

· 药剂与炮制 ·

# 波棱瓜子乙酸乙酯部位抗免疫性肝损伤活性谱效关系分析

李春沁, 王紫燕, 陈璐, 刘美琳, 张梅\*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:探讨波棱瓜子乙酸乙酯部位 HPLC 特征图谱与其抗免疫性肝损伤活性的相互关系。方法:采用硅胶柱色谱分离结合均匀设计获得不同化学成分组成的 9 批波棱瓜子乙酸乙酯部位样品,应用 HPLC 建立 9 批样品特征图谱并通过聚类分析评价 9 批样品的差异性;建立卡介苗 + 脂多糖诱导小鼠免疫性肝损伤模型测定给药组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT),天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性及肝组织匀浆中丙二醛 (MDA) 含量;结合灰色关联分析法及偏最小二乘回归分析法 (PLSR) 研究其谱效相关性。结果:9 批不同组合的样品 HPLC 图谱有明显差异,从其共有模式中标定了 16 个特征峰。与模型组相比,9 批波棱瓜子给药组小鼠血清中 ALT,AST 活性和肝匀浆中 MDA 含量明显降低。谱效相关性研究发现 6,7,10,15,16 号峰 (分别代表化合物波棱甲素、波棱素、波棱醇、波棱酮、波棱醛) 是与抗免疫性肝损伤作用关联性较大的正相关色谱峰。结论:各样品对免疫性肝损伤均具有治疗作用,其护肝作用主要活性成分为波棱甲素、波棱素、波棱醇、波棱酮、波棱醛。

**[关键词]** 波棱瓜子; 乙酸乙酯部位; 指纹图谱; 免疫性肝损伤; 灰色关联法; 偏最小二乘法; 谱效关系

**[中图分类号]** R945;R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0001-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130001

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160512.1613.018.html>

**[网络出版时间]** 2016-05-12 16:13

## Spectrum-effect Relationship Between HPLC Fingerprints and Hepatoprotective Activity of Ethyl Acetate Extract from *Herpetospermum caudigerum*

LI Chun-qin, WANG Zi-yan, CHEN Lu, LIU Mei-lin, ZHANG Mei\*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the relationship between HPLC fingerprints and hepatoprotective activity of ethyl acetate extract from *Herpetospermum caudigerum*. **Method:** Fingerprints of different combination of ethyl acetate extract from *H. caudigerum* were established by HPLC and were evaluated by hierarchical clustering analysis. In addition, nine samples of ethyl acetate fraction from *H. caudigerum* with different chemical composition were acquired by uniform design and silica gel column chromatography. The hepatoprotective activity of *H. caudigerum* were evaluated with models of immunologic liver injury in mice, and the models were induced by

**[收稿日期]** 20150812(009)

**[基金项目]** 四川省科技支撑项目(2013SZ0114)

**[第一作者]** 李春沁,在读硕士,从事药物分析研究,Tel:15281087655,E-mail:591460435@qq.com

**[通讯作者]** \*张梅,教授,博士生导师,从事中药及其复方物质基础和质量管理研究,Tel:028-61800231,E-mail:zhangmei63@126.com

injecting bacille calmette-guerin (BCG) and lipopolysaccharide (LPS) through the tail vein. The spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and hepatoprotective activity was investigated by grey relational analysis and partial least squares regression analysis (PLSR). **Result:** There were significantly differences in HPLC fingerprints of 9 samples, and 16 common characteristic peaks were detected in HPLC chromatography. Compared with the model group, the treatment with 9 samples restored the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and decreased the content of malonaldehyde (MDA) in BCG/LPS-induced immunological liver injury mice. The spectrum-efficacy relationship found that the main anti-immunological liver injury effect was mostly due to herpetin, herpetotriol, herpetrione, herpetone and herpetal. **Conclusion:** Each sample exhibits good activity on anti-liver injury, and that some lignan constituents, such as herpetin, herpetrione, herpetotriol, herpetone and herpetal, might be the main contributive components in *H. caudigerum* to hepatoprotective activity.

[**Key words**] *Herpetospermum caudigerum*; ethyl acetate extract; fingerprints; immunological liver injury; grey relational analysis; partial least squares regression analysis; spectrum-effect relationship

波棱瓜子是一种常用藏族药,具有清热解毒、去火降热、助消化之功效,治疗肝热、黄疸型传染性肝炎等症<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明波棱瓜子的不同溶剂(三氯甲烷、乙醇、水等)提取物、脂肪酸及木脂素类成分(波棱酮、波棱素等)具有清除自由基、抗炎、抗氧化、抗乙肝病毒等作用<sup>[2-5]</sup>。课题组前期研究表明波棱瓜子乙酸乙酯提取物(主要含木脂素类成分<sup>[4,12]</sup>)具有良好的护肝作用<sup>[13]</sup>。本实验在建立波棱瓜子乙酸乙酯部位 HPLC 特征图谱基础上,研究其抗免疫性肝损伤作用,并采用灰色关联及偏最小二乘回归分析法研究其 HPLC 特征图谱与护肝活性之间的相关性,为确定波棱瓜子抗免疫性肝损伤的可能活性成分(群)提供参考。

### 1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),UV1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。波棱瓜子购于四川甘孜,经成都中医药大学药学院裴瑾教授鉴定为葫芦科植物波棱瓜 *Herpetospermum caudigerum* 的干燥成熟种子;天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),丙二醛(MDA)和总蛋白(TP)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;异落叶松脂醇,去氢双松柏醇,波棱甲素,波棱素,herpetetrone,波棱醇,波棱酮,波棱醛,波棱内酯 A 和波棱内酯 B 对照品(实验室自制,纯度 89.1% ~ 94.3%,仅用于定性鉴别);联苯双酯滴丸(浙江医药股份有限公司新昌制药厂,批号 111015),卡介苗(BCG,北京天坛生物制品研究所,批号 20120312),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级昆明种小鼠,雄性,110 只,体重 18 ~ 22 g,购于成都达硕实验动物有限公司,合格证号

SCXK(川)2013-24。

### 2 方法与结果

**2.1 波棱瓜子乙酸乙酯部位样品制备** 取波棱瓜子粗粉,分别加 10, 8, 6 倍量 95% 乙醇水浴回流提取,提取时间分别为 2.0, 1.5, 1.5 h。合并提取液,旋转蒸发回收乙醇,得浸膏,冷却。浸膏分层后将上层绿色油状物弃去,用石油醚洗涤下层黄色固体。黄色固体用水分散后用乙酸乙酯萃取 3 次,合并上层萃取液,浓缩干燥得棕黄色粉末,即为波棱瓜子乙酸乙酯提取物<sup>[13]</sup>。取乙酸乙酯提取物 60 g 经硅胶柱色谱进行分离,色谱柱(8 cm × 110 cm),10 倍量硅胶(200 ~ 300 目);洗脱剂为不同比例的二氯甲烷-丙酮。二氯甲烷-丙酮(50:1)洗脱部分为混合物 R1,二氯甲烷-丙酮(10:1)洗脱部分为混合物 R2,二氯甲烷-丙酮(1:1)洗脱部分为混合物 R3,甲醇洗脱部分为混合物 R4。将 R1 ~ R4 根据均匀设计原则配比成 9 批波棱瓜子乙酸乙酯部位样品(S1 ~ S9)<sup>[14]</sup>,见表 1。

表 1 混合物 R1-R4 的  $U_9(9^4)$  均匀设计

样品	R1	R2	R3	R4
S1	0.30	0.05	0.24	0.40
S2	0.06	0.35	0.32	0.50
S3	0.24	0.45	0.56	0.80
S4	0.48	0.40	0.16	0.30
S5	0.36	0.30	0.48	0.10
S6	0.54	0.25	0.72	0.60
S7	0.12	0.15	0.64	0.20
S8	0.18	0.20	0.08	0.70
S9	0.42	0.10	0.40	0.90

## 2.2 高效液相特征图谱

**2.2.1 色谱条件** Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 检测波长 230 nm, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL, 流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 32 min, 20% ~ 25% A; 32 ~ 45 min, 25% A; 45 ~ 80 min, 25% ~ 30% A; 80 ~ 120 min, 30% ~ 45% A)。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密称取 9 批供试品各 30 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.2.3 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取异落叶松脂醇, 去氢双松柏醇, 波棱甲素, 波棱素, herpetrone, 波棱醇, 波棱酮, 波棱醛, 波棱内酯 A 和波棱内酯 B 对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.2.4 方法学考察** 取同一供试品溶液, 按 2.2.1 项下条件连续进样 5 次, 计算色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 表明仪器精密度良好。取同一批样品 5 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下条件测定, 结果色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 表明该方法重复性良好。取同一供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 按 2.2.1 项下条件进样, 结果色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 表明在 24 h 内该供试品溶液基本稳定。

**2.2.5 HPLC 图谱峰的归属** 在该色谱条件下, 得波棱瓜子乙酸乙酯部位 HPLC 图谱, 见图 1。标定其中 16 个峰为特征峰, 并将其依次标号, 6 号峰为参照物峰, 见图 2。鉴定峰 2 ~ 4, 6 ~ 8, 10 ~ 11, 15 ~ 16 分别为异落叶松脂醇, 去氢双松柏醇, 波棱内酯 A, 波棱甲素, 波棱素, herpetrone, 波棱醇, 波棱内酯 B, 波棱酮, 波棱醛。

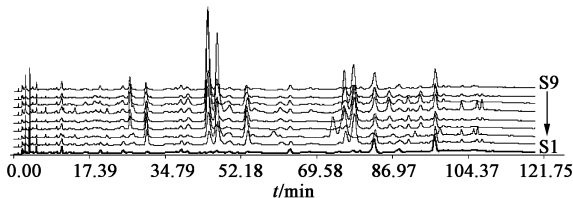


图 1 9 批波棱瓜子乙酸乙酯部位 HPLC 特征谱  
Fig. 1 HPLC fingerprints of 9 batches of ethyl acetate extract from *Herpetospermum caudigerum*

**2.2.6 聚类分析** 与参照物峰相比, 计算其他特征指纹峰相对保留时间, 9 批波棱瓜子乙酸乙酯部位样品各色谱特征峰相对保留时间和峰面积见表 2。对 9 批供试品进行聚类分析, 评价 9 批样品之

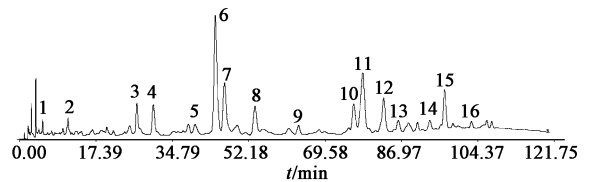


图 2 波棱瓜子乙酸乙酯部位 HPLC 对照谱  
Fig. 2 Reference chromatogram of 9 batches of ethyl acetate extract from *Herpetospermum caudigerum*

间的差异性, 见图 3。结果显示 9 批供试品主要分为 4 类 (I, II, III, IV)。I 类包括 S2, S3, S4, S5; II 类包括 S1, S9; III 类包括 S7, S8; IV 类包括 S6。表明由均匀设计配比的 9 批供试品中化学成分存在较大的差异, 便于进行样品化学成分与药效关联性分析。

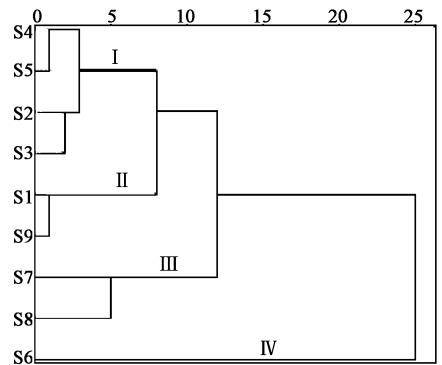


图 3 9 批波棱瓜子乙酸乙酯部位样品聚类分析  
Fig. 3 Hierarchical clustering dendrogram of 9 batches of ethyl acetate extract from *Herpetospermum caudigerum*

## 2.3 9 批 HE 抗免疫性肝损伤药效试验

**2.3.1 分组、给药与指标检测** 110 只雄性昆明种小鼠随机均分为正常组、模型组及 9 批波棱瓜子乙酸乙酯部位给药组, 每组 10 只。造模第 1 天, 除正常组外, 其余小鼠尾静脉注射卡介苗 2.5 mg, 造模第 2 天起, 给药组每天分别按 0.25 g·kg<sup>-1</sup> 灌胃给予波棱瓜子乙酸乙酯部位样品; 正常组与模型组按 20 mL·kg<sup>-1</sup> 灌胃给予生理盐水, 连续给药 12 d, 末次给药 1 h 后, 除正常组外, 其余小鼠尾静脉注射 LPS 7.5 μg。禁食 10 h 后, 摘眼球取血, 分离血清, 检测 ALT 和 AST 水平, 脱颈处死小鼠, 剖取肝脏, 剪取部分肝脏组织, 冰浴中用生理盐水制成 10% 肝匀浆, 离心 (2 500 r·min<sup>-1</sup>, 10 min), 取上清液, 检测 TP 和 MDA 各项指标。所有指标的测定均按试剂盒说明书进行。

**2.3.2 数据处理** 均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行方差齐性分析及独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示有显著性差异。9 批波棱瓜子给药

表 2 波棱瓜子乙酸乙酯部位各特征峰的相对保留时间和峰面积

Table 2 Relative retention time and peak area of each characteristic peak of ethyl acetate extract from *Herpetospermum caudigerum*

No.	相对保留时间	峰面积								
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
1	0.082	539.54	767.91	559.87	601.93	527.07	621.71	833.61	559.52	741.70
2	0.248	748.02	1 090.07	247.60	892.31	580.00	674.19	1 140.47	612.80	890.19
3	0.599	0	433.55	435.60	2 438.04	2 435.23	3 533.55	4 937.40	3 394.48	1 509.29
4	0.682	366.35	3 345.96	4 291.91	3 659.68	3 791.87	2 714.91	4 943.06	1 422.40	773.01
5	0.896	499.12	989.54	622.74	1 575.58	1 287.93	877.32	1 027.32	979.89	704.75
6	1.000	220.03	4 021.35	7 272.45	11 722.71	13 207.29	28 157.83	25 056.42	20 819.69	5 506.95
7	1.046	810.93	6 596.01	11 536.50	1 375.85	5 879.84	21 574.71	1 954.73	5 526.12	1 842.60
8	1.201	621.35	4 016.61	6 726.22	3 938.96	4 337.48	4 208.40	5 930.34	1 831.94	981.98
9	1.425	984.10	885.15	399.32	735.83	451.47	944.35	1 090.48	676.85	1 243.29
10	1.708	0	3 944.00	7 395.91	948.33	3 681.05	12 349.20	1 339.12	3 057.30	561.10
11	1.754	949.64	11 276.30	14 580.70	11 592.95	11 738.47	8 466.46	14 179.13	4 304.24	1 396.78
12	1.861	4 141.24	4 376.22	2 379.88	3 688.66	2 424.70	4 723.66	5 350.24	2 921.23	5 078.77
13	1.935	0	562.05	1 546.66	1 172.83	1 330.16	1 389.31	2 185.41	1 723.20	487.70
14	2.099	297.50	0	1 003.10	1 281.76	1 070.28	1 034.67	1 949.60	1 273.96	576.19
15	2.173	3 520.75	3 556.05	1 740.46	2 911.87	1 949.07	4 154.02	4 270.59	2 410.52	4 223.01
16	2.310	0	593.54	814.62	450.23	323.32	446.57	452.56	487.56	325.97

组小鼠血清中 ALT, AST 活性和肝匀浆中 MDA 含量均较模型组明显降低, 说明 9 批样品均具有抗免疫性肝损伤的作用。由于血清 ALT, AST 和肝组织

MDA 为低优指标, 为使 3 个指标数值表达含义与药效呈正相关, 将 3 个指标变量进行了转换<sup>[15]</sup>, 见表 3。

表 3 波棱瓜子乙酸乙酯部位对免疫性肝损伤小鼠血清中转氨酶及肝匀浆中 MDA 含量的影响及其药效转换值( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Data of effective indexes and their converted values of ethyl acetate extract from *Herpetospermum caudigerum* on immunological liver injury mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	ALT/ U·L <sup>-1</sup>	AST/ U·L <sup>-1</sup>	MDA/ nmol·g <sup>-1</sup>	转换值		
					ALT	AST	MDA
正常	-	11.34 ± 1.56	21.47 ± 13.94	12.03 ± 1.17	-	-	-
模型	-	76.69 ± 13.79 <sup>2)</sup>	92.23 ± 16.72 <sup>2)</sup>	29.23 ± 2.33 <sup>1)</sup>	-	-	-
S1	250	41.24 ± 14.42 <sup>4)</sup>	59.69 ± 8.37 <sup>4)</sup>	21.70 ± 1.72 <sup>3)</sup>	35.45	32.54	7.53
S2	250	35.37 ± 10.54 <sup>4)</sup>	40.80 ± 9.35 <sup>4)</sup>	16.89 ± 2.01 <sup>4)</sup>	41.32	51.43	12.34
S3	250	33.90 ± 9.61 <sup>4)</sup>	38.68 ± 7.14 <sup>4)</sup>	15.29 ± 1.81 <sup>4)</sup>	42.79	53.55	13.94
S4	250	37.76 ± 8.75 <sup>4)</sup>	45.89 ± 8.73 <sup>4)</sup>	19.25 ± 2.53 <sup>3)</sup>	38.93	46.34	9.98
S5	250	41.60 ± 8.43 <sup>4)</sup>	49.79 ± 9.44 <sup>4)</sup>	18.56 ± 1.87 <sup>4)</sup>	35.09	42.44	10.67
S6	250	21.47 ± 9.13 <sup>4)</sup>	29.11 ± 11.42 <sup>4)</sup>	14.01 ± 1.69 <sup>4)</sup>	55.22	63.12	15.22
S7	250	33.91 ± 10.98 <sup>4)</sup>	35.8 ± 10.29 <sup>4)</sup>	17.21 ± 2.64 <sup>3)</sup>	42.78	56.43	12.02
S8	250	36.71 ± 12.74 <sup>4)</sup>	42.14 ± 9.34 <sup>4)</sup>	16.25 ± 1.77 <sup>4)</sup>	39.98	50.09	12.98
S9	250	35.71 ± 11.32 <sup>4)</sup>	40.17 ± 9.45 <sup>4)</sup>	17.54 ± 1.94 <sup>4)</sup>	40.98	52.06	11.69

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。转换值 = 模型组药效值 - 给药组药效值。

2.4 谱效关系研究 采用灰色关联分析法和偏最小二乘回归法分析 9 批波棱瓜子乙酸乙酯部位样品

HPLC 色谱数据与抗肝损伤药效数据相关性。  
2.4.1 灰色关联度分析 以样品药效学指标(转

换值)为母序列,样品指纹图谱特征峰信息为子序列,利用 DPS7.05 统计软件,运用灰色关联分析法进行谱效相关性分析。依据母序列与子序列关联度大小确定各指纹特征峰对药效贡献的大小,并由此从所考察的复杂系统中找出主次因素。结果发现各特征峰所代表的化学成分与抗免疫性肝损伤具有一定的关联(关联度均 > 0.56),其中 6,7,10,13,15,16 号峰与样品抗免疫性肝损伤的药效活性有较大关联(关联度均 > 0.60),这些化合物可能是与波棱瓜子抗免疫性肝损伤作用有较大关联的活性物质。见表 4。

表 4 波棱瓜子乙酸乙酯部位 HPLC 色谱特征峰与药效值的关联度  
Table 4 Correlation between converted values of ALT,AST,MDA and specific peaks of HPLC fingerprint of ethyl acetate extract from *Herpetospermum caudigerum*

关联序	峰号	$y_1$	关联序	峰号	$y_2$	关联序	峰号	$y_3$
1	7	0.793 3	1	16	0.701 8	1	16	0.781 7
2	10	0.786 7	2	7	0.687 0	2	10	0.758 6
3	1	0.677 6	3	10	0.683 8	3	7	0.749 8
4	16	0.658 1	4	6	0.672 9	4	6	0.682 4
5	9	0.655 7	5	15	0.669 4	5	13	0.663 2
6	15	0.653 6	6	9	0.666 7	6	4	0.647 6
7	6	0.652 0	7	13	0.647 9	7	8	0.647 2
8	5	0.647 6	8	8	0.645 8	8	3	0.635 0
9	12	0.631 5	9	1	0.642 9	9	5	0.632 7
10	14	0.620 2	10	12	0.637 3	10	11	0.630 6
11	8	0.620 1	11	4	0.621 5	11	14	0.611 8
12	3	0.610 9	12	11	0.614 8	12	15	0.603 3
13	13	0.602 3	13	5	0.612 1	13	9	0.592 8
14	4	0.595 4	14	2	0.604 5	14	12	0.580 7
15	2	0.589 8	15	3	0.600 8	15	1	0.576 3
16	11	0.589 7	16	14	0.584 6	16	2	0.561 2

注: $y_1, y_2, y_3$  分别代表各色谱特征峰与药效指标 ALT, AST, MDA 之间的关联度。

**2.4.2 偏最小二乘回归分析** 以指纹图谱中代表化学成分各特征峰的峰面积值为自变量,药效转换值为因变量,利用 DPS7.05 统计软件,运用偏最小二乘回归法进行谱效相关性分析,各 HPLC 色谱峰对药效活性(ALT,AST 和 MDA)的影响见图 4,计算各自变量对应因变量的回归系数,以回归系数建模, $Y_1, Y_2, Y_3$  分别表示 ALT,AST,MDA 的药效转换值, $X$  表示对应峰峰面积。得回归方程分别为  $Y_1 = 5.88 \times 10^{-3} X_1 - 9.84 \times 10^{-4} X_2 + 2.03 \times 10^{-4} X_3 +$

$1.65 \times 10^{-4} X_4 - 2.36 \times 10^{-3} X_5 + 9.70 \times 10^{-5} X_6 + 2.89 \times 10^{-4} X_7 + 9.40 \times 10^{-5} X_8 + 2.35 \times 10^{-3} X_9 + 4.66 \times 10^{-4} X_{10} + 4.00 \times 10^{-5} X_{11} + 7.23 \times 10^{-5} X_{12} + 4.50 \times 10^{-4} X_{13} + 4.25 \times 10^{-4} X_{14} + 9.34 \times 10^{-4} X_{15} + 5.37 \times 10^{-3} X_{16} + 25.68; Y_2 = 8.75 \times 10^{-3} X_1 + 4.33 \times 10^{-4} X_2 + 5.04 \times 10^{-4} X_3 + 1.33 \times 10^{-4} X_4 + 1.87 \times 10^{-3} X_5 + 1.54 \times 10^{-4} X_6 + 0.34 \times 10^{-3} X_7 + 3.28 \times 10^{-4} X_8 + 2.60 \times 10^{-3} X_9 + 0.56 \times 10^{-3} X_{10} + 0.44 \times 10^{-4} X_{11} + 0.95 \times 10^{-3} X_{12} + 0.12 \times 10^{-2} X_{13} + 0.34 \times 10^{-3} X_{14} + 0.12 \times 10^{-2} X_{15} + 0.66 \times 10^{-2} X_{16} + 22.97; Y_3 = 0.12 \times 10^{-2} X_1 - 0.75 \times 10^{-3} X_2 + 0.56 \times 10^{-4} X_3 - 0.21 \times 10^{-4} X_4 - 0.66 \times 10^{-3} X_5 + 0.32 \times 10^{-4} X_6 + 0.99 \times 10^{-4} X_7 + 0.61 \times 10^{-4} X_8 + 0.23 \times 10^{-3} X_9 + 0.16 \times 10^{-3} X_{10} + 0.98 \times 10^{-4} X_{12} + 0.25 \times 10^{-3} X_{13} - 0.96 \times 10^{-4} X_{14} + 0.15 \times 10^{-3} X_{15} + 0.23 \times 10^{-2} X_{16} + 8.11。$

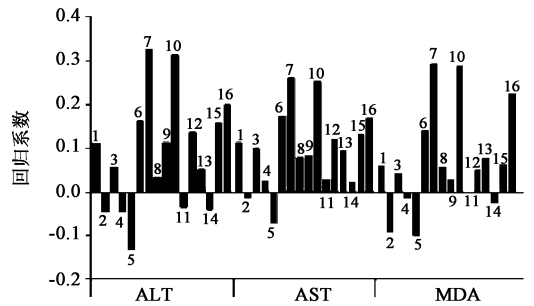


图 4 ALT,AST,MDA 药效转换值与 16 个特征峰峰面积之间的 PLSR 标准化回归系数

Fig. 4 Standardization regression coefficient of PLSR model between the area values of 16 specific peaks and converted values of ALT,AST and MDA

结果表明 2,4,5,11,14 号峰与波棱瓜子抗免疫性肝损伤活性不都呈正相关,与灰色关联度分析结果不一致。其余特征峰与药效均呈正相关,其中 7,10,16,15,6,12 号峰与降低 ALT 和 AST 活性有较大的关联,7,10,16,6,13,15 号峰与降低 MDA 含量有较大关联。结合灰色关联度分析结果,确认 7(波棱素),10(波棱醇),6(波棱甲素),15(波棱酮),16(波棱醛)号峰是与波棱瓜子乙酸乙酯部位的抗免疫性肝损伤作用关联性较大的正相关色谱峰。

### 3 讨论

课题组前期研究表明不同产地波棱瓜子乙酸乙酯部位的化学成分差异较小,不利于样品化学成分与药效关联性分析,故本文采用硅胶柱色谱分离结合均匀设计对波棱瓜子乙酸乙酯提取物进行了处

理,成功地制备了 9 批存在较大化学成分差异的样品。前期药效学研究表明波棱瓜子乙酸乙酯提取物低、中剂量组(0.25,0.35 g·kg<sup>-1</sup>)均具有较明显的保肝降酶作用<sup>[13]</sup>。实验中选用的 9 批组合样品,通过 HPLC 分析,各样品中各成分峰面积与未经分离的样品比较均有一定程度增加,故本文选择了低剂量 0.25 g·kg<sup>-1</sup>,研究结果表明组合后的样品使用该剂量亦为有效剂量。

谱效学研究能阐明指纹图谱特征与药效的相互关系,确定相应的药效物质基础,从而使构建的药效指纹图谱更有针对性地控制中药质量<sup>[16-17]</sup>。中药谱效关系的建立包括多种统计学方法,如灰色关联度分析、偏最小二乘回归分析等。灰色关联度法用于分析因素内部关联,如果 2 个因素之间相对变化保持一致,则关联度大,反之,关联度小。偏最小二乘回归分析综合了多元回归分析、典型相关分析和主成分分析,可以充分利用数据建立较为精确的模型。灰色关联度法在于分析成分因素之间的联系,但在各成分对药效的综合贡献描述力方面较差,偏最小二乘回归分析能描述各成分因素对药效的综合贡献,但无法确定各成分因素间的定量关系。2 种数学建模方式各有其优势与不足。故本文在建立谱效关系数学模型时采用了这 2 种方法相互验证,且波棱酮、波棱素、波棱甲素的护肝作用已有报道<sup>[4-5,18]</sup>,在一定程度上验证了本文研究成果。

#### [参考文献]

[1] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:441-443.  
[2] Fang Q M, Zhang H, Cao Y, et al. Anti-inflammatory and free radical scavenging activities of ethanol extracts of three seeds used as "Bolengguazi" [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 114(1):61-65.  
[3] 陈璐, 张梅, 姚红娥, 等. 波棱瓜子脂肪油对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(2):143-145.  
[4] Zhang M, Deng Y, Zhang H B, et al. Two new coumarins from *Herpetospermum caudigerum* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2008, 56(2):192-193.

[5] 李娟娟, 沈刚, 尹蓉莉, 等. 砂炒对波棱瓜子有效成分、致腹泻以及保肝作用的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2):236-239.  
[6] Kaouadji M, Favre B J. Herpetrione, a trimeric lignoid isolated from *Herpetospermum caudigerum* Wall [J]. Tetrahedron Lett, 1983, 24(52):5881-5884.  
[7] Kaouadji M, Favre B J. Herpetradione, a new lignoid tetramer isolated from *Herpetospermum caudigerum* Wall [J]. Tetrahedron Lett, 1984, 25(45):5135-5136.  
[8] Kaouadji M, Favre B J. Herpeptol, a new lignoid pentamer [J]. Tetrahedron Lett, 1984, 25(45):5137-5138.  
[9] Kaouadji M, Favre B J. Herpetol, a new dimeric lignoid [J]. Z Naturforsch C: Biosci, 1984, 39(3/4):307-308.  
[10] Kaouadji M, Favre B J. Herpetetrone, another tetrameric lignoid from *Herpetospermum caudigerum* seeds [J]. J Nat Prod, 1987, 50(6):1089-1094.  
[11] Yang F, Zhang H J, Zhang Y Y, et al. A hepatitis B virus inhibitory neolignan from *Herpetospermum caudigerum* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010, 58(3):402-404.  
[12] 张梅, 董小萍, 邓赟, 等. 藏药波棱瓜子中一个新的倍半降木脂素[J]. 药学学报, 2006, 41(7):659-661.  
[13] 陈璐, 张梅, 李春沁, 等. 波棱瓜子乙酸乙酯提取物对小鼠免疫性肝损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3):111-113.  
[14] Fang K T, Lin D K J, Winker P, et al. Uniform design: theory and applications [J]. Technometrics, 2000, 42(3):237-248.  
[15] 张华锋, 刘炯, 张杰, 等. 基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究[J]. 中草药, 2013, 44(19):2696-2702.  
[16] 李婷婷, 王新芳, 马玲, 等. 谱效关系与一测多评相结合全面提升中药材质量控制标准[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19):225-228.  
[17] 陈璐, 张梅, 雷有成, 等. 波棱瓜子脂肪油抗免疫性肝损伤的谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11):123-126.  
[18] Shen B D, Chen H G, Shen C Y, et al. Hepatoprotective effects of lignans extract from *Herpetospermum caudigerum* against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2015, doi: 10.1016/j.jep.2015.01.044.

[责任编辑 刘德文]