

牛蒡子-甘草药对指纹图谱的建立及其抗炎活性谱效关系研究

邢耀莹^{1,2,3}, 王姿杨^{1,2,3}, 王露^{1,2,3}, 杨苗苗^{1,2,3}, 庞哲^{1,2,3}, 赵宁^{1,2,3}, 崔治家^{1,2,4*}, 邵晶^{1,2,3,4,5,6*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000
2. 西北中藏药省部共建协同创新中心, 甘肃 兰州 730000
3. 国家中医药管理局三级实验室(中药化学重点实验室), 甘肃 兰州 730000
4. 甘肃省中医药研究中心, 甘肃 兰州 730000
5. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 甘肃 兰州 730000
6. 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 建立牛蒡子-甘草药对的 HPLC 指纹图谱, 研究探讨牛蒡子-甘草药对抗炎活性的谱效关系。方法 采用 HPLC 法建立牛蒡子-甘草药对的指纹图谱, 结合聚类分析与主成分分析(principal component analysis, PCA)对收集到的 18 批牛蒡子-甘草药对进行质量评价; 以脂多糖刺激 RAW264.7 细胞制备炎性细胞模型, 以一氧化氮分泌量为指标考察 18 批牛蒡子-甘草药对的抗炎活性, 采用灰色关联度分析(gray correlation analysis, GCA)和偏最小二乘法回归(partial least squares regression, PLSR)分析 HPLC 共有峰与炎症指标间的谱效相关性。**结果** 指纹图谱研究共标定 38 个共有峰, 经混合对照品指认出 13 个成分, 聚类分析与 PCA 结果一致, 综合评价结果显示, 样品 S7 质量最佳。GCA 结果显示, 牛蒡子-甘草药对 HPLC 指纹图谱各共有峰抗炎活性关联度为 F5(甘草苷)>F17(甘草酸)>F1>F3>F4>F9>F11(异甘草苷)>F13(牛蒡子苷)>F19>F23>F21(牛蒡苷元)>F14; 通过 PLSR 分析发现, 牛蒡子-甘草药对 38 个共有峰中 17 个特征峰(VIP>1)与其抗炎作用显著相关, 且 F21(VIP>1.5)贡献较大。**结论** 建立的牛蒡子-甘草药对 HPLC 指纹图谱可用于其质量评价, 谱效相关性研究初步筛选出的 17 个成分可作为其抗炎作用有效成分群, 为牛蒡子-甘草药对抗炎活性物质基础与作用机制的阐释提供研究基础和科学依据。

关键词: 牛蒡子-甘草药对; 指纹图谱; 抗炎作用; 谱效关系; 灰色关联度; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法回归分析; 质量评价; 甘草苷; 甘草酸; 异甘草苷; 牛蒡子苷; 牛蒡苷元

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1237-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.017

Establishment of fingerprint profiles of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair and study of their anti-inflammatory activity spectrum-effect relationship

XING Yaoying^{1,2,3}, WANG Ziyang^{1,2,3}, WANG Lu^{1,2,3}, YANG Miaomiao^{1,2,3}, PANG Zhe^{1,2,3}, ZHAO Ning^{1,2,3}, CUI Zhijia^{1,2,4}, SHAO Jing^{1,2,3,4,5,6}

1. School of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China
2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, Lanzhou 730000, China
3. Traditional Chinese Chemistry Laboratory, Third Level Research Laboratory of State Administration of Traditional Chinese

收稿日期: 2023-07-11

基金项目: 甘肃省中医药研究中心开放课题(zyzx-2023-18); 2022年甘肃省高等学校青年博士基金项目(2022QB-090); 甘肃省教育厅双一流重大科研项目(GSSYLXM-05); 中医药公共卫生服务补助专项课题(2305191901)

作者简介: 邢耀莹, 女, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础及质量控制研究。Tel: 17339856406 E-mail: xyy08060115@163.com

*通信作者: 邵晶, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基及质量控制与产品开发研究。

Tel: 13893437656 E-mail: cn221@163.com

崔治家, 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事药用植物多样性及中药资源开发利用研究。

Tel: 13893480666 E-mail: zhijiacui@126.com

Medicine, Lanzhou 730000, China

4. Research Center of Traditional Chinese Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

5. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

6. Research Center of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology and Engineering of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of Niubangzi (*Arctii Fructus*, AF)-Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, GRR) and to investigate the spectrum-effect relationship of the anti-inflammatory activity of AF-GRR. **Methods** To establish the fingerprint of AF-GRR and evaluate the quality of AF-GRR from different manufacturers by combining cluster analysis and principal component analysis (PCA); To prepare an inflammatory cell model using lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells, and to investigate the anti-inflammatory activity of AF-GRR from different manufacturers by using NO secretion as an index, and to apply gray correlation analysis (GCA) and partial least squares regression (PLSR) analysis. The spectroscopic correlations between the HPLC peaks and the inflammatory indexes were analyzed by GCA and PLSR analysis. **Results** A total of 38 shared peaks were identified in the fingerprint profile, and 13 components were recognized by the mixed control finger. The clustering analysis was consistent with the results of PCA, and the comprehensive evaluation results showed that sample S7 had the best quality. The results of GCA showed that the correlation degree of anti-inflammatory activity of each shared peak of AF-GRR fingerprint was F5 (liquiritin) > F17 (glycyrrhizic acid) > F1 > F3 > F4 > F9 > F11 (isoliquiritin) > F13 (arctigenin) > F19 > F23 > F21 (arctiin) > F14; By PLSR analysis, it was found that AF-GRR fingerprint had 38 shared peaks. Among the 38 peaks, 17 peaks (VIP > 1) were significantly correlated with their anti-inflammatory effects and F21 (VIP > 1.5) contributed more. **Conclusion** The HPLC fingerprints of AF-GRR established in this study can be used for their quality evaluation, and the 17 components initially screened in the spectroscopic correlation study can be regarded as the effective components of their anti-inflammatory effects. This study can provide a research basis and scientific basis for the elucidation of the material basis and mechanism of action of the anti-inflammatory activity of AF-GRR.

Key words: *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair; fingerprinting; anti-inflammatory effect; spectrum-effect relationship; gray correlation; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares regression analysis; quality evaluation; liquiritin; glycyrrhizic acid; isoliquiritin; arctiin; arctigenin

药对是中药配伍组方的基本单位之一，通过组方的配伍分解，从阐释药对的药效物质基础和作用机制入手，是能有效、全面地阐释中药复方的重要途径之一^[1]。牛蒡子、甘草 2 药作为基本药对配伍历史悠久，独立成方使用最早见《太平圣惠方》中记载：“牛蒡子散，牛蒡子 1 两（微炒）、甘草 1 分（炙微赤，锉），治口疮久不愈”^[2]。后经《证类治裁》《奇效良方》《本草纲目》等多部中医药典籍进行转载后形成了应用主治各异的新处方，如明代《痘治理辨》中记载“牛蒡子甘草散，牛蒡子（麸炒）1 两、甘草（炙）1 钱，麻痘初作，服此则稀”^[3]；清代《杂病源流犀烛》中记载“甘草鼠粘汤，甘草 1 两、鼠粘根 2 两，主治肺热，咽喉痛”等^[4-5]。现今常用的中药复方如银翘散、五福化毒丸、羚羊感冒片等中也多含有牛蒡子-甘草药对，证明了牛蒡子-甘草药对配伍使用的广泛性和临床有效性^[6-7]。其中牛蒡子辛苦而寒，具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽之功^[8]，甘草甘平，能够清热解毒、润肺止咳、缓急止痛等^[9]，2 药相伍，清补合法。现代研究表明牛蒡子、甘草均具有抗炎、抗病毒、免疫调节等作用，与牛蒡

子含有的木脂素类（牛蒡苷、牛蒡苷元）、绿原酸类（绿原酸 A、B、C）等成分以及甘草含有黄酮类（甘草素、异甘草素、甘草查耳酮 A）和三萜皂苷类（甘草酸、甘草次酸）等成分密切相关^[10-11]。

炎症反应是机体对外界物理、化学或生物刺激及感染、内源组织损伤等做出的防御性免疫反应，广泛发生于机体的细胞、组织和器官等^[12]。依据其发生程度和持续时间的不同分为急性炎症和慢性炎症，急性炎症持续时间较短，如局部组织损伤所致的发热、红肿、疼痛等。慢性炎症持续时间较长，炎症因子的长期异常分泌会导致关节炎、糖尿病、自身免疫性疾病以及肿瘤等多种炎症性疾病的发生^[13]。当机体处于过度炎症的环境下，巨噬细胞通过释放大量炎症因子来调控炎症反应，如一氧化氮（nitric oxide, NO）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）、白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）等^[14]。脂多糖为革兰阴性菌细胞壁的主要成分，能够刺激巨噬细胞释放炎症因子，常作为构建 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型的常用试剂，且该模型作为筛选抗炎药物的经典模型被广泛应用^[15]。目

前有关牛蒡子、甘草的报道主要聚焦于各单味药材的研究，而对于2药配伍使用的药效物质基础及作用机制研究较少，探讨其抗炎活性具有实际意义。

如何全面地反映牛蒡子-甘草药对抗炎活性成分的关键在于探索牛蒡子-甘草药对的抗炎作用物质基础。中药谱效学以中药指纹图谱为研究基础，与药效评价相结合，并应用生物信息学方法建立谱-效相关性分析，可为揭示中药药效物质提供科学依据^[6]。本研究基于牛蒡子、甘草药对临床应用的历史有效性和广泛性，以收集到的18批样品研究建立牛蒡子-甘草药对 HPLC 指纹图谱，以脂多糖刺激 RAW264.7 细胞制备炎性细胞，分析 HPLC 共有峰与炎性指标间的谱效相关性，以期为牛蒡子-甘草药对抗炎的有效成分群的阐释及药理学机制研究提供科学基础，为进一步开发利用该药对提取物的质量评价提供参考，也为含有该药对的中药复方药效物质基础及作用机制的全面阐释提供研究基础和思路方向。

1 材料

1.1 细胞

RAW264.7 细胞株 (批号 JF4RFYWU3S) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药材

炒牛蒡子、甘草药材购自不同生产厂家，以同一厂家药材为原则进行配对，经甘肃中医药大学崔治家教授分别鉴定为菊科牛蒡属植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实和豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。具体信息见表 1。

1.3 试剂

甲醇 (批号 20220103)、乙腈 (批号 20221005)、甲酸 (批号 20280825) 为色谱纯，均购自天津市大

茂化学试剂厂；95%乙醇 (批号 20190301) 为分析纯，购自天津市富宇精细化工有限公司；对照品异甘草苷 (批号 Y15A10H95344)、异绿原酸 B (批号 AF20060701)、甘草素 (批号 C26A10Q87040)、异绿原酸 A (批号 AF20020302)、甘草查耳酮 A (批号 A19GB145817)、牛蒡苷元 (批号 Y26D6Y17483)、甘草酸 (批号 Y02J11L113432)、甘草苷 (批号 Z07J12X136344)、牛蒡子苷 (批号 Z11D6B7394)、异甘草素 (批号 H03D9Z76567)、绿原酸 (批号 B20782)、异绿原酸 C (批号 AF20121801)、甘草次酸 (批号 B31O9D73752) 均购自上海源叶生物科技有限公司，质量分数均 ≥ 98%；脂多糖 (批号 820F036)、MTT (批号 917Q054)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 1121E0324)、PBS 缓冲液 (批号 P1020) 购自北京索莱宝科技有限公司；RAW264.7 细胞专用培养基 (批号 WHAA23E072) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.4 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)；BS110S 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)；SB-5200DTD 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)；AP-01P 型真空泵 (天津奥特塞恩斯仪器有限公司)；800Y 型高速多功能粉碎机 (永康市铂欧五金制品有限公司)；OHG-9070B 型智能电热恒温鼓风干燥箱 (上海琅实设备有限公司)；Benchmark plus 型酶标仪 (上海新振仪器设备有限公司)；CKX41+DP21 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)；CPY-180 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；IC1000 型 Countstar 自动细胞计数仪 (上海睿钰生物科技有限公司)。

表 1 牛蒡子-甘草样品信息

Table 1 Information of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* samples

样品 序号	购买地	牛蒡子		甘草		样品 序号	购买地	牛蒡子		甘草	
		产地	批号	产地	批号			产地	批号	产地	批号
S1	兰州安泰堂中药饮片有限公司	甘肃	22062701	甘肃	22053001	S10	洪雅县瓦屋山药业有限公司	四川	211201	甘肃	220202
S2	惠仁堂	甘肃	200502	甘肃	20220601	S11	酒泉市中医院	辽宁	2206001	甘肃	210332
S3	甘肃中医药大学附属医院	甘肃	JZ2106003	甘肃	20210703	S12	安徽惠丰国药有限公司	陕西	230101	内蒙古	23020101
S4	四川新荷花中药饮片股份有限公司	四川	2207011	内蒙古	2204045	S13	康美药业股份有限公司	东北	211003471	内蒙古	220602261
S5	甘肃陇原峰药业有限公司	甘肃	21081401	甘肃	21022501	S14	陇西保和堂	甘肃	20210321	甘肃	20220414
S6	甘肃康乐药业有限责任公司	甘肃	211104	甘肃	220314	S15	定西市中医院	甘肃	JZ2106104	甘肃	20210817
S7	陕西渭南	陕西	A221112	新疆	A221211	S16	康乐药业	甘肃	191024	甘肃	220823
S8	兰州大学第二附属医院	甘肃	220501A	甘肃	20191007	S17	甘肃省人民医院	甘肃	191101	甘肃	220701A
S9	甘肃省中医院	甘肃	221204	甘肃	20220201	S18	方回春堂中医馆	东北	191127	新疆	201002

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称定绿原酸、甘草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、异甘草苷、牛蒡子苷、甘草素、甘草酸、异甘草素、牛蒡苷元、甘草查耳酮 A、甘草次酸对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 40、48、36、48、44、40、44、48、44、40、40、44、40 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定炒牛蒡子、甘草饮片粉末（过 3 号筛）各 2 g，于具塞锥形瓶中，移液管量取 80 mL 95%乙醇加入，称定质量，45 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min（40 kHz、250 W），补足减失的质量后抽滤，取续滤液 5 mL，水浴挥干溶剂，经同体积甲醇复溶后即得供试品溶液；余量滤液挥干溶剂，干浸膏留存。

2.1.3 色谱条件^[17] 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ）；检测波长 254 nm；体积流量 0.5 mL/min；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 10 μL ；流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~5 min，20%乙腈；5~15 min，20%~25%乙腈；15~20 min，25%~27%乙腈；20~25 min，27%~29%乙腈；25~35 min，29%~31%乙腈；35~40 min，31%~33%乙腈；40~45 min，33%~50%乙腈；45~50 min，50%~52%乙腈；50~70 min，52%~54%乙腈；70~75 min，54%~55%乙腈；75~80 min，55%~57%乙腈；80~95 min，57%~80%乙腈；95~105 min，80%~90%乙腈；105~110 min，90%乙腈。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液，按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次，以响应值较大且分离度较好的第 7 个峰为参照峰，计算得 13 种对照品相对峰面积的 RSD 均小于 3%，结果显示所用仪器的精密度较好。

2.2.2 重复性试验 取同一牛蒡子-甘草药对（S1），按“2.1.2”项下方法制备 6 个平行供试品溶液，依据“2.1.3”项下色谱条件进样测定，以响应值较大且分离度较好的第 7 个峰为参照峰，计算得 13 种成分相对峰面积的 RSD 均小于 3%，说明所选用的色谱方法具有较好的重复性。

2.2.3 稳定性试验 取同一牛蒡子-甘草药对（S1）供试品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1.3”项下方法进样测定，以响应值较大且分离度较好的第 7 个峰为参照峰，计算得 13 种成分相对峰面积的 RSD 均小于 3%，表明所制备的供试品溶液在 24 h 内质量稳定。

2.3 指纹图谱的建立及相似度评价

2.3.1 指纹图谱的生成 取 18 批牛蒡子-甘草药对样品（S1~S18），按“2.1.2”项下方法依次制备供试品溶液，按“2.1.3”项下色谱条件进样测定。测定结果导出为 TXT 格式，依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 年版）软件，得到 18 批样品（S1~S18）的叠加图谱。采用中位数法，时间宽度为 0.2 min，以 S1 作为参照图谱，经多点校正后采用 mark 峰匹配，共确定 38 个共有峰，生成对照图谱，见图 1。

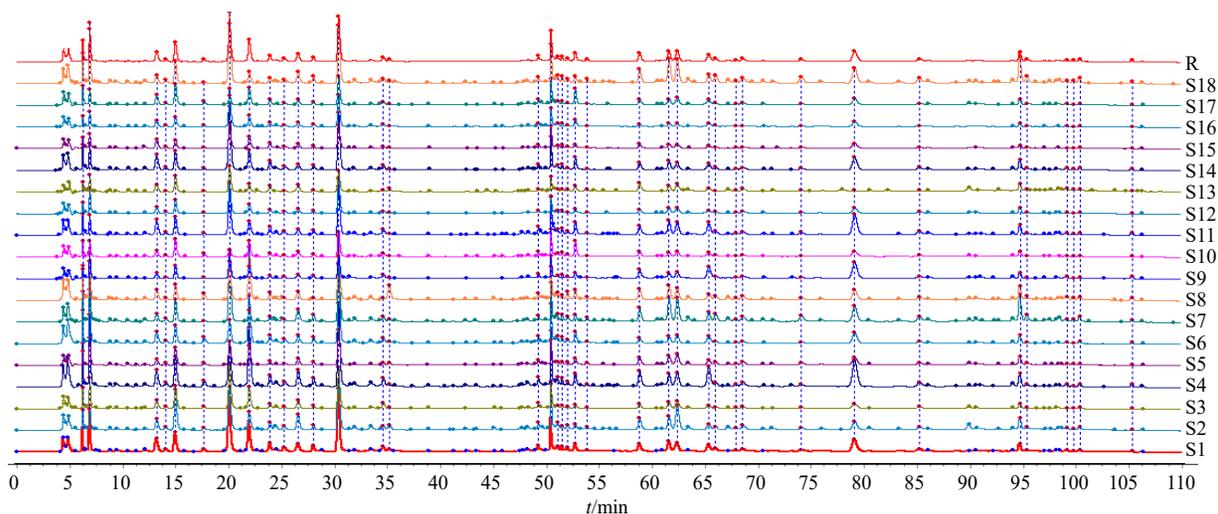


图 1 18 批牛蒡子-甘草药对样品（S1~S18）的指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱（R）

Fig. 1 Fingerprint overlay of 18 batches of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair samples (S1—S18) and their control fingerprints (R)

2.3.2 相似度评价 选择分离度好、含量较高的 38 个色谱峰作为牛蒡子-甘草药对的指纹图谱共有特征峰，以对照指纹图谱为参照，对 18 批牛蒡子-甘草药对指纹图谱的相似度评价见表 2，从表中可以看出，牛蒡子-甘草药对的指纹图谱相似度均>0.7，表明所建立的指纹图谱方法可用于牛蒡子-甘草药对的整体质量控制。

2.4 共有峰的指认与分析

2.4.1 共有峰的指认 取“2.1.1”项下的混合对照

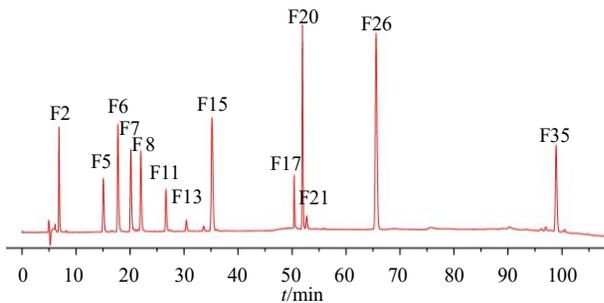
品溶液，按“2.1.3”项下色谱条件进样测定，得混合对照品溶液色谱图（图 2）。通过与供试品溶液出峰的保留时间比对，可指认牛蒡子-甘草药对共有峰 F2、F5~F8、F11、F13、F15、F17、F20、F21、F26、F35 分别为绿原酸、甘草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、异甘草苷、牛蒡子苷、甘草素、甘草酸、异甘草素、牛蒡苷元、甘草查耳酮 A、甘草次酸。

2.4.2 聚类分析 聚类分析能够从整体角度分析并

表 2 18 批牛蒡子-甘草药对共有模式相似度

Table 2 Similarity of common pattern between 18 batches of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair

样品	相似度																		R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	
S1	1.000	0.913	0.980	0.946	0.950	0.927	0.844	0.945	0.868	0.823	0.945	0.969	0.883	0.985	0.970	0.965	0.937	0.937	0.985
S2	0.913	1.000	0.939	0.886	0.951	0.850	0.882	0.880	0.826	0.867	0.912	0.911	0.922	0.905	0.913	0.874	0.922	0.922	0.950
S3	0.980	0.939	1.000	0.914	0.941	0.898	0.841	0.922	0.830	0.826	0.915	0.958	0.907	0.969	0.954	0.954	0.922	0.921	0.971
S4	0.946	0.886	0.914	1.000	0.954	0.976	0.907	0.957	0.913	0.898	0.926	0.904	0.818	0.910	0.930	0.873	0.877	0.877	0.967
S5	0.950	0.951	0.941	0.954	1.000	0.929	0.933	0.941	0.896	0.918	0.927	0.951	0.907	0.917	0.952	0.906	0.928	0.928	0.982
S6	0.927	0.850	0.898	0.976	0.929	1.000	0.904	0.966	0.826	0.898	0.864	0.886	0.790	0.878	0.911	0.852	0.826	0.825	0.939
S7	0.844	0.882	0.841	0.907	0.933	0.904	1.000	0.869	0.844	0.984	0.850	0.868	0.842	0.814	0.891	0.814	0.783	0.783	0.904
S8	0.945	0.880	0.922	0.957	0.941	0.966	0.869	1.000	0.824	0.857	0.879	0.900	0.846	0.903	0.915	0.876	0.878	0.878	0.955
S9	0.868	0.826	0.830	0.913	0.896	0.826	0.844	0.824	1.000	0.846	0.928	0.876	0.792	0.857	0.869	0.850	0.855	0.855	0.907
S10	0.823	0.867	0.826	0.898	0.918	0.898	0.984	0.857	0.846	1.000	0.832	0.850	0.821	0.793	0.873	0.804	0.766	0.765	0.889
S11	0.945	0.912	0.915	0.926	0.927	0.864	0.850	0.879	0.928	0.832	1.000	0.921	0.850	0.955	0.931	0.911	0.936	0.936	0.963
S12	0.969	0.911	0.958	0.904	0.951	0.886	0.868	0.900	0.876	0.850	0.921	1.000	0.924	0.958	0.959	0.974	0.933	0.933	0.971
S13	0.883	0.922	0.907	0.818	0.907	0.790	0.842	0.846	0.792	0.821	0.850	0.924	1.000	0.887	0.895	0.898	0.893	0.893	0.913
S14	0.985	0.905	0.969	0.910	0.917	0.878	0.814	0.903	0.857	0.793	0.955	0.958	0.887	1.000	0.960	0.974	0.938	0.938	0.970
S15	0.970	0.913	0.954	0.930	0.952	0.911	0.891	0.915	0.869	0.873	0.931	0.959	0.895	0.960	1.000	0.960	0.900	0.900	0.971
S16	0.965	0.874	0.954	0.873	0.906	0.852	0.814	0.876	0.850	0.804	0.911	0.974	0.898	0.974	0.960	1.000	0.899	0.899	0.947
S17	0.937	0.922	0.922	0.877	0.928	0.826	0.783	0.878	0.855	0.766	0.936	0.933	0.893	0.938	0.900	0.899	1.000	1.000	0.953
S18	0.937	0.922	0.921	0.877	0.928	0.825	0.783	0.878	0.855	0.765	0.936	0.933	0.893	0.938	0.900	0.899	1.000	1.000	0.953
R	0.985	0.950	0.971	0.967	0.982	0.939	0.904	0.955	0.907	0.889	0.963	0.971	0.913	0.970	0.971	0.947	0.953	0.953	1.000



F2-绿原酸; F5-甘草苷; F6-异绿原酸 B; F7-异绿原酸 A; F8-异绿原酸 C; F11-异甘草苷; F13-牛蒡子苷; F15-甘草素; F17-甘草酸; F20-异甘草素; F21-牛蒡苷元; F26-甘草查耳酮 A; F35-甘草次酸。

F2-chlorogenic acid; F5-liquiritin; F6-isochlorogenic acid B; F7-isochlorogenic acid A; F8-isochlorogenic acid C; F11-isoliquiritin; F13-arctiin; F15-liquiritigenin; F17-glycyrrhizic acid; F20-isoliquiritigenin; F21-arctigenin; F26-licochalcone A; F35-glycyrrhetic acid.

图 2 混合对照品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of mixed control

比较不同样品间的相似性，排除相关性较差变量的影响^[18]。对 18 批牛蒡子-甘草药对的数据采用聚类分析法^[19]进行分析以探索其差异性。使用 SPSS 26.0 软件，以 18 批牛蒡子-甘草药对指纹图谱的 38 个共有峰的峰面积作为变量，选择平方欧式距离为测度，采用组间均联法进行系统聚类，对其进行聚类分析。结果显示，当平方欧式距离为 10 时，18 批样品可以被分为 3 类，S7、S18、S1、S14、S11、S2、S6、S8 为第 1 类，S10、S17、S12、S16、S13、S15、S5、S9、S3 为第 2 类，S4 为第 3 类，聚类分析树状图见图 3。

2.4.3 主成分分析 (principal component analysis, PCA) PCA 能将多个指标转化为少数几个主成分，这些主成分是原始变量的线性组合，且彼此之间互不相关，可以直观显示出不同样品之间的整体差异性，进一步寻找不同批牛蒡子-甘草药对质量的

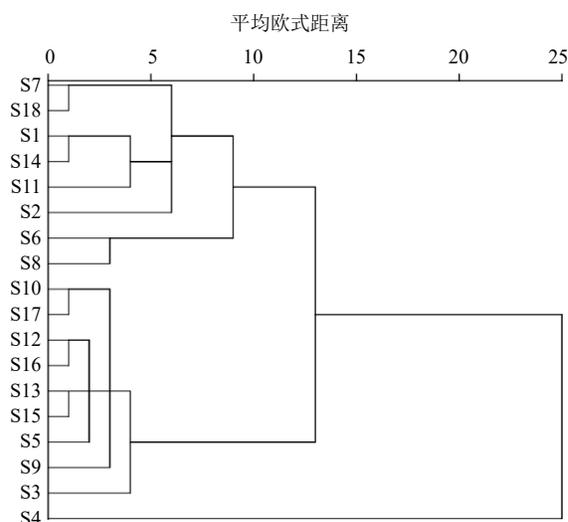


图3 聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis tree diagram

差异性变量^[20]。将 18 批牛蒡子-甘草药对指纹图谱的 38 个共有峰的峰面积作为变量,结合 SIMCA 14.1 与 SPSS 26.0 软件对其进行 PCA,以特征值>1,自动得到 5 个主成分,累积方差贡献率为 92.272%,相关信息见表 3,结合总方差解释结果,观察碎石图(图 4),当折线由陡峭突然变得平稳时,陡峭到平稳对应的因子个数即为参考提取因子个数。结果表明,5 个主成分能够充分体现 38 个共有峰的基本特征值和主要信息,可以作为牛蒡子-甘草药对质量的差异性变量反映其整体质量,具有进一步研究的意义。

表 3 主成分特征值和方差贡献率

Table 3 Eigenvalues and variance contribution rates of principal component

主成分	初始特征值	方差百分比/%	累积方差贡献率/%
1	60.979	60.979	36.387
2	16.169	16.169	56.525
3	7.488	7.488	71.945
4	4.581	4.581	84.005
5	3.055	3.055	92.272

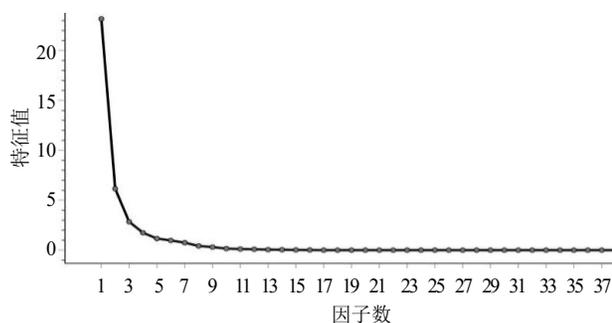


图 4 公因子碎石图

Fig. 4 Common factor lithotripsy diagram

主成分载荷矩阵反映了各变量对主成分的贡献大小和作用方向^[21]。依据表 4 可以看出 38 个共有峰中 F2~F4、F7、F22~F25、F27~F30、F32~F34、F36、F37 位于第 1 个主成分上有较高的载荷, F3、F4、F7~F10、F12、F13、F14、F16、F17~F19、F33 位于第 2 个主成分上有较高的载荷, F12、F14、F19、F21、F22、F26、F31、F38 位于第 3 个主成分上有较高的载荷, F1、F6、F8、F15、F20、F35 位

表 4 主成分矩阵

Table 4 Principal component matrix

共有峰	载荷					共有峰	载荷					共有峰	载荷				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
F1	0.493	0.423	0.352	0.570	0.087	F14	0.165	0.556	0.705	-0.105	0.203	F27	0.914	0.212	0.290	0.048	0.059
F2	0.551	0.417	0.428	0.365	0.011	F15	0.281	-0.057	-0.253	0.883	0.032	F28	0.843	0.317	0.352	0.078	0.218
F3	0.050	0.838	0.296	0.230	0.071	F16	0.428	0.533	0.543	0.230	0.392	F29	0.779	0.162	0.253	0.241	0.455
F4	0.564	0.656	0.408	0.021	0.205	F17	0.303	0.649	0.449	0.237	0.442	F30	0.965	0.098	0.083	-0.060	0.066
F5	0.265	0.396	0.138	0.106	0.827	F18	0.417	0.643	0.178	0.301	0.421	F31	0.371	0.401	0.794	0.078	-0.010
F6	-0.158	0.312	0.375	0.792	0.122	F19	0.440	0.596	0.569	0.146	0.220	F32	0.777	0.361	0.472	0.070	0.123
F7	0.738	0.593	-0.007	-0.087	-0.096	F20	0.479	0.374	0.235	0.668	0.298	F33	0.964	0.070	0.157	0.114	0.096
F8	-0.110	0.518	0.386	0.694	0.073	F21	-0.179	0.283	0.594	0.329	0.148	F34	0.977	0.006	0.055	0.138	0.088
F9	0.044	0.831	0.203	0.361	0.163	F22	0.760	0.114	0.071	0.254	0.528	F35	0.519	0.146	0.131	0.672	0.167
F10	-0.091	0.858	0.394	0.040	0.270	F23	0.666	0.183	0.425	0.317	0.391	F36	0.936	-0.084	-0.104	0.220	0.101
F11	0.515	0.436	0.183	0.238	0.622	F24	0.933	0.199	0.187	0.106	0.134	F37	0.947	0.125	0.055	0.197	0.107
F12	0.485	0.601	0.536	-0.102	0.217	F25	0.810	0.169	0.094	0.050	0.524	F38	0.541	0.187	0.622	0.420	-0.152
F13	0.403	0.740	0.304	0.390	0.065	F26	0.185	0.298	0.867	0.129	0.136						

加粗表示高载荷。

Bold indicates high load.

于第4主成分上有较高的载荷, F5、F11、F22位于第5主成分上有较高的载荷, 主成分含义较清晰, 说明影响样品质量差异的并不是单一成分, 而是由多个成分聚集产生作用, 对应中药治疗疾病多成分、多靶点的特点。选择6个主成分进行PCA, 绘制主成分得分图, 结果见图5, 样品总体可聚为2类(S4

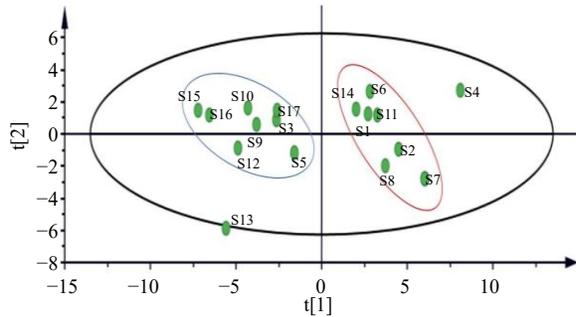


图5 主成分得分图

Fig. 5 Principal component score chart

与S13为离群样品), 与聚类分析结果基本一致, 样品间产生差异可能与采收季节、产地加工和炮制等相关。进一步根据各主成分值及贡献率分别计算综合得分, 评价18批牛蒡子-甘草药对样品的质量, 结果见表5, 综合得分的排名反映出18批牛蒡子-甘草药材的质量差异, 排名越高质量越好。

2.5 18批牛蒡子-甘草对脂多糖所致RAW264.7细胞炎症模型的影响

2.5.1 细胞培养 RAW264.7细胞采用专用培养基, 于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。

2.5.2 样品制备 取“2.1.2”项下留存干浸膏(样品S1), 加入专用培养基配制成2mg/mL(含0.1% DMSO)的样品母液, 过0.22μm微孔滤膜, 备用。

2.5.3 牛蒡子-甘草对RAW264.7细胞活性的影响 取处于对数生长期的RAW264.7细胞, 调整细胞密度为1.5×10⁵~2.0×10⁵个/mL, 每孔200μL接种

表5 主成分综合得分

Table 5 Comprehensive score of principal components

样品	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	综合得分	排名	样品	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	综合得分	排名
S1	-0.16	4.20	-0.97	-0.25	-0.78	22.56	6	S10	-4.95	-2.82	1.02	-0.09	0.48	1.63	18
S2	1.02	1.40	-1.99	0.00	3.50	24.38	4	S11	0.70	1.28	1.92	-0.73	-0.60	23.94	5
S3	-2.61	0.96	-1.21	-0.91	0.10	11.52	12	S12	-1.53	-0.94	-1.01	-0.90	-0.67	13.39	11
S4	-0.80	3.18	4.25	1.13	1.15	22.35	7	S13	-0.35	-3.18	-2.06	0.64	0.40	15.45	10
S5	-0.72	-2.42	-0.07	-0.46	0.49	15.46	9	S14	-0.28	4.19	-0.72	-0.69	-0.99	22.13	8
S6	-3.54	2.68	0.72	1.05	-0.16	11.17	13	S15	-3.58	0.20	-1.51	-0.88	-0.70	7.39	16
S7	12.08	-0.78	0.36	-0.72	-0.11	59.17	1	S16	-3.16	-0.39	-1.10	-0.67	-0.87	8.46	15
S8	2.46	-0.88	-1.24	4.63	-1.01	27.82	3	S17	-4.46	-1.69	0.57	0.04	0.56	4.10	17
S9	-2.18	-4.18	2.71	-0.50	-0.67	10.01	14	S18	12.06	-0.81	0.34	-0.69	-0.13	59.08	2

于96孔板中(空白组为200μL完全培养基), 37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜, 弃去孔中原培养液, 空白组与正常组加入200μL完全培养基, 给药组分别加入含2.0、1.8、1.6、1.4、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2mg/mL牛蒡子-甘草药对95%乙醇总提物的完全培养基, 每组5个复孔, 培养24h后, 各孔加5mg/mL MTT溶液20μL, 置于CO₂培养箱中继续培养4h, 弃去各孔上清液, 加入150μL DMSO, 振荡混匀15~20min, 待各孔中紫色结晶完全溶解, 于570nm处测定吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{正常}} - A_{\text{空白}})$$

采用GraphPad Prism 9软件进行统计学分析, 结果见表6。当牛蒡子-甘草药对95%乙醇总提物质量浓度高于1.0mg/mL时, 细胞存活率低于90%; 当牛蒡子-甘草药对95%乙醇总提物质量浓度为0.2~0.8mg/mL时, 细胞存活率大于90%且随质量浓度变化趋势小, 可以为后续实验提供依据。

表6 牛蒡子-甘草药对95%乙醇总提物对RAW264.7细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair on 95% alcohol total extract on RAW264.7 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%
空白	—	0.00±0.75
正常	—	100.00±3.78 ^{##}
牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物	0.2	119.74±1.40 ^{**}
	0.4	119.84±2.96 ^{**}
	0.6	117.00±2.65 ^{**}
	0.8	117.35±3.25 ^{**}
	1.0	103.88±4.65
	1.2	35.26±3.53 ^{**}
	1.4	12.88±0.65 ^{**}
1.6	12.84±1.07 ^{**}	
1.8	12.17±1.29 ^{**}	
2.0	112.50±1.38 ^{**}	

与空白组比较: ^{##}P<0.01; 与对照组比较: ^{**}P<0.01。

^{##}P<0.01 vs blank group; ^{**}P<0.01 vs control group.

2.5.4 不同质量浓度牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL, 每孔 200 μL 接种于 96 孔板中, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜, 弃去孔中原培养液, 正常组加入 200 μL 专用培养基, 模型组加入 200 μL 含脂多糖 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 专用培养基, 给药组分别加入 200 μL 0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/mL 牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物含脂多糖 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 专用培养基, 每组设置 3 个复孔, 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 按相关试剂盒说明书操作, 检测细胞分泌 NO 水平。采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。

由表 7 可知, 与正常组比较, 模型组 NO 含量明显上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物干预后在质量浓度 0.2~0.8 mg/mL 内 NO 含量降低 ($P < 0.01$), 并呈剂量相关性。为尽可能准确筛选牛蒡子-甘草药对抗炎活性有效成分群, 设定给药质量浓度为 0.8 mg/mL 进行后续 18 批牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物抗炎谱效相关性研究。

2.5.5 体外抗炎实验 按“2.5.2”项下方法制备样品溶液, 得到 18 批牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物, 按照相关试剂盒说明书操作, 检测细胞 NO 水平。结果见表 8, 与正常组比较, 模型组 NO 分泌量升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 18 批样品均能

表 7 牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair on secretion of NO from lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	NO/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
正常	—	5.17 ± 0.13
模型	—	$11.53 \pm 0.27^{##}$
牛蒡子-甘草药对	0.1	11.13 ± 0.23
95%乙醇总提物	0.2	$10.11 \pm 0.28^{**}$
	0.3	$9.20 \pm 0.13^{**}$
	0.4	$8.34 \pm 0.14^{**}$
	0.5	$7.93 \pm 0.16^{**}$
	0.6	$7.72 \pm 0.15^{**}$
	0.7	$7.46 \pm 0.13^{**}$
	0.8	$7.38 \pm 0.07^{**}$

与正常组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$, 表 8 同。
 $^{##}P < 0.01$ vs normal group; $^{**}P < 0.01$ vs model group, same as Table 8.

表 8 18 批牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物对 NO 分泌量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of 18 batches of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair on 95% total alcohol extract on NO secretion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	NO/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	编号	NO/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
正常	5.82 ± 0.09	S9	$6.22 \pm 0.08^{**}$
模型	$9.54 \pm 0.07^{##}$	S10	$6.75 \pm 0.06^{**}$
S1	$6.71 \pm 0.04^{**}$	S11	$6.33 \pm 0.07^{**}$
S2	$5.64 \pm 0.03^{**}$	S12	$7.98 \pm 0.21^{**}$
S3	$6.98 \pm 0.22^{**}$	S13	$5.82 \pm 0.04^{**}$
S4	$6.97 \pm 0.14^{**}$	S14	$6.66 \pm 0.11^{**}$
S5	$6.63 \pm 0.09^{**}$	S15	$7.00 \pm 0.04^{**}$
S6	$6.47 \pm 0.04^{**}$	S16	$6.17 \pm 0.07^{**}$
S7	$6.06 \pm 0.16^{**}$	S17	$5.62 \pm 0.07^{**}$
S8	$6.15 \pm 0.12^{**}$	S18	$5.71 \pm 0.02^{**}$

不同程度降低 RAW264.7 炎性细胞的 NO 分泌量。

2.6 灰色关联度分析 (gray correlation analysis, GCA)

GCA 能够表征各因素间的关联程度, 通过计算关联度, 然后根据关联的大小进行排序、分析, 关联度值越大, 说明关系越密切, 对药效的“贡献”越大。主要包括定义参考序列和比较序列、处理参考数列和比较数列数据、计算参考数列和比较数列的绝对差值、计算灰色关联系数和灰色关联度^[22]。

2.6.1 原始数据的无量纲化处理 为消除因变量与各变量之间单位不同的影响, 用均值化法对原始数据进行无量纲化处理^[23]。将牛蒡子-甘草药对抗炎作用的药效指标作为母序列, 牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物的共有峰峰面积作为子序列, 变换的母序列记为 $Y(k)$ (k 为 18 批样品编号)、子序列记为 $X_f(k)$ (f 为峰号)。

2.6.2 序列和子序列绝对差序列及关联度的计算 根据公式计算母序列与子序列的绝对差序列 $[\Delta_f(k)]$ 和关联度 $[A_f(k)]$ 。当关联度大于 0.8 时, 表明子序列与母序列关联密切, 当关联度 0.6~0.8 时, 表明两者关联度一般^[24]。

$$\Delta_f(k) = |Y(k) - X_f(k)| \quad (1)$$

$$A_f(k) = [\Delta_f(k)_{\min} + \rho \Delta_f(k)_{\max}] / [\Delta_f(k) + \rho \Delta_f(k)_{\max}] \quad (2)$$

ρ 为分辨系数, 取值为 0.5

18 批样品对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响与其指纹图谱 38 个共有峰的关联度见表 9, 结果显示, 除 F34、F36 外, 其余色谱峰的灰色关联度均大于 0.8, 进一步说明牛蒡子-甘草药对抗炎活性是多种成分共同作用的结果。各共有峰所代表的化学成

表9 18批牛蒡子-甘草药对共有峰峰面积与抗炎药效的关联度

Table 9 Correlation between peak areas of shared peaks and anti-inflammatory efficacy of 18 batches of *Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* drug pair

共有峰	关联度	关联序	共有峰	关联度	关联序
F1	0.899	3	F20	0.850	29
F2	0.864	19	F21	0.875	11
F3	0.896	4	F22	0.821	35
F4	0.892	5	F23	0.877	10
F5	0.914	1	F24	0.852	27
F6	0.838	33	F25	0.856	24
F7	0.870	14	F26	0.870	13
F8	0.856	23	F27	0.843	32
F9	0.890	6	F28	0.856	22
F10	0.865	18	F29	0.860	21
F11	0.882	7	F30	0.847	31
F12	0.869	16	F31	0.854	26
F13	0.880	8	F32	0.850	30
F14	0.875	12	F33	0.854	25
F15	0.813	36	F34	0.748	37
F16	0.869	15	F35	0.850	28
F17	0.902	2	F36	0.796	38
F18	0.861	20	F37	0.868	17
F19	0.877	9	F38	0.827	34

分对其抗炎活性的影响程度有所不同，与RAW264.7细胞NO分泌量有较大关联性的色谱峰贡献大小顺序为F5(甘草苷) > F17(甘草酸) > F1 > F3 > F4 > F9 > F11(异甘草苷) > F13(牛蒡子苷) > F19 > F23 > F21(牛蒡苷元) > F14。

2.7 指纹图谱与抗炎药效的偏最小二乘回归 (partial least squares regression, PLSR) 分析

PLSR分析是一种模型拟合度好和预测能力强的数据处理方法，集聚类分析、PCA、多元线性回归 (multiple linear regression, MLR) 优势为一体，且具有无须剔除样本、预测精度高、计算量小，易于定性解释等特点，已普遍应用于中药谱效学^[25]。利用SIMCA14.1软件，将18批牛蒡子-甘草药对38个共有峰的峰面积进行标准化处理，结果作为自变量(X)，RAW264.7细胞NO分泌量作为因变量(Y)，进行PLSR分析，结果见图6，结果表明所标示的共有峰中F1、F3、F5、F6、F9、F15、F17、F18、F20~F23、F25、F26、F28、F29、F33~F37与RAW264.7细胞NO分泌量呈负相关，与牛蒡子-甘草药对抗炎药效呈正相关。

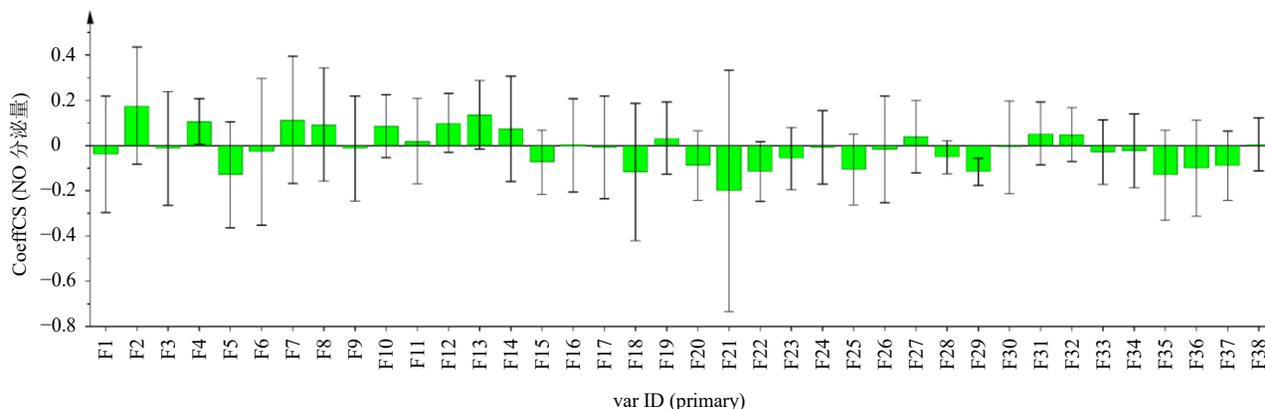


图6 回归系数图

Fig. 6 Regression coefficient graph

基于PLSR分析变量的选择方法进行变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 分析。VIP值反映了自变量对因变量的解释能力，值越大 (VIP > 1)，解释能力越强^[26]。18批牛蒡子-甘草药对指纹图谱的38个共有峰与RAW264.7细胞NO分泌量的VIP图见图7，由VIP图可知，牛蒡子-甘草药对38个共有峰中17个特征峰 (VIP > 1) 与其抗炎作用显著相关且F21 (VIP > 1.5) 贡献较大，牛蒡苷元 (F21) 是引起18批牛蒡子-甘草药对抗炎药效产生差异的最主要变量。

3 讨论

中药复方应在传统配伍理论和临床应用基础上开展继承创新的现代开发研究，阐释药效物质基础和作用机制是推动中药复方现代化创新开发研究的科学需求。药对是中药配伍组方的基本单位之一，在中医临证方剂配伍中起到相辅相成的作用^[1]。

本研究以色谱峰信息最大化、方法稳定为宗旨优化了提取条件；对流动相配比、柱温、体积流量和波长等进行筛选，以色谱峰分离度和峰面积为考察目标确定了最佳色谱条件，且依据课题组前期

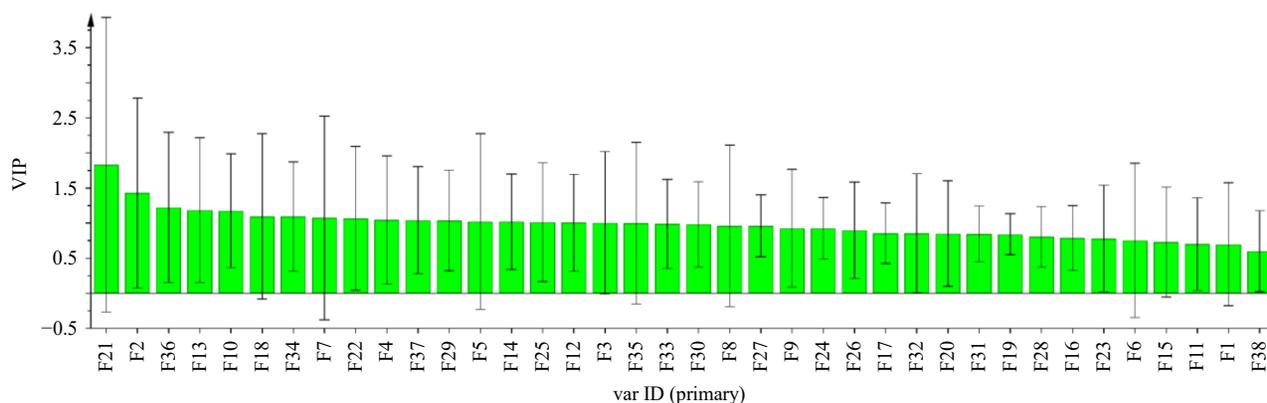


图7 VIP分析

Fig. 7 VIP analysis

文献信息挖掘及“生信分析-网络药理学-分子对接”的相关研究确定牛蒡子和甘草药材具有抗炎活性研究基础的有效成分作为对照品。牛蒡子-甘草药对指纹图谱共标定 38 个共有峰，经混合对照品溶液指出 13 个共有峰，18 批样品相似度均 >0.7 ，表明所建立的指纹图谱方法可用于药对的整体质量评价。聚类分析结果显示，当平方欧式距离为 10 时，18 批样品被分为 3 类；PCA 得到 5 个主成分，累计方差贡献率为 92.272%，能够充分体现牛蒡子-甘草药对活性成分的基本信息，选择 6 个主成分绘制主成分得分图，样品总体可聚为 2 类（S4 与 S13 为离群样品），与聚类分析结果基本一致，样品间产生差异可能与采收季节、产地加工和炮制等相关。进一步根据各主成分值及贡献率分别计算 18 批样品综合得分，来评价收集到的 18 批牛蒡子-甘草药对质量，综合得分的排名越高说明药材的质量越好，结果显示样品 S7 质量最佳。

本研究以脂多糖刺激 RAW264.7 细胞制备炎性细胞模型^[27]，以 NO 分泌量作为药效学指标考察 18 批牛蒡子-甘草药对的抗炎活性。首先以细胞存活率为判定指标对给药安全剂量进行筛选，当牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物质量浓度为 0.2~0.8 mg/mL 时，细胞存活率均大于 100%，进行 3 次重复实验后结果一致，说明牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物在 0.2~0.8 mg/mL 能够促进细胞活力，但随质量浓度变化趋势不明显，考虑可能与药物质量浓度设定梯度变化较小和细胞种板均匀度相关。在给药安全剂量范围内设定梯度质量浓度考察牛蒡子-甘草药对 95%乙醇总提物的抗炎活性，与模型组比较，给药组 NO 分泌量显著降低，呈剂量相关性，体外抗炎实验结果显示，18 批样品均能不同程度降低

RAW264.7 炎性细胞的 NO 分泌量。值得注意的是，实验过程中空白组 NO 分泌量较高，考虑 RAW264.7 细胞对于培养环境要求严格，尤其对于 CO₂ 的浓度具有较高的敏感性，在实验期间不同实验人员不定期开关培养箱使其培养环境无法长时间稳定，导致细胞活力有所降低，这可能是导致空白组 NO 释放量过高的主要原因。

本研究采用 GCA 和 PLSR 分析对牛蒡子-甘草药对的抗炎活性进行谱效相关性分析，GCA 结果表明 38 个共有峰中多个成分的关联度均大于 0.8，色谱峰贡献大小顺序为 F5（甘草苷） $>$ F17（甘草酸） $>$ F1 $>$ F3 $>$ F4 $>$ F9 $>$ F11（异甘草苷） $>$ F13（牛蒡子苷） $>$ F19 $>$ F23 $>$ F21（牛蒡苷元） $>$ F14，说明牛蒡子-甘草药对的抗炎活性是通过多成分协同作用产生的；其中甘草苷、甘草酸、异甘草苷、牛蒡子苷、牛蒡苷元已明确具有较好的抗炎作用，甘草总皂苷（甘草酸等）能够通过抑制 NO、TNF- α 、IL-6 的炎症因子的分泌来达到抗炎作用，牛蒡苷元可以通过抑制 Janus 激酶（Janus kinase, JAK）/信号转导与转录激活子（signal transducer and activators of transcription, STAT）信号通路发挥抗炎作用^[28-29]，牛蒡苷可通过抗炎、解热等途径减轻炎症反应^[30]。PLSR 分析结果显示，牛蒡子-甘草药对 38 个共有峰中有 17 个特征峰（VIP $>$ 1）与其抗炎作用显著相关，且牛蒡苷元（F21，VIP $>$ 1.5）是引起 18 批牛蒡子-甘草药对抗炎药效产生差异的主要变量。牛蒡子-甘草药对临床配伍应用中牛蒡子的炮制加工方法分别为炒制品和生品，相关研究表明，炒制条件的不同使得牛蒡子的抗炎药效存在差异，高温炒制使部分牛蒡子苷分解成其抗炎主要活性成分牛蒡苷元^[31]。一定程度解释了可能由于 18 批样品炒制程

度不同,导致牛蒡苷元含量差异,使其成为影响牛蒡子-甘草药对抗炎药效产生差异的主要变量。

综上,本研究建立了牛蒡子-甘草药对 HPLC 指纹图谱的研究方法,通过 GCA 与 PLSR 分析探讨了指纹图谱共有峰与抗炎活性的谱效相关性,筛选出牛蒡子-甘草药对抗炎作用的有效成分群,可为牛蒡子-甘草药对的抗炎药效物质基础研究、质量评价及相关制剂开发提供研究基础。此外,本研究发现,在未指认的化学成分中也有部分与该药对抗炎药效具有一定关联性,后续将采用液质联用技术进行进一步阐释研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邓树泳,李静,罗来成. 中药药对的现代研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 1003-1005.
- [2] 李经纬. 中医大辞典 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 294.
- [3] 赵佶. 圣济总录: 二〇〇卷 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1962: 641.
- [4] 彭怀仁. 中医方剂大辞典 第三册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 389.
- [5] 清·沈金鳌撰. 李占永李晓林校注. 杂病源流犀烛 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1994: 393.
- [6] 金永鹂,李泽世,辛相如,等. 银翘散临床应用进展 [J]. 中国民间疗法, 2022, 30(23): 116-121.
- [7] 段佳葳,胡齐莉,张婷婷. HPLC 法测定羚羊感冒片中牛蒡苷的含量 [J]. 黑龙江医药, 2007, 20(4): 299-300.
- [8] 邢耀莹,王姿杨,何海,等. 传统中药牛蒡子的研究现状与发展趋势分析 [J]. 山西中医药大学学报, 2023(1): 28-37.
- [9] 肖先,李春燕,刘晓龙,等. 甘草的主要化学成分及药理作用研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2023, 40(3): 280-285.
- [10] 张晓娟,张燕丽,左冬冬,等. 牛蒡子的质量控制、药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2013, 30(6): 125-128.
- [11] 韩维维,钟晴,张蓉,等. 甘草有效成分及其作用机制研究进展 [J]. 生命的化学, 2023, 43(12): 1956-1962.
- [12] 陶琦,李剑勇. 炎症与疾病关系研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42(5): 34-43.
- [13] Balbuena E, Cheng J R, Miller B, et al. The function of β -carotene on colonic inflammation and gut barrier integrity [J]. *FASEB J*, 2021, 8: 723480.
- [14] 付育,何天柳,李霓. RNA 结合蛋白与巨噬细胞炎症因子表达 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(12): 1612-1620.
- [15] Choi G S, Lim J H, Rod-In W, et al. Anti-inflammatory properties of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids isolated from *Ammodytes personatus* eggs in LPS-stimulated RAW264.7 cells [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2022, 131: 1109-1117.
- [16] 张强,杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 680-683.
- [17] 何海,赵沙沙,张小荣,等. 不同配伍比例牛蒡子-甘草药对中 12 个活性成分溶出量及抗炎作用的差异性研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(8): 1040-1046.
- [18] Zhao M Y, Gou J B, Zhang K X, et al. Principal components and cluster analysis of trace elements in buckwheat flour [J]. *Foods*, 2023, 12(1): 225.
- [19] Akopov A S, Moskovtsev A A, Dolenko S A, et al. Cluster analysis in biomedical researches [J]. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 2013(4): 84-96.
- [20] 石岩,魏锋,马双成. 关于主成分分析在中药和天然药物分析研究中应用的探讨 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 3031-3035.
- [21] Bro R, Smilde A K. Principal component analysis [J]. *Anal Methods*, 2014, 6(9): 2812-2831.
- [22] 梁志毅,黄贵发,陈仕妍,等. 基于熵权 TOPSIS 模型和灰色关联度分析的土茯苓质量评价 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(9): 1207-1213.
- [23] 李硕,王志允,常华杰,等. 木香 HPLC 指纹图谱的建立及其抗氧化、抗辐射作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2023, 54(8): 2580-2587.
- [24] 王志萍,李林杰,王昱涵,等. 基于灰色关联度的金母颗粒抗炎作用的谱效关系研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(5): 675-683.
- [25] 张庆,茹庆国,林红梅,等. 基于 PLSR 分析当归挥发油分子蒸馏馏分中化学成分与抗炎作用的相关性 [J]. 环球中医药, 2015, 8(10): 1153-1158.
- [26] 肖瑞瑶,滕攀攀,胡超,等. 偏最小二乘回归分析应用于中药谱效关系的研究进展 [J]. 辽宁化工, 2020, 49(3): 303-305.
- [27] Cheng L P, Ren Y J, Lin D B, et al. The anti-inflammatory properties of *Citrus wilsonii* Tanaka extract in LPS-induced RAW264.7 and primary mouse bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1213.
- [28] 董金香,邓毅,刘靛,等. 甘肃野生甘草内生菌发酵液与宿主水煎液、总黄酮、总皂苷对 LPS 致 RAW264.7 分泌炎症因子的影响 [J]. 北方药学, 2016, 13(7): 137-138.
- [29] Gao Q, Yang M B, Zuo Z. Overview of the anti-inflammatory effects, pharmacokinetic properties and clinical efficacies of arctigenin and arctiin from *Arctium lappa* L. [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(5): 787-801.
- [30] 张小倩,王苏贵,季家乐,等. 牛蒡子中牛蒡苷的研究进展 [J]. 文山学院学报, 2023, 36(2): 6-13.
- [31] 邵晶,文喜艳,王兰霞,等. 牛蒡子不同炒制品中的成分与含量及其对动物的抗炎活性对比研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(15): 1464-1468.

[责任编辑 李亚楠]