

基于谱效相关分析黄芪茎叶乙酸乙酯部位的抗氧化活性成分

李小兰, 高欣缘, 李学颖, 王小敏, 秦楠, 郭丽丽*

(山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西晋中 030619)

摘要: 该研究旨在采用谱效关联法筛选黄芪茎叶中的抗氧化活性成分。以 19 批不同产地黄芪茎叶的乙酸乙酯萃取物为检测样品, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统建立样品的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 采用体外抗氧化法评价不同样品的抗氧化活性, 通过皮尔逊相关性、偏最小二乘回归和灰色关联度分析对黄芪茎叶样品共有峰与其抗氧化活性指标进行关联性分析。结果表明, 从 19 批黄芪茎叶样品指纹图谱中标定了 13 个共有峰 (F1~F13), 各批次样品与对照指纹图谱的相似度值为 0.912~0.997。不同产地黄芪茎叶的乙酸乙酯部位具有显著不同的抗氧化能力 ($P<0.05$), 进一步的谱效关联性分析显示, F3、F5、F7、F8、F10、F12 是反映黄芪茎叶抗氧化活性的主要特征峰。经与对照品比对, F5、F10、F12 分别被鉴别为槲皮苷、毛蕊异黄酮和山奈酚。该研究为进一步开发黄芪茎叶抗氧化产品奠定了重要理论基础。

关键词: 黄芪茎叶; 抗氧化活性; 指纹图谱; 谱效关联

文章编号: 1673-9078(2025)03-279-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0088

Antioxidant Active Components of Ethyl Acetate Fractions from the Stems and Leaves of *Astragalus membranaceus* Based on Spectrum-effect Correlation

LI Xiaolan, GAO Xinyuan, LI Xueying, WANG Xiaomin, QIN Nan, GUO Lili*

(College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

Abstract: Spectrum-effect correlation was used to screen antioxidant active components from the stems and leaves of *Astragalus membranaceus*. A total of 19 batches of ethyl acetate extracts from the stems and leaves of *A. membranaceus* with different geographical origins were used as test samples. High-performance liquid chromatography fingerprints of the samples were established using the similarity evaluation system of chromatographic fingerprints of traditional Chinese medicine, and the *in vitro* antioxidant activities of different samples were investigated. The correlation between common peaks of the

引文格式:

李小兰,高欣缘,李学颖,等.基于谱效相关分析黄芪茎叶乙酸乙酯部位的抗氧化活性成分[J].现代食品科技,2025,41(3):279-289.

LI Xiaolan, GAO Xinyuan, LI Xueying, et al. Antioxidant active components of ethyl acetate fractions from the stems and leaves of *Astragalus membranaceus* based on spectrum-effect correlation [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 279-289.

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 山西省自然科学研究面上项目 (202303021221160); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“太行本草”专项项目 (2022PY-TH-04); 山西省研究生科研实践创新项目 (2023KY687); 山西中医药大学研究生创新创业项目 (2023CX044)

作者简介: 李小兰 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药食同源中药功能产品研究, E-mail: lx120210903@163.com

通讯作者: 郭丽丽 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 活性物质研究及功能食品开发, E-mail: cauguolili@163.com

stems and leaves of *A. membranaceus* and their antioxidant activity indices was clarified using Pearson correlation analysis, partial least squares regression, and grey correlation analysis. The results showed that 13 common peaks (F1~F13) were calibrated from the fingerprints of the 19 batches of samples. The similarity values between samples from each batch and the control fingerprint were 0.912~0.997. Ethyl acetate fractions from the stems and leaves of *A. membranaceus* with different geographical origins had significantly different antioxidant capacities ($P<0.05$). Further spectrum-effect correlation analysis showed that F3, F5, F7, F8, F10, and F12 were the main characteristic peaks reflecting the antioxidant activity of the stems and leaves of *A. membranaceus*. Among them, F5, F10, and F12 were respectively identified as quercitrin, calycosin, and kaempferol through comparison with the reference. This study provides an important theoretical foundation for further development of antioxidant products from the stems and leaves of *A. membranaceus*.

Key words: stems and leaves of *Astragalus membranaceus*; antioxidant activity; fingerprint; spectrum-effect correlation

人体许多慢性疾病及衰老现象均与体内自由基水平失衡有关^[1], 挖掘具有清除自由基和抗氧化功能的天然资源一直是研究者关注的热点方向^[2]。黄芪茎叶是豆科多年生草本植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 或膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.]^[3]的地上部分, 属植物黄芪的非传统药用部位。相较于植物黄芪的入药根部, 黄芪茎叶具有产量大、价格便宜等开发优势, 深入探索黄芪茎叶的精深利用与增值化途径成为重要研究课题。目前, 黄芪已成为药食同源物品, 黄芪茎叶也成为黑龙江省的地方食品^[4], 这些均为黄芪茎叶在大健康领域的应用奠定了政策基础。

现代研究表明, 黄芪茎叶含有与入药根部类似的多糖类、黄酮类、皂苷类等化学成分, 其中所含的黄酮类被报道具有抗氧化、抗炎、清除自由基等活性^[5-7]。课题组前期研究表明, 黄芪茎叶乙酸乙酯部位具有较石油醚、氯仿和正丁醇部位更强的清除 DPPH·、ABTS⁺、O₂^{·-} 等自由基的活性, 说明黄芪茎叶清除自由基和抗氧化的成分主要集中于乙酸乙酯部位, 进一步的液质分析结果表明黄芪茎叶乙酸乙酯部位的成分主要为黄酮类, 其次为有机酸类^[8], 但尚不明确具体的抗氧化活性成分。基于指纹图谱数据和生物活性研究的谱效关联分析是可用于活性物质基础研究的有效方法, 该理论通过整合数学统计方法, 如相关分析、灰色关联分析、主成分分析、偏最小二乘回归分析等来增强生物活性物质的化学指纹图谱, 具有专属性强、重现性好、整体、宏观等优点^[9], 现已被用于多个食品功效成分的研究中^[10-13]。

基于此, 本研究采用谱效相关研究黄芪茎叶乙酸乙酯部位中的抗氧化活性成分, 首先建立黄芪茎

叶乙酸乙酯部位的 HPLC 指纹图谱, 同时进行不同样品的体外抗氧化活性分析, 进而采用皮尔逊相关性分析、偏最小二乘回归和灰色关联度分析进行谱效关联, 最终明确黄芪茎叶抗氧化的物质基础, 为黄芪茎叶抗氧化相关产品的开发和质量评价奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

HH-4 数显恒温水浴锅, 金坛市杰瑞尔电器有限公司; AR223CN 电子天平, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; R-1001LN 旋转蒸发仪, 郑州长城科工贸有限公司; SB25-120 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; SpectraMax 190 酶标仪, 北京生原诚业科技有限公司; RIGOL L-3000 高效液相色谱仪, 北京普源精电科技有限公司。

1.2 样品和试剂

本研究采用的 19 批黄芪茎叶样品分别采收于山西、内蒙古、黑龙江和甘肃省, 经山西中医药大学中药资源与鉴定教研室刘计权教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的茎叶, 样品信息详见表 1。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 分析纯, 梯希爱(上海)化成工业发展科技有限公司; 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS), 分析纯, 合肥博美生物科技有限责任公司; 2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪 (TPTZ), 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 邻苯三酚, 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 无水乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 过硫酸钾、硫酸亚

铁、醋酸,分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈,色谱纯,天津市康科德科技有限公司。毛蕊异黄酮葡萄糖苷(HPLC $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮(HPLC $\geq 98\%$),上海融合医药科技有限公司; 槲皮苷(HPLC $\geq 98\%$)、山奈酚(HPLC $\geq 98\%$),上海麦克林生化科技有限公司; 山奈酚-3-O-桑布双糖苷(HPLC $\geq 98\%$),成都普斯生物科技股份有限公司。

表1 样品信息
Table 1 Sample information

样品	产地
S1	山西省大同市浑源县大仁庄村
S2	山西省忻州市代县胡峪乡
S3	山西省大同市浑源县东坊城乡
S4	山西省忻州市繁峙县苏孟庄村
S5	甘肃省定西市岷县文斗乡
S6	甘肃省定西市岷县西寨村
S7	山西省大同市浑源县官儿乡
S8	山西省大同市广灵县望狐乡
S9	黑龙江省大兴安岭地区加格达奇区
S10	山西省大同市浑源县黄花滩乡
S11	山西省大同市灵丘县蒜玉门村
S12	内蒙古通辽市科尔沁区河西镇
S13	山西省大同市浑源县裴村乡
S14	山西省大同市浑源县千佛岭乡
S15	山西省大同市浑源县青磁窑乡
S16	山西省大同市天镇县保平堡村
S17	山西省大同市浑源县王庄堡镇
S18	山西省大同市阳高县大泉山村
S19	山西省朔州市应县盘道村

1.3 方法

1.3.1 黄芪茎叶乙酸乙酯部位的制备

黄芪茎叶样品经干燥粉碎过60目筛。称取15 g黄芪茎叶粉末置于250 mL的锥形瓶中,加入180 mL $\varphi=65\%$ 的乙醇,超声提取40 min,超声温度为70 °C,超声功率500 W,提取2次,合并两次滤液后旋转蒸发浓缩至一定浓度,60 °C烘箱中烘干,得粗提物粉末。将粗提物粉末以1:20 mg/mL的纯水复溶,依次用等体积石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取,得到各部分萃取液,将乙酸乙酯部位旋转蒸发至一

定浓度,60 °C水浴蒸干,4 °C储藏备用。

1.3.2 HPLC指纹图谱建立

1.3.2.1 色谱条件

流动相为乙腈(A)-水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 15%~20% A; 10~20 min, 20%~23% A; 20~28 min, 23%~26% A; 28~32 min, 26%~30% A; 32~40 min, 30%~55% A; 40~48 min, 55%~90% A; 48~50 min, 90%~15% A; 50~60 min, 15% A),检测波长为260 nm,色谱柱为Agilent ZORBAX Extend C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),柱温为25 °C,流量为0.8 mL/min,进样量为10 μ L。

1.3.2.2 供试品溶液制备

精密称取“2.1”项下制备的黄芪茎叶乙酸乙酯提取物0.01 g,加入色谱级甲醇充分溶解,制得2 mg/mL供试品溶液。

1.3.2.3 对照品溶液制备

精密称取适量毛蕊异黄酮葡萄糖苷、槲皮苷、山奈酚、毛蕊异黄酮和山奈酚-3-O-桑布双糖苷,用甲醇配制成终质量浓度分别为0.02、0.02、0.02、0.02和0.5 mg/mL的混合对照品溶液。

1.3.2.4 方法学考察

通过对同1份样品(S11)进行6次重复进样评价方法精密性。通过在相同初始条件下独立制备的6份样品评价重复性。对于稳定性研究,将样品溶液在室温下储存,并分别在0、2、4、8、12和24 h进行进样分析^[14]。

1.3.2.5 指纹图谱的建立

采用“2.2.1”项下HPLC条件检测供试品溶液,以获得不同产地黄芪茎叶乙酸乙酯萃取物的HPLC色谱图,进而采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年第1版)”对不同产地黄芪茎叶乙酸乙酯萃取物的色谱图进行相似度评价。具体过程如下:选取样品S12的色谱图为参比色谱,时间窗宽度为0.1,经多点校正后自动对齐共有峰,以中值法创建对照指纹图谱(R),最后计算对照指纹图谱与19个样品的相似度值^[15]。

1.3.2.6 指纹图谱中色谱峰的指认

将“2.2.3”项下制备的混合对照品溶液进样至HPLC系统,得混合对照品溶液的HPLC色谱图,将该色谱图与对照指纹图谱进行比对,根据对照品的保留时间指认样品对照指纹图谱中的色谱峰。

1.3.3 抗氧化活性测定

1.3.3.1 样品溶液的制备

称取不同产地的黄芪茎叶乙酸乙酯部位粉末各 0.1 g, 加无水乙醇定容至 50 mL, 制得质量浓度为 2 mg/mL 的样品溶液, 再用无水乙醇逐级稀释成 0.2~2.0 mg/mL 系列质量浓度溶液, 4 °C 下保存备用。

1.3.3.2 对 DPPH· 的清除能力测定

配制 0.1 mmol/L DPPH· 溶液, 向 96 孔板中分别加入 20 μL 样品溶液和 200 μL 的 DPPH· 溶液, 室温下避光反应 30 min, 测定各浓度样品 517 nm 波长处吸光度值, 每个样品重复 3 次, 取平均值, 按公式 (1) 计算 DPPH· 清除率 (%) [16]。以清除率为纵坐标, 样品浓度为横坐标作图, 经 Origin 软件拟合后计算样品对 DPPH· 的半数清除率 (IC₅₀)。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C——DPPH· 清除率, %;

A₁——样品的吸光度值;

A₂——无水乙醇代替 DPPH· 溶液时的吸光度值;

A₀——无水乙醇代替样品溶液时的吸光度值。

1.3.3.3 对 ABTS⁺ 的清除能力测定

称取 ABTS 粉末 30 mg, 加超纯水 8 mL 溶解制得 7.0 mmol/L 的 ABTS 溶液; 称取 K₂S₂O₈ 粉末 10 mg, 加 15 mL 超纯水溶解。将上述两种溶液按 1:1 混合, 得到 ABTS⁺ 储备液, 4 °C 避光条件下放置 10~12 h。将 60 μL 样品溶液和 150 μL 的 ABTS⁺ 溶液分别加入 96 孔板中, 避光静置 30 min, 在 734 nm 波长处测定各浓度样品的吸光度值, 每个样品重复 3 次, 取平均值, 按公式 (2) 计算 ABTS⁺ 清除率 (%) [17]。以清除率为纵坐标, 样品浓度为横坐标作图, 经 Origin 软件拟合后计算样品对 ABTS⁺ 的半数清除率 (IC₅₀)。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C——ABTS⁺ 清除率, %;

A₁——样品的吸光度值;

A₂——无水乙醇代替 ABTS⁺ 溶液时的吸光度值;

A₀——无水乙醇代替样品溶液时的吸光度值。

1.3.3.4 对 O₂⁻ 的清除能力测定

分别将 140 μL 的 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 值 = 8.2) 溶液、60 μL 的不同浓度样品溶液和 30 μL 的

邻苯三酚盐酸 (3 mmol/L) 溶液加入到 96 孔板中, 混匀后 25 °C 水浴 5 min, 最后加入 20 μL 的盐酸溶液 (10 mol/L) 终止反应, 325 nm 下检测各浓度吸光度值 [18]。每个样品重复 3 次, 取均值, 按公式 (3) 计算清除率 (%)。以清除率为纵坐标, 样品浓度为横坐标作图, 经 Origin 软件拟合后计算 O₂⁻ 半数清除率 (IC₅₀)。

$$C = \left(1 - \frac{A_1'' - A_2''}{A_0''}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C——O₂⁻ 清除率, %;

A₁''——样品的吸光度值;

A₂''——蒸馏水代替邻苯三酚盐酸溶液时的吸光度值;

A₀''——无水乙醇代替样品溶液时的吸光度值。

1.3.3.5 铁离子还原能力测定

将 10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L FeCl₃ 溶液与 0.3 mmol/L 醋酸缓冲液按 1:1:10 的比例混合制成 FRAP 工作液。将 50 μL 样品溶液加入到 150 μL FRAP 工作液中, 充分混匀后, 避光放置 30 min, 593 nm 处测定吸光度值, 每个样品重复 3 次, 取平均值。用去离子水配制 0.2~2.0 mmol/L 的 FeSO₄ 标准液, 同上述方法测定 FeSO₄ 标准液的吸光度值, 并以浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程 $y = 1.8709x + 0.2641$ ($R^2 = 0.9908$)。将样品的吸光度值代入上述回归方程, 计算得出对应的 FeSO₄ 摩尔浓度, 以此表示不同浓度样品的铁离子还原能力 (即 FRAP 值) [19]。

1.4 数据分析

采用 SPSS 26.0 (IBM) 软件进行方差分析及皮尔逊相关性分析; SIMCA 14.0 (Umetrics) 软件进行偏最小二乘回归分析; SPSS pro 在线软件进行灰色关联度分析; Origin 2022 (Origin Lab) 软件绘制图表并计算抗氧化活性中的 IC₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 方法学验证

精密度试验结果表明相对保留时间的 RSD 值为 0.69%~2.49%, 相对峰面积的 RSD 值为 1.03%~4.78% ($n=6$), 均小于 5%, 表明仪器精密度良好。重复性试验结果表明, 共有峰的相对保留时

间RSD值为0.06%~2.30%，相对峰面积RSD值为0.26%~3.43% ($n=6$)，表明该方法具有良好的重复性。稳定性试验结果表明，共有峰的相对保留时间RSD值为0.41%~1.81%，相对峰面积RSD值为1.45%~4.37%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.2 指纹图谱与相似性分析

19个产地的黄芪茎叶乙酸乙酯部位指纹图谱如图1所示，各批次样品与对照指纹图谱的相似

度值为0.912~0.997，相似度均大于0.9，表明所建立的对照指纹图谱具有较好的代表性，可用于黄芪茎叶乙酸乙酯部位的指纹图谱比较测定。通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统分析共标定出13个共有峰(图2a)，通过与图2b的混合对照品溶液色谱图进行比对，鉴别出峰1为毛蕊异黄酮葡萄糖苷，峰2为山奈酚-3-O-桑布双糖苷，峰5为槲皮苷，峰10为毛蕊异黄酮，峰12为山奈酚。

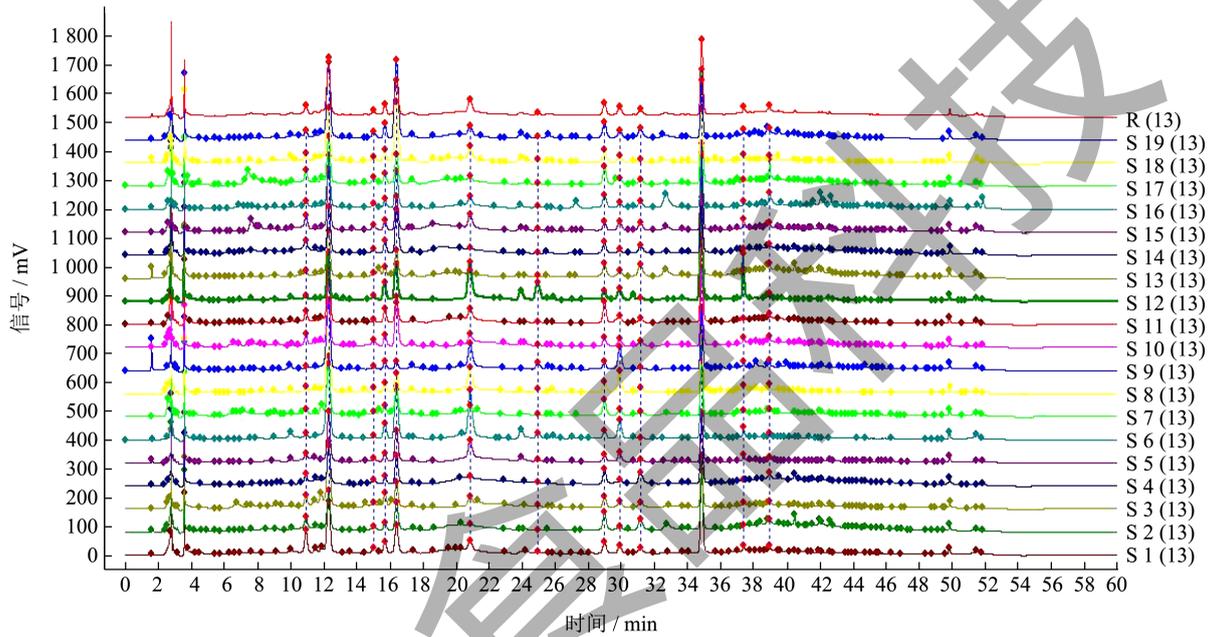


图1 19批黄芪茎叶样品的指纹图谱

Fig.1 Fingerprints of 19 batches of *Astragalus membranaceus* stems and leaves

注: S1~S19为19批不同产地黄芪茎叶样品，具体与表1一致; R为对照指纹图谱; 13为共有峰数目。

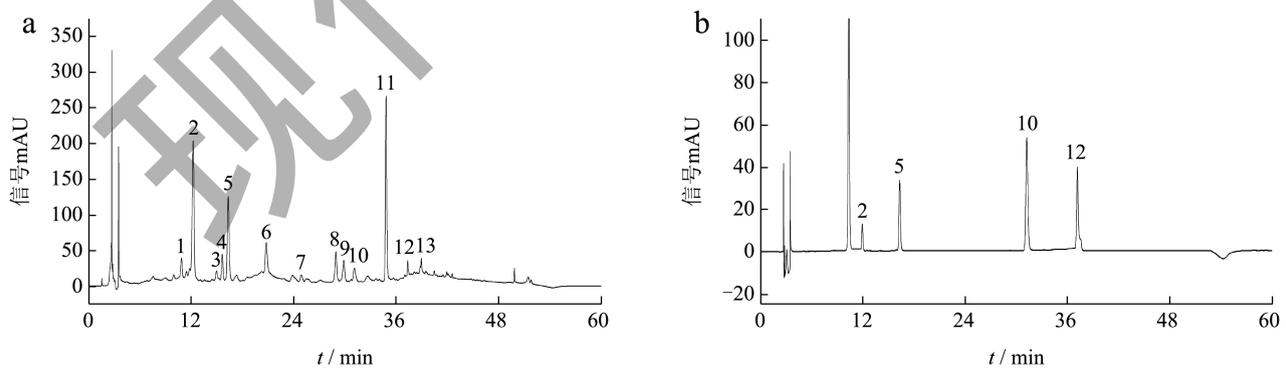


图2 对照指纹图谱(a)和混合对照品(b)色谱图

Fig.2 Chromatograms of the control fingerprint (a) and mixed references (b)

注: 1~13为共有峰序号，其中1为毛蕊异黄酮葡萄糖苷，2为山奈酚-3-O-桑布双糖苷，5为槲皮苷，10为毛蕊异黄酮，12为山奈酚。

2.2 抗氧化活性

2.2.1 对DPPH·的清除能力

由图3可知, 19批不同产地黄芪茎叶的乙酸乙酯部位对DPPH·的清除能力有所不同 ($P < 0.05$), 其清除DPPH·的 IC_{50} 值为0.610~0.910 mg/mL, 其中黑龙江大兴安岭地区加格达奇区的样品具有最小的 IC_{50} 值, 甘肃定西岷县西寨村的样品表现出最大的 IC_{50} 值, 山西省样品表现出中等的清除DPPH·活性。课题组前期研究表明山西省朔州市应县盘道村所产黄芪茎叶总黄酮提取物清除DPPH·的 IC_{50} 值为0.933 mg/mL, 该值大于同产地黄芪茎叶乙酸乙酯部位清除DPPH·的 IC_{50} 值(0.875 mg/mL), 说明乙酸乙酯部位具有较总黄酮粗提物更强的抗氧化活性, 这可能与乙酸乙酯部位中富集了更多的黄酮类化合物有关。曹明原等^[20]的研究表明, 何首乌叶乙酸乙酯部位具有较总黄酮粗提物更高的抗氧化活性, 进一步说明乙酸乙酯部位中含有更多的抗氧化活性成分。

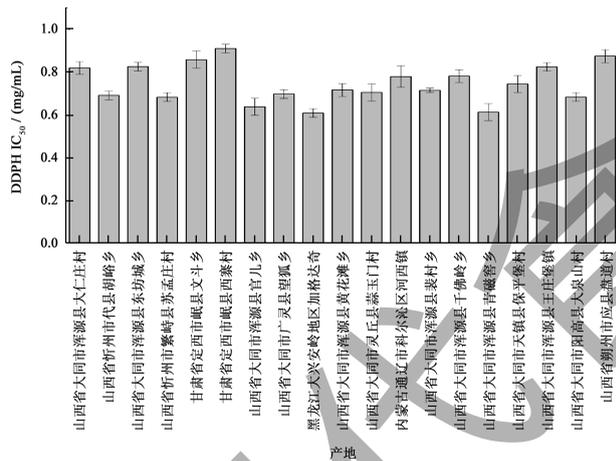


图3 19批黄芪茎叶乙酸乙酯部位对DPPH·的清除能力 IC_{50} 值

Fig.3 IC_{50} values of the scavenging capacity of ethyl acetate fractions from *Astragalus membranaceus* stems and leaves on DPPH·

2.2.2 对ABTS⁺的清除能力

由图4可知, 19批不同产地黄芪茎叶的乙酸乙酯部位对ABTS⁺的清除能力有所不同 ($P < 0.05$), 其清除ABTS⁺的 IC_{50} 值为0.616~0.877 mg/mL, 其中山西省大同市浑源县大仁庄村样品清除ABTS⁺的活性最强。19批黄芪茎叶的乙酸乙酯部位对ABTS⁺的清除能力均优于人参茎叶乙酸乙酯部位的清除能力 ($IC_{50} > 1.0$ mg/mL)^[21], 目前人参茎叶因具有抗氧化、抑菌、抗疲劳等功效而被用于饮料、

口服液等功能食品的开发中^[22,23], 为黄芪茎叶的精深利用提供了实践参考。

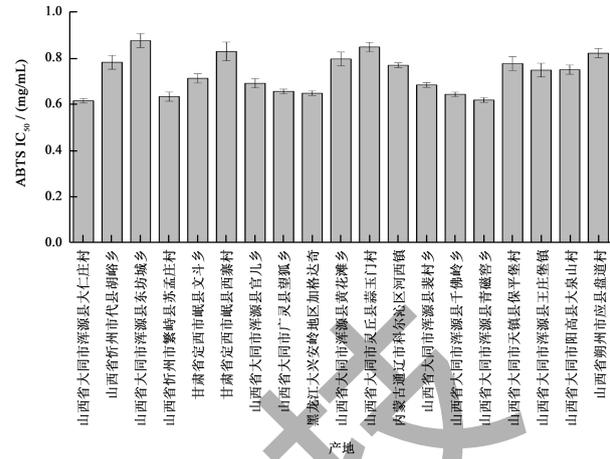


图4 19批黄芪茎叶乙酸乙酯部位对ABTS⁺的清除能力 IC_{50} 值

Fig.4 IC_{50} values of the scavenging capacity of ethyl acetate fractions from *Astragalus membranaceus* stems and leaves on ABTS⁺

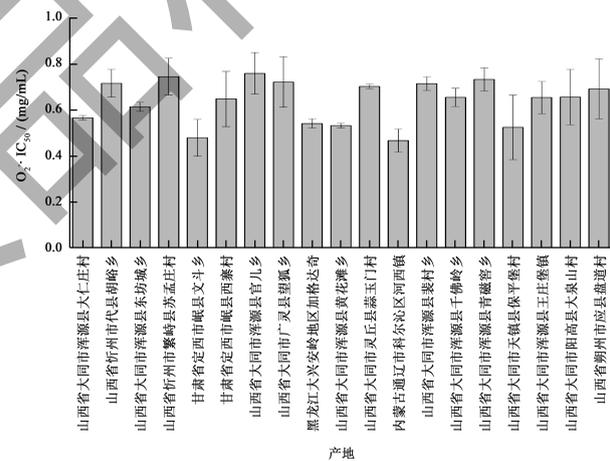


图5 19批黄芪茎叶乙酸乙酯部位对O₂⁻的清除能力 IC_{50} 值

Fig.5 IC_{50} values of the scavenging capacity of ethyl acetate fractions from 19 batches of *Astragalus membranaceus* stems and leaves on O₂⁻

2.2.3 对O₂⁻的清除能力

由图5可知, 19批不同产地黄芪茎叶的乙酸乙酯部位对O₂⁻的清除能力有所不同 ($P < 0.05$), 其清除O₂⁻的 IC_{50} 值为0.468~0.760 mg/mL, 其中内蒙古通辽市科尔沁区河西镇样品清除O₂⁻的活性最强, 山西省大部分样品的 IC_{50} 值较为接近, 表现出中等的O₂⁻清除能力。谭亮等^[24]的研究表明, 黄秋葵乙酸乙酯部位清除O₂⁻的 IC_{50} 值为4.86 mg/mL, 而本研究中19批黄芪茎叶乙酸乙酯部位清除O₂⁻的

IC₅₀ 值均小于 1.0 mg/mL, 表明黄芪茎叶具有较黄秋葵更显著的抗氧化活性, 进一步说明黄芪茎叶是一种优良天然抗氧化资源。

2.2.4 铁离子还原能力

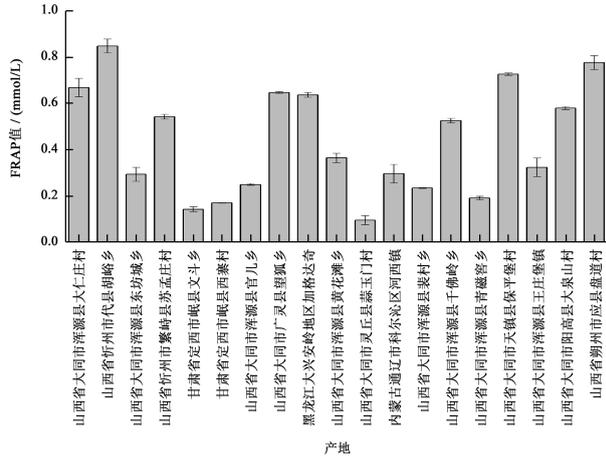


图 6 19 批黄芪茎叶乙酸乙酯部位还原铁离子能力 FRAP 值
Fig.6 FRAP values of ethyl acetate fractions from 19 batches of *Astragalus membranaceus* stems and leaves

图 6 反映了质量浓度为 1.0 mg/mL 的 19 批不同产地黄芪茎叶乙酸乙酯部位的还原铁离子能力。由图可知, 不同产地黄芪茎叶乙酸乙酯部位的还原铁离子能力相差较大 ($P < 0.05$), 其 FRAP 值范围为 0.096~0.848 mmol/L, 其中山西省代县样品的 FRAP 值最大, 表现出最强的抗氧化活性, 山西省其他地区 (灵丘县除外)、内蒙和黑龙江样品的铁离子还原能力次之, 甘肃省样品和山西省灵丘县蒜玉门村样品的铁离子还原能力最弱, 表明产地可能对黄芪茎叶中抗氧化活性成分的积累具有较显著的影响。同时也注意到, FRAP 变化趋势与 DPPH·、ABTS⁺、O₂⁻ 清除能力基本保持一致, 但略有差别, 这可能与各抗氧化模型作用机理不同有关。此外, 与某一自由基清除能力相比, 不同产地样品间的 FRAP 值差异更大。这可能是由于某一自由基清除能力的测定反映的是黄芪茎叶乙酸乙酯部位中某些成分的抗氧化活性, 而 FRAP 值所反映的总抗氧化能力正是不同的有效成分清除不同自由基的有效和^[25], 从而反映为 FRAP 值随不同产地的差异较单一自由基的清除能力更明显。

2.3 谱效相关分析

2.3.1 Pearson相关性分析

以 13 个共有峰的峰面积为自变量, 以不同产地黄芪茎叶乙酸乙酯部位清除 DPPH·、ABTS⁺、

O₂⁻ 的 IC₅₀ 值以及 FRAP 值为因变量, 进行皮尔逊相关性分析, 结果如图 7 所示。根据前述抗氧化活性的测定原理, 样品清除 DPPH·、ABTS⁺、O₂⁻ 的 IC₅₀ 值为负向指标, 即 IC₅₀ 值越小, 表示抗氧化活性越强; 样品的 FRAP 值为正向指标, 即 FRAP 值越大, 表示抗氧化活性越强。由图 7 可知, F8、F9、F10 和 F13 与清除 DPPH· 的 IC₅₀ 值呈负相关, 其中 F10 呈显著负相关, 相关性系数为 -0.594, ($P < 0.05$); F8 和 F10 与清除 ABTS⁺ 的 IC₅₀ 值呈负相关趋势, 相关性大小顺序为 F10 > F8; F1、F3、F4、F5、F7、F8、F10、F12 和 F13 与 FRAP 值呈正相关, 其中相关系数大小排前三的峰顺序为 F3 > F10 > F5; F3、F4、F6、F7、F9、F11、F12 和 F13 与清除 O₂⁻ 的 IC₅₀ 值呈负相关, 其中 F7 和 F12 呈显著相关, 相关性系数分别为 -0.524 和 -0.509, ($P < 0.05$)。综合考虑, 选取与四个抗氧化活性指标显著相关或相关性较大的峰 F3、F5、F7、F8、F10 和 F12 作为可能的抗氧化活性成分。Yu 等^[14]研究了养阴通脑方的抗氧化物质基础, 在 Pearson 相关性分析时首先筛选出与 DPPH· 清除率和 FRAP 值这两个正向指标呈正相关的色谱峰, 然后再按相关性大小排序, 取排序前三的峰作为其潜在的抗氧化活性物质。

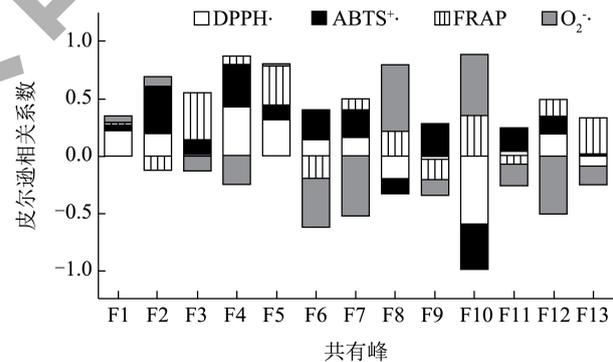


图 7 13 个共有峰与抗氧化活性的皮尔逊相关性分析结果
Fig.7 Results of Pearson correlation analysis of 13 common peaks with antioxidant activity

2.3.2 偏最小二乘回归分析

采用与 Pearson 相关性分析相同的自变量和因变量进行偏最小二乘回归分析, 结果用变量投影重要性 (VIP 值) 和回归系数来反映。VIP 值反映模型中每一个自变量在解释因变量时的重要性, VIP 值越大, 自变量对因变量的解释能力就越强, 通常认为 VIP ≥ 1 时, 自变量在解释因变量时具有显著重要性^[26]。通过回归分析得到如图 8 所示的结果, 与清除 DPPH· 的 IC₅₀ 值呈负相关的峰按照回归系

数绝对值大小排序为 F10 > F9 > F11 > F13 > F6 > F8 (图 8a1), 其中 VIP ≥ 1 的峰为 F10 和 F6 (图 8a2); 与清除 ABTS⁺ 的 IC₅₀ 值呈负相关的峰按照回归系数绝对值大小排序为 F10 > F8 > F1 (图 8b1), 其中 VIP ≥ 1 的峰为 F3、F10、F13、F8 和 F5 (图 8d2)。综合考虑, 选取在四个抗氧化活性指标中既符合相关趋势又满足 VIP ≥ 1 的峰 F3、F5、F6、F7、F8、F10、F12、F13 作为可能的抗氧化活性成分。

其中 VIP ≥ 1 的峰为 F7、F12 和 F6 (图 8c2); 与 FRAP 值呈正相关的峰按照回归系数大小排序为 F3 > F10 > F13 > F8 > F5 (图 8d1), 其中 VIP ≥ 1 的峰为 F3、F10、F13、F8 和 F5 (图 8d2)。综合考虑, 选取在四个抗氧化活性指标中既符合相关趋势又满足 VIP ≥ 1 的峰 F3、F5、F6、F7、F8、F10、F12、F13 作为可能的抗氧化活性成分。

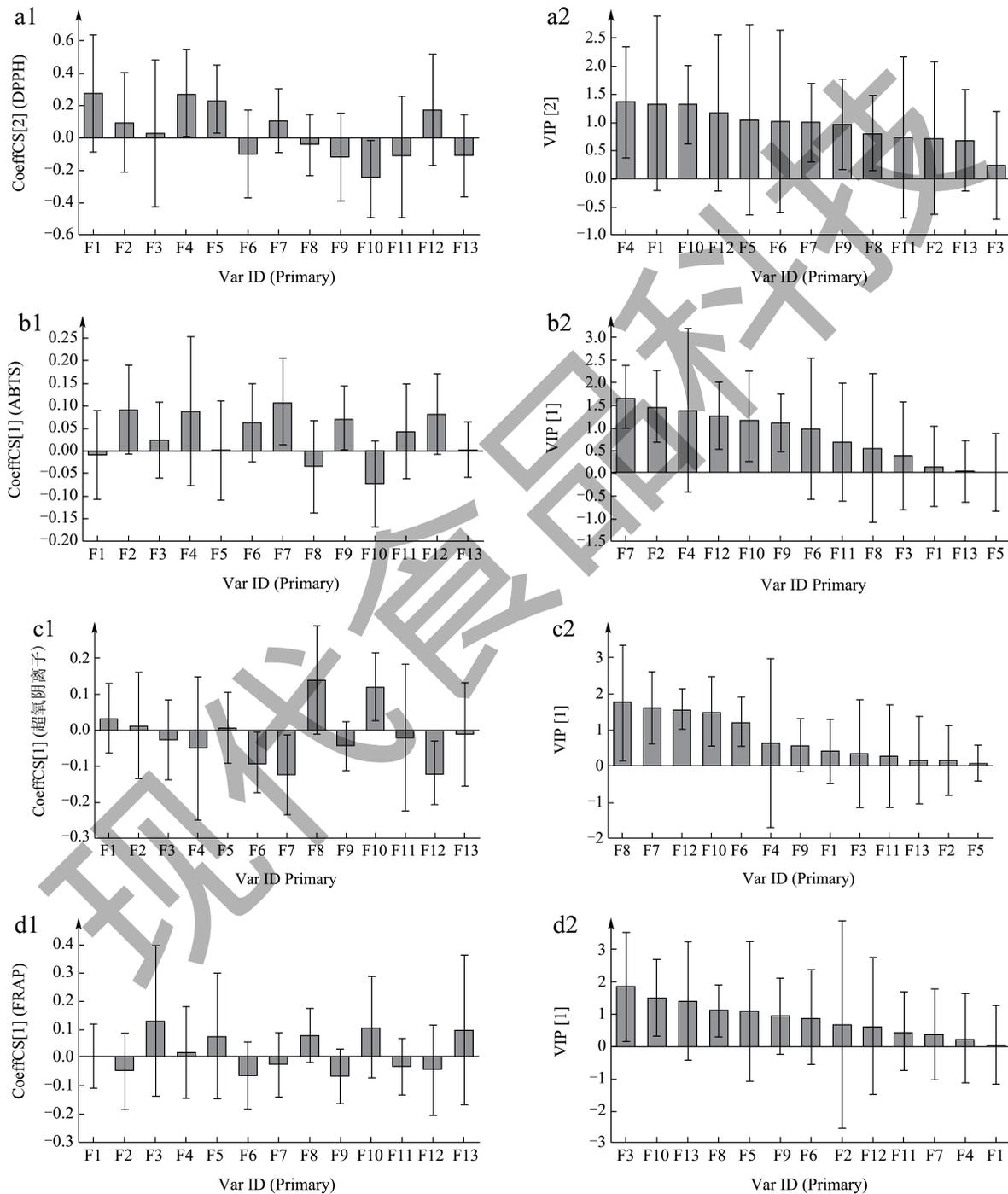


图 8 13 个共有峰与清除 DPPH[·] (a)、ABTS⁺ (b)、O₂^{-·} (c) IC₅₀ 值和 FRAP 值 (d) 的回归系数 (1) 和 VIP 值 (2) 图
 Fig.8 Regression coefficients (1) and VIP values (2) plots of the 13 common peaks with the IC₅₀ values of DPPH[·] (a), ABTS⁺ (b), O₂^{-·} (c) scavenging capacity and FRAP values (d)

表 2 13个共有峰与抗氧化活性的灰色关联度分析结果

Table 2 Grey correlation analysis results of 13 common peaks and antioxidant activity

排序	峰序号	清除 DPPH· 关联度	峰序号	清除 ABTS ⁺ · 关联度	峰序号	清除 O ₂ ⁻ · 关联度	峰序号	还原铁离子能力关联度
1	F10	0.870	F10	0.857	F6	0.810	F3	0.881
2	F8	0.853	F8	0.847	F7	0.796	F10	0.873
3	F2	0.852	F1	0.846	F4	0.793	F8	0.867
4	F11	0.850	F3	0.834	F3	0.792	F5	0.865
5	F13	0.848	F4	0.831	F12	0.791	F13	0.856
6	F3	0.841	F13	0.829	F11	0.785	F4	0.853
7	F9	0.833	F11	0.827	F2	0.778	F2	0.841
8	F1	0.828	F2	0.826	F9	0.770	F11	0.841
9	F4	0.827	F5	0.823	F1	0.767	F1	0.821
10	F6	0.825	F9	0.805	F13	0.767	F9	0.815
11	F12	0.813	F12	0.803	F5	0.766	F12	0.797
12	F5	0.806	F6	0.784	F8	0.746	F6	0.794
13	F7	0.802	F7	0.780	F10	0.719	F7	0.778

2.3.3 灰色关联度分析

由于清除 DPPH·、ABTS⁺· 和 O₂⁻· 的 IC₅₀ 值为负向指标，因此要对其进行标准化处理。然后以 13 个共有峰的峰面积为特征序列（自变量），以不同产地黄芪茎叶乙酸乙酯部位清除 DPPH·、ABTS⁺·、O₂⁻· 的 IC₅₀ 值以及 FRAP 值为母序列（因变量），分别进行灰色关联度分析^[27]。结果可直接反映 13 个共有峰峰面积对清除 DPPH·、ABTS⁺·、O₂⁻· 的 IC₅₀ 值以及 FRAP 值的影响，见表 2。各共有峰与 4 个抗氧化活性指标的关联度均大于 0.7，说明各共有峰与抗氧化活性指标具有较好的关联性。将各共有峰与清除 DPPH·、ABTS⁺·、O₂⁻· 能力和铁离子还原能力的关联度进行排序，前 5 分别为 F10 > F8 > F2 > F11 > F13、F10 > F8 > F1 > F3 > F4、F6 > F7 > F4 > F3 > F12 和 F3 > F10 > F8 > F5 > F13。

2.3.4 抗氧化活性成分的确定

综合分析 Pearson 相关性、偏最小二乘回归和灰色关联度分析结果，取在 3 种分析中均呈较强相关性的峰 F3、F5、F7、F8、F10、F12 为黄芪茎叶中的潜在抗氧化活性成分，其中 F5、F10、F12 已被分别指认为槲皮苷、毛蕊异黄酮和山奈酚，均为黄酮类化合物。黄酮类化合物具有明确的抗氧化

活性^[28]，大量研究也已证实本研究所鉴别出的三种化合物具有抗氧化活性。如研究发现槲皮苷可显著减少伪狂犬病毒感染的 3D4/2 细胞中活性氧的分泌，表明槲皮苷具有抗氧化作用^[29]。对毛蕊异黄酮的抗菌抗肿瘤研究中发现其具有较强的抗氧化活性，清除 DPPH· 的 IC₅₀ 为 120 μg/mL^[30]。研究表明山奈酚可通过降低氧化应激，从而调节内质网应激并诱导线粒体凋亡发挥预防肝癌的作用^[31]。此外，杨锡金等^[32]采用谱效相关研究了景天三七的抗氧化活性物质基础，发现槲皮苷也是景天三七抗氧化活性的关键成分，其可与 GSTP1、ROS-1、TNF、HO-1 和 NO-1 蛋白相结合，这也从反向证实了本研究谱效相关结果的可靠性。值得注意的是，毛蕊异黄酮葡萄糖苷也表现出一定的清除自由基能力，但本研究的谱效关系分析结果并不支持该化合物在黄芪茎叶中发挥主要的抗氧化活性，这可能是由于毛蕊异黄酮葡萄糖苷在黄芪茎叶中的含量较低，对生物活性的贡献率较小，从而在谱效相关分析中未被筛选出来。Li 等^[33]采用 UPLC-MS/MS 分析了黄芪茎叶中 25 种成分的含量，结果表明黄芪茎叶中毛蕊异黄酮和山奈酚的含量远高于毛蕊异黄酮葡萄糖苷，这一结果与上述推测一致。

3 结论

本研究通过谱效关联方法探究了黄芪茎叶的抗氧化物质基础, 指纹图谱结果显示共标定出 13 个共有峰, 进一步采用三种化学计量学方法分析黄芪茎叶乙酸乙酯部位指纹图谱与体外抗氧化活性指标间的内在关系。分析结果表明, 共有 6 个峰 (F3、F5、F7、F8、F10、F12) 与黄芪茎叶抗氧化活性关联性较强, 经 HPLC 法确定了其中的三种成分, 分别为槲皮苷 (F5)、毛蕊异黄酮 (F10)、山奈酚 (F12), 结合相关文献报道这三种成分均具有明显的抗氧化活性, 因此槲皮苷、毛蕊异黄酮和山奈酚可能是黄芪茎叶发挥抗氧化作用的活性成分。另有三种潜在抗氧化活性成分 (F3、F7、F8) 尚未鉴定出, 后续可通过分离制备结合质谱和核磁共振等方法进一步明确这三种未知成分的结构。本研究为进一步深入探究黄芪茎叶抗氧化的作用机制及相关抗氧化产品的开发提供了理论依据。

参考文献

- [1] MEHDI S R, NANJANGUD V. A K, PAOLO Z, et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 694.
- [2] 包卫洋, 赵前程, 王祖哲. 海洋生物活性肽的研究与产业化 [M]. 北京: 海洋出版社, 2020.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [4] 齐齐哈尔医学院. DBS 23/007-2019, 食品安全地方标准 干制黄芪茎叶 [S]. 黑龙江: 黑龙江省卫生健康委员会, 2019.
- [5] CUI L Y, MA Z N, WANG D F, et al. Ultrasound-assisted extraction, optimization, isolation, and antioxidant activity analysis of flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 90: 106190.
- [6] WANG T T, RUAN J Y, LI X X, et al. Bioactive cyclolanstane-type saponins from the stems of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2016, 70(2): 198-206.
- [7] LI Y, GUO S, ZHU Y, et al. Comparative analysis of twenty-five compounds in different parts of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Astragalus membranaceus* by UPLC-MS/MS [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2019, 9(6): 392-399.
- [8] GUO L L, SUN Y, PING X L, et al. Chemical composition and antibacterial activity of ethyl acetate extract of *Astragalus membranaceus* aerial parts [J]. *Journal of Food Safety*, 2022, 42(1): e12947.
- [9] 张强, 杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(3): 680-683.
- [10] 樊兰兰, 巫秋连, 黄万方, 等. 基于谱效关系筛选广西甜茶调节脂代谢活性质量标志物 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45(13): 17-29.
- [11] 邵起菊, 李玉琴, 曹莉, 等. 菊苣中酚类化合物的 HPLC-ECD 指纹图谱及抗氧化活性谱-效关系 [J]. *现代食品科技*, 2023, 39(9): 113-122.
- [12] 包伊凡, 沈新春, 韩欣然, 等. 基于谱效关系的辣木叶降糖活性物质研究 [J]. *中国食品学报*, 2021, 21(1): 225-235.
- [13] 王艳, 杨锡金, 何婷, 等. 基于谱效关系的火棘果酚类化合物抗氧化活性分析 [J]. *食品科技*, 2023, 48(7): 176-184.
- [14] YU L, ZHANG Y Y, ZHAO X X, et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and antioxidant activity of Yangyin Tongnao prescription [J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2021, 2021: 1-11.
- [15] XIAO Y Y, SHAN X X, WANG H X, et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprint and antioxidant of "San-Bai Decoction" extracts [J]. *Journal of Chromatography B*, 2022, 1208: 123380.
- [16] 沙玉欢, 毛晓英, 吴庆智, 等. 核桃分心木黄酮物质的组分及其抗氧化性分析 [J]. *食品科学*, 2021, 42(12): 91-98.
- [17] 冯娇, 肖海鸿. 不同产地银柴胡黄酮含量及其抗氧化活性研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(5): 8-12.
- [18] 袁晓攀, 李世刚, 张宏岐, 等. 五峰绿茶的体外抗氧化活性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(3): 51-55.
- [19] DOU J H, WANG Z Y, SHI D D, et al. HPLC fingerprint and total antioxidant capacity of the extracts from the aerial part of *Paeonia lactiflora* Pall [J]. *International Journal of Food Properties*, 2023, 26(1): 1364-1373.
- [20] 曹明原, 吴静, 顾震, 等. 何首乌叶不同萃取部位的总黄酮和总酚含量及其抗氧化活性 [J]. *食品工业*, 2022, 43(3): 105-110.
- [21] 金学俊, 栗铭鸿, 崔福顺. 人参茎叶成分分析及提取物抗氧化活性研究 [J]. *食品科技*, 2018, 43(9): 279-284.
- [22] 逢焕欢, 费砚群, 徐凤丽, 等. HPLC法测定活力源口服液 中人参茎叶总皂苷的含量 [J]. *中国药品标准*, 2014, 15(3): 202-205.
- [23] 陈玉娇, 俞佳, 马晓丹, 等. 口服人参茎叶皂苷和黄芪多糖对鸡抗氧化功能的影响 [J]. *中兽医医药杂志*, 2016, 1: 37-40.
- [24] 谭亮, 臧秀珍, 云忠祥, 等. 黄秋葵抗氧化活性研究 [J]. *中成药*, 2023, 45(3): 829-835.
- [25] 菅芳芳, 张钟元, 肖亚茹, 等. 基于不同方法评价坚果与果干复配物的抗氧化能力 [J]. *食品科学*, 2023, 44(9): 114-122.
- [26] QIU Q, LIU X F, HUANG C Y, et al. Study on the fingerprint spectrum and the Spectrum-effect relationship of Analgesic

- and Anti-inflammatory effects of the aqueous extract from *Dalbergia hancei* Benth [J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2023, 2023: 1242756.
- [27] 张弘,张慧文,张莎莎,等.基于灰色关联分析的蕈蕈体外抗氧化活性谱效关系研究[J].*食品与药品*,2023,25(6): 494-499.
- [28] SHEN N, WANG T F, GAN Q, et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity [J]. *Food Chemistry*, 2022, 383: 132531.
- [29] WANG Q H, XIE X D, CHEN Q, et al. Effects of quercitrin on PRV-induced secretion of reactive oxygen species and prediction of lncRNA regulatory targets in 3D4/2 cells [J]. *Antioxidants*, 2022, 11: 631.
- [30] KHADEMI E. Study of the anti-bacterial and anti-tumor effects of calycosin [J]. *Archives of Advances in Biosciences*, 2023, 14(1): E41056.
- [31] SHARMA N, BISWAS S, Al-DAYAN N, et al. Antioxidant role of kaempferol in prevention of hepatocellular carcinoma [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(9): 1419.
- [32] 杨锡金,王艳,陈梓瀚,等.基于HPLC-ECD研究景天三七抗氧化活性的谱效关系[J].*食品工业科技*,2023,44(16): 15-24.
- [33] LI Y, GUO S, ZHU Y, et al. Comparative analysis of twenty-five compounds in different parts of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Astragalus membranaceus* by UPLC-MS/MS [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2019, 9(6): 392-399.

现代食品科技