

· 药学基础 ·

## 基于主成分因子加权和灰色关联分析法的栀子利胆作用谱效关系分析

刘婧, 黄潇, 付小梅\*, 杨超, 王芳, 刘德鸿, 裴建国, 吴志瑰, 谢赛赛, 汪新婵  
(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的:考察栀子的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱与利胆作用,并分析指纹图谱与利胆作用关联性,为明确栀子利胆作用物质基础提供依据。方法:通过高效液相色谱法建立8批不同采收期栀子药材指纹图谱,采用主成分因子加权法对利胆药效指标胆汁流量、胆汁中总胆汁酸、总胆固醇、总胆红素含量进行计算,得到栀子利胆作用综合指标;运用灰色关联度分析法分析其利胆作用的谱效关系。结果:谱效关系研究表明,各共有峰所代表的化学成分对其利胆作用贡献的大小顺序为(关联度>0.8)9号峰>14号峰>26号峰>4号峰>30号峰>6号峰>1号峰>10号峰>5号峰>24号峰;通过对以上成分进行全波长扫描,推测峰9,14,4为环烯醚萜类成分;推测26,30,24为西红花苷类成分;与对照品的液相谱图对照确认,9号峰为栀子苷。结论 栀子的利胆作用是由多种成分,多个通路共同作用的结果,初步确定栀子主要利胆成分为栀子苷,为探索栀子利胆作用物质基础的研究提供了参考。

**[关键词]** 栀子; 利胆; 谱效关系; 主成分因子加权; 灰度关联分析; 栀子苷

**[中图分类号]** R284.1;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0135-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201612

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200429.1621.003.html>

**[网络出版日期]** 2020-4-29 16:29

## Spectrum-effect Relationship of Choleric Effect of Gardeniae Fructus Extract Based on Principal Component Analysis and Gray Correlation Analysis

LIU Jing, HUANG Xiao, FU Xiao-mei\*, YANG Chao, WANG Fang, LIU De-hong, PEI Jian-guo,  
WU Zhi-gui, XIE Sai-sai, WANG Xin-li  
(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effective substance of the choleric effect of Gardeniae Fructus, and analyze the relationships between its choleric effect and the HPLC fingerprint chromatogram. **Method:** HPLC method was applied to establish the fingerprint chromatography of 8 batches of Gardeniae Fructus at different harvest periods. The flow, the content of bile acid, bilirubin and cholesterol in bile were tested, and then the principal component analysis was used to comprehensively evaluate the total choleric effects of Gardeniae Fructus. After the relationships between the relative peak area of the common peaks and the choleric effects were explored using grey relationship analysis method, the spectrum-effect relationship of Gardeniae Fructus was established. **Result:** The order of the contribution of the chemical components to the

**[收稿日期]** 20200305(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360620);江西省青年科学基金项目(20171BAB215064,20192ACBL21034);江西省科技创新杰出青年人才培养计划项目(20192BCB23018);江西省卫生计生委科技计划项目(20185527,2018A311);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ180653,GJJ190678);江西省中药学一流学科专项科研基金项目(JXSYLXK-ZHYAO026,JXSYLXK-ZHYAO047)

**[第一作者]** 刘婧,副教授,从事中药制剂学研究,Tel:0791-87118645,E-mail:liujing860828@163.com

**[通信作者]** \*付小梅,教授,从事中药品质评价研究,Tel:0791-87118983,E-mail:smilefxm@163.com

choloretic effect at the common peaks was as follow ( $r > 0.8$ ): P9>P14>P26>P4>P30>P6>P1>P10>P5>P24. Among all peaks, the full wavelength scanning results implied that the peaks 9, 14 and 4 might be iridoids, and the peaks 26, 30 and 24 might be crocins. By comparing with the standard substances, the peak 9 was finally identified as geniposide. **Conclusion:** The choloretic effect of Gardeniae Fructus may be the results of multiple components and pathways, and the main components in Gardeniae Fructus with the choloretic effect was from geniposide. In conclusion, these results provide a reference for investigating the material basis of choloretic effect of Gardeniae Fructus.

**[Key words]** Gardeniae Fructus; choloretic effect; spectrum-effect relationship; principal component analysis; grey relationship analysis; geniposide

梔子是茜草科植物梔子的干燥成熟果实,性寒、味苦,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒的功效<sup>[1]</sup>,其作为传统保肝利胆中药,在利胆的经典名方如茵陈蒿汤、梔子柏皮汤等复方中作为主药。现代药理研究已经证明,梔子提取物具有较好的利胆作用,同时梔子中所含的主要成分——梔子苷、西红花苷及西红花酸均具有利胆作用<sup>[2-4]</sup>,为了更好地开发梔子的利胆作用,有必要进一步研究梔子中利胆作用的主要物质基础。

目前对于梔子利胆物质基础的研究多集中于单一成分的研究,中药作为一个多组分、多靶点综合作用的复杂整体,其药效是由多个有效成分共同作用多个靶点产生的效果,因此如何整体全面地反映梔子的利胆成分是探索其利胆作用物质基础的一个难点。

中药“谱效关系”的研究出现恰好能够解决这个问题,中药“谱效关系”的研究是通过合理的谱-效模型和分析方法,使中药活性成分群整体特征精细表达与多指标、多靶点作用机制紧密联系,从而系统揭示中药活性成分与药理作用之间的关系,该方法对中药药效物质基础的合理确定起到了积极作用<sup>[5-6]</sup>。因此本研究建立不同采收期梔子药材的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱并测定利胆的药效学指标——胆汁流量、胆汁中总胆汁酸、总胆固醇、总胆红素含量,采用主成分因子加权法对利胆多个药效指标计算,得到利胆综合指标,并采用灰色关联分析法将指纹图谱与利胆综合指标进行关联,探讨其谱效关系,为进一步探讨梔子药材的利胆作用药效物质基础提供实验依据,以期对梔子利胆的临床应用及质量的全面评价提供参考。

## 1 材料

Agilent 1200型高效液相色谱仪(四元泵,柱温箱,DAD检测器,美国安捷伦公司),KQ-300DE型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功

率300 W,频率40 kHz),BS224S型1/1万电子天平(德国Satorius公司),高速冷冻离心机(美国Beckman-Coulter公司,30 000 r·min<sup>-1</sup>),SpectraMax M2型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司),Thermo Forma -86 °C型冰箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

熊去氧胆酸片(上海信宜药厂有限公司,批号41140501),磷酸(分析纯,天津永大化学试剂有限公司),甲醇、乙腈(色谱纯,西陇化工有限公司);总胆汁酸、总胆红素、总胆固醇检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20161126,20161126,20161126);对照品京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷,梔子苷,西红花苷-I,西红花苷-II,西红花苷-III均为自制,经<sup>1</sup>H-NMR,<sup>13</sup>C-NMR,MS鉴定结构,纯度经高效液相色谱按面积归一化法测定均>98%。

梔子均采自于江西新干梔子GAP种植基地,采收于2014年霜降前后各4批,共8批(从2014年10月8日开始采收,每隔5 d采收1次,编号S1~S8),经江西中医药大学药学院范崔生教授鉴定为中药材梔子 *Gardenia jasminoides* 的果实,凭证标本存于江西中医药大学中药鉴定学科组。采集的梔子按2015年版《中国药典》方法进行干燥,即除去果梗和杂质,蒸至上气或置沸水中略烫,取出,干燥,放入自封袋中保存备用。

清洁级雄性SD大鼠(180~220 g)由湖南斯莱克实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(湘)2013-0004。动物饲养于江西中医药大学药学院动物室,其中温度(24±2) °C,相对湿度(55±2)%。经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号20171127。

## 2 方法与结果

**2.1 梔子提取物制备** 分别称取编号S1~S8生梔子药材500 g,用8倍体积70%乙醇回流提取2 h,共提取2次,合并滤液,回收乙醇至无醇味后进行冷冻

干燥,得到栀子干浸膏,于4℃冰箱保存。

## 2.2 指纹图谱的建立

**2.2.1 色谱条件<sup>[7]</sup>** 采用Agilent Eclipse C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 6%A; 10~18 min, 6%~12%A; 18~22 min, 12%~16%A; 22~28 min, 16%~20%A; 28~40 min, 20%A; 40~60 min, 20%~36%A; 60~65 min, 36%~55%A), DAD检测器,检测波长210 nm,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量5 μL,柱温30℃。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取8批栀子干浸膏各0.5 g,精密称定,加甲醇溶解后,定容至10 mL,混匀得到供试品溶液,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min后过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

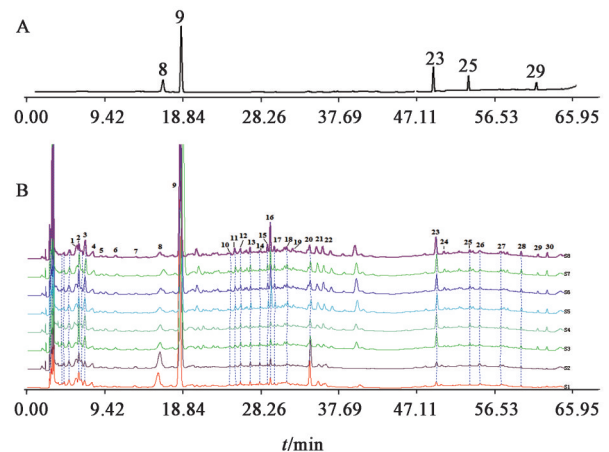
**2.2.3 混合对照品溶液** 精密称取对照品京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷,栀子苷,西红花苷-I,西红花苷-II,西红花苷-III适量,加甲醇配置成质量浓度分别为213.0, 523.0, 67.3, 21.0, 24.2 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.2.4 栀子提取物指纹图谱的建立及共有峰标定** 分别将8批不同采收期栀子按照2.2.1项下色谱条件进样,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对高效液相图谱进行处理,得到8批不同采收期栀子的指纹图谱。同时以S1号样品为参照样品,经Mark峰匹配,确定30个共有峰。8号色谱峰为栀子中的主要成分,且出峰稳定,故选其作为指纹图谱的参照峰,计算得到相对保留时间及相对峰面积,同时进行全波长扫描得到各共有峰的最大吸收波长,见图1,表1。经混合对照品的HPLC图定位,鉴定出5个色谱峰,分别是8号峰为京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷,9号峰为栀子苷,23号峰为西红花苷-I,25号峰为西红花苷-II,29号峰为西红花苷-III。

## 2.3 栀子利胆作用

**2.3.1 分组及给药剂量** 取雄性SD大鼠80只,适应性饲养1周后进行随机分组,每组8只,分别为空白组(0.5%CMC-Na),阳性药组(熊去氧胆酸,100 mg·kg<sup>-1</sup>)<sup>[8]</sup>,分别称取S1~S8组的栀子干浸膏于量瓶中,加入5%CMC-Na制成混悬液进行使用,配置成0.08 g·mL<sup>-1</sup>的栀子提取物混悬液,各组大鼠按10 mL·kg<sup>-1</sup>进行灌胃,1次/d,连续给药7 d。

**2.3.2 对正常大鼠胆汁流量影响** 第7天给药1 h后进行胆管插管手术,末次给药1 h后腹腔注射乌拉坦(1 g·kg<sup>-1</sup>)麻醉大鼠行胆管插管手术。将麻醉好的大鼠仰卧位固定,腹部去毛,用75%乙醇消毒。



8.京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷;9.栀子苷;23.西红花苷-I;25.西红花苷-II;29.西红花苷-III

图1 混合对照品(A)及8批栀子(B)HPLC指纹谱

Fig. 1 HPLC of mixed references (A) and fingerprint of Gardeniae Fructus (B)

沿腹正中线切开约2 cm,找到胃幽门部,翻转十二指肠,将十二指肠微微拉起,找到白色有韧性胆管,剥离胆管上膜,分离出靠近十二指肠乳头的胆管。用注射器针头在分离的胆管的远心端扎一个小口后,插入一内径约为0.3 mm胆管引流胆汁,待胆汁入管后,用医用缝合线固定胆管。手术后用止血钳夹闭腹壁,并用生理盐水润湿过的纱布覆盖伤口保持湿润,稳定15~20 min后,以30 min为一单位收集胆汁,共收集8次,记录各时段胆汁流量,其结果分别见表2。与空白组比较,S1~S8组栀子均能不同程度增加胆汁流量,表明栀子具有促进胆汁分泌的作用。其中S2,S3,S6,S8组栀子在各时间点都能显著增加正常大鼠胆汁流量( $P<0.05$ , $P<0.01$ );除60~90 min外,S4,S5组栀子能显著增加正常大鼠各时间点胆汁流量( $P<0.05$ , $P<0.01$ );除30~120 min外,S7组栀子显著增加正常大鼠各时间点胆汁流量( $P<0.05$ , $P<0.01$ );S1组栀子仅在0~30 min显著增加正常大鼠胆汁流量。

**2.3.3 对正常大鼠胆汁成分影响** 将收集所得胆汁混合,按试剂盒说明测定胆汁中总胆汁酸、胆固醇及总胆红素含量,结果见表3。与空白组相比,S1~S8组栀子均能显著升高正常大鼠胆汁中总胆汁酸、胆固醇及总胆红素含量( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。

**2.4 利胆综合指标计算** 由于反映利胆作用的药效指标较多,若将每个药效指标与指纹图谱相关联,所得结果只能表征各成分对该药效指标的贡献程度,而不能整体反映各成分对利胆作用的贡献程度,故本实验采用主成分因子分析法对利胆药效指

表1 8批栀子指纹图谱共有峰的相对保留时间、相对峰面积及最大吸收波长

Table 1  $t_R$ , peak area and maximum wavelength of common peak of fingerprint

No.	$t_R$	相对峰面积								最大吸收波长/nm
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	
1	0.389	0.380	0.369	1.440	1.521	0.843	3.885	1.288	1.883	218, 260, 295
2	0.411	0.135	0.136	0.116	0.249	0.117	0.615	0.232	0.558	238
3	0.436	0.141	0.137	0.789	1.040	0.885	3.145	1.080	2.644	238
4	0.492	0.179	0.163	0.284	0.295	0.429	1.308	0.503	1.361	238
5	0.551	0.031	0.033	0.091	0.118	0.123	0.497	0.156	0.295	223, 245, 298
6	0.664	0.035	0.031	0.180	0.232	0.175	0.527	0.187	0.496	250
7	0.815	0.075	0.080	0.154	0.153	0.091	0.358	0.187	0.226	218, 260
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	240
9	1.152	6.772	6.441	14.231	15.347	14.161	42.292	15.266	33.412	238
10	1.524	0.047	0.043	0.093	0.228	0.125	0.257	0.152	0.401	228, 255, 340
11	1.563	0.044	0.046	0.197	0.219	0.387	1.093	0.451	1.210	237, 328
12	1.604	0.113	0.067	0.310	0.275	0.506	1.352	0.438	1.239	230, 320
13	1.677	0.067	0.073	0.177	0.158	0.305	0.588	0.315	0.734	238, 320
14	1.747	0.056	0.048	0.123	0.113	0.116	0.288	0.085	0.261	240, 320
15	1.807	0.029	0.022	0.056	0.067	0.338	0.771	0.285	0.957	250, 340
16	1.828	0.126	0.136	0.295	0.285	1.282	3.337	1.071	3.439	260, 355
17	1.858	0.027	0.036	0.084	0.081	0.336	0.820	0.340	0.776	250, 350
18	1.951	0.371	0.085	0.274	0.152	0.262	0.556	0.383	0.622	238, 320
19	2.030	0.033	0.022	0.065	0.047	0.112	0.158	0.101	0.104	265, 390
20	2.126	0.710	0.698	0.629	0.745	0.582	2.039	0.721	1.408	232, 313
21	2.185	0.232	0.144	0.284	0.435	0.716	1.848	0.836	1.703	240, 328
22	2.225	0.079	0.144	0.118	0.537	0.560	2.580	0.682	1.696	218, 245, 330
23	3.074	0.112	0.139	0.909	1.142	1.016	3.149	1.297	2.980	440
24	3.133	0.043	0.048	0.060	0.099	0.129	0.517	0.186	0.412	330, 440
25	3.324	0.020	0.024	0.145	0.241	0.203	0.542	0.244	0.541	440
26	3.399	0.057	0.081	0.135	0.222	0.168	0.403	0.172	0.625	340, 420
27	3.557	0.066	0.050	0.091	0.133	0.159	0.283	0.199	0.532	440
28	3.709	0.024	0.027	0.133	0.157	0.189	0.427	0.241	0.538	325, 440
29	3.903	0.024	0.015	0.182	0.283	0.250	0.628	0.310	0.709	440
30	4.004	0.016	0.125	0.235	0.272	0.271	0.725	0.279	0.656	256, 330, 440

标进行权重处理,以得到栀子利胆作用综合指标。

主成分因子分析法是权重客观赋值法的一种<sup>[9-10]</sup>,利用正交变换将一组可能存在相关性的变量重新组合为一组线性不相关的变量,将重新组合后的变量称为主成分,再通过指标数据的权重来计算综合评价。本实验采用该方法计算总胆汁流量 $X_1$ ,胆汁酸 $X_2$ ,胆固醇 $X_3$ ,胆红素 $X_4$  4个指标的权重值,最终得出利胆作用综合指标 $Y$ 。其中利胆单个药效指标见表4。

**2.4.1 主成分选择** 将表4中总胆汁流量 $X_1$ ,胆汁

酸 $X_2$ ,胆固醇 $X_3$ ,胆红素 $X_4$ 指标数据标准化后,利用SPSS 20.0软件进行主成分分析,得到4个主成分,特征值 $\lambda$ 分别为1.615, 1.199, 1.019, 0.167。4个主成分的贡献度 $C$ 分别为40.377%, 29.970%, 25.469%, 4.184%。可以看出,前3个主成分的特征值 $\lambda$ 均 $>1$ ,并且累计贡献度达到95.816%,故选择前3个主成分进行权重计算。

**2.4.2 主成分线性组合系数** 将SPSS 20.0软件计算出的3个主成分系数分别除以其特征值的平方根,得主成分线性组合系数 $b$ ,见表5。

表2 栀子对正常大鼠胆汁流量的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of Gardeniae Fructus extracts on bile flow( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

mL

组别	剂量/g·kg	0~30 min	30~60 min	60~90 min	90~120 min	120~150 min	150~180 min	180~210 min	210~240 min
空白	-	0.30±0.04	0.39±0.06	0.41±0.04	0.36±0.03	0.30±0.04	0.28±0.05	0.24±0.05	0.22±0.02
熊去氧胆酸	0.1	0.46±0.06 <sup>2)</sup>	0.50±0.06 <sup>1)</sup>	0.40±0.09	0.30±0.08	0.26±0.05	0.32±0.09	0.30±0.09	0.24±0.08
S1	0.8	0.52±0.04 <sup>2)</sup>	0.42±0.05	0.41±0.08	0.34±0.07	0.34±0.08	0.32±0.04	0.32±0.05	0.24±0.03
S2	0.8	0.59±0.07 <sup>2)</sup>	0.59±0.08 <sup>2)</sup>	0.56±0.07 <sup>2)</sup>	0.54±0.07 <sup>2)</sup>	0.49±0.08 <sup>2)</sup>	0.45±0.08 <sup>1)</sup>	0.42±0.08 <sup>2)</sup>	0.40±0.07 <sup>2)</sup>
S3	0.8	0.59±0.07 <sup>2)</sup>	0.59±0.07 <sup>2)</sup>	0.56±0.09 <sup>1)</sup>	0.49±0.07 <sup>1)</sup>	0.43±0.07 <sup>1)</sup>	0.41±0.01 <sup>2)</sup>	0.37±0.04 <sup>1)</sup>	0.34±0.07 <sup>1)</sup>
S4	0.8	0.46±0.07 <sup>2)</sup>	0.47±0.06 <sup>1)</sup>	0.46±0.04	0.44±0.04 <sup>1)</sup>	0.40±0.05 <sup>2)</sup>	0.40±0.05 <sup>2)</sup>	0.37±0.04 <sup>2)</sup>	0.36±0.03 <sup>2)</sup>
S5	0.8	0.56±0.04 <sup>2)</sup>	0.52±0.08 <sup>1)</sup>	0.44±0.03	0.44±0.05 <sup>1)</sup>	0.52±0.10 <sup>2)</sup>	0.48±0.09 <sup>2)</sup>	0.36±0.06 <sup>1)+</sup>	0.38±0.05 <sup>2)</sup>
S6	0.8	0.51±0.07 <sup>2)</sup>	0.48±0.07 <sup>1)</sup>	0.48±0.06 <sup>2)</sup>	0.52±0.05 <sup>2)</sup>	0.50±0.05 <sup>2)</sup>	0.47±0.05 <sup>2)</sup>	0.43±0.05 <sup>2)</sup>	0.40±0.07 <sup>2)</sup>
S7	0.8	0.46±0.05 <sup>2)</sup>	0.44±0.04	0.40±0.05	0.40±0.05	0.38±0.05 <sup>1)</sup>	0.39±0.04 <sup>2)</sup>	0.36±0.05 <sup>2)</sup>	0.34±0.06 <sup>2)</sup>
S8	0.8	0.64±0.07 <sup>2)</sup>	0.51±0.07 <sup>1)</sup>	0.49±0.06 <sup>1)</sup>	0.47±0.06 <sup>1)</sup>	0.46±0.05 <sup>2)</sup>	0.44±0.07 <sup>2)</sup>	0.44±0.07 <sup>2)</sup>	0.38±0.07 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01(表3同)。

表3 栀子对正常大鼠胆汁成分的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Gardeniae Fructus extracts on composition of bile in rats( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	总胆汁酸/mol·L <sup>-1</sup>	总胆固醇/mmol·L <sup>-1</sup>	总胆红素/μmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	15.56±0.45	0.57±0.12	47.43±5.05
熊去氧胆酸	0.1	14.64±2.78	0.70±0.07 <sup>1)</sup>	99.68±3.66 <sup>2)</sup>
S1	0.8	19.67±1.64 <sup>2)</sup>	0.69±0.30 <sup>2)</sup>	57.05±2.00 <sup>1)</sup>
S2	0.8	17.82±1.22 <sup>2)</sup>	1.23±0.11 <sup>2)</sup>	48.31±2.08 <sup>1)</sup>
S3	0.8	21.03±2.54 <sup>2)</sup>	1.00±0.17 <sup>2)</sup>	70.88±6.20 <sup>2)</sup>
S4	0.8	20.97±2.33 <sup>2)</sup>	1.04±0.20 <sup>2)</sup>	60.98±6.56 <sup>2)</sup>
S5	0.8	18.91±2.18 <sup>1)</sup>	1.02±0.10 <sup>2)</sup>	53.96±4.60 <sup>1)</sup>
S6	0.8	26.66±2.80 <sup>2)</sup>	0.96±0.13 <sup>2)</sup>	71.08±5.49 <sup>2)</sup>
S7	0.8	25.86±2.05 <sup>2)</sup>	1.09±0.26 <sup>2)</sup>	62.08±6.38 <sup>1)</sup>
S8	0.8	18.37±1.53 <sup>2)</sup>	0.91±0.13 <sup>2)</sup>	91.52±6.47 <sup>2)</sup>

表4 利胆作用的药效指标

Table 4 Index of cholcretic effect

编号	总流量X <sub>1</sub>	胆汁酸X <sub>2</sub>	胆固醇X <sub>3</sub>	胆红素X <sub>4</sub>
S1	2.91	19.67	0.69	57.05
S2	4.02	17.82	1.23	48.31
S3	3.77	21.03	1.00	70.88
S4	3.41	20.97	1.04	60.98
S5	3.70	18.91	1.02	53.96
S6	3.80	26.66	0.96	71.08
S7	3.17	25.86	1.09	62.08
S8	3.82	18.37	0.91	91.52

表5 主成分线性组合系数

Table 5 Linear combination coefficient of principal components

指标	主成分线性组合系数b		
	第一主成分	第二主成分	第三主成分
总流量X <sub>1</sub>	0.674	0.412	0.028
胆汁酸X <sub>2</sub>	-0.269	-0.237	0.923
胆固醇X <sub>3</sub>	0.135	-0.247	0.366
胆红素X <sub>4</sub>	-0.176	0.890	0.113

的线性组合系数b带入公式 $\varepsilon = \frac{\sum_{i=1}^3 C_i b_i}{\sum_{i=1}^3 C_i}$ 进行加权

平均,并在此基础上归一化后可得总胆汁流量X<sub>1</sub>,胆汁酸X<sub>2</sub>,胆固醇X<sub>3</sub>,胆红素X<sub>4</sub>的综合指标计算公式,Y=0.532X<sub>1</sub>+0.073X<sub>2</sub>+0.097X<sub>3</sub>+0.297X<sub>4</sub>。根据利胆综合指标计算公式得到8批栀子利胆作用综合指

2.4.3 各指标权重及综合指标 以总胆汁流量X<sub>1</sub>,胆汁酸X<sub>2</sub>,胆固醇X<sub>3</sub>,胆红素X<sub>4</sub>的第一、第二、第三主成分的方差贡献度C为权重,将表5中各指标

标,结果见表6。

表6 利胆作用综合指标

Table 6 Total choloretic effect of Gardeniae Fructus

编号	利胆作用综合指标
S1	0.83
S2	1.00
S3	1.06
S4	0.96
S5	0.96
S6	1.08
S7	0.95
S8	1.14

2.5 栀子指纹图谱与利胆作用灰色关联分析 以8批不同采收期栀子利胆综合指标作为参考序列,以栀子HPLC图谱共有峰峰面积数据作为比较序列进行灰色关联分析。

2.5.1 原始数据的无量纲化处理 由于数据中物理意义不同,所以数据的量纲也不一定相同,不便于比较,或在比较时难以得到正确的结论。因此在进行灰色关联度分析时,需要将数据统一进行无量纲化处理。本研究采用的无量纲化方法是初值化法<sup>[11-13]</sup>。

2.5.2 计算参考数列与比较数列的灰色关联系数 按公式(1)分别计算每个比较序列和参考序列所对应元素的关联系数,式中 $x_0(k)$ 和 $x_i(k)$ 分别为栀子各批次利胆指标及各批次提取物特征峰面积,均做无量纲化处理; $k$ 为峰号; $\rho$ 为分辨系数,在0~1内取值,若 $\rho$ 越小,关联系数间差异越大,区分能力越强,一般情况下 $\rho$ 取0.5。

$$\eta(k) = \frac{\min_{i=1,2,\dots,m} \left( \min_{k=1,2,\dots,n} |x_0(k) - x_i(k)| + \rho \cdot \max_{i=1,2,\dots,m} \left( \max_{k=1,2,\dots,n} |x_0(k) - x_i(k)| \right) \right)}{\left( |x_0(k) - x_i(k)| + \rho \cdot \max_{i=1,2,\dots,m} \left( \max_{k=1,2,\dots,n} |x_0(k) - x_i(k)| \right) \right)} \quad (1)$$

2.5.3 灰色关联度计算 关联度为关联系数的算术平均数按照公式(2)计算。

$$r = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \eta \quad (2)$$

运用灰色关联分析法建立谱效相关性数理统计模型,以8批不同采收期栀子利胆综合指标作为参考序列,以栀子HPLC图谱共有峰峰面积数据作为比较序列进行灰色关联分析,关联度计算结果见表7。由表7可得知8批栀子共有峰与利胆综合指标关联度数据,关联数据的大小可确定各色谱峰对利胆作用的贡献大小顺序,各成分对利胆作用贡献度由大到小排序分别为峰9>14>26>4>30>6>1>10>

5>24>3>13>7>12>21>27>23>2>28>25>29>19>22>18>11>20>8>17>16>15;其中峰9,14,26,4,30,6,1,10,5,24的关联度均>0.800,初步确定这10个峰作为利胆作用的主要成分;同时与对照品的液相图谱图对比,确定9号峰为栀子苷。

表7 8批栀子指纹图谱中峰面积与利胆综合指标关联度

Table 7 Correlation between total choloretic effects of Gardeniae Fructus extract and each characteristic peak area

峰号	$t_R/\text{min}$	利胆综合指标
1	6.273	0.817 5
2	6.618	0.764 0
3	7.020	0.781 7
4	7.919	0.850 4
5	8.869	0.815 1
6	10.690	0.818 6
7	13.123	0.776 0
8	16.109	0.664 4
9	18.551	0.909 9
10	24.557	0.816 8
11	25.172	0.680 6
12	25.838	0.774 1
13	27.011	0.777 4
14	28.139	0.854 6
15	29.101	0.583 8
16	29.453	0.608 9
17	29.934	0.611 4
18	31.434	0.690 5
19	32.707	0.724 7
20	34.244	0.674 1
21	35.193	0.773 8
22	35.840	0.717 3
23	49.517	0.772 2
24	50.472	0.805 7
25	53.554	0.743 8
26	54.751	0.851 7
27	57.297	0.773 7
28	59.747	0.758 6
29	62.875	0.727 6
30	64.494	0.843 4

### 3 讨论

3.1 色谱波长优化 栀子中含有多类成分,主要为环烯醚萜类及其苷类、有机酸类、西红花苷类三大类成分,采用的检测波长通常是该类成分的最大

吸收波长,分别为238,320,440 nm。但为了能够在同一波长下表现出栀子中各类成分,更好地研究各成分对于药效作用的贡献程度,本研究选择了210 nm作为检测波长。

**3.2 利胆综合指标确定** 中药是一个极其复杂的化合物库,是由所含的几个成分甚至几类成分通过多途径、多环节、多靶点综合作用于机体来发挥治疗作用,因此常选择多个效应指标来综合评价药效。然而各效应指标的评价基点及药物对各效应指标的反应灵敏度不一致,故需将各药效指标进行统一计量单位,进行标准化,形成整合效应进行综合评价,因此如何合理分配各药效指标权重是保障药效科学性和合理性评价的关键<sup>[14-18]</sup>。

主成分因子加权法是权重客观赋值法的一种方法,该方法能够缩小评价指标范围、消除各指标的相互影响,在计算主成分的同时,对各成分进行了权重分配,使综合评价的结果更为客观可靠。由于利胆药主要作用是促进胆汁分泌、胆囊收缩和胆囊排空,因此大多数研究是以胆汁流量以及胆汁中所含有的主要化学成分—胆汁酸、胆固醇及胆红素的含量变化作为评价利胆作用的药效指标<sup>[19-20]</sup>。本研究采用了主成分因子加权法对利胆指标总胆汁流量、以及胆汁中胆汁酸、胆固醇、胆红素进行了权重分配,并通过该方法计算出利胆作用综合指标。该方法的使用不仅使权重指标分配合理,而且保障了所获的综合指标科学可靠。

**3.3 谱效关系分析** 谱效关系的研究是中医药领域内处于学术前沿的中药现代化新思路,是通过指纹图谱信息与药效作用的相互关系研究,揭示中药所含的化学成分与药效之间的相互关系和规律,从而阐明中药各药效成分之间的协同或拮抗作用并能找寻到中药的药效物质基础。

谱效关系的分析方法众多,灰色关联度分析法是目前中药谱效研究中常用的方法之一,该方法主要是通过灰关联度顺序来描述因素间相关程度,其特点是可使动态指标的原始信息得到充分的利用,同时所需分析数据较少,对数据要求较低<sup>[21-22]</sup>。故此本研究采用灰色关联度分析法对不同批次利指指纹图谱数据进行标准化和量化处理,并将之与主成分因子加权法获得的利胆综合指标进行关联,进一步保证了谱效分析结果的可靠性。根据关联程度可以初步判断栀子利胆作用的主要成分为峰9,14,26,4,30,6,1,10,5,24(关联度均>0.800)。为了更好地推测这10个峰的类型,本研究采用高效液

相色谱法对这10个峰进行全波长扫描以得到其最大吸收波长,见表2。根据文献报道以及前期研究可以得知<sup>[23-24]</sup>,环烯醚萜类成分的最大吸收波长为238 nm左右,西红花苷类成分最大吸收波长为440 nm,故此推测峰9,14,4为环烯醚萜类成分,26,30,24为西红花苷类成分。与对照品的液相色谱图对照确认,9号峰为栀子苷,这一结果也与之前文献报道环烯醚萜类成分、西红花苷类成分具有较好利胆作用相符,说明采用主成分因子加权和灰色关联分析法研究栀子利胆作用的物质基础实验设计合理,结果可靠。下一步将通过质谱等手段对其余成分进行结构鉴定,以期可以进一步确定栀子利胆作用的物质基础,为开发新型利胆中成药打下基础。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 付小梅,葛菲,褚小兰,等. 栀子和水栀子利胆抗炎作用的对比研究[J]. 江西中医学院学报,2001,13(4):165-166.
- [3] 朱振家,钱之玉,陆莉华,等. 栀子提取物京尼平苷和西红花苷利胆作用的研究[J]. 中草药,1999,30(11):841-843.
- [4] 彭婕,钱之玉,刘同征,等. 京尼平苷和西红花酸保肝利胆作用的比较[J]. 中国新药杂志,2003,12(2):105-108.
- [5] 蔡靛,张倩,杨丰庆. 中药谱效学的应用进展[J]. 中草药,2017,48(23):5005-5011.
- [6] 陶金华,狄留庆,文红梅,等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2410-2413.
- [7] 刘婧,付小梅,吴建华,等. 栀子樟帮法炮制前后的化学成分变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(2):1-5.
- [8] 杨琼,陆付耳,徐丽君,等. 利胆化痰片的利胆消炎作用[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(33):3531-3534.
- [9] 汪应洛. 系统工程[M]. 北京:机械工业出版社,2008.
- [10] 颜惠琴,牛万红,韩惠丽,等. 基于主成分分析构建指标权重的客观赋权法[J]. 济南大学学报:自然科学版,2017,31(6):519-523.
- [11] 谭学瑞,邓聚龙. 灰关联分析——医学多因素分析法[J]. 数理医药学杂志,1996,9(1):14-17.
- [12] 刘思峰,党耀国,方志耕. 灰色系统理论及其应用[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [13] 曾令军,林兵,宋洪涛. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J]. 中国中药杂志,2015,40(8):1425-

- 1432.
- [14] 李淑娇,李伟霞,唐于平,等. 基于主成分分析和多指标综合指数法的当归-红花不同配比活血化瘀作用比较[J]. 药学学报,2014,49(9):1304-1309.
- [15] 庞汉青,唐于平,史旭芹,等. 基于主成分分析和多指标综合指数法丹参不同有效部位的活血化瘀作用比较[J]. 中草药,2016,47(18):3239-3247.
- [16] 王帅,包永睿,杨欣欣,等. 基于谱效关系的朝鲜天南星和东北天南星相似性评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(11):44-48.
- [17] 申鸽,景大山,杨飞,等. 珍珠透骨草HPLC指纹图谱及抗炎活性的谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(12):175-180.
- [18] 刘自远,刘成福. 综合评价中指标权重系数确定方法探讨[J]. 中国卫生质量管理,2006,13(2):44-46.
- [19] 刘银花,梁利球,沈婕,等. 溪黄草与虎杖煎剂利胆作用的实验研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(7):1626-1627.
- [20] 孔俊飞,李月廷,吴京涛,等. 利胆汤对大鼠利胆作用的实验研究[J]. 中国医药导报,2013,10(35):21-23.
- [21] KADIER A, ABDESHAHIAN P, SIMAYI Y, et al. Grey relational analysis for comparative assessment of different cathode materials in microbial electrolysis cells[J]. Energy,2015,90:1556-1562.
- [22] SHEN C H, LIU C T, SONG X J, et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Rubia cordifolia* L. by spectrum-effect relationships [J]. J Chromatogr B,2018,1090:73-80.
- [23] 陶曙红,郭丽冰,陈艳芬,等. 环烯醚萜类成分提取分离与含量测定方法的研究进展[J]. 中成药,2016,38(12):2665-2668.
- [24] 刘若楠,杨志玲,莫润宏. 多波长HPLC法同时测定栀子药材中3种有效成分的含量[J]. 中华中医药杂志,2012,27(9):2438-2440.

[责任编辑 顾雪竹]