

珍珠透骨草 HPLC 指纹图谱及抗炎活性的谱效关系

申 鸽，景大山，杨 飞，陈 婕，葛 睿，杨官娥*
(山西医科大学 药学院，太原 030001)

〔摘要〕 目的:建立珍珠透骨草药材的 HPLC 指纹图谱,并研究其与抗炎活性之间的谱效关系。方法:采用 HPLC 法建立珍珠透骨草的指纹图谱;在相似度评价基础上,结合聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA),对其中的共有峰进行评价;建立二甲苯致小鼠耳肿胀模型考察珍珠透骨草的抗炎活性,灰色关联度分析(GRA)和偏最小二乘回归分析(PLSR)研究谱效关系。结果:建立了珍珠透骨草的 HPLC 指纹图谱,确定了其中 24 个色谱峰为共有峰,相似度除了 S2 和 S5,均在 0.907 以上,通过对照品比对法指认了其中 4 个峰。HCA 结果表明,全部样品被聚为四类,与 PCA 结果基本一致,结合偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)发现,5,6 和 7 号峰为造成珍珠透骨草样品组间差异的 3 个标志性化合物。不同来源的珍珠透骨草药材均有不同程度的抗炎活性,谱效关系表明,1,4,5,6 和 10 号峰是与抗炎活性关联较大的正相关峰。结论:建立了珍珠透骨草药材的 HPLC 指纹图谱,并确定 1,4,5,6 和 10 号峰为 5 个与抗炎活性密切相关的成分,为药材质量控制提供更全面的参考。

〔关键词〕 珍珠透骨草;指纹图谱;抗炎活性;谱效关系;灰色关联度分析;偏最小二乘回归分析

〔中图分类号〕 R284.2;R289;R22;R2-031 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2019)12-0174-07

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.20191215

〔网络出版地址〕 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190301.1101.010.html>

〔网络出版时间〕 2019-03-04 10:28

Correlation Analysis Between HPLC Fingerprint and Anti-inflammatory Activity of Speranskiae Tuberculatae Herba

SHEN Ge, JING Da-shan, YANG Fei, CHEN Jie, GE Rui, YANG Guan-e*
(School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

〔Abstract〕 **Objective:** The aim of this study was to investigate high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint, anti-inflammatory activity as well as the correlation between them in Speranskiae Tuberculatae Herba. **Method:** Fingerprint by HPLC was established on Speranskiae Tuberculatae Herba from different sources. The common peaks were evaluated on the basis of similarity evaluation together with hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). Ear swelling induced by xylene in mice model was used to study the anti-inflammatory activity. Grey relational analysis (GRA) and partial least square regression analysis (PLSR) were used to study the relationship between the HPLC fingerprint and the anti-inflammatory activity. **Result:** The HPLC fingerprint of Speranskiae Tuberculatae Herba was established and 24 common peaks were determined, with the similarity above 0.907 (except for S2 and S5). Four peaks were identified by comparing to reference substances. The result of HCA showed that Speranskiae Tuberculatae Herba from different sources were clustered into four categories, in consistent with the result of PCA. Combined with discriminant analysis of partial least squares discrimination analysis (PLS-DA), three signature compounds represented by 5, 6, 7 peaks were responsible for the differences between groups. Different sources of Speranskiae Tuberculatae

〔收稿日期〕 20181107(018)

〔基金项目〕 山西省中药材中药饮片标准研究项目(2016010C,2016003C);国家自然科学基金项目(30672621,81173473);山西省自然科学基金项目(2010011048-2);太原市科技项目(120247-08)

〔第一作者〕 申 鸽,在读硕士,从事天然药物活性成分研究工作,Tel:0351-4690143,E-mail:982070394@qq.com

〔通信作者〕 * 杨官娥,博士,教授,从事天然药物化学及生物转化研究工作,Tel:0351-4690143,E-mail:yangguane@aliyun.com

Herba differed in anti-inflammatory activity. The sectrum-activity relationship showed that the peaks 1, 4, 5, 6, and 10 were positively correlated with the anti-inflammatory activity. **Conclusion:** The HPLC fingerprint of Speranskiae Tuberculatae Herba was established, and 5 components closely related to the anti-inflammatory activity were determined. The present study provide more comprehensive reference for quality control of the Speranskiae Tuberculatae Herba.

[**Key words**] Speranskiae Tuberculatae Herba; fingerprint; anti-inflammatory activity; spectrum-effect relationship; grey relational analysis; partial least squares regression analysis

珍珠透骨草为大戟科地构叶属植物地构叶的干燥全草,分布于河南、山东、山西、安徽等地。珍珠透骨草具有祛风除湿、舒筋和活血止痛的功效,主治风湿痹痛、筋骨挛缩、寒湿脚气和疮癣肿毒等证^[1]。现代药理研究表明,珍珠透骨草具有抗炎^[2]、抗氧化^[3]、抑制血小板聚集^[4]等作用。透骨草类药材品种混乱,同名异物现象严重^[5-6]。王璇等^[2]对5种透骨草类药材的抗炎、镇痛活性进行研究,发现珍珠透骨草的抗炎活性优于其他品种;珍珠透骨草所含化学成分主要为黄酮类、生物碱类、挥发油及有机酸等^[7],其化学成分复杂,抗炎活性药效物质基础尚不明确。

珍珠透骨草作为山西的习用药材,现收录于《山西省中药材标准》(2011年版)^[8],质量控制主要以性状鉴别、显微鉴别、浸出物含量等检验项目为主,尚未有相关指标性质控成分含量的测定对其质量进行控制和评价。中药指纹图谱是一种综合、量化的色谱鉴定手段,可以比较全面地反映中药材及制剂的化学成分及特征,进而评价其质量稳定性及一致性^[9-10]。“中药谱效关系”是一种广泛应用于单味药材及复方制剂内在质量控制的中药药效物质辨识模式,通过对药材的化学特征和生物活性进行考察,采用统计学分析方法,科学地阐述其化学成分与疗效的关系^[11-12]。本实验室前期进行了珍珠透骨草对照药材的研究,发现尚未有珍珠透骨草指纹图谱及指纹图谱与药效相结合的报道,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立珍珠透骨草指纹图谱,研究其模式识别,并以抗炎活性作为切入点,结合灰色关联度分析(GRA)^[13]和偏最小二乘回归分析(PLSR)^[14]研究其指纹图谱与抗炎活性的谱效关系,初步揭示珍珠透骨草发挥抗炎作用的物质基础,以期珍珠透骨草进一步的质量控制提供方法和依据。

1 材料

LC-20Atvp型全自动高效液相色谱仪(日本岛津),Diamonsil® C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),AR1140型1/1万电子分析天平(奥斯豪国

际贸易有限公司),8 mm 直径打孔器(山东潍坊五金工具厂)。

对照品阿魏酸(中国食品药品检定研究院,批号110773-201012,纯度>98.0%);木犀草素、香叶木素和穗花杉双黄酮(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为17102605,17061501,17022505,纯度均>98.0%);阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司,批号BJ69519);二甲苯(分析纯),甲酸(分析纯)和甲醇(色谱纯)(天津科密欧试剂有限公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,成都天龙化工试剂厂);其他试剂均为市售分析纯。

动物选用昆明种小鼠,SPF级,雌雄各半,体重18~22 g,由山西医科大学实验动物中心提供,许可证号SYXK(晋)2018-0004,所有动物学实验均符合山西医科大学伦理委员会要求,伦理审批号2019003。

15批珍珠透骨草药材来源见表1,所有药材经山西医科大学药学院白云娥副教授鉴定均为大戟科植物地构叶 *Speranskia tuberculata* 的干燥全草或地上部分。

表 1 珍珠透骨草药材来源
Table 1 Sources of Speranskiae Tuberculatae Herba

编号	产地	编号	产地
S1	河北 1	S9	山东 2
S2	山东 1	S10	河南 2
S3	广西	S11	河北 3
S4	河南 1	S12	山西 3
S5	山西 1	S13	河南 3
S6	河北 2	S14	山西 4
S7	山西 2	S15	山西 5
S8	安徽		

2 指纹图谱的建立

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取珍珠透骨草药材粉末(过20目筛)1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加

入 85% 乙醇 20 mL, 密塞, 回流提取 120 min。待其冷却至室温后, 滤纸滤过, 减压回收溶剂, 残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取阿魏酸、木犀草素、香叶木素和穗花杉双黄酮对照品适量, 加甲醇分别制成单一对照品储备液。分别精密吸取各单一对照品储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶, 加入甲醇, 摇匀, 定容后, 即为混合对照品溶液 (阿魏酸 0.052 g·L⁻¹, 木犀草素 0.050 g·L⁻¹, 香叶木素 0.036 g·L⁻¹, 穗花杉双黄酮 0.052 g·L⁻¹)。

2.1.3 动物试验供试药液的制备 按 2.1.1 项下制备珍珠透骨草 85% 乙醇提取液, 过滤, 回收溶剂, 冷冻干燥后, 加 0.5% CMC-Na 溶液配制成相当于生药量 1 g·mL⁻¹ 的溶液, 作为动物试验供试药液。

2.2 HPLC 色谱条件 Diamonsil® C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A)-0.2% 甲酸 (B) 梯度洗脱 (0~15 min, 5%~40% A; 15~35 min, 40%~60% A; 35~80 min, 60%~75% A), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 340 nm, 进样量 20 μL。

2.3 方法学考察 专属性: 取空白溶剂 (甲醇) 和珍珠透骨草药材 (S12) 的供试品溶液各 1 份, 按 2.2 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果表明, 空白溶剂不干扰测定, 表明所用方法专属性良好。精密密度: 取珍珠透骨草药材 (S12) 的供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件, 连续进样 6 针, 各共有峰相对保留时间 RSD 均 <1%, 相对峰面积 RSD 均 <3%, 说明仪器精密密度良好。稳定性: 取珍珠透骨草药材 (S12) 的供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件, 分别在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 后进样测定, 各共有峰相对保留时间 RSD 均 <1%, 相对峰面积 RSD 均 <3%, 说明供试品溶液室温条件下 24 h 内稳定性良好。重复性: 取珍珠透骨草药材 (S12) 6 份, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液 6 份, 按 2.2 项下色谱条件进样测定, 各共有峰相对保留时间 RSD 均 <1%, 相对峰面积 RSD 均 <3%, 说明所用方法重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱的建立及特征峰的指认 分别取不同来源的珍珠透骨草药材 (S1~S15), 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2 项色谱条件进样, 记录色谱图, 比较 15 批珍珠透骨草的色谱图, 确定 24 个共有峰, 其中 23 号峰为穗花杉双黄酮, 分离度好, 峰形良好, 含量稳定, 故以其作为参照峰。将混

合对照品溶液, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 通过比对, 确定 8 号峰为阿魏酸, 16 号峰为木犀草素, 20 号峰为香叶木素, 23 号峰为穗花杉双黄酮, 指纹图谱匹配见图 1, 共有峰模式见图 2A, 混合对照品溶液见图 2B。

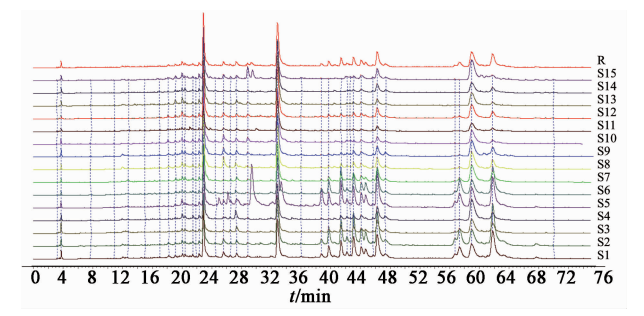
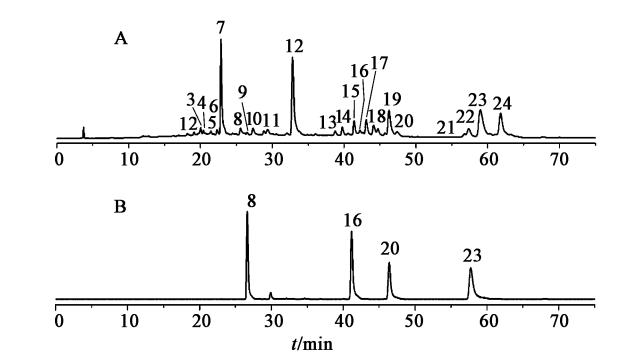


图 1 珍珠透骨草药材 HPLC 指纹谱匹配叠加
Fig. 1 HPLC fingerprint peak matching of Speranskiae Tuberculatae Herba



A. 药材共有峰模式; B. 混合对照品; 8. 阿魏酸; 16. 木犀草素; 20. 香叶木素; 23. 穗花杉双黄酮
图 2 混合对照品及珍珠透骨草药材 HPLC 共有峰模式
Fig. 2 HPLC of mixed reference substance and Speranskiae Tuberculatae Herba total pattern diagram

由图 1, 2 可知各批次珍珠透骨草整体峰的保留时间与对照图谱基本相似, 表明主要成分基本一致, 但部分峰的峰面积有所差异, 表明不同批次成分的含量有所不同。

2.5 相似度评价 将 15 批珍珠透骨草样品指纹图谱 AIA 数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012. A 版) 软件进行相似度分析, 结果表明, 除 S2 和 S5 批相似度分别为 0.892 和 0.730, 其余各批样品相似度在 0.907~0.982, 表明各批次珍珠透骨草质量基本稳定, 个别相似度较低的批次, 可能与季节、栽培方式、采收加工等有关。见表 2。

2.6 聚类分析 将 15 批珍珠透骨草指纹图谱中的 24 个共有峰的峰面积进行 Zscore 标准化处理, 形成 24×15 阶数据矩阵, 导入 SPSS 24.0 软件进行 Q 型

表 2 15 批珍珠透骨草药材指纹图谱的相似度

Table 2 Similarity of chromatographic fingerprint of 15 batches of Speranskiae Tuberculatae Herba

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.934	S9	0.978
S2	0.892	S10	0.935
S3	0.981	S11	0.933
S4	0.973	S12	0.956
S5	0.730	S13	0.936
S6	0.919	S14	0.938
S7	0.960	S15	0.907
S8	0.982		

聚类分析。采用组间连接法 (between groups linkage) 进行 HCA 分析,样品间的距离用欧氏距离法 (euclidean distance) 进行计算,结果显示,当判别距离为 25 时,15 批珍珠透骨草被聚类为 4 大类:第一大类包括 S4, S7, S8, S9, S10, S12, S13, S14 和 S15;第二类包括 S3 和 S11;第三大类包括 S1, S2 和 S5;第四大类包括 S6。结果表明,样品分类存在产地交叉的情况,即样品的分类不受产地的影响,但可能与所含部分化学成分的含量有关。不同批次珍珠透骨草药材之间的相关性与相似度结果大致一致,进一步说明了聚类分析可用来分析不同批次珍珠透骨草的指纹图谱。见图 3。

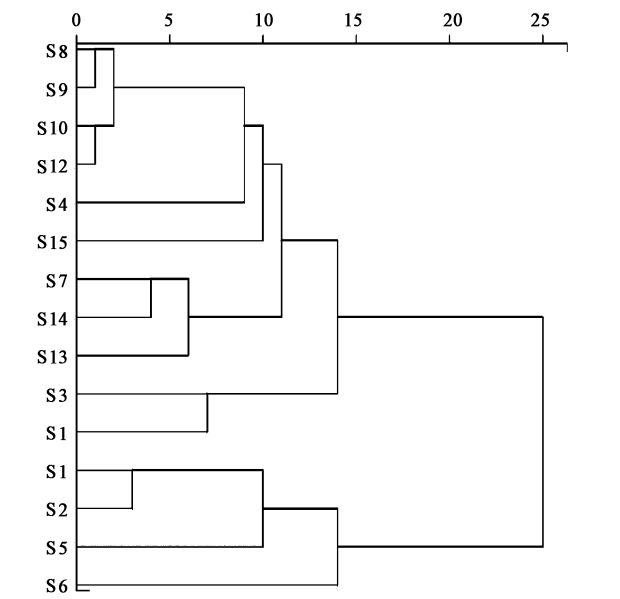


图 3 珍珠透骨草指纹图谱聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of Speranskiae Tuberculatae Herba fingerprint

2.7 主成分分析 (PCA) 15 批药材的 24 个共有

峰峰面积经 Zscore 标准化后导入 SPSS 24.0 软件进行 PCA 处理,求出相关矩阵的特征值、方差贡献率和初始因子载荷矩阵,以特征值 1 为提取标准,得到前 5 个主成分的累计方差贡献率达到 91.672%,表明这 5 个主成分代表了珍珠透骨草指纹图谱 24 个共有峰所包含的大部分信息,这 5 个主成分足以评价珍珠透骨草药材的品质。见表 3,4。

表 3 主成分方差贡献率

Table 3 Variance contribution rate of principel component

峰号	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征根值	方差贡献率/%	累积贡献率/%	特征根值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	11.202	46.675	46.675	11.202	46.675	46.675
2	4.508	18.782	65.457	4.508	18.782	65.457
3	3.016	12.568	78.025	3.016	12.568	78.025
4	2.050	8.543	86.567	2.050	8.543	86.567
5	1.225	5.105	91.672	1.225	5.105	91.672

由初始因子载荷矩阵推测,各批次珍珠透骨草药材质量产生差异化的原因是由多种化学成分综合作用的结果。由表 4 可知,第一主成分的累积贡献率为 46.675%,为“信息量”最多的成分,其信息主要来自于色谱峰 6,9 以及 13~24;第二主成分的信息主要来自于色谱峰 1,3,5,6,8,10,11 和 23;第三主成分的信息主要来自于色谱峰 2,4 和 7;第四主成分的信息主要来自于色谱峰 1,12 和 23;第五主成分的信息主要来自于色谱峰 2 和 4。

用 SIMCA 13.0 软件对 5 种主成分进行 PCA 分析,得到 PCA 得分图,15 批珍珠透骨草药材分类状况与聚类分析结果基本一致,见图 4。为了研究样品组间差异,采用偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 模型,以 VIP 值作为指标来筛选差异较大的成分。一般认为, VIP 值 > 1 的变量对分类起关键性作用^[15]。5,6 和 7 号峰为造成样品组间差异的主要色谱峰,表明 5,6 和 7 号峰在珍珠透骨草药材质量控制中起着相对重要的作用,见图 5。

3 抗炎作用

3.1 动物分组和给药 选 140 只昆明种小鼠随机分为 14 组,每组 10 只,分别设模型组、阳性组 (阿司匹林肠溶片) 和试验组 (珍珠透骨草醇提取物)。除模型组给予生理盐水外,其余各组给予相应的药物,给药剂量见表 5。灌胃给药,每天给药 1 次,连续 5 d。第 5 天给药 45 min 后,于小鼠右耳廓前后均匀涂擦二甲苯 50 μL,致炎 30 min 后将小鼠颈

表 4 色谱峰初始因子载荷矩阵

Table 4 Component matrix of chromatographic peak

峰号	主成分					峰号	主成分				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	0.083	0.662	0.033	0.705	-0.032	13	0.861	-0.091	-0.092	-0.168	-0.063
2	0.112	0.280	0.604	-0.252	-0.666	14	0.921	-0.333	0.045	0.129	-0.117
3	0.406	0.694	-0.029	-0.462	0.004	15	0.919	-0.332	0.094	0.049	-0.032
4	-0.002	-0.140	0.730	-0.133	0.581	16	0.957	-0.099	0.056	-0.060	0.045
5	0.137	0.759	0.488	0.238	0.006	17	0.940	-0.218	0.074	0.180	-0.065
6	0.501	0.752	0.336	-0.215	0.015	18	0.966	-0.029	0.066	0.038	-0.113
7	-0.256	0.017	0.946	-0.036	-0.093	19	0.978	-0.181	0.068	0.009	0.028
8	0.312	0.687	-0.331	0.484	-0.064	20	0.855	0.037	0.172	0.091	0.309
9	0.664	0.433	-0.442	0.013	0.031	21	0.947	-0.171	-0.025	0.182	0.000
10	0.433	0.618	-0.341	-0.175	0.437	22	0.914	-0.343	0.073	0.150	-0.075
11	0.147	0.606	-0.358	-0.135	-0.276	23	0.592	0.532	0.203	-0.520	0.104
12	-0.360	0.331	0.444	0.656	0.104	24	0.933	-0.281	0.102	0.148	-0.035

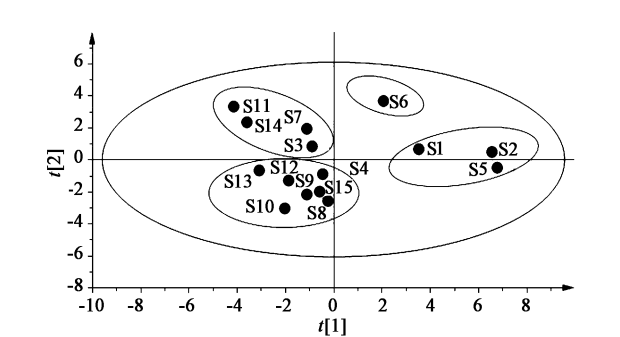


图 4 主成分 PCA 得分
Fig. 4 PCA of principal component

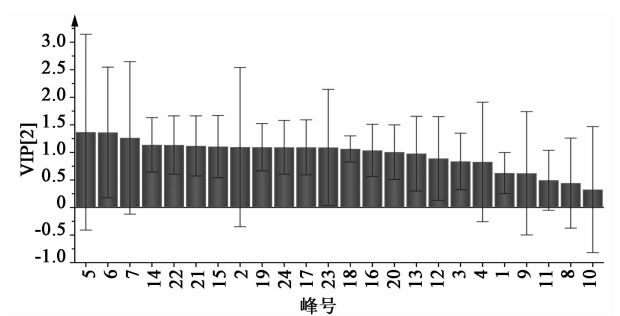


图 5 色谱峰 PLS-DA VIP
Fig. 5 PLS-DA VIP of chromatographic peak

椎脱臼处死。沿耳廓基线剪下双耳,用直径 8 mm 打孔器分别在两耳同一部位打下圆耳片,迅速用分析天平称质量^[16],计算各组肿胀度及抑制率。采用 SPSS 24.0 进行统计分析,组间数据比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。结果表明,与模型组相比,12 批珍珠透骨草醇提物均具

有一定的抗炎活性,其中,以 S10 抗炎活性最强,见表 5。

肿胀度 = 右耳质量 - 左耳质量。
抑制率 = (模型组耳廓肿胀度 - 给药组耳廓肿胀度) /
模型组耳廓肿胀度 × 100%。

3.2 珍珠透骨草醇提物指纹图谱与抗炎活性关系
3.2.1 灰色关联度分析 以不同批次珍珠透骨草醇提物对二甲苯所致小鼠耳肿胀的抑制率设为母序列,子序列为 HPLC 指纹图谱 24 个共有峰的峰面积,分辨系数 ρ 取 0.5,按文献[17-18]的方法和步骤进行数据处理。所得关联度见表 6,各个共有峰所代表的化学成分与抗炎作用均有一定的关联性(关联度 > 0.637),表明珍珠透骨草醇提物的抗炎作用是多组分共同发挥作用的结果。依据关联性的 大小,确定确定各成分对抗炎作用贡献的大小顺序为 5 > 6 > 4 > 23 > 12 > 7 > 2 > 3 > 20 > 18 > 19 > 10 > 1 > 11 > 21 > 24 > 17 > 9 > 16 > 8 > 15 > 22 > 13 > 14。其中 5 和 6 号峰对抗炎作用贡献最大,二者的关联度均 > 0.9。

3.2.2 偏最小二乘回归分析 以 HPLC 指纹图谱 24 个共有峰的峰面积作为自变量,不同批次珍珠透骨草醇提物对二甲苯所致小鼠耳肿胀的抑制率作为因变量,利用 SIMCA 13.0 软件进行偏最小二乘回归法进行谱效相关性分析,回归系数和 VIP 变量投影重要性结果见图 6A 与图 6B。结果表明,珍珠透骨草 HPLC 指纹图谱中的 1,4,5,6,7,9,10,11,12,13,15,18,22 和 24 号峰与抗炎作用呈正相关,即

表 5 珍珠透骨草抗炎作用

Table 5 Anti-inflammatory effect of Speranskiae Tuberculatae Herba

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肿胀度 /mg	抑制率 /%	组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肿胀度 /mg	抑制率 /%
模型	-	12.54 ± 2.30	-	S8	9	9.39 ± 3.92 ¹⁾	25.15
阿司匹林	0.60	6.37 ± 2.10 ²⁾	49.21	S9	9	8.36 ± 3.44 ²⁾	33.32
S1	9	9.86 ± 3.15 ¹⁾	21.42	S10	9	7.99 ± 2.47 ²⁾	36.30
S3	9	9.16 ± 3.73 ¹⁾	26.94	S11	9	9.34 ± 3.37 ¹⁾	25.51
S4	9	9.29 ± 2.08 ¹⁾	25.96	S12	9	9.09 ± 2.63 ²⁾	27.52
S6	9	8.54 ± 3.39 ²⁾	31.93	S13	9	9.76 ± 2.02 ¹⁾	22.21
S7	9	9.49 ± 3.47 ¹⁾	24.37	S14	9	9.23 ± 2.02 ¹⁾	26.37

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾代表 $P < 0.01$ 。

表 6 共有峰与抗炎药效的关联度

Table 6 Correlation between common peak and anti-inflammatory efficacy

No.	关联度	No.	关联度
1	0.810	13	0.667
2	0.863	14	0.637
3	0.860	15	0.697
4	0.882	16	0.734
5	0.908	17	0.753
6	0.902	18	0.825
7	0.864	19	0.817
8	0.705	20	0.845
9	0.740	21	0.767
10	0.816	22	0.671
11	0.789	23	0.878
12	0.876	24	0.759

相对含量增加,抗炎作用增强;剩下的 10 个峰与抗炎作用呈负相关。用变量投影重要性指标(VIP)值来描述自变量对因变量的解释程度,VIP 值越大(>1),自变量对因变量的解释能力越强^[19-21]。3,21,20,8,4,23,1,5,10 和 6 号色谱峰的 VIP 值均>1,说明这几个色谱峰对小鼠抗炎作用影响较显著。综合上述珍珠透骨草醇提物指纹图谱共有峰与小鼠抗炎作用的 PLSR 分析结果,4,1,5,10 和 6 号峰为与抗炎活性关联性较大的正相关峰。灰色关联度分析与偏最小二乘回归分析结果基本一致。

4 讨论

本实验对供试品溶液的提取条件进行了优化,以提取效率最高、提取方法稳定、色谱信息最大化为指标,对提取溶剂、提取方法、溶媒倍量进行优化,最终确定的提取方法为用乙醇溶液(85%)回流提取

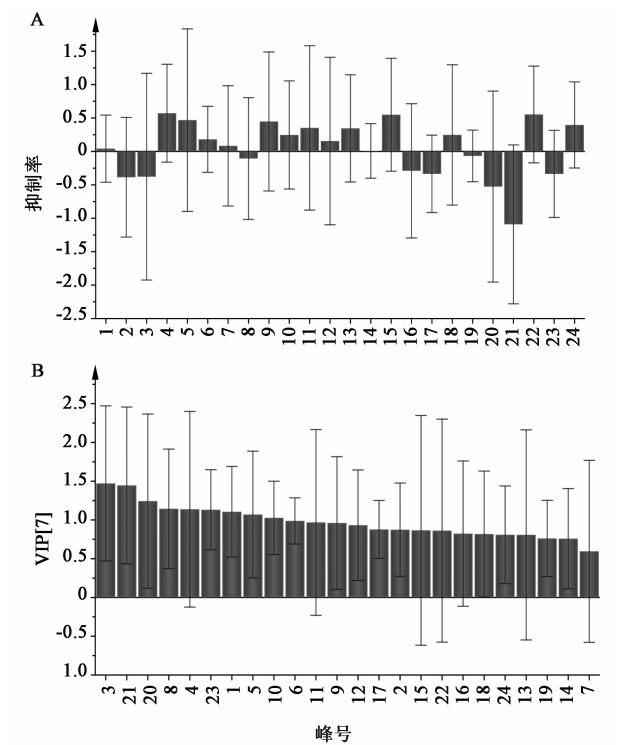


图 6 共有峰与抗炎药效值的偏回归系数(A)及VIP值(B)
Fig. 6 Partial regression coefficient (A) and VIP value (B) of common ualue and anti-inflammatory efficacy

120 min,20 倍溶媒。在建立指纹图谱的过程中,对色谱条件进行了考察,发现以甲醇-0.2% 甲酸溶液为流动相,检测波长为 340 nm,柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹为条件时,各色谱峰分离效果好,峰形较好,基线平稳。

本试验综合 15 批不同来源珍珠透骨草药材指纹图谱的 24 个共有峰的峰面积,指纹图谱的相似度结果,聚类分析结果及主成分分析结果,优选出 12 个不同批次珍珠透骨草来考察抗炎药效。因珍珠透骨草临床上主要以治疗风湿性关节炎为主,因此,本

研究采用二甲苯致小鼠耳肿胀模型来评价抗炎活性,经预试验选择了药效较好的剂量 $9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,作为给药剂量,结果表明,不同来源珍珠透骨草药材对小鼠耳肿胀均有抑制作用且强度不同。

本研究建立了 15 批珍珠透骨草药材指纹图谱,提取出 24 个能够表征含量差异的共有峰,相似度除了 S2 和 S5,均在 0.907 以上,说明不同来源珍珠透骨草质量相对较稳定。通过 HCA 法分析,将样品聚类为 4 类,分类存在产地交叉情况,说明产地并不能作为珍珠透骨草质量评价指标,应综合各化学成分含量整体考虑。通过 PLS-DA 分析,发现 5,6 和 7 号峰这 3 个差异性较大的成分,造成了样品分类的组间差异,因而成分 5,6 和 7 对药材质量控制起着相对重要的作用。

灰色关联度分析结果表明,指纹图谱 24 个共有峰所代表的化学成分与抗炎活性之间的关联度大于 0.637,说明珍珠透骨草发挥抗炎药效是多组分、多靶点综合作用的结果。综合偏最小二乘回归分析结果表明,1,4,5,6 和 10 号峰为对抗炎活性呈较大正相关的色谱峰,与主成分分析结果相似。因此,进一步利用化学分离,LC-MS 等手段,探究这 5 个峰所表征的物质,对珍珠透骨草药材质量控制有着重要的作用。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 1878.

[2] 王璇, 崔景荣, 肖志平, 等. 透骨草类药材抗炎镇痛作用的比较[J]. 北京医科大学学报, 1998, 30 (2): 145-148.

[3] 李会端, 乔爱平. 酶辅助法提取透骨草中总黄酮及抗氧化性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27 (3): 432-437.

[4] 杨俊旺, 梁永录, 李文广, 等. 吡啶-2,6-(1H,3H)二酮生物碱对 ADP, AA, Collagen 诱导的兔血小板聚集的影响[J]. 中国药理学通报, 1998, 14 (1): 24-26.

[5] 迟玉明, 阎文政, 李家实. 透骨草的原植物及商品调查[J]. 中国中药杂志, 1990, 15 (5): 6-9, 61.

[6] 王璇, 蔡少青, 张玉华, 等. 中药透骨草的商品基源研究[J]. 北京医科大学学报, 1997, 29 (3): 241-242, 248.

[7] 索金红, 伊勋非. 珍珠透骨草的化学成分及药理作用[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2009, 24 (5): 506-508.

[8] 山西省食品药品监督管理局. 山西省中药材中药饮片标准[M]. 北京: 科学出版社, 2011.

[9] 吴亚超, 刘佩文, 李德坤, 等. 不同产地栀子的 UPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (2): 74-78.

[10] 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.

[11] 湛晓. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4 (31): 6132, 6134.

[12] 谷海水, 谷卫华. 浅谈中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 当代医药论丛, 2014, 12 (12): 45.

[13] 钟凌云, 王婷婷, 徐婷. “谱-效-性”关联分析探讨不同姜汁炮制黄连的作用差异[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (20): 7-13.

[14] 潘杰, 刘德胜, 颜贵明. 数据分析应用于中药谱效关系中的研究进展[J]. 中医药学报, 2018, 46 (4): 119-122.

[15] 张可佳, 孙宁宁, 杨雪, 等. UPLC 结合化学计量学方法的胡黄连指纹图谱研究[J]. 中草药, 2018, 49 (3): 685-693.

[16] 马玉玲, 薛志远, 高霞, 等. 基于化学计量学的川木香抗炎活性谱效关系研究[J]. 分析测试技术与仪器, 2016, 22 (1): 15-22.

[17] 于萍, 李克. 使用 Microsoft Excel 进行数据的灰关联分析[J]. 微型电脑应用, 2011, 27 (3): 29-30, 37.

[18] 李生茂, 刘琳, 谭睿外, 等. 市售沙棘 HPLC 指纹图谱一致性及抗氧化活性谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (11): 43-48.

[19] 王惠文. 偏最小二乘回归的线性与非线性方法[M]. 北京: 国防工业出版社, 2006.

[20] 相美容, 王孝霞, 孙启慧, 等. 细辛不同极性部位 HPLC 指纹图谱与其镇痛抗炎活性的谱效关系研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (12): 2603-2607.

[21] 姜红, 史亚军, 赵生玉, 等. 基于偏最小二乘法对三果汤抗氧化作用谱-效关系的分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (3): 8-12.

[责任编辑 顾雪竹]