components. This study can provide a comprehensive reference for the basis and quality control of antioxidant active substances of Gossampim Flos and its different parts.

**KEY WORDS:** Gossampim Flos; antioxidant; fingerprint; 2, 2-diazo-di (3-ethyl-benzothiazol-6-sulfonic acid) diammonium salt; 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine radical; spectral effect relationship

木棉花为木棉科植物木棉 [*Gossampinus malabarica* (DC.) Merr.] 的干燥花, 是常用的药食同源中药之一, 具有清热、利湿、解毒、止血、祛风的功效<sup>[1]</sup>。研究表明, 木棉花的化学成分主要包括黄酮类、苯丙素类及酚酸类等成分, 具有显著的抗氧化、抗菌抗炎、抗癌、保肝、心脏保护等作用<sup>[2]</sup>。目前木

棉花的抗氧化研究仅限于黄酮类成分的提取工艺及木棉花不同部位(花和树皮)总黄酮抗氧化性研究, 未见木棉花及其不同部位(花瓣、花萼、雄蕊)的抗氧化谱效关系研究<sup>[3]</sup>。

氧化反应是诱导癌症、衰老等多种疾病的主要起因, 黄酮类化合物作为一类良好的天然抗氧化剂,

**基金项目:**中华人民共和国工信部 2022 年产业技术基础公共服务平台项目资助(2022-230-221); 佛山市南海区重点领域科技攻关专项资助(南科〔2023〕20号-18)

**作者简介:**余欣彤, 女, 本科, 初级中药师 研究方向: 中药制剂工艺研究 \* **通讯作者:**张正, 男, 硕士, 副主任中药师 研究方向: 中药制剂工艺与质量控制研究 Tel: (0757)85128602

可有效克服自由基对机体细胞的氧化攻击<sup>[4]</sup>。目前可通过体外测定自由基清除率评价抗氧化活性,根据褪色程度与其被清除程度(即吸光度的改变)成定量关系,从而进行抗氧化活性的评价。2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)在氧化剂的作用下氧化成绿色的阳离子自由基,加入抗氧剂后会抑制其生成,溶液颜色变浅<sup>[5]</sup>。1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基(DPPH)是一种稳定的氮中心自由基,当自由基与抗氧剂提供的电子配对结合,可使 DPPH 试剂的特征紫红色消失<sup>[6]</sup>。由于指纹图谱所体现的化学成分并不全是活性成分,基于前期研究成果<sup>[7]</sup>,建立木棉花及其不同部位超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并将指纹图谱与清除 ABTS 自由基和 DPPH 自由基的活性相联系,采用灰色关联度分析、斯皮尔曼分析、逐步回归分析、偏最小二乘回归分析,整合分析共有峰与其抗氧化活性的相关性,构建谱效关系,旨在筛选木棉花不同部位抗氧化能力的物质基础,为建立与抗氧化活性结合的质量控制提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1290 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);UV-2600i 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公

司);Milli-Q Direct 型超纯水系统(德国 Merck 公司);XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);TC-15 套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂);111B 型二两装高速中药粉碎机(浙江瑞安市永历制药机械有限公司)。

### 1.2 试剂与药物

原儿茶酸(批号:110809-201906,纯度为 97.7%)、芒果苷(批号:1111607-201704,纯度为 98.1%)、牡荆苷(批号:111687-201704,纯度为 94.9%)、芦丁(批号:100080-20201,纯度为 92.2%)、槲皮苷(批号:111538-202007,纯度为 93.5%)、异槲皮苷(批号:111809-201804,纯度为 97.2%)(中国食品药品检定研究院);新绿原酸(批号:wkq19021413,纯度为 99.9%)、维采宁Ⅱ(批号:wkq0001217,纯度为 ≥98%)(四川省维克奇生物科技有限公司);DP-PH、ABTS 自由基清除能力试剂盒(苏州格锐思生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯,水为超纯水。12 批木棉花来自 4 个不同产地,经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为木棉科植物木棉 [*Gossampinus malabarica* (DC.) Merr.],符合《中国药典》2020 年版一部木棉花项下要求,信息见表 1。将 12 批木棉花药材的花瓣、花萼、雄蕊分离,得木棉花花瓣(编号:B1~B12)、花萼(编号:E1~E12)、雄蕊(编号:R1~R12)。

表 1 12 批木棉花样品产地信息

Tab. 1 Origin information of 12 batches of Gossampim Flos samples

No.	Place of China(in Chinese)	No.	Place of China( in Chinese)
Y1	Yunnan Yuxi(云南玉溪)	Y7	Guangdong Guangzhou(广东广州)
Y2	Yunnan Yuxi(云南玉溪)	Y8	Hainan Ledong(海南乐东)
Y3	Yunnan Yuxi(云南玉溪)	Y9	Guangdong Guangzhou(广东广州)
Y4	Guangxi Nanning(广西南宁)	Y10	Yunnan Chuxiong(云南楚雄)
Y5	Yunnan Kunming(云南昆明)	Y11	Yunnan Chuxiong(云南楚雄)
Y6	Guangdong Guangzhou(广东广州)	Y12	Guangdong Guangzhou(广东广州)

## 2 方法与结果

### 2.1 木棉花水提取物抗氧化活性的测定

**2.1.1 工作液的制备** 分别取 ABTS 储备液和  $K_2S_2O_8$  储备液各 1 mL 置 50 mL 棕色量瓶中,混合均匀,避光放置 12 h,得 ABTS 基液,临用前用无水乙醇稀释至刻度,得 ABTS 工作液。称取 DPPH 约 2 mg,精密称定,置 50 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇溶解并定容至刻度,得 DPPH 工作液。

**2.1.2 对照溶液的制备** 称取 Vc 对照品适量,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加体积分数 70% 乙醇溶解并定容至刻度,制成质量浓度为  $0.301 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

的 Vc 储备液。精密吸取 Vc 储备液适量,用体积分数 70% 乙醇稀释成质量浓度分别为  $0.024$ 、 $0.060$ 、 $0.096$ 、 $0.120$ 、 $0.180$ 、 $0.240$ 、 $0.300 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 Vc 对照溶液。

**2.1.3 ABTS 自由基清除率的测定** 测定管:50  $\mu\text{L}$  各部位供试品溶液 + 950  $\mu\text{L}$  ABTS 工作液;对照管:50  $\mu\text{L}$  各部位供试品溶液 + 950  $\mu\text{L}$  无水乙醇;空白管:50  $\mu\text{L}$  无水乙醇 + 950  $\mu\text{L}$  ABTS 工作液。将上述样品混匀,室温(25  $^{\circ}\text{C}$ )避光静置 6 min,于 734 nm 波长处测定吸光度,分别记为  $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$  和  $A_{\text{空白}}$ 。ABTS 自由基清除率按公式 1 计算:

ABTS 自由基清除率 (%) =  $(A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$  [8] 公式(1)

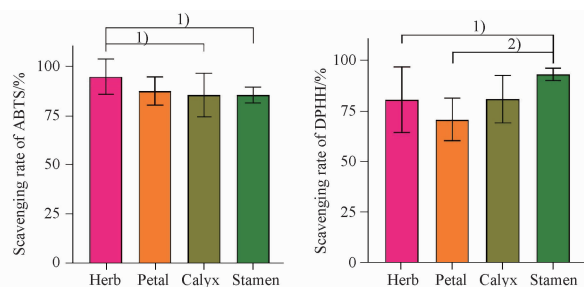
**2.1.4 DPPH 自由基清除率的测定** 测定管: 400  $\mu\text{L}$  各部位供试品溶液 + 600  $\mu\text{L}$  DPPH 工作液; 对照管: 400  $\mu\text{L}$  各部位供试品溶液 + 600  $\mu\text{L}$  体积分数 80% 甲醇; 空白管: 400  $\mu\text{L}$  体积分数 80% 甲醇 + 600  $\mu\text{L}$  DPPH 工作液。将上述样品混匀, 室温 (25  $^{\circ}\text{C}$ ) 避光静置 30 min, 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 于 517 nm 波长处测定吸光度, 分别记为  $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$  和  $A_{\text{空白}}$ 。DPPH 自由基清除率按公式 2 计算:

DPPH 自由基清除率 (%) =  $(A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$  [8] 公式(2)

## 2.2 12 批木棉花及其不同部位抗氧化活性的测定

按“2.1”项下方法对 12 批木棉花药材及其不同部位的水提取物进行 ABTS、DPPH 清除能力的测定, 结果见表 2; 采用 GraphPad Prism 8.0 软件对表 2 进行单因素方差分析, 结果见图 1。木棉花药材及不同部位清除 ABTS 自由基的能力强弱依次为药材 > 花瓣 > 花萼  $\approx$  雄蕊, 与药材相比, 花萼与雄蕊具有显著

性差异 ( $P < 0.05$ )。清除 DPPH 自由基能力强弱依次为雄蕊 > 药材  $\approx$  花萼 > 花瓣, 与雄蕊相比, 花瓣具有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 药材具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。



与药材相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与花瓣相比, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , compared to herb; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , compared to petal.

**图 1** 木棉花及其不同部位清除 2,2-联氮-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基 (DPPH) 能力的单因素方差分析结果。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

**Fig. 1** Results of one-way anova analysis on ABTS and DPPH scavenging ability of Gossampim Flos and its different parts.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

**表 2** 木棉花及其不同部位清除 ABTS、DPPH 能力的结果

**Tab. 2** Results of ABTS and DPPH removal ability of Gossampim Flos and its different parts

Herb			Petal			Calyx			Stamen		
No.	ABTS	DPPH	No.	ABTS	DPPH	No.	ABTS	DPPH	No.	ABTS	DPPH
Y1	98.83	85.12	B1	85.52	65.92	E1	98.30	82.57	R1	89.71	94.19
Y2	100.42	79.40	B2	79.46	57.05	E2	97.60	83.30	R2	87.45	90.35
Y3	99.89	87.74	B3	94.25	76.50	E3	96.41	84.45	R3	84.90	90.66
Y4	99.58	89.29	B4	83.73	69.87	E4	91.52	85.91	R4	84.71	90.66
Y5	99.15	88.10	B5	96.43	85.58	E5	87.03	84.86	R5	87.65	95.85
Y6	96.50	94.64	B6	86.61	73.50	E6	84.33	83.19	R6	88.04	94.50
Y7	72.43	38.21	B7	77.68	48.50	E7	61.88	47.39	R7	76.96	92.22
Y8	99.47	88.10	B8	94.25	78.10	E8	86.43	81.94	R8	80.10	95.12
Y9	99.26	89.29	B9	95.44	81.84	E9	87.03	86.85	R9	89.61	94.40
Y10	99.26	90.00	B10	94.74	75.53	E10	87.62	80.90	R10	80.69	85.37
Y11	91.52	71.07	B11	82.04	66.24	E11	71.46	69.83	R11	85.69	95.54
Y12	79.85	61.07	B12	79.17	65.92	E12	74.15	94.05	R12	88.73	93.88
Average	94.68	80.17	Average	87.44	70.38	Average	85.31	80.44	Average	85.35	92.73

## 2.3 UPLC 指纹图谱的建立 [7-10]

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱为 ACQUITY HSS T3 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5%  $\rightarrow$  10% A; 5 ~ 7 min, 10%  $\rightarrow$  13% A; 7 ~ 9 min, 13% A; 9 ~ 15 min, 13%  $\rightarrow$  22% A; 15 ~ 20 min, 22% A; 20 ~ 30 min, 22%  $\rightarrow$  5% A); 检测波长为 257 nm; 流速为 0.3  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 分别取原儿茶酸、新绿原酸、芒果苷、维采宁 II、牡荆苷、芦丁、异槲皮苷、槲皮苷对照品适量, 精密称定, 加体积分数 50% 甲醇制成

质量浓度分别为 0.107、0.050、0.077、0.043、0.026、0.038、0.040、0.114  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取不同批次木棉花药材及其不同部位 (过三号筛) 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加水 50 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即为供试品溶液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密密度实验** 取同一木棉花药材 (Y1) 供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 3 号芒果苷色谱峰为参照峰 (S), 计算得共有峰

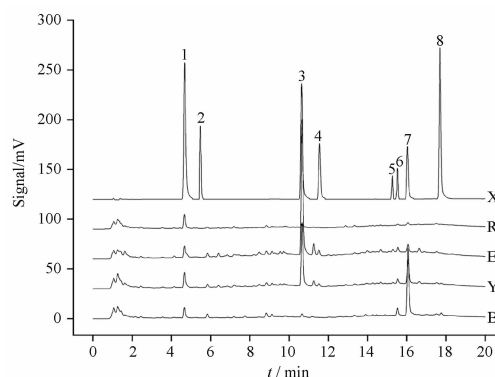
相对保留时间和相对峰面积的 RSD 范围分别为 0.17% ~ 0.53% 和 1.50% ~ 1.87%, 表明该方法精密度良好。

**2.4.2 重复性实验** 精密称取同一木棉花药材 (Y1), 按“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以 3 号芒果苷色谱峰为参照峰 (S), 计算得共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 范围分别为 0.88% ~ 1.05% 和 1.01% ~ 2.66%, 表明该方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性实验** 取同一木棉花药材 (Y1) 供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以 3 号芒果苷色谱峰为参照峰 (S), 计算得共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 范围分别为 0.81% ~ 1.27% 和 2.07% ~ 3.45%, 表明供试品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。

**2.4.4 指纹图谱的建立及相似度评价** 将 12 批木棉花药材及其不同部位按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录其色谱图, 导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》, 进行多点校正、自动匹配, 中位数法生成叠加指纹图谱及对照指纹图谱, 见图 2~3。与对照品进行比对, 指出 1 号峰为原儿茶酸, 2 号峰为新绿原酸, 3 号峰为芒果苷, 4 号峰为维采宁 II, 5 号峰为牡荆苷, 6 号峰为芦丁, 7 号峰为异槲皮苷, 8 号峰为槲皮苷。其中部分批

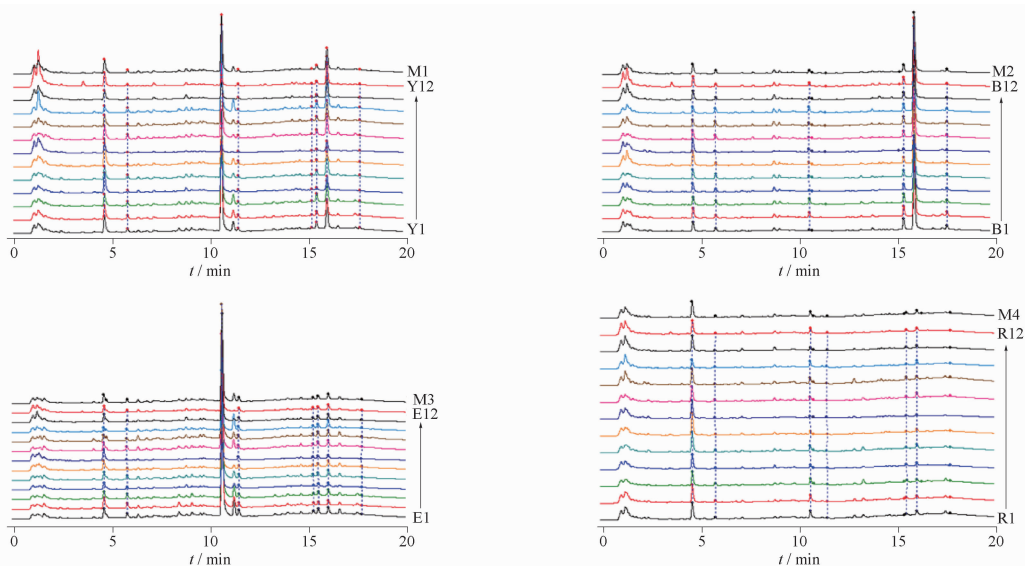
次花瓣部位丢失 4 号及 5 号峰, 雄蕊部位丢失 5 号及 7 号峰。以不同部位的对照指纹图谱为参照图谱, 相似度分析结果见表 3。12 批木棉花药材相似度为 0.734 ~ 0.995, 花瓣相似度为 0.834 ~ 1.000, 花萼相似度为 0.947 ~ 1.000, 雄蕊相似度为 0.921 ~ 0.999, 表明不同批次木棉花及其不同部位的化学成分相似, 质量较为稳定。



X - 混合对照品; Y - 药材; B - 花瓣; E - 花萼; R - 雄蕊; 1 - 原儿茶酸; 2 - 新绿原酸; 3 - 芒果苷; 4 - 维采宁 II; 5 - 牡荆苷; 6 - 芦丁; 7 - 异槲皮苷; 8 - 槲皮苷。  
X - mixed control; Y - herb; B - petal; E - calyx; R - stamen; 1 - protocatechuic acid; 2 - neochlorogenic acid; 3 - mangiferin; 4 - vicenin II; 5 - vitexin; 6 - rutin; 7 - isoquercetin; 8 - quercetin.

**图 2** 木棉花及其不同部位混合对照品超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱

**Fig. 2** Mixed control UPLC fingerprint of Gossampim Flos and its different parts



Y - 药材; B - 花瓣; E - 花萼; R - 雄蕊; M1 - 药材对照指纹图谱; M2 - 花瓣对照指纹图谱; M3 - 花萼对照指纹图谱; M4 - 雄蕊对照指纹图谱。  
Y - herb; B - petal; E - calyx; R - stamen; M1 - common control fingerprints of herb; M2 - common control fingerprints of petal; M3 - common control fingerprints of calyx; M4 - common control fingerprints of stamen.

**图 3** 木棉花及其不同部位 UPLC 指纹图谱

**Fig. 3** UPLC fingerprint of Gossampim Flos and its different parts

表3 木棉花及其不同部位相似度评价结果

Tab. 3 Similarity evaluation results of Gossampim Flos and its different parts

No.	Similarity	No.	Similarity	No.	Similarity	No.	Similarity
Y1	0.995	B1	0.998	E1	0.999	R1	0.996
Y2	0.987	B2	0.999	E2	1.000	R2	0.994
Y3	0.984	B3	0.998	E3	0.999	R3	0.988
Y4	0.971	B4	1.000	E4	0.997	R4	0.998
Y5	0.995	B5	1.000	E5	1.000	R5	0.999
Y6	0.914	B6	0.997	E6	0.998	R6	0.986
Y7	0.854	B7	0.834	E7	0.947	R7	0.976
Y8	0.992	B8	1.000	E8	1.000	R8	0.994
Y9	0.980	B9	0.997	E9	0.998	R9	0.995
Y10	0.954	B10	0.996	E10	0.996	R10	0.921
Y11	0.896	B11	0.999	E11	0.997	R11	0.992
Y12	0.734	B12	1.000	E12	0.996	R12	0.998
M1	1.000	M2	1.000	M3	1.000	M4	1.000

## 2.5 谱效关系研究

**2.5.1 灰色关联度分析** 灰色关联度分析中主要包括定义参考序列和比较序列,归一化处理原始数据,计算关联系数和灰色关联度,根据各因素之间关联的大小进行排序分析,从而确定各共有峰对药效贡献的大小<sup>[11-12]</sup>。本实验中将木棉花抗氧化活性作为母序列,指纹图谱共有峰峰面积作为子序列,采用均值法对数据进行归一化处理,计算其关联度,得

到各共有峰对抗氧化活性的贡献高低,结果见表4~5。关联度值越大,表明该化学成分与抗氧化活性之间的关联越大,反之则表示关联越小。木棉花药材及其不同部位的抗氧化活性存在一定差异,抗氧化能力贡献最大的色谱峰分别为:维采宁II(药材)、异槲皮苷(花瓣)、芦丁(花萼)、维采宁II(雄蕊),故可初步将这些化合物作为其抗氧化指纹图谱药效控制点。

表4 木棉花及其不同部位指纹图谱与 ABTS 清除率的关联度

Tab. 4 Correlation between the fingerprint of Gossampim Flos and its different parts and scavenging rate of ABTS

Peak number	Herb		Petal		Calyx		Stamen	
	Relevancy	Ranking	Relevancy	Ranking	Relevancy	Ranking	Relevancy	Ranking
Protocatechuic acid	0.78	3	0.94	2	0.93	2	0.70	5
Neochlorogenic acid	0.76	4	0.87	6	0.90	4	0.66	7
Mangiferin	0.65	8	0.89	5	0.91	3	0.56	8
Vicenin II	0.83	1	0.77	7	0.88	7	0.82	1
Vitexin	0.82	2	0.74	8	0.73	8	0.78	2
Rutin	0.71	5	0.94	3	0.93	1	0.74	4
Isoquercetin	0.71	6	0.96	1	0.89	6	0.75	3
Quercetin	0.66	7	0.89	4	0.89	5	0.68	6

表5 木棉花及其不同部位指纹图谱与 DPPH 清除率的关联度

Tab. 5 Correlation between the fingerprint of Gossampim Flos and its different parts and scavenging rate of DPPH

Peak number	Herb		Petal		Calyx		Stamen	
	Relevancy	Ranking	Relevancy	Ranking	Relevancy	Ranking	Relevancy	Ranking
Protocatechuic acid	0.74	3	0.93	3	0.93	2	0.72	5
Neochlorogenic acid	0.70	6	0.88	5	0.91	3	0.67	6
Mangiferin	0.63	8	0.88	6	0.91	4	0.57	8
Vicenin II	0.80	1	0.77	7	0.88	7	0.81	1
Vitexin	0.79	2	0.74	8	0.72	8	0.76	3
Rutin	0.73	4	0.93	2	0.94	1	0.74	4
Isoquercetin	0.71	5	0.96	1	0.89	5	0.76	2
Quercetin	0.64	7	0.89	4	0.89	6	0.67	7

**2.5.2 斯皮尔曼分析** 采用 SPSS 26.0 软件,经正态性检验,本实验中数据为非正态分布,故对抗氧化活性指标与 12 批木棉药材及其不同部位的色谱峰进行斯皮尔曼分析,结果见表 6;采用 Origin 2018 软件并绘制可视化热图,见图 4。在 ABTS 自由基清除

率分析中,芦丁与木棉花药材及花萼呈显著正相关( $P < 0.05$ ),芒果苷、牡荆苷与木棉花药材及花萼呈极显著正相关( $P < 0.01$ ),牡荆苷与花瓣呈显著负相关( $P < 0.05$ ),维采宁 II、槲皮苷与雄蕊呈显著正相关( $P < 0.05$ )。

表 6 木棉花及其不同部位指纹图谱与抗氧化活性的相关性分析

Tab. 6 Correlation analysis of fingerprint and antioxidant activity of Gossampim Flos and its different parts

Peak number	Herb		Petal		Calyx		Stamen	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
Protocatechuic acid	0.401	0.330	-0.548	-0.469	-0.140	-0.175	-0.088	0.153
Neochlorogenic acid	-0.280	-0.309	0.356	0.352	0.259	0.280	-0.348	-0.529
Mangiferin	0.705 <sup>1)</sup>	0.372	0.155	0.148	0.811 <sup>1)</sup>	0.326	0.520	0.284
Vicenin II	0.502	0.415	-0.039	-0.047	-0.382	-0.312	0.617 <sup>2)</sup>	0.127
Vitexin	0.717 <sup>3)</sup>	0.093	-0.626 <sup>3)</sup>	-0.536	0.759 <sup>3)</sup>	0.285	0.268	-0.219
Rutin	0.628 <sup>4)</sup>	0.098	0.236	0.120	0.578 <sup>4)</sup>	0.599 <sup>4)</sup>	0.341	0.192
Isoquercetin	0.222	0.067	0.401	0.305	0.128	-0.062	0.313	0.164
Quercetin	0.498	-0.126	0.366	0.240	0.309	0.137	0.619 <sup>5)</sup>	0.128

注:与芒果苷相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与维采宁 II 相比,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与牡荆苷相比,<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ;与芦丁相比,<sup>4)</sup> $P < 0.05$ ;与槲皮苷相比,<sup>5)</sup> $P < 0.05$ 。

Note: <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , compared with mangiferin; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , compared with vicenin II; <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , compared with rutin; <sup>4)</sup> $P < 0.05$ , compared with rutin; <sup>5)</sup> $P < 0.05$ , compared with quercetin.

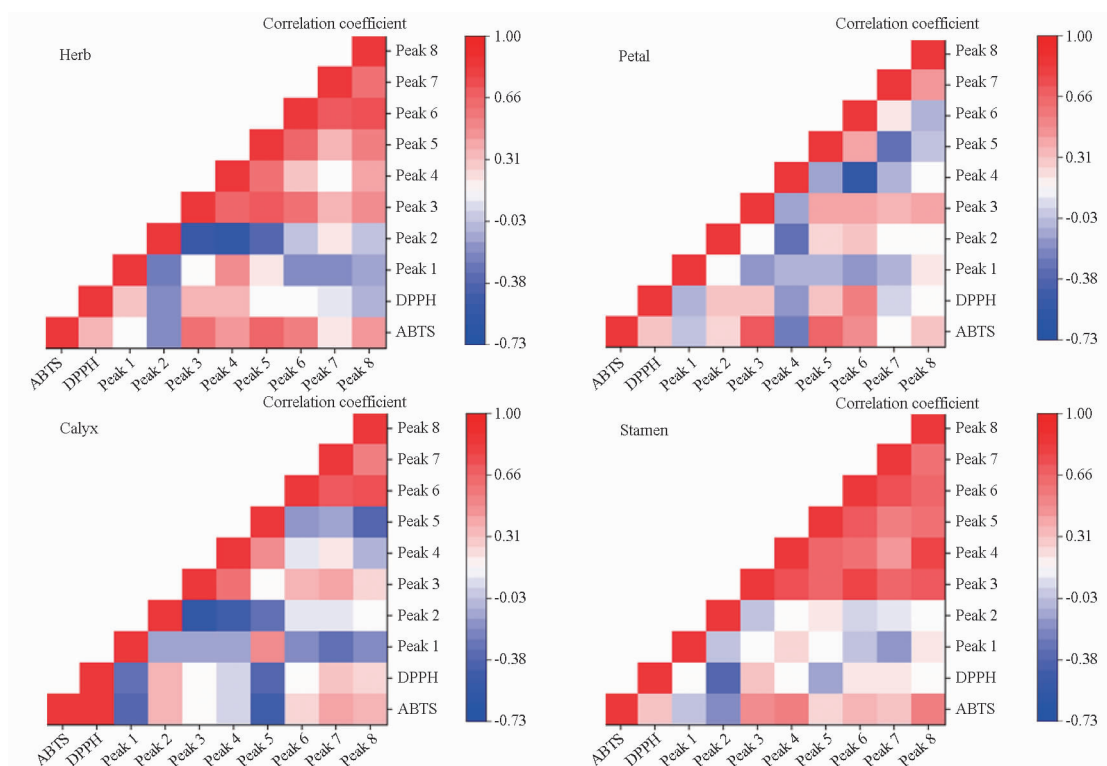


图 4 斯皮尔曼分析可视化热图

Fig. 4 Visual heat map of Spearman's analysis

**2.5.3 逐步回归分析** 以 ABTS 自由基清除率 ( $M$ )、DPPH 自由基清除率 ( $N$ ) 和色谱峰面积 ( $S$ ) 为因变量和自变量,采用 SPSS 26.0 软件进行逐步回归分析<sup>[13]</sup>,得到回归模型,见表 7~8。回归模型均具有极显著差异( $P < 0.05$ ),表明木棉花药材及其不同部位的指纹图谱峰与其抗氧化活性之间存在显

著的线性关系,可用其指纹图谱色谱峰峰面积预测 ABTS 自由基清除率和 DPPH 自由基清除率。

**2.5.4 偏最小二乘回归分析** 分别以 12 批木棉花及其不同部位的 ABTS 自由基清除率、DPPH 自由基清除率作为因变量,指纹图谱共有峰峰面积作为自变量,采用 SMICA-P 14.0 软件进行偏最小二乘法

表7 木棉花及其不同部位指纹图谱与 ABTS 自由基清除率的回归方程

Tab. 7 Regression equation of fingerprint and ABTS scavenging rate of Gossampim Flos and its different parts

Category	Scavenging rate of ABTS
Herb	$M_{\text{herb}} = 0.875 + 0.116S_{\text{mangiferin}}$
Petal	$M_{\text{petal}} = 0.875 + 0.125S_{\text{mangiferin}}$
Calyx	$M_{\text{calyx}} = 0.861 + 0.234S_{\text{mangiferin}} - 0.102S_{\text{vicenin II}}$
Stamen	$M_{\text{stamen}} = 0.933 + 0.060S_{\text{mangiferin}}$

表8 木棉花及其不同部位指纹图谱与 DPPH 自由基清除率的回归方程

Tab. 8 Regression equation of fingerprint and DPPH scavenging rate of Gossampim Flos and its different parts

Category	Scavenging rate of DPPH
Herb	$N_{\text{herb}} = 0.304 + 0.159S_{\text{mangiferin}} + 0.363S_{\text{protocatechuic acid}} + 0.168S_{\text{isoquercetin}}$
Petal	$N_{\text{petal}} = 0.519 + 0.227S_{\text{mangiferin}} + 0.254S_{\text{protocatechuic acid}}$
Calyx	$N_{\text{calyx}} = 0.656 + 0.181S_{\text{mangiferin}} + 0.363S_{\text{neochlorogenic acid}}$
Stamen	(The significance of DPPH free radical clearance and the common peak-to peak area of stamen fingerprint did not meet the requirement)

分析,得到自由基清除率与共有峰峰面积的标准化回归系数和变量投影重要性系数,见图5~6。回归系数的正负表示自变量与因变量具有正相关或负相关关系,而变量重要性投影值(VIP)值表示自变量对因变量贡献的大小,当VIP > 1表明该自变量对因变量的解释能力越强,对模型具有显著的贡献<sup>[14-15]</sup>。由VIP值结果可知,以ABTS或DPPH自由基清除率为指标时,芒果苷、槲皮苷、芦丁、牡荆苷为药材主要药效峰,维采宁II、牡荆苷为花瓣主要药效峰,芒果苷、牡荆苷、槲皮苷为花萼主要药效峰;以ABTS自由基清除率为指标时,芒果苷、维采宁II、牡荆苷、芦丁、槲皮苷为雄蕊主要药效峰;以DPPH自由基清除率为指标时,原儿茶酸、新绿原酸、芒果苷、槲皮苷为雄蕊主要药效峰。由标准化回归系数结果可知,与木棉花药材及花瓣ABTS或DPPH自由基清除率呈负相关(回归系数 < 0)的色谱峰分别为新绿原酸、原儿茶酸、维采宁II、牡荆苷;与花萼ABTS自由基清除率呈负相关(回归系数 < 0)的色谱峰分别为原儿茶酸、维采宁II;与雄蕊ABTS或DPPH自由基清除率呈负相关(回归系数 < 0)的色谱峰分别为新绿原酸、牡荆苷、芦丁、异槲皮苷。

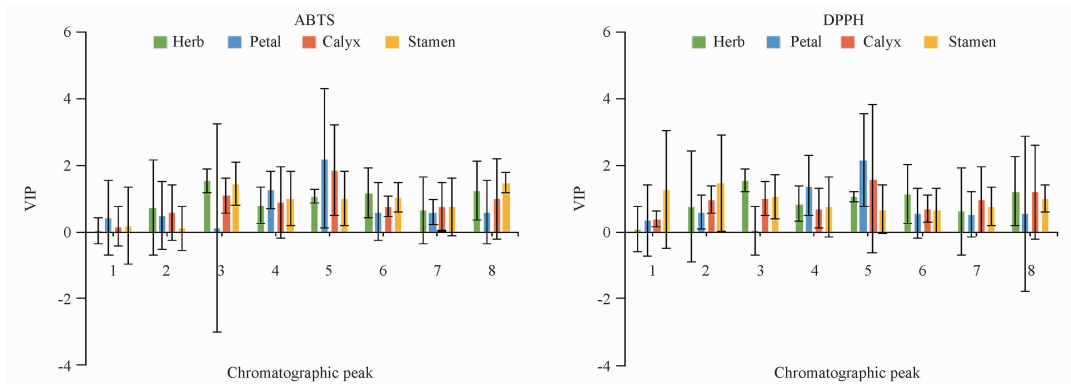


图5 木棉花药材及其不同部位偏最小二乘回归(PLSR)模型重要性投影值(VIP)值。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 5 VIP value and regression coefficient of Gossampim Flos PLSR model. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

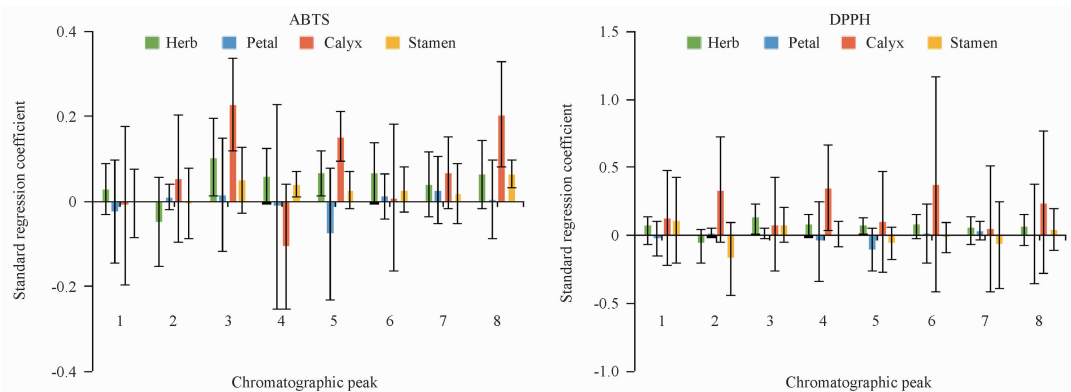


图6 木棉花药材及其不同部位 PLSR 模型回归系数。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 6 PLSR model regression coefficients of Gossampim Flos and its different parts. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

中药具有多成分、多靶点等特性,在疾病治疗过程中,其功效主要取决于多种成分的共同作用<sup>[16]</sup>。为阐明中药质量与其疗效的关系,本实验建立了木棉花 UPLC 指纹图谱。基于前期研究成果<sup>[5]</sup>,对指纹图谱的色谱条件进行优化,同时优化供试品溶液的制备方法,考察提取方式(回流、超声)、提取时间(30、60 min)对提取效果的影响。结果显示,超声提取时部分活性成分未能彻底提取出来,提取 30 min 的提取效果与提取 60 min 的无明显差异,故本实验采用“2.3.3”项下供试品溶液制备方法。

本实验对 12 批木棉花药材及其不同部位水提取物的抗氧化活性进行测定,结果显示,清除 ABTS、DPPH 自由基能力强弱分别为药材 > 花瓣 > 花萼 ≈ 雄蕊、雄蕊 > 药材 ≈ 花萼 > 花瓣。近年来,谱效学成为一个研究热点,其将中药指纹图谱与药效学相结合,探讨中药成分含量与药效的相关性,对木棉花药材的有效开发和利用具有一定的参考意义。灰色关联度分析结果显示,抗氧化能力贡献最大的色谱峰分别为:维采宁 II(药材)、异槲皮苷(花瓣)、芦丁(花萼)、维采宁 II(雄蕊)。但关联度值均为正值,只能反映与药效相关性的大小,无法分析与药效呈负相关的成分,同时无法显示各成分的显著性<sup>[17]</sup>。斯皮尔曼分析与逐步回归分析结果显示,木棉花药材及其不同部位的指纹图谱色谱峰(芦丁、牡荆苷、芒果苷等)与其抗氧化活性之间存在显著的线性关系( $P < 0.05$ )。偏最小二乘回归分析结果显示,芒果苷、槲皮苷、芦丁、牡荆苷等化合物为木棉花药材及其不同部位抗氧化活性的主要有效成分。联合上述几种分析,每种方法得到的相关性结果并不完全一致,但每种方法之间相互补充相互验证,综合 3 种方法可知,木棉花及其不用部位的抗氧化作用是多组分共同发挥作用的结果<sup>[9]</sup>。

### REFERENCES

[1] Ch. P (2020) Vol I (中国药典 2020 年版.一部)[S]. 2020: 65-66.  
[2] TANG A C, YU Y, HUANG M, *et al.* Advances in studies on chemical constituents and pharmacological effects of bombax malabaricum flower[J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2020, 29(23):74-79.  
[3] WENG Y Y, ZHANG Z F, ZENG Z F, *et al.* Study on the extraction and antioxidant activity of total flavonoids from different

parts of Kapok by internal boiling under reduced pressure[J]. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2016, 44(9):293-297.  
[4] WANG X Q, LIN T, BI F J, *et al.* Analysis on ABTS free radicals scavenging ability of Shengmai Capsule[J]. *Pharm Today* (今日药学), 2024, 34(5):331-335.  
[5] YAO W H, LI F Y, WANG J, *et al.* Study on extraction of total flavonoids in Ligustrum flowers and its scavenging activity on DPPH free radicals[J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2016, 37(14):42-45+67.  
[6] LI D K, WU H W, LI G F, *et al.* Study on content of total polyphenols and total anthraquinones in Rhubarb and its spectrum-effect relationship of anti-oxidation *in vitro*[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34(4):541-552.  
[7] ZENG Z J, YU X T, DENG C C, *et al.* Study on the differences in different parts of Gossampim flos based on chemical pattern recognition and entropy TOPSIS method[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34(9):1557-1564, 1581.  
[8] NAN M L, YIN H, SI X L, *et al.* Study on the spectrum-effect relationship between the different solvent extracts of *Lonicera japonica* leaves and their antioxidants[J]. *J Changchun Univ Chin Med* (长春中医药大学学报), 2022, 38(10):1102-1107.  
[9] HUANG L L, ZHENG Y, WANG X, *et al.* Relationship between antioxidant activity and spectrum-effect of Hibisci Mutabilis Folium[J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2022, 39(19):2489-2497.  
[10] Guangdong Institute for Drug Control. Quality standard for mumi-anhua peifangkeji [EB/OL]. <https://gdic.gd.gov.cn/attachment/0/473/473083/3635461>. 2021-11-10/2024-09-09.  
[11] CHEN S Y, LI L, DENG L H, *et al.* Grey relation analysis and chemical pattern recognition on characteristic chromatogram of *Smilacis Glabrae* Rhizome[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2022, 57(18):1535-1542.  
[12] SHI Y S, WAN Q, WANG Q L, *et al.* Research on grades of Vine Tea based on entropy TOPSIS method and grey correlation analysis[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53(17):5504-5512.  
[13] BU C, HONG Y, WANG X Q, *et al.* Study on the fingerprint of *n*-butanol fraction of *Paridis Rhizoma* and its antioxidant activity spectrum-effect relationship[J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2022, 36(5):27-32.  
[14] HE T, LUO M, WANG Y, *et al.* Establishment of HPLC-ECD fingerprinting of *Prunella vulgaris* L. and study on its antioxidant spectrum-effect relationship[J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2023, 40(8):1021-1028.  
[15] YANG Y, LU X R, SONG P S, *et al.* Correlation analysis between HPLC fingerprint and antioxidant activity of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2022, 42(4):607-617.  
[16] TAN J C, BAI L D, REN J, *et al.* Optimization of extraction process of total flavonoids in *Moghania philippinensis* Merr. et Rolfe and study on antioxidant activity of extracted phase *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2022, 57(20):1710-1716.  
[17] LI L, PAN Q W, LIU H, *et al.* Application of grey relational analysis in the study of chinese medicine spectral efficacy[J]. *J China Pharm* (中国药房), 2018, 29(11):1581-1584.  
(收稿日期:2024-05-09)