

• 药理与临床 •

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

张华锋, 刘 炯, 张 杰, 杨 云*, 卫 冰, 王启帅
河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008

摘要: 目的 探讨北柴胡正丁醇萃取部位的保肝作用及与其 HPLC 指纹图谱间的谱效关系, 以阐明其药效物质基础。方法 采用 HPLC-ELSD 法获取北柴胡正丁醇萃取部位的指纹图谱; 检测 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠血清中丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平、肝组织中丙二醛 (MDA) 的量和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性; 利用聚类分析与典型相关分析法对色谱-药效数据进行相关分析。结果 从 HPLC 指纹图谱中共提取出 12 个能够标示药材特征的皂苷类成分的共有峰。不同产地北柴胡药材的保肝作用存在显著差异 ($P < 0.05$)。聚类分析和典型相关分析明确了给予北柴胡正丁醇萃取部位的小鼠血清中 ALT 水平和肝组织中 SOD 活性与皂苷类化合物柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 之间存在线性关系。结论 北柴胡保肝作用的部分药效物质基础为柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d。

关键词: 北柴胡; 保肝作用; HPLC 指纹图谱; 谱效关系; 药效物质基础

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2696-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.013

Spectrum-effect relationship of *Bupleurum chinense* for hepatoprotective effect based on cluster analysis and typical correlation analysis

ZHANG Gua-feng, LIU Jiong, ZHANG Jie, YANG Yun, WEI Bing, WANG Qi-shuai
College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

Abstract: Objective To analyze the spectrum-effect relationship between the hepatoprotective effect and HPLC fingerprints of the *n*-butanol fraction extracted from *Bupleurum chinense* and to elucidate its effective substance. **Methods** HPLC-ELSD was used to obtain the fingerprint peaks of *n*-butanol fraction of *B. chinense*; the levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, malondialdehyde (MDA) content, and superoxide dismutase (SOD) activity in liver tissue of mice with acute hepatic injury induced by CCl₄ were detected. Cluster analysis and typical correlation analysis were used to analyze the data of spectrum and efficacy. **Results** Twelve common peaks which could show the features of *B. chinense* were isolated and there was statistical difference ($P < 0.05$) among the hepatoprotective effects of *B. chinense* from different origins. Saikoside a and saikoside d were proved to have linear relationship with the serum ALT level and liver tissue SOD activity in mice with acute liver injury in the treatment group by cluster analysis and typical correlation analysis. **Conclusion** Saikoside a and saikoside d are the effective substances of *B. chinense* with hepatoprotective effect.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; hepatoprotective effect; HPLC fingerprint; spectrum-effect relationship; effective substance

中药谱效关系是在中药指纹图谱和药效学研究结果的基础上, 将物质群特征峰的指纹图谱与量化的药效指标联系起来获取化学与药效信息。该方法能够明确与中药药效相关的物质基础, 反映药材的内在质量^[1], 既适用单味中药, 也适用于复方化学

成分的研究。

目前对谱效学研究的手段主要有图谱与药效的直观比较方法和多元回归分析法, 前者对样品数据的代表性及相关性要求极高, 结果易受人为主观因素影响; 后者存在自变量之间的共线性问题及多重

收稿日期: 2012-11-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAI006A10); 河南省科技成果转化项目 (092201310001)

作者简介: 张华锋 (1987—), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事中药及制剂中活性成分研究及新药开发。E-mail: w709319243@qq.com

*通信作者 杨 云 Tel: (0371)65680605 E-mail: yyun@china.com.cn

回归分析标本的量的问题,分析繁琐,研究周期较长。本实验采用聚类分析法对同一样本中的不同指标变量进行聚类分析,探寻各变量之间的相关性,将相似的变量提取出来,减少了分析变量的个数,使得变量间相关分析的适用性更强,而且可为挑选相关分析方法提供依据。

柴胡总皂苷具有广泛的药理活性,如保肝、解热、抗癫痫、抗抑郁等^[2-6]。但由于柴胡中柴胡皂苷类成分繁杂多样,因此到目前为止尚未完全明确柴胡皂苷类化合物与其药理作用的相关性。基于此本实验以北柴胡正丁醇萃取部位(柴胡总皂苷)为研究对象,考察其对急性小鼠肝损伤的保护作用,建立该部位的 HPLC 指纹图谱,通过探讨其谱效关系,为进一步研究北柴胡药材的药效物质基础提供实验依据,以期能够探索出行之有效的谱效关系研究方法。

1 材料

1.1 药材与试剂

北柴胡样品共 10 批,分别采自陕西、山西、河南、河北、辽宁、甘肃等北柴胡主产区。经河南中医药大学生药教研室董诚明教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。药材样品信息见表 1。

表 1 北柴胡药材来源
Table 1 Sources of *B. chinense*

编号	生长方式	生长年限	产地
S1	栽培	两年生	辽宁大连
S2	野生	多年生	山西大同
S3	野生	多年生	陕西宝鸡
S4	野生	多年生	河南西峡
S5	野生	多年生	河北丰宁
S6	野生	多年生	河北承德
S7	野生	多年生	河南滦平
S8	野生	多年生	河南栾川
S9	栽培	20 个月	河南辉县
S10	栽培	22 个月	河南嵩县

联苯双酯滴丸,浙江万邦药业有限公司,批号 090906; 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所; 色谱纯乙腈,美国 Tidea 公司; CCl_4 , 分析纯; 0.2% CCl_4 植物油溶液、双蒸水自制; 柴胡皂苷

a 对照品、柴胡皂苷 d 对照品,自制,经峰面积归一化法测定质量分数均大于 98%。

1.2 仪器

SUMMIT 高效液相色谱仪,美国 Dionex 公司; 2000ES 蒸发光散色检测器,美国 Alltech 公司; METTLER AE240 电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; BS210S 型电子天平,北京赛多利斯天平公司; SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂; PT2100 型内切式组织匀浆机,美国 Polytron 公司; 3-18K 型高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司; LDZ5-2 低速自动平衡离心机,北京京立公司; 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂; 电热恒温水浴锅,北京长风仪器仪表公司; UV-2000 型紫外可见分光光度计,尤尼科上海仪器有限公司; ChromafingerTM2005 色谱指纹图谱系统解决方案软件,珠海科曼中药研究有限公司。

1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量 (20 ± 2) g,河南医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2005-0001,实验动物使用许可证 SCXK (豫) 2005-001。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 北柴胡总皂苷提取物的制备 取北柴胡粗粉 50.0 g,乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,第 1 次加 8 倍量乙醇,第 2 次加 6 倍量乙醇,减压滤过,合并滤液,减压回收乙醇至膏状。浸膏以等量正丁醇饱和和水溶解并以水饱和正丁醇等量萃取 3 次,合并萃取液,浓缩得柴胡皂苷提取物 (生药 11.20 mg/mL)。

2.1.2 测定用供试品溶液的制备 取“2.1.1”项下皂苷提取物适量,甲醇溶解,制备生药 8 mg/mL 的供试品溶液。

2.1.3 药效实验用试药溶液的制备 取“2.1.1”项下提取物适量,加生理盐水 50 mL,3 000 r/min 离心 3 min,沉淀加蒸馏水 50 mL 溶解,3 000 r/min 离心 3 min,合并 2 次溶液,混匀,减压浓缩至 50 mL,即得生药 1.0 g/mL 的药液。

2.1.4 指纹图谱研究用供试品溶液的制备 取北柴胡粗粉 1.0 g,精密称定,甲醇超声提取 1 h,滤过,洗涤沉淀,合并滤液,挥干溶剂,剩余物以适量水饱和正丁醇溶解并以水饱和正丁醇等量萃取 3 次,合并萃取液,甲醇定容,即得生药 0.2 g/mL 的供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取柴胡皂苷 a 对照品 9.57 mg，置 5 mL 容量瓶中，加甲醇超声溶解，定容，摇匀，即得 1.914 mg/mL 的柴胡皂苷 a 对照品溶液。

2.3 北柴胡总皂苷的测定

2.3.1 标准曲线的绘制 分别吸取质量浓度为 1.914 mg/mL 的柴胡皂苷 a 对照品溶液 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL，甲醇定容至 5 mL，即得不同质量浓度的对照品稀释液。吸取对照品稀释液各 0.80 mL，水浴挥干溶媒，加 1% 对二甲氨基苯甲醛乙醇液 0.10 mL，挥干，加磷酸 4.0 mL，70 °C 水浴加热 30 min，冷却至室温，测定 535 nm 处吸光度，以吸光度为纵坐标 (Y)，对照品溶液质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 3.1086X + 0.0682$, $r = 0.9996$, 线性范围为 0.0306 ~ 0.3062 mg。

2.3.2 方法学考察 经方法学考察，显示精密密度、稳定性、重复性、加样回收率的 RSD 分别为 0.15%、0.08%、2.75%、3.29%，均符合分析要求。

2.3.3 北柴胡药材总皂苷测定 取“2.1.2”项下的供试品溶液 0.80 mL，按照“2.3.1”项下方法测定，10 批北柴胡 (S1~S10) 中柴胡总皂苷的质量分数见表 2。

表 2 10 批北柴胡中柴胡总皂苷的量

Table 2 Total saponins in 10 batches of *B. chinense*

样品	柴胡总皂苷 / %	样品	柴胡总皂苷 / %
S1	1.31	S6	1.14
S2	1.56	S7	1.16
S3	1.63	S8	2.05
S4	1.93	S9	1.24
S5	1.19	S10	1.64

2.4 北柴胡指纹图谱及其数据分析

2.4.1 指纹图谱的获取及其共有模式的建立 吸取“2.1.4”项下供试品溶液 10 μL，SUMMIT 高效液相色谱仪测定^[7]。色谱条件：Hydro-RP80A C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，柱温 30 °C，体积流量 1.0 mL/min；流动相为乙腈 (A) - 水 (B)，梯度洗脱 (0~15 min, 15% A; 15~25 min, 30% A; 25~40 min, 35% A; 40~60 min, 45% A; 60~70 min, 50% A; 70 min 后 15% A)，进样量 1.0 μL；蒸发光散色检测器，漂移管温度 110 °C，空气体积流量 3.0 L/min。采用 Chromap 色谱指纹图谱系统解

决方案软件，以 S8 号样品的指纹图谱为保留时间参考标准，选取分离度好的柴胡皂苷 d 色谱峰作为内参照峰，对 10 批北柴胡样品的色谱指纹峰进行匹配。结果见图 1。

运用高斯曲线对共有模式进行色谱基线校正，生成北柴胡皂苷类成分的 HPLC-ELSD 指纹图谱共有模式 (高斯曲线模拟图，图 2)。

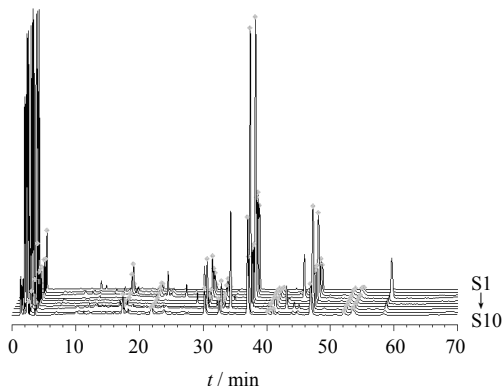


图 1 10 批北柴胡药材 HPLC-ELSD 指纹图谱
Fig. 1 HPLC-ELSD fingerprint of 10 batches of *B. chinense*

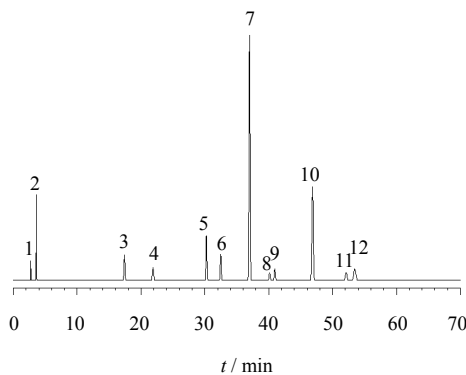


图 2 北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱共有模式
Fig. 2 Common pattern of HPLC-ELSD fingerprint of *B. chinense*

2.4.2 指纹图谱相似度计算 以北柴胡指纹图谱共有模式作为 10 批药材指纹图谱色谱峰匹配的依据，对样品指纹图谱进行相似度评价。结果显示，所选取的 12 个共有峰具有代表性，相关系数均大于 0.9，能够用于标示北柴胡皂苷类成分的特征。

2.4.3 共有峰分析 确定了 12 个能标示北柴胡皂苷类成分的共有峰。通过与对照品色谱图相比，指出共有峰中的 7 号色谱峰为柴胡皂苷 a 的信号峰，10 号色谱峰为柴胡皂苷 d 的信号峰。

2.4.4 指纹图谱的聚类分析 以 HPLC 指纹图谱中的共有峰作为描述样品化学特征的变量,应用 SPSS 13.0 统计软件、采用系统聚类分析方法对 10 批药材样品进行聚类分析,即以指纹图谱的 12 个共有峰所对应的峰面积对数值为变量,然后采用 SPSS 13.0 统计软件对 10 批药材样本进行聚类。结果见图 3。由图 3-A 可知,当分类距离为 10 时,结合表 2 数据,可将药材细分为 4 类,即总皂苷质量分数分别

为 1.56%~1.64%、2.05%、1.14%~1.31%、1.93%。为寻找指纹图谱共有峰中各元素间的亲疏关系^[8],对色谱数据进行变量聚类,所得分析结果见图 3-B。由图 3-B 可见,当分类距离为 5 时,可将 12 个共有峰分为 2 类,即 7 号和 10 号色谱峰聚为一类;其余 10 个色谱共有峰聚为一类。通过与对照品色谱图对比,得出 7 和 10 号色谱峰分别是化合物柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的色谱峰。

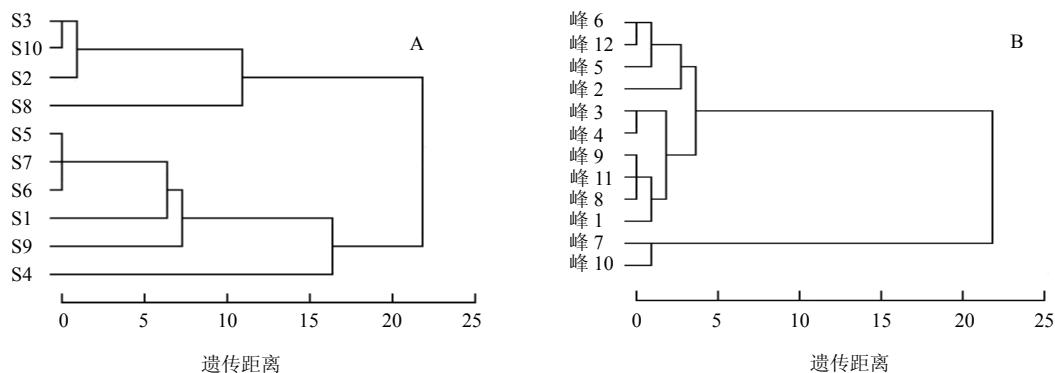


图 3 10 批北柴胡样品指纹图谱聚类分析树状图 (A) 和变量聚类分析树状图 (B)

Fig. 3 Dendrograms of cluster analysis (A) and variable cluster analysis (B) on 10 batches of *B. chinense*

以上分析表明,指纹图谱共有峰不仅能标示北柴胡皂苷类成分的共有特征,还能有效地表达不同样本间的细微差异,而且不同的共有峰所解释的样本差异的比例是不同的。

2.5 北柴胡皂苷提取物对 CCl₄ 致小鼠肝损伤的影响

2.5.1 分组、给药与指标检测 小鼠随机分为 13 组,即对照组、模型组、联苯双酯 (0.15 g/kg) 阳性对照组、不同产地北柴胡皂苷提取物 (20 g/kg) 组,每天 ig 给药 1 次,每次 20 mL,连续给药 7 d,对照组及模型组给予等体积生理盐水。末次给药后禁食不禁水 2 h,对照组 ip 植物油 10 mL/kg,其余各组均 ip 0.2%CCl₄ 植物油溶液 10 mL/kg^[9-10]。造模后 18 h 眼球取血,分离血清,测定血清中 ALT 和 AST 的水平。取小鼠肝脏,制备匀浆,检测肝组织中 SOD 的活性和 MDA 的量。

2.5.2 结果分析 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果显示,与对照组相比,模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平均显著升高 ($P < 0.05$),肝组织中 MDA 的量显著增加 ($P < 0.05$),SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$),表明小鼠急性肝损伤模型造模成功。与模型组相比,不同产地北柴胡正丁醇

萃取部位均可有效抑制肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 水平的升高、肝组织中 MDA 量的增加及 SOD 活性的降低 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

由于血清 ALS、AST 和肝组织 MDA 为低优指标,而肝组织 SOD 为高优指标,为了统一指标所表达的含义,对 4 个指标变量进行“统一化”变换,计算公式为 $\bar{X}'_{\text{统一化}} = |\bar{X}'_{\text{给药}} - \bar{X}'_{\text{模型}}|$ 。结果见表 3。

2.5.3 组间比较及样本聚类分析 对 10 个产地的北柴胡的保肝作用进行比较 (SOD、MDA、ALT 和 AST 4 个指标均具备方差齐性),均存在显著差异 ($P < 0.05$),表明 10 个不同产地药材中柴胡皂苷的保肝作用不同 (至少有 2 个产地之间存在统计学差异)。

以原始的药效均数和“统一化”变换后的药效均数分别作为描述样本特征的变量,进行样本聚类分析,结果完全相同,证明经“统一化”变换后的变量可以代替原样本均数变量用于描述不同样本的药效学特征。以“统一化”变换后的药效均数作为变量对样本药效学特征进行描述,聚类结果见图 4。

由图 4-A 及表 3 可知,以 SOD、MDA、ALT 和 AST 4 个药效指标作为描述样本特征的变量时,当分类距离为 15 时,可将样品分为 2 类,1 类为柴

表 3 北柴胡对 CCl₄ 致小鼠肝损伤的药效指标均数的“统一化”计算结果

Table 3 Unification results of effective index of *B. chinense* on mice with liver injury induced by CCl₄

组别	ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	SOD / (U·mg ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)	统一化变换			
					ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	SOD / (U·mg ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)
对照	19.30±3.40*	17.30±4.24*	296.36±37.43*	3.04±0.60*				
模型	41.20±2.82 [▲]	84.70±5.74 [▲]	87.21±21.78 [▲]	7.57±1.15 [▲]				
联苯双酯	30.10±4.07 [▲]	47.70±8.25 [▲]	256.39±22.76 [▲]	4.50±0.72*				
S1	26.40±1.90 [▲]	58.40±6.59 [▲]	236.53±45.26 [▲]	4.91±1.11 [▲]	14.80	26.30	149.32	2.66
S2	25.70±2.71 [▲]	64.20±6.13 [▲]	281.85±29.69*	5.81±0.94 [▲]	15.50	20.50	194.64	1.76
S3	30.20±2.62 [▲]	52.00±6.85 [▲]	166.87±37.34 [▲]	5.51±0.61 [▲]	11.00	32.70	79.66	2.06
S4	25.60±1.90 [▲]	58.00±5.62 [▲]	276.80±26.24*	6.02±0.99 [▲]	15.60	26.70	189.59	1.55
S5	30.50±3.38 [▲]	66.90±4.91 [▲]	157.21±23.41 [▲]	5.01±0.66 [▲]	10.70	17.80	70.00	2.56
S6	34.40±2.63 [▲]	64.10±4.86 [▲]	126.69±24.05 [▲]	3.20±0.59*	6.80	20.60	39.48	4.37
S7	31.00±3.43 [▲]	54.70±5.19 [▲]	145.33±29.75 [▲]	3.25±0.82*	10.20	30.00	58.12	4.32
S8	28.90±2.56 [▲]	56.10±5.67 [▲]	248.18±23.28 [▲]	5.14±1.27 [▲]	12.30	28.60	160.97	2.43
S9	31.10±2.47 [▲]	60.60±5.08 [▲]	157.80±29.57 [▲]	3.91±0.99*	10.10	24.10	70.59	3.66
S10	28.30±2.41 [▲]	58.40±5.78 [▲]	269.29±39.14 [▲]	4.77±1.10 [▲]	12.90	26.30	182.08	2.80

与对照组比较: [▲]P<0.05; 与模型组比较: *P<0.05

[▲]P < 0.05 vs control group; *P < 0.05 vs model group

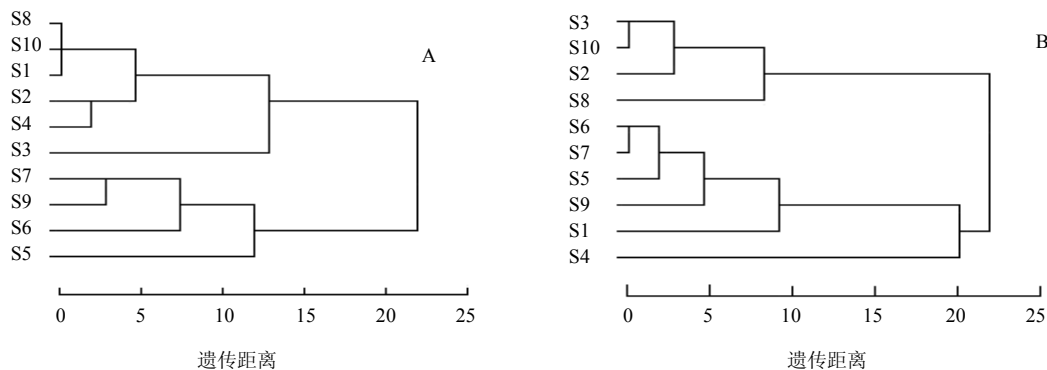


图 4 10 批北柴胡药材药效学特征聚类分析树状图 (A) 和总聚类分析树状图 (B)

Fig. 4 Dendrograms of pharmacodynamic characteristic cluster analysis (A) and total cluster analysis (B) of 10 batches of *B. chinense*

胡总皂苷质量分数在 1.31%~2.05%; II 类为柴胡总皂苷质量分数在 1.14%~1.24%。

2.6 谱效关系研究

2.6.1 色谱数据与药效数据相关性分析 将 HPLC 指纹图谱共有峰和样本间的药效结果均数作为共同变量, 描述 10 批样本 (构成一个 12×10+4×10 的数据集), 进行聚类分析。结果见图 4。

综合图 4-B 与表 3 可见, 当分类距离为 10 时, 样本可分为 5 类, I 类为柴胡总皂苷质量分数在 1.56%~1.64%; II 类为柴胡总皂苷质量分数为

2.05%; III 类为柴胡总皂苷质量分数在 1.14%~1.24%; IV 类为柴胡总皂苷质量分数为 1.31%; V 类为柴胡总皂苷质量分数为 1.93%。结果表明, 变量之间可能存在着某种关联性。对样本的所有变量 (12+4) 进行变量聚类。结果见图 5。

图 5 与图 3-A, 可见当分类距离为 10 时, 可将所有来自于同一样本的变量 (12+4) 重新分成 4 类, I 类为 3、4、11、12、1、6、9、5、2、8 号峰, II 类为 ALT、SOD、7 和 10 号峰, III 类为 AST, IV 类为 MDA。ALT 和 SOD 与指纹图谱共有峰 7 和 10

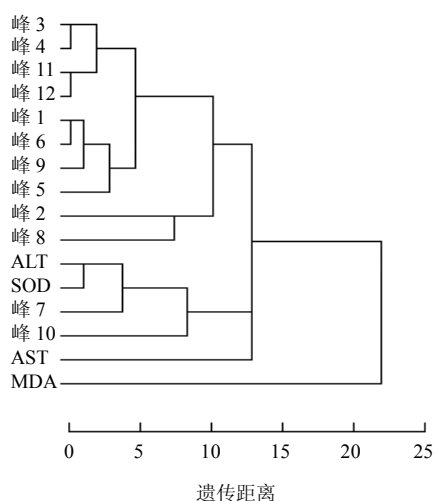


图5 指纹图谱和药效学所有变量聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of all variables of fingerprint and pharmacodynamics

可聚为一类，有较高的相关性。

2.6.2 典型相关分析 典型相关分析用于分析2组随机变量间的相关关系。以给予北柴胡正丁醇萃取部位提取物组小鼠的ALT和SOD的“统一化”变换后的均数为变量，描述不同产地柴胡间的保肝作用效能（药效变量组），同时以指纹图谱共有峰7和10的峰面积对数描述不同产地间北柴胡的化学信息（色谱峰变量组）。10批样本以SOD、MDA、ALT和AST4个特征值来描述，构成一个(10×4)的数据集，进行相关分析。以柯尔莫诺夫-斯米尔诺夫检验(1-Sample K-S Test)对样本的药效和色谱峰进行正态性检验，各项指标 $P > 0.05$ ，均能满足典型相关分析的要求。

典型相关分析提取出2个典型变量对(U_1 、 V_1 和 U_2 、 V_2)，它们之间的典型相关系数分别为0.842、0.517，药效变量组和色谱峰变量组所构建的典型变量对相关系数的绝对值越接近1，显示仅 U_1 和 V_1 变量对的相关系数具有统计学意义($P = 0.039$)，二者之间为线性相关($r = 0.842$)。

对色谱峰变量组和药效变量组的典型变量进行提取，通过典型相关系数检验及典型变量冗余度分析，结果显示 U_1 解释了色谱峰原变量总变异的60.5%，色谱峰原变量组的变异被药效变量组的典型变量(V_1 、 V_2)所解释的比例为53.5%，其中 V_1 就解释了色谱峰原变量总变异的42.9%；药效原变量组($\bar{X}'_{\text{统一化SOD}}$ 、 $\bar{X}'_{\text{统一化ALT}}$)的总变异被本身的 V_1 解释了91.7%，色谱峰变量组的2个典型变量(U_1 、

U_2)蕴含了药效变量组信息的67.3%，其中仅 U_1 就解释了药效变量组总变异的65.1%。结合以上分析，所提取的典型变量对(U_1 、 V_1)之间具有线性正相关($r = 0.842$)， $2U_1 = -1.257 \ln A_{\text{柴胡皂苷a}} + 0.398 \ln A_{\text{柴胡皂苷d}}$ (U_1 为由色谱峰变量组提取出来的第1典型变量； $A_{\text{柴胡皂苷a}}$ 表示柴胡皂苷a的色谱峰面积； $A_{\text{柴胡皂苷d}}$ 表示柴胡皂苷d的色谱峰面积)。

以上分析结果显示反映色谱信息的第1典型变量 U_1 主要由柴胡皂苷a与柴胡皂苷d共同决定；反映药效信息的第1典型变量 V_1 主要由 $\bar{X}'_{\text{统一化ALT}}$ 与 $\bar{X}'_{\text{统一化SOD}}$ 共同决定。提示北柴胡中柴胡皂苷a和柴胡皂苷d对 CCl_4 所致急性肝损伤小鼠血液中ALT水平和肝组织SOD活性产生影响；而柴胡皂苷a与柴胡皂苷d的共同作用对药效呈增强作用，它们是保肝作用的关键成分，这与文献报道^[11]相符。

3 讨论

为了保证色谱分析与药效实验中柴胡总皂苷用药的一致性，笔者在保证总皂苷提取率的前提下，统一了上述2种实验用样品的制备过程，即均以正丁醇部位作为研究对象。只是用于色谱分析时，采用甲醇超声提取，而用于药效学研究时采用乙醇回流提取（因为当样品用量较大时，不利于用超声提取），且由于甲醇具有一定的肝脏毒性，不利于动物实验。

本实验将柴胡总皂苷的量作为分类依据，有效地对分类条件进行定义，弥补了系统聚类关于分类条件模糊的缺点^[12-13]。将色谱指标和药效均数指标进行变量聚类，通过聚类结果，可对不同指标的相似性及分类情况进行总体调控，找出变量之间的相关性，剔除相似性相对较差的变量，为数据的精确处理提供思路。结果表明聚类分析法用于谱效学的数据处理是可行和高效的。

本实验引用典型相关分析对谱效数据进行分析是一种探索性研究，经过聚类分析可有效地将多变量归类，从中选取相关性较高的变量作为典型相关分析的数据，还可对变量进行筛选。本实验选用聚类分析与典型相关分析相结合的方法对谱效学数据进行分析归纳。未选用主成分和因子分析主要是考虑到因子分析对于样本量的要求过于严苛（一般要求观测例数应为指标个数的5倍以上，要求总样本量应大于100），这大大约束了因子分析在谱效学分析中的应用。

综上所述，本实验结果表明北柴胡保肝作用的

部分药效物质基础为柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d, 谱效关系研究是探讨北柴胡化学成分和药效之间相关性的有效途径。

参考文献

- [1] 张丽杰, 刘丽娟, 齐凤琴, 等. 中药谱效关系研究进展 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2010, 27(11): 971-975.
- [2] 何燕, 胡志峰, 齐李平, 等. 柴胡皂苷-d 抗肝纤维化大鼠脂质过氧化作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8): 915-919.
- [3] 薛燕, 白金叶. 柴胡解热成分的比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19(1): 11-12.
- [4] 谢炜, 林佳, 张作文, 等. 柴胡皂苷 a 对体外培养大鼠海马星形胶质细胞激活的抑制作用 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(10): 1798-1801.
- [5] 戈宏焱, 陈博, 许丹, 等. 柴胡皂苷 A 对抑郁模型大鼠脑中单胺类神经递质及其代谢产物含量的影响 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(8): 1535-1538.
- [6] 郭晓擎, 田俊生, 史碧云, 等. 南柴胡和北柴胡组成的逍遥散抗抑郁作用的 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2209-2216.
- [7] 王启帅, 杨云, 肖功胜, 等. 北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及色谱数据的分析 [J]. 中成药, 2011, 33(3): 373-378.
- [8] 田润涛. 河南北柴胡 LC 指纹图谱研究及中药色谱指纹图谱技术探讨 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2004.
- [9] 李夏, 段冷昕, 王楠娅, 等. 鹿茸多肽对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(24): 1864-1866.
- [10] 辛念, 熊建新, 韩淑英, 等. 荞麦种子总黄酮对四氯化碳所致急性肝损伤的保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1456-1458.
- [11] Nishiura T, Marukawa S, Ishida H, *et al.* Effects of saikosaponins on hepatic damage induced by halothane and hypoxia in Phenobarbital-pretreated rats [J]. *J Anesth*, 1994, 8(1): 87-92.
- [12] 杨小兵. 聚类分析中若干关键技术的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [13] 惠周利. 聚类分析中的若干问题研究及应用 [D]. 太原: 中北大学, 2008.