

广山楂 HPLC 指纹图谱建立及其活血化癥作用谱效关系研究

张 萌¹, 邓家刚^{1,2,3}, 韦 玮^{1,3}, 郝二伟^{1,2}, 秦健峰^{1,2}, 谢金玲^{1,2}, 覃豪丽^{1,3}, 梁钰莹^{1,3}, 覃竹慧^{1,3}, 余良辰^{1,3}, 侯小涛^{1,2,3*}

1. 广西中药药效研究重点实验室, 广西 南宁 530200

2. 农作物废弃物功能成分研究协同创新中心, 广西 南宁 530200

3. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

摘 要: 目的 建立广山楂 *Malus doumeri* 指纹图谱, 测定各批次广山楂的“活血化癥”药效学指标, 探讨广山楂化学成分与活血化癥功效的谱效关系。方法 采用 HPLC 法建立 18 批广山楂的指纹图谱。利用大鼠高脂模型, 测定不同批次广山楂的“活血化癥”药效学指标, 包括高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 含量及血液流变学指标等。运用偏最小二乘回归法 (partial least-square method regression, PLSR)、灰色关联度分析法, 分析广山楂化学成分与活血化癥药效指标间的谱效关系。结果 构建了广山楂的 HPLC 图谱, 确定了 6 个共有峰, 并指认了其中的 2 个共有峰 (绿原酸、根皮苷)。活血化癥实验表明, 不同批次广山楂活血药效指标间具有明显差异, 在标定的广山楂 6 个特征峰中, 峰 2~6 与 HDL-C 呈正相关, 峰 1、5、6 与 LDL-C 呈正相关, 峰 1、5 与 TC 呈正相关, 峰 3、4 与 TG 呈正相关; 灰色关联度分析表明, 峰 3、5、6 所代表的化学成分与活血化癥药效具有一定关联性。结论 建立了广山楂药材的指纹图谱, 并对其谱效关系进行了研究, 为广山楂的临床合理使用及质量控制研究提供了一定的参考依据。

关键词: 壮药; 广山楂; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 谱效关系; 绿原酸; 根皮苷

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0601-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.028

Establishment of HPLC fingerprint of *Malus doumeri* and its spectrum-effect relationship of blood-activating and stasis-resolving

ZHANG Meng¹, DENG Jia-gang^{1,2,3}, WEI Wei^{1,3}, HAO Er-wei^{1,2}, QIN Jian-feng^{1,2}, XIE Jin-ling^{1,2}, QIN Hao-li^{1,3}, LIANG Yu-ying^{1,3}, QIN Zhu-hui^{1,3}, YU Liang-chen^{1,3}, HOU Xiao-tao^{1,2,3}

1. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Nanning 530200, China

2. Collaborative Innovation Center of Study on Functional Ingredients of Agricultural Residues, Nanning 530200

3. China School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To establish the fingerprints of *Malus doumeri*, determine their pharmacodynamic indexes of blood-activating and stasis-resolving of various batches of *M. doumeri*, and explore the spectrum-effect relationship between the chemical components of *M. doumeri* and the efficacy of blood-activating and stasis-resolving. **Methods** The HPLC fingerprints of 18 batches of *M. doumeri* were established. The pharmacodynamic indexes of blood-activating and stasis-resolving of different batches of *M. doumeri* were determined using rat hyperlipidemia model, including high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG), hemorheology index and so on. The partial least-square method regression (PLSR) and grey correlation analysis method was used to explore the spectrum-effect relationship between the chemical components of *M. doumeri* and the pharmacodynamic indexes of blood-activating and stasis-resolving. **Results** HPLC chromatogram of *M. doumeri* was established, six common peaks were identified, and two common peaks (chlorogenic acid and phloridzin) were calibrated. The experiment of blood-activating and stasis-resolving showed that there were significant differences in

收稿日期: 2022-09-20

基金项目: 国家重点研发计划课题: 20 种彝、傣、壮、瑶、苗民族药品种整理与质量评价 (2019YFC1712304)

作者简介: 张 萌 (1995—), 女, 硕士, 研究方向为药物分析及质量控制。E-mail: 1756944960@qq.com

*通信作者: 侯小涛 (1969—), 女, 教授, 研究方向为中药活性成分及质量控制研究。E-mail: xthou@126.com

pharmacodynamic indexes among different batches of *M. doumeri*. Among the six characteristic peaks of *M. doumeri*, peaks 2—6 were positively correlated with HDL-C, peaks 1, 5 and 6 were positively correlated with LDL-C, peaks 1 and 5 were positively correlated with TC, and peaks 3 and 4 were positively correlated with TG; Grey correlation analysis showed that the chemical constituents represented by peak 3, 5 and 6 had a certain correlation with the efficacy of blood-activating and stasis-resolving. **Conclusion** In this experiment, the fingerprint of *M. doumeri* was established, and its spectrum-effect relationship was studied, which provided a certain reference basis for the clinical rational use and quality control of *M. doumeri*.

Key words: Zhuang medicine; *Malus doumeri* (Bois.) Chev; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; spectrum-effect relationship; chlorogenic acid; phloridzin

广山楂, 又名芒山楂、大果山楂, 为台湾林擒 *Malus doumeri* (Bois.) Chev、光萼林擒 *M. leiocalyx* S. Z. Huang 的成熟果实, 是广西道地药材之一^[1-2]。广山楂的果实^[3]、叶^[4-5]均可入药, 其果实性温, 味甘、酸、涩, 归脾、胃、肝经, 具有消食健胃、行气散瘀的功效, 用于肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、疝气疼痛、高脂血症等^[6]。现代药理研究表明广山楂具有开胃助消化、调血脂、消炎抗菌及抗肿瘤的作用^[7]。其果大、气味清香、酸甜适中, 为药食两用药^[8], 现已列入广西壮药材质量标准^[9]。

血瘀证模型包括气滞血瘀、气虚血瘀、外伤血瘀、血虚血瘀、寒凝血瘀、阳虚血瘀、阴虚血瘀、痰浊血瘀、热毒血瘀、慢性血瘀 10 种类型, 不同血瘀模型所用造模方法不同^[10]。广山楂具有行气散瘀之功效, 现代药理表明其具有调血脂、治疗高脂血症等作用, 故本研究采用高脂饲料喂养法建立痰浊血瘀模型, 对广山楂的活血化瘀功效进行考察, 采用 HPLC 建立广山楂指纹图谱, 并运用数理统计方法将药效学信息与 HPLC 指纹图谱化学信息进行相关性研究, 以期表征广山楂的活血化瘀效应组分, 探寻广山楂活血化瘀活性成分的研究思路, 为其谱效关系研究奠定基础^[11]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 包括四元超高压溶剂系统、自动进样样本管理器、PDA 检测器、Empower 2 色谱工作站); WND-200 电热万能粉碎机 (天津太斯特仪器有限公司); SB25-12D 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); CPA225D 万分之一分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; DZKW-D-6 电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器有限公司); DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有

限公司); JCS-W 电子天平 (哈尔滨众汇衡器有限公司); C21-SC016-A 电磁灶 (杭州九阳生活电器有限公司); N-1100 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); DLSB-5/20 低温冷却液循环泵 (郑州长城科工贸有限公司); NVP-1000 隔膜真空泵、NVC-300 真空控制器 (上海爱朗仪器有限公司); Microfuge 22R 台式微量冷冻离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); FM40 雪花制冰机 (北京长流科学仪器公司); AL800 全自动生化仪 (日本岛津); Mill-Q Advantage 超纯水系统 (四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 材料

对照品根皮苷 (批号 MUST-21071902, 成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 99\%$); 绿原酸 (批号 MUST-21070910, 成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$); 乙腈、甲醇 (色谱级, 美国飞世尔试剂公司); 血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒 (批号 20210722)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG) 试剂盒 (批号 20210721)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒 (批号 20210724)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterin, LDL-C) 试剂盒 (批号 20210724) 购自南京建成生物工程研究所; 辛伐他丁 (山东鲁抗医药集团赛特有限公司, 批号 30517); 甲醇、乙醇 (分析级, 成都科隆化学品有限公司); 磷酸 (色谱级, 成都金山化学试剂有限公司); 水为超纯水。18 批不同产地广山楂药材经广西中药研究院黄云峰研究员鉴定为蔷薇科植物台湾林擒 *M. doumeri* (Bois.) Chev 的成熟果实。药材样品来源信息如表 1 所示。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠, 6~8 周, 体质量 160~200 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物实验经广西中医药大学伦理委员会批准 (批准号为 DW 2018), 遵循广

表 1 广山楂药材样品来源

Table 1 Source of *M. doumeri* samples

编号	药用部位	产地/采集地点	编号	药用部位	产地/采集地点
GSZG-1	果实	广西百色靖西	GSZG-10	果实	广西梧州市
GSZG-2	果实	广西梧州	GSZG-11	果实	广西金秀县六项乡郎冲村
GSZG-3	果实	广西靖西	GSZG-12	果实	广西金秀县六项村
GSZG-4	果实	云南连昌	GSZG-13	果实	广西恭城县三江乡
GSZG-5	果实	黄氏民族中草药店	GSZG-14	果实	广西恭城县平安镇
GSZG-6	果实	银泰原生中草药店(靖西自采)	GSZG-15	果实	广西永福县
GSZG-7	果实	广西百色靖西县兴康中草药店	GSZG-16	果实	广西德保县孟达镇
GSZG-8	果实	梁家辉野生中草药馆	GSZG-17	果实	广西柳江县
GSZG-9	果实	靖西市古树村弄伦屯	GSZG-18	果实	广西平南县大鹏镇

西中医药大学有关实验动物管理和使用的规定。动物于广西中医药大学动物中心常规喂养,自由进食饮水,10 h 光照/14 h 黑暗,温度 21~25 °C,湿度 30%~70%。

2 方法

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为月旭 BETASIL C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸(B),洗脱梯度:0~3 min, 6%~12%A; 3~18 min, 12%A; 18~20 min, 12%~19%A; 20~45 min, 19%A; 45~53 min, 19%~28%A; 53~60 min, 28%~30%A; 60~78 min, 30%~60%A。体积流量 1 mL/min; 柱温 23 °C; 检测波长 285 nm; 进样量 10 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定广山楂药材粉末(过 65 目筛)约 1.0 g(精确至 0.000 1 g),置具塞锥形瓶中,加入 70%甲醇 20 mL,称定质量,超声 1 h(500 W、50 Hz),取出晾凉,补足减失质量,过 0.22 μm 微孔滤膜,转移至进样瓶备用。

2.1.3 对照品溶液的制备 取适量绿原酸、根皮苷对照品,精密称定,分别加入甲醇定容于 10 mL 量瓶中,再分别吸取上述对照品溶液,配制为含绿原酸、根皮苷各 0.05 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.4 方法学考察

(1) 精密度:取广山楂药材(GSZG-1),按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项色谱条件,连续进样 6 次,采集图谱,计算各共有峰峰面积及保留时间 RSD 值。

(2) 重复性:取广山楂药材(GSZG-1),按照“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按照“2.1.1”

项色谱条件,连续进样 6 次,采集图谱,计算各共有峰峰面积及保留时间 RSD 值。

(3) 稳定性:取广山楂药材(GSZG-1),按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 时进样,采集图谱,计算各共有峰峰面积及保留时间 RSD 值。

2.1.5 指纹图谱建立及相似度评价 取 18 批广山楂药材,采用“2.1.2”“2.1.3”项下方法进行溶液制备,按“2.1.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”进行数据分析。采用 SPSS 23.0 数据分析软件进行聚类分析。

2.2 活血化瘀药效研究

2.2.1 高脂饲料组成 2%胆固醇、10%蛋黄粉、10%猪油、0.5%胆酸钠、77.5%基础饲料。

2.2.2 广山楂药液的制备 10 批广山楂果(GSZG-2、3、9、10、12、14~18,广山楂 1~10)加 10 倍量水煎煮 2 h,滤过后,药渣加 8 倍量水煎煮 1.5 h,将 2 次滤液合并,浓缩至所需剂量,备用。

2.2.3 辛伐他汀药液的配制 将蒸馏水置于 50~60 °C 水浴锅预热,甲基纤维素钠粉末与蒸馏水按 5:1 水浴助溶;再将辛伐他汀白色药丸研磨成粉末状与 0.5%甲基纤维素钠助悬剂按(1 mg:1 mL)比例混合,于 37 °C 水浴加热至完全溶解,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的辛伐他汀药液。

2.2.4 活血化瘀实验 104 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 7 d,按体质量随机分为对照组、模型组、阳性药(辛伐他汀)组、不同批次广山楂(广山楂 1~10)组,每组 8 只。除对照组大鼠饲以常规饲料外,其余各组大鼠均饲以高脂饲料,每只大鼠投食量为

25 g/d。不同批次广山楂组大鼠每天 ig 给药 1 次，给药剂量为 10 g/kg，阳性药组每天 ig 给药 1 次，给药剂量为 10 mg/kg，对照组和模型组大鼠每天 ig 等量水，连续给药 5 周。末次给药后，腹主动脉采血，离心（3000 r/min）15 min，取上清液，检测血液流变学指标及血脂四项指标 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量。

2.3 谱效关系研究^[12-14]

2.3.1 偏最小二乘回归（partial least-square method regression, PLSR）分析 利用 SIMCA 14.1 软件进行 PLSR 分析，以广山楂共有峰峰面积作为自变量（ X ），分别以给药组 HDL-C、LDL-C、TC、TG 含量作为因变量（ Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 ），进行相关性分析，建立回归方程。

2.3.2 灰色关联度分析 将 10 批广山楂共有峰分别与其血脂四项指标 HDL-C、LDL-C、TC、TG 含量相关联，计算关联度。

3 结果

3.1 HPLC 指纹图谱

3.1.1 方法学考察 在重复性、精密度、稳定性考察中，以根皮苷为参照峰，样品各峰保留时间及峰面积 RSD 均小于 3.0%，说明该法重复性、精密度及稳定性良好，可用于建立广山楂的指纹图谱。

3.1.2 色谱峰指认 以 GSZG-1 为参照图谱，进行多点校正和全谱峰匹配，生成广山楂指纹图谱及对照指纹图谱（R），见图 1。根据相对保留时间（ t_R ）及特征吸收波长，确定 6 个共有峰，并从 6 个共有峰中指认 2 个主要特征指纹峰即峰 1、4，分别为绿原酸、根皮苷。以对照指纹图谱为参照，计算 18 批广山楂相似度，18 批广山楂药材相似度值为 0.200~1.000，与共有模式相似度在 0.717~0.985。

3.1.3 聚类分析 将 18 批不同产地广山楂药材的 6 个共有峰的峰面积作为变量，导入 SPSS 23.0 数据分析软件，采用系统聚类分析法，将数据进行转换分析，得到广山楂药材的聚类分析图，如图 2 所示，以欧式距离 15 聚类，将 18 批广山楂分为 3 类，第 1~15、17 批分为第 I 类，第 16 批分为第 II 类、第 18 批分为第 III 类。

3.2 活血化瘀药效学结果

3.2.1 广山楂对大鼠血液流变学指标的影响 各组大鼠的血液流变学指标结果见表 2。不同批次广山楂对大鼠血液流变学指数普遍影响较小，方差分析结果显示，与模型组比较，广山楂 3、5 组的全血

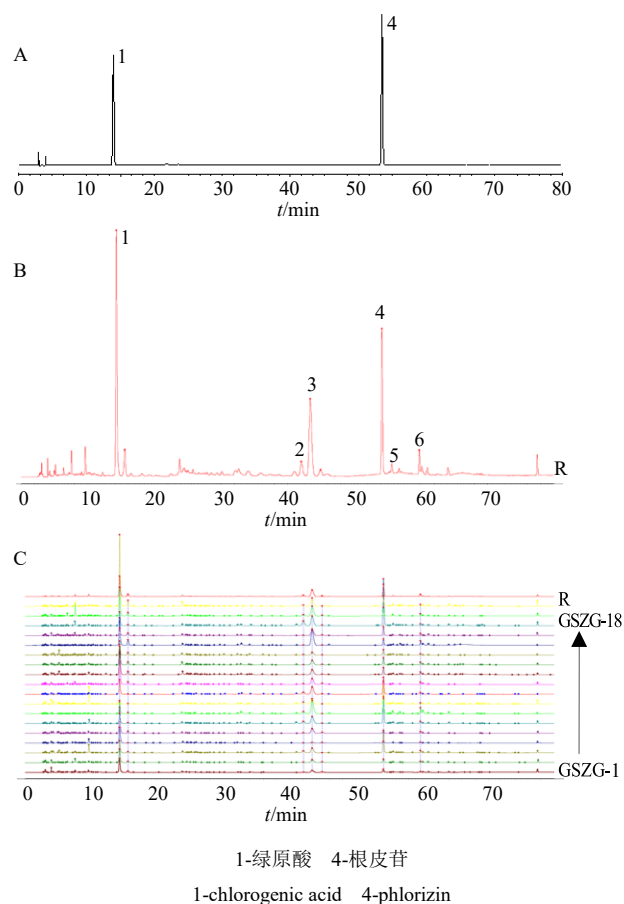


图 1 对照品 HPLC 色谱图 (A)、广山楂对照指纹图谱 (B)、18 批广山楂指纹图谱 (C)

Fig. 1 HPLC of control solution (A), reference fingerprint of *M. doumeri* (B) and fingerprint of 18 batches of *M. doumeri* (C)

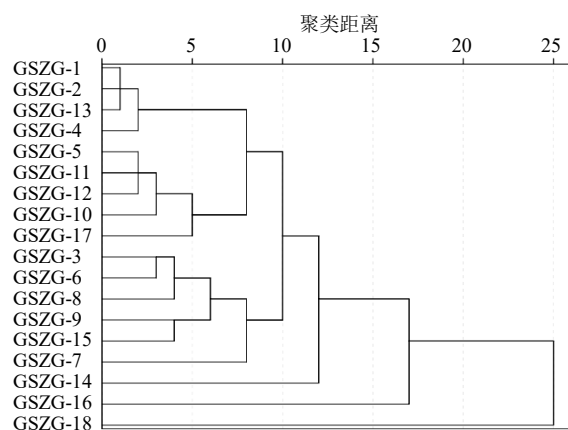


图 2 18 批样品聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis of 18 batches of samples

低切还原黏度显著降低（ $P < 0.05$ ），广山楂 7~10 组的红细胞聚集指数与红细胞聚集系数均显著降低（ $P < 0.01$ 、0.001），其中广山楂 8 组的全血黏度

表 2 广山楂对大鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Effect of *M. doumeri* on hemorheology in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	全血黏度/(mPa·s)			血浆黏度/ (mPa·s)	红细胞聚集 指数	红细胞聚集 系数	红细胞内黏 度/(mPa·s)	全血还原黏度/(mPa·s)		
	200/s	30/s	1/s					低切	中切	高切
对照	5.02±0.45***	6.99±0.63***	31.36±2.95**	1.42±0.15	6.25±0.17*	4.29±0.12*	0.57±0.06	22.36±3.45**	4.99±0.75***	3.58±0.54***
模型	4.21±0.28	5.93±0.41	27.35±2.45	1.50±0.10	6.49±0.30	4.45±0.21	0.60±0.04	18.37±2.04	3.98±0.38	2.83±0.27
阳性药	4.43±0.25	6.24±0.34	28.83±1.57	1.50±0.18	6.50±0.16	4.46±0.11	0.60±0.07	19.47±2.00	4.22±0.43	3.00±0.31
广山楂 1	4.24±0.31	5.95±0.48	27.31±2.97	1.51±0.15	6.43±0.29	4.41±0.20	0.60±0.06	18.22±2.62	3.97±0.46	2.83±0.30
广山楂 2	4.23±0.24	5.92±0.31	26.73±1.64	1.68±0.48	6.32±0.28	4.33±0.19	0.67±0.19	17.04±3.26	3.70±0.72	2.65±0.51
广山楂 3	4.01±0.29	5.58±0.44	25.03±2.67	1.55±0.15	6.25±0.40	4.29±0.27	0.62±0.06	16.24±2.23*	3.62±0.43	2.60±0.30
广山楂 4	4.10±0.46	5.71±0.47	25.75±4.24	1.46±0.06	6.43±1.90	4.41±1.30	0.59±0.02	17.60±2.86	3.90±0.27	2.80±0.29
广山楂 5	4.12±0.18	5.78±0.27	26.50±1.62	1.73±0.37	6.43±0.24	4.41±0.17	0.69±0.15	15.87±3.10*	4.89±5.08	2.47±0.49
广山楂 6	4.40±0.29	6.12±0.34	27.36±1.94	1.48±0.12	6.24±0.52	4.28±0.35	0.59±0.05	18.55±1.78	4.15±0.37	2.98±0.29
广山楂 7	4.29±0.27	5.92±0.35	25.67±1.92	1.51±0.20	5.97±0.27***	4.10±0.18***	0.61±0.08	17.16±2.03	3.97±0.52	2.88±0.39
广山楂 8	4.74±0.37**	6.45±0.49*	26.90±2.95	1.54±0.18	5.69±0.52***	3.90±0.36***	0.61±0.07	17.74±3.15	4.25±0.63	3.12±0.45
广山楂 9	4.56±0.35*	6.20±0.40	25.84±1.42	1.54±0.11	5.69±0.41***	3.90±0.28***	0.61±0.04	17.03±1.68	4.08±0.34	3.00±0.25
广山楂 10	4.49±0.42	6.16±0.51	26.37±2.10	1.58±0.24	5.90±0.53**	4.05±0.36**	0.64±0.10	16.98±2.67	3.96±0.58	2.89±0.43

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 表 3 同* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group, same as fig. 3

(200/s)、全血黏度(30/s)与广山楂 9 组的全血黏度(200/s)明显升高($P<0.05$ 、0.01)。

3.2.2 广山楂对高血脂大鼠血脂四项的影响 各组大鼠的血脂四项指标见表 3。方差分析结果显示,与模型组比较,除广山楂 1、2 组外,其余各组大鼠 HDL-C 含量均有不同程度增高($P<0.05$ 、0.01、0.001),但对大鼠 LDL-C 影响较小,仅广山楂 1、3、4、8 组大鼠 LDL-C 含量明显降低($P<0.05$ 、0.01);各批次广山楂给药组大鼠 TC 显著降

低($P<0.01$ 、0.001);除广山楂 3 组外,各给药组大鼠 TG 均显著降低($P<0.01$ 、0.001)。由此可见,不同批次广山楂均具有不同程度的活血化瘀功效。

3.3 谱效关系研究结果^[14-16]

3.3.1 PLSR 方程 因变量 Y_1 为 HDL-C 含量,建立方程为 $Y_1 = -0.091 0 X_1 + 0.152 4 X_2 + 0.478 4 X_3 + 0.075 1 X_4 + 0.198 9 X_5 + 0.212 5 X_6$, 其中 2~6 号色谱峰回归系数为正,即与 HDL-C 含量呈正相关,1 号峰则呈负相关。因变量 Y_2 为 LDL-C 含量,建立

表 3 广山楂对大鼠血脂四项指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Effect of *M. doumeri* on four indexes of blood lipid in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	HDL-C/(mmol·mL ⁻¹)	LDL-C/(mmol·mL ⁻¹)	TC/(mmol·mL ⁻¹)	TG/(mmol·mL ⁻¹)
对照	0.58±0.07	0.20±0.11***	1.45±0.10***	0.41±0.05***
模型	0.52±0.05	0.44±0.10	2.23±0.36	1.14±0.08
阳性药	0.69±0.12	0.39±0.13**	1.07±0.13***	0.68±0.10***
广山楂 1	0.53±0.11	0.27±0.11**	1.15±0.25***	0.85±0.23**
广山楂 2	0.50±0.11	0.37±0.12	1.50±0.31**	0.87±0.11***
广山楂 3	0.67±0.12**	0.31±0.07*	1.36±0.28***	1.11±0.27
广山楂 4	0.65±0.03***	0.31±0.06**	1.54±0.25***	0.77±0.15***
广山楂 5	0.61±0.03***	0.42±0.17	1.22±0.04***	0.82±0.11***
广山楂 6	0.84±0.09***	0.35±0.18	1.17±0.15***	0.71±0.13***
广山楂 7	0.78±0.08***	0.48±0.51	1.29±0.14***	0.92±0.13***
广山楂 8	0.96±0.14***	0.28±0.14*	1.18±0.23***	0.92±0.18***
广山楂 9	0.98±0.29***	0.37±0.08	1.30±0.19***	0.66±0.20**
广山楂 10	0.61±0.12*	0.40±0.09	1.47±0.25***	0.78±0.12***

方程为 $Y_2=0.1377X_1-0.5219X_2-0.0914X_3-0.1116X_4+0.5460X_5+0.1498X_6$, 其中 1、5、6 号色谱峰回归系数为正, 即与 LDL-C 呈正相关, 其余各峰则呈负相关。因变量 Y_3 为 TC 含量, 建立方程为 $Y_3=0.2410X_1-0.0465X_2-0.2025X_3-0.0560X_4+0.0224X_5-0.1841X_6$, 其中 1、5 号色谱峰回归系数为正, 即与 TC 含量呈正相关, 其余各峰则呈负相关。因变量 Y_4 为 TG 含量, 建立方程为 $Y_4=-0.1181X_1-1.7615X_2+0.6253X_3+2.3300X_4-0.8479X_5-1.1004X_6$, 其中 3、4 号色谱峰回归系数为正, 即与 TG 含量呈正相关, 其余各峰则呈负相关。

3.3.2 灰色关联度 采用均值法将 10 批广山植的血脂四项数据与其共有峰峰面积数据进行归一化处理^[15-16]。将归一化后的血脂四项指标设置为母序列 Y_k , 6 个共有峰归一化后峰面积设置为子序列为 X_i (i 表示共有峰编号 1、2、3、4、5、6), 然后计算母序列与子序列的灰色关联系数 $[A_{ik}, A_{ik}=(\Delta i_{kmin}+\rho \times \Delta i_{kmax})/(\Delta i_{kmax}+\rho \times \Delta i_{kmax})]$, 其中 $\Delta i_k=|Y_k-X_i|$, 分辨系数 ρ 为 0.5, A_{ik} 取平均值即关联度。当关联度大于 0.8, 则表示母序列与子序列关联度较大; 当关联度介于 0.6~0.8, 则表示二者关联度一般; 当关联度小于 0.6, 则表示二者关联度较小^[17]。由表 4 可见, 与广山植血脂四项指标贡献作用关联度较大的色谱峰为 3、5、6 号色谱峰, 说明其与广山植活血化瘀作用关联性较大。与 PLSR 分析结果结合分析, 可综合得出 5、6 号峰是与广山植活血化瘀作用关联度较大的正相关色谱峰, 即主要具有活血化瘀作用, 该色谱峰所对应的物质成分还需进一步的探索研究。

4 讨论

4.1 指纹图谱

本研究建立了广山植药材的指纹图谱, 根据《中

药指纹图谱—质量评价、质量控制与新药研发》和《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南》, 对流动相 (甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水) 进行考察, 发现乙腈-0.1%磷酸水洗脱能力较好, 色谱分离较好; 采用紫外-可见分光光度计在 200~400 nm 波长下对广山植药材样品进行扫描, 285 nm 波长下出峰数量较多; 对柱温进行了考察, 发现柱温在 20~23 °C 时分离度良好, 温度越高则分离度越差; 对体积流量、不同酸浓度等耐用性进行了考察, 体积流量在 0.8~1.2 mL/min, 酸浓度在 0.8%~1.2% 对色谱峰无明显影响。实验对提取方法及溶剂进行了考察, 发现不同醇浓度色谱峰数量无差异, 但醇浓度较低时提取不完全, 导致色谱峰偏低, 峰面积具有差异, 最终将广山植提取工艺定为 70% 甲醇超声提取。

4.2 药效研究

广山植原植物多为山间野生, 以广西靖西市多见, 且山间生长环境复杂, 导致不同产地药材具有差异性, 所以实验最终选择广西山间多地采集的药材 (GSZG-2、3、9、10、12、14~18 批) 进行药效学研究, 发现不同批次药材对大鼠不同指标效果均有差异, 与模型组相比, GSZG-15~18 批广山植对红细胞聚集指数及红细胞聚集系数具有显著性差异, 10 批药材均可以降低大鼠 TC 含量, 其中 9 批可以降低 TG 含量, 8 批可以升高 HDL-C 含量。通过不同批次广山植给药组血脂四项及血液流变学指标可以看出, 广山植对高血脂大鼠的血脂四项指标影响较为明显, 但对血液流变学指标影响较小。不同批次广山植对大鼠 LDL-C 影响较小, 其中广西德保县孟达镇 (GSZG-16) 广山植对大鼠血脂四项及血液流变学影响较大, 由此可以看出不同产地广山植有一定的药效差异。

4.3 谱效关系研究

主成分分析、典型相关分析、多元线性回归分析、灰色关联度分析、逐步回归分析、聚类分析、PLSR 分析等为建立中药谱-效关系常用的统计学方法^[18], 本研究采用的 PLSR 分析为较通用的方法。灰关联分析是灰色系统理论的一种新的分析方法, 是根据因素之间发展趋势的相似或相异程度, 亦即“灰色关联度”, 作为衡量因素间关联程度的一种方法^[18]。本研究采用 PLSR 和灰色关联度分析相结合的方法, 成功建立了广山植 HPLC 特征图谱与其抗高血脂的谱效关系, 可以清晰地看出特征图谱中代

表 4 广山植指纹图谱特征成分与药效指标灰色关联度
Table 4 Grey relational degree between characteristic components and pharmacodynamic indexes of *M. doumeri*

共有峰	A_{HDL-C}	A_{LDL-C}	A_{TC}	A_{TG}
1	0.782 0	0.793 1	0.796 8	0.738 8
2	0.683 8	0.709 6	0.731 3	0.724 5
3	0.886 9	0.820 2	0.825 7	0.796 6
4	0.705 2	0.715 5	0.745 2	0.751 8
5	0.852 0	0.869 1	0.862 4	0.843 4
6	0.840 1	0.885 0	0.868 1	0.832 6

表化学成分与广山楂“活血化瘀”药效的相关性,从而推测药效物质基础,综合得出 5、6 号峰是与活血化瘀作用关联性较大的色谱峰,即主要具有活血化瘀作用,其所代表的化学成分需要进一步探究。广山楂含有多种化学成分,其中 1 (绿原酸)、2、3、4 (根皮苷) 号色谱峰与其活血化瘀疗效同样具有相关性。广山楂活血化瘀作用并非仅由个别成分决定,而是多种成分的综合体现,其他成分的作用尚有待于进一步探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邓家刚, 韦松基. 广西道地药材 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 24-31.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第三十六卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1974: 399.
- [3] 曾勇豪, 唐初明, 周云涛. 广西风味小野果涩梨的特点及开发利用价值研究 [J]. 林业勘查设计, 2014(2): 85-88.
- [4] 尚本清, 王融初, 罗军武, 等. 林檎叶的综合利用研究 II. 叶片浸出物的抑菌效应 [J]. 湖南农学院学报, 1994(3): 240-243.
- [5] 林叶新, 李忠海. 林檎叶水提物及其不同极性组分的抑菌和清除自由基作用的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1264-1269.
- [6] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准 (第 2 卷) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011: 17-18.
- [7] 潘莹, 张林丽. 大果山楂的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 2972-2973.
- [8] 李开祥, 邓绍林, 廖健明, 等. 靖西大果山楂生产及加工现状的调查研究 [J]. 广西林业科学, 2003, 32(4): 214-216.
- [9] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- [10] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992: 21-22.
- [11] 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.
- [12] 阮沛桦, 邓红, 傅咏梅, 等. 基于灰色关联度的叠鞘石斛叶抗氧化部位的筛选 [J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1700-1707.
- [13] 冯月, 段飞鹏, 李一圣, 等. 不同产地金钗石斛醇提物 HPLC 指纹图谱的建立及其抗炎作用的谱效关系研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(15): 1825-1830.
- [14] 代孟孟, 张茜, 能纪娟, 等. 基于谱效关系探讨莱菔子促进肠运动活性成分 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(6): 806-815.
- [15] 张天泽, 郭威, 赵怀龙, 等. 基于谱效关系的金莲花抗肠道病毒 71 型物质基础研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(3): 386-392.
- [16] 陈艺粼, 晁利芹, 苏秀红, 等. 短梗菝葜乙酸乙酯部位抗肿瘤活性谱效关系 [J]. 中成药, 2021, 43(12): 3518-3523.
- [17] 陈峰. 医用多元统计分析方法 [M]. 第 2 版. 北京: 中国统计出版社, 2006: 36, 46, 60.
- [18] 帖晓燕, 戴海蓉, 辛国雄, 等. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1303-1311.

[责任编辑 潘明佳]