金银花的HPLC指纹图谱建立及其抗炎作用谱-效关系研究Δ

缪艳燕*,徐帮会,徐　剑,张永萍,刘　杰,刘　耀(贵州中医药大学药学院,贵阳　550025)

中图分类号　R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2020)20-2497-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2020.20.12

摘　要　目的:建立金银花指纹图谱,并研究其抗炎作用的谱-效关系。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)。色谱柱为Diamonsil C_{18},流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为238 nm,进样量为10 μL。以绿原酸为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立10批不同产地金银花药材样品的HPLC指纹图谱;通过对照品比对,指认共有峰对应的化学成分,并进行相似度分析。采用二甲苯、角叉菜胶及棉球诱导的急、慢性炎症小鼠模型评价10批金银花药材水提物对耳、足、肉芽肿的肿胀抑制率,并计算平均值,作为综合药效指标;基于共有峰峰面积和综合药效指标,采用灰色关联度分析法(GRA)和偏最小二乘回归分析法(PLSR)联合分析金银花指纹图谱与抗炎作用的谱-效关系,选择GRA关联度大于0.7且PLSR模型回归系数大于0的色谱峰为特征峰,计算10批金银花药材中特征峰峰面积占共有峰峰面积总和的百分比(即"峰占比")。结果:10批金银花药材样品的HPLC指纹图谱中有共有峰25个,相似度为0.775～0.994;指认出其中9个成分,分别为芦丁(峰18)、金丝桃苷(峰20)、异绿原酸B(峰22)、木犀草素(峰21)、绿原酸(峰9)、马钱苷(峰10)、新绿原酸(峰2)、异绿原酸C(峰25)、异绿原酸A(峰23)。10批金银花对小鼠耳肿胀、足肿胀、肉芽肿均具有抑制作用,抑制率平均值为47.95%～56.52%;GRA分析显示,关联度由大到小依次为峰8>12>18>16>3>11>20>22>19>21>1>9>10>13>24>14>2>17>25>23>5>4>15,且其关联度均大于0.7;峰2、4、5、7、8、10、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、24的PLSR模型回归系数均大于0,与抗炎作用成正相关;除峰7外,其余均为特征峰,且峰5、8、10、16、18、20、24的变量重要性投影值均大于1。10批金银花药材特征峰的峰占比为58.61%～71.19%。结论:成功建立金银花的HPLC指纹图谱,10批样品组分相似,抗炎成分含量相对较高;暂定金银花特征峰峰占比不得低于51.8%。

关键词　金银花;高效液相色谱法;指纹图谱;抗炎作用;谱-效关系;灰色关联度;偏最小二乘法

Establishment of HPLC Fingerprint of *Lonicera japonica* and Study on Its Anti-inflammatory Spectrum-effect Relationship

MIAO Yanyan, XU Banghui, XU Jian, ZHANG Yongping, LIU Jie, LIU Yao (School of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To establish fingerprint of *Lonicera japonica*, and to study its anti-inflammatory spectrum-effect relationship. METHODS: HPLC was adopted. The determination was performed on Diamonsil C_{18} column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was 238 nm. The sample size was 10 μL. Using chlorogenic acid as reference, HPLC fingerprint

brain against ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(6): 989-998.

[21] HUANG YG, TAO W, YANG SB, et al. Autophagy: novel insights into therapeutic target of electroacupuncture against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(6): 954-961.

[22] LEE YK, LEE JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy[J]. *Bmb Rep*, 2016, 49(8): 424-430.

[23] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 609-624.

[24] SU H, LIU W. PIK3C3/VPS34 control by acetylation[J]. *Autophagy*, 2018, 14(6): 1086-1087.

[25] KANG R, ZEH HJ, LOTZE MT, et al. The Beclin-1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571-580.

[26] 单培仁,余灵芳,黄周青,等.调控自噬对H9C2心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响[J].心电与循环,2013,32(6):473-477.

(收稿日期:2020-06-14　修回日期:2020-09-21)
(编辑:罗　瑞)

Δ 基金项目:国家重点研发计划子课题(No.2018YFD0700204);贵州省药物新剂型新工艺科技创新人才团队项目(No.黔科合平台人才〔2017〕5655);贵州省国内一流建设学科中药学(No.GNYL〔2017〕008)

* 讲师,硕士。研究方向:中药制剂新技术与新剂型。E-mail:mmyy79@163.com

of 10 batches of *L. japonica* from different production areas was established according to *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition). By comparing with reference substance, chemical constituents corresponding to common peaks were identified, and the similarity analysis was conducted. Acute and chronic inflammatory models of mice induced by xylene, carrageenan and cotton ball were used to evaluate inhibition rate of 10 batches of *L. japonica* to ear, foot and granuloma swelling; the average value was calculated as the comprehensive pharmacodynamic index. The spectrum-effect relationship with HPLC fingerprint of *L. japonica* and anti-inflammatory effect was analyzed by grey relational analysis (GRA) and partial least squares regressiosn (PLSR) based on common peak area and comprehensive pharmacodynamic index. Chromatographic peaks with correlation>0.7 and regression coefficient of PLSR model>0 were characteristic peaks. The percentage of peak areas of characteristic peaks to peak areas of common peak was calculated in 10 batches of *L. japonica* (e.g. "peak ratio"). RESULTS: There were 25 common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of *L. japonica*, with similarity of 0.775-0.994. Totally 9 peaks were confirmed, i.e. rutin (peak 18), hyperoside (peak 20), isochlorogenc acid B (peak 22), galuteolin (peak 21), chlorogenc acid (peak 9), loganin (peak 10), neochlorogenic acid (peak 2), isochlorogenic acid C (peak 25), isochlorogenic acid A (peak 23). All 10 batches of *L. japonica* had inhibitory effects on ear swelling, foot swelling and granuloma, with average inhibitory rate of 47.95%-56.52%. The correlation by GRA was peak 8>12>18>16>3>11>20>22>19>21>1>9>10>13>24>14>2>17>25>23>5>4>15, and all of correlations were greater than 0.7. The regression coefficient of PLSR for peaks 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24 were all greater than 0; those peaks were positively correlated with anti-inflammatory effect and were characteristic peaks except for peak 7; among them, VIP values of peaks 5, 8, 10, 16, 18, 20, 24 were greater than 1. The peak ratio of 10 batches of *L. japonica* was 58.61%-71.19%. CONCLUSIONS: HPLC fingerprint of 10 batches of *L. Japonica* is successfully established. 10 batches of samples have similar components, and the content of anti-inflammatory components is relatively high. The proportion of characteristic peaks to common peaks should not be less than 51.8%.

KEYWORDS *Lonicera japonica*; HPLC; Fingerprint; Anti-inflammatory effect; Spectrum-effect relationship; Grey relational analysis; Partial least squares

金银花 Lonicerae Japonicae Flos 为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.的干燥花蕾或待初开的花，主要分布于我国贵州、河南、山东和湖北等地，其经济、食用及药用价值较高，属药食同源植物[1]。金银花作为药用历史悠久的中草药，具有抗病毒、抗肿瘤、提高免疫和抗氧化等诸多功效[1-2]。目前，已有关于金银花指纹图谱及其抗炎药效的研究，如刘惠等[3]建立了不同批次金银花的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，结果表明，10批金银花指纹图谱的相似度均在0.92以上；胡璇等[4]对四倍体金银花水提物的抗炎作用进行了研究，结果表明，该水提物具有明显的抗炎作用。但是，目前尚无研究探讨指纹图谱与抗炎药效的直接内在联系[5]。基于此，本研究采用灰色关联度分析法（GRA）与偏最小二乘回归分析法（PLSR）联合建立金银花指纹图谱与抗炎药效的谱-效关系，以期从该药中筛选出与抗炎药效密切相关的化学成分，旨在为金银花的抗炎物质基础研究和临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪（美国Agilent公司）；AE240型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；SK8210LHC型超声波清洗仪（上海商信化玻仪器有限公司）；HHW21.600AⅡ型恒温水浴锅（天津市泰斯特仪器有限公司）。

1.2 药品与试剂

10批金银花药材（编号：S1～S10）经贵州中医药大学生药学教研室孙庆文教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb.的干燥花蕾或待初开的花，其来源信息详见表1。

表1 金银花药材样品来源信息

Tab 1 Information of *L. japonica* sources

编号	产地	编号	产地
S1	山东临沂	S6	河南封丘
S2	山东临沂	S7	河南密县
S3	湖北罗田	S8	安徽亳州
S4	河北巨鹿	S9	河北获鹿
S5	河南新乡	S10	山东枣庄

马钱苷对照品（批号：111640-201808，纯度：99.0%）、木犀草苷对照品（批号：111720-201609，纯度：94.9%）、绿原酸对照品（批号：110753-201817，纯度：96.8%）、金丝桃苷对照品（批号：111521-201708，纯度：95.1%）、芦丁对照品（批号：100080-201610，纯度：92.6%）均购自中国食品药品检定研究院；异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、新绿原酸对照品（成都植标化纯生物技术有限公司，批号：181214、181209、190102、181209，纯度均大于98%）；蒲地蓝消炎片（安徽济人药业有限公司，批号：20180514，规格：每片重0.3 g）；阿司匹林肠溶片（沈阳奥吉娜药业有限公司，批号：180914，规格：100 mg）；角叉菜胶（上海伊卡生物技术有限公司，批号：EK170811，纯度：99%）；生理盐水（安徽丰原药业

股份有限公司淮海药厂，批号：180218142）；乙腈（批号：20181205，色谱纯）、水合氯醛（批号：20160705）均购自国药集团化学试剂有限公司；二甲苯（重庆川东化工有限公司，批号：20160301，纯度：99%）；卡拉胶（上海伊卡生物技术有限公司）；其余试剂均为分析纯，水为纯净水。

1.3 动物

昆明种小鼠，清洁级，雌性，2月龄，体质量（20±2）g，购自长沙市天勤生物技术股份有限公司，动物生产许可证号：SCXK（湘）2014-0011。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取金银花药材适量，粉碎，过40目筛，精密称取粉末1.0 g，置于具塞锥形瓶中，加水25 mL，称定质量，加热回流提取2 h，放冷至室温，再次称定质量，用水补足减失的质量，摇匀，取上清液过0.45 μm微孔滤膜，取续滤液，即得供试品溶液，备用。

2.1.2 对照品溶液 分别精密称取马钱苷、木犀草苷、绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、新绿原酸、金丝桃苷、芦丁对照品适量，加甲醇溶解并稀释制成上述成分质量浓度分别为13.2、10.8、7.3、7.1、7.5、7.6、12.8、18、15 μg/mL的单一对照品溶液，备用。

2.2 色谱条件

色谱柱：Diamonsil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0～18 min，7% A→8% A；18～30 min，8% A→12% A；30～50 min，12% A→20% A；50～60 min，20% A；60～65 min，20% A→25% A；65～70 min，25% A→30% A；70～80 min，30% A→7% A）；流速：1.0 mL/min；柱温：30 ℃；检测波长：238 nm；进样量10 μL。

2.3 指纹图谱的建立与分析

2.3.1 精密度试验 取同一批金银花药材（编号：S2）适量，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2”项下色谱条件连续测定6次，记录峰面积。以绿原酸（即峰9，分离度好且峰形对称）为参照，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果，相对保留时间的RSD均小于1%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3%（n=6），表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批金银花药材（编号：S2）适量，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以绿原酸为参照，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果，相对保留时间的RSD均小于2.5%（n=7），相对峰面积的RSD均小于3%（n=7），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批金银花药材（编号：S2）适量，共6份，分别按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以绿原酸峰（峰9）为参照，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果，相对保留时间的RSD均小于1%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3%（n=6），表明本方法重复性良好。

2.3.4 HPLC指纹图谱的生成 分别取10批金银花药材样品适量，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》，以S2为参照图谱（因S2图谱的色谱峰信号相对较强且峰形明显），设置时间窗宽度为0.1 s，采用多点校正法进行色谱峰匹配，生成10批金银花药材样品的HPLC叠加指纹图谱，详见图1；采用中位数法生成对照指纹图谱（R），详见图2。

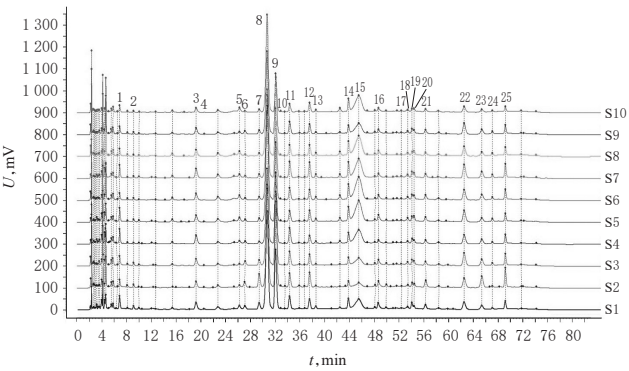


图1 10批金银花药材的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superposition fingerprints of 10 batches of *L. japonica*

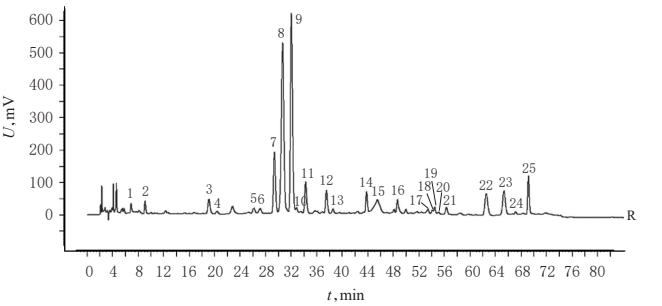


图2 金银花药材的对照指纹图谱

Fig 2 Reference fingerprint of *L. japonica*

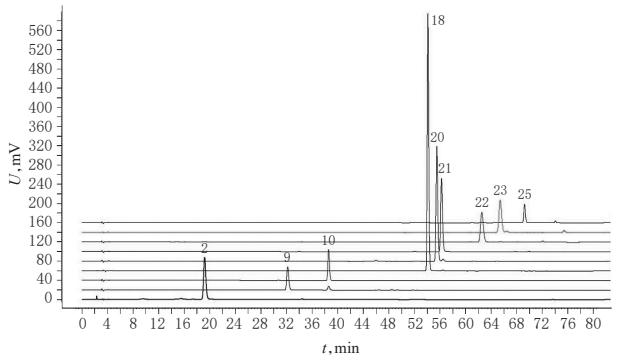
2.3.5 共有峰指认 由图1和图2可见，10批金银花药材样品含共有峰25个，通过与对照品（取“2.1.2”项下9种单一对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，其叠加色谱图见图3）比对，指认出其中9个成分，分别为新绿原酸（峰2）、绿原酸（峰9）、马钱苷（峰10）、芦丁（峰18）、金丝桃苷（峰20）、木犀草苷（峰21）、异绿原酸（峰22）、异绿原酸A（峰23）、异绿原酸C（峰25）。

2.3.6 相似度评价 将10批金银花药材样品的HPLC指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》进行相似度评价。结果，10批样品的相似度在0.775～0.994范围内，详见表2。

2.4 抗炎作用研究

2.4.1 金银花水提取液的制备 分别称取金银花药材

适量，分别用12、10、10倍量水（mL/g）加热回流提取3次，每次2 h，合并滤液，浓缩，制成质量浓度为0.6 g/mL（以生药量计）的药液。



注：2.新绿原酸；9.绿原酸；10.马钱苷；18.芦丁；20.金丝桃苷；21.木犀草素；22.异绿原酸B；23.异绿原酸A；25.异绿原酸C

Note：2. neochlorogenic acid；9. chlorogenic acid；10. loganin；18. rutin；20. hyperoside；21. luteolin；22. isochlorogenic acid B；23. isochlorogenic acid A；25. isochlorogenic acid C

图3　对照品溶液叠加色谱图谱

Fig 3　Superposition chromatograms of reference substance

表2　10批金银花药材样品的相似度评价结果

Tab 2　Similarity evaluation results of 10 batches of *L. japonica*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.947	0.975	0.965	0.942	0.931	0.953	0.918	0.991	0.947	0.979
S2	0.947	1.000	0.979	0.897	0.795	0.788	0.850	0.775	0.938	0.800	0.881
S3	0.975	0.979	1.000	0.959	0.868	0.870	0.923	0.848	0.983	0.870	0.943
S4	0.965	0.897	0.959	1.000	0.940	0.959	0.987	0.931	0.985	0.937	0.985
S5	0.942	0.795	0.868	0.940	1.000	0.992	0.972	0.982	0.942	0.994	0.981
S6	0.931	0.788	0.870	0.959	0.992	1.000	0.986	0.983	0.943	0.986	0.984
S7	0.953	0.850	0.923	0.987	0.972	0.986	1.000	0.964	0.969	0.962	0.990
S8	0.918	0.775	0.848	0.931	0.982	0.983	0.964	1.000	0.921	0.973	0.966
S9	0.991	0.938	0.983	0.985	0.942	0.943	0.969	0.921	1.000	0.945	0.987
S10	0.947	0.800	0.870	0.937	0.994	0.986	0.962	0.973	0.945	1.000	0.980
R	0.979	0.881	0.943	0.985	0.981	0.984	0.990	0.966	0.987	0.980	1.000

2.4.2　小鼠耳肿胀实验　参照文献方法[6]进行小鼠耳肿胀实验。将156只小鼠随机分成13组，分别为空白对照组、化学药阳性对照组（阿司匹林肠溶片，20 mg/kg）、中药阳性对照组（蒲地蓝消炎片，7.68 mg/g）和10批金银花组[记为S1～S10组，金银花水提取液，12 mg/g（以生药量计）]，每组12只。化学药阳性对照组和中药阳性对照组给药剂量按相应品种的临床成人1日剂量计，S1～S10组给药剂量按《中国药典》中金银花药材的1日剂量计。除空白对照组小鼠灌胃等体积生理盐水外，其余各组小鼠均灌胃相应药物，每日1次，连续15 d。末次给药30 min后，于各组小鼠右耳正反两面均匀涂抹二甲苯50 μL致炎，并以左耳作为对照。30 min后，将各组小鼠颈椎脱臼处死，用直径8 mm打孔器在左右耳相对称部位取耳片，分别称定质量，并按以下公式计算耳肿胀度和肿胀抑制率：耳肿胀度＝右耳质量－左耳质量，肿胀抑制率＝（右耳质量－左耳质量）/左耳质量×100%[7]。采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析；计量资料均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用t检验；$P<0.05$为差异有统计学意义。结果，与空白对照组比较，化学药阳性对照组、中药阳性对照组和S1～S10组小鼠耳肿胀度均显著降低（$P<0.01$），说明10批金银花均能显著抑制二甲苯所致的小鼠耳廓炎症肿胀，其中河北获鹿产金银花的抗炎作用相对较强（耳肿胀抑制率为49.13%），详见表3。

表3　各组小鼠耳肿胀度和肿胀抑制率的检测结果（n＝12）

Tab 3　Results of ear swelling degree and inhibition rate of swelling in mice of each group（n＝12）

组别	耳肿胀度（$\bar{x}\pm s$），mg	耳肿胀抑制率，%	组别	耳肿胀度（$\bar{x}\pm s$），mg	耳肿胀抑制率，%
空白对照组	27.72±2.40		S5组	15.05±4.74**	29.58
化学药阳性对照组	13.92±3.47**	49.78	S6组	19.52±2.95**	33.91
中药阳性对照组	13.36±4.39**	51.80	S7组	18.01±6.56**	38.28
S1组	14.37±5.60**	48.16	S8组	18.32±4.34**	45.71
S2组	16.88±5.47**	47.47	S9组	16.75±6.11**	49.13
S3组	14.56±5.77**	35.03	S10组	14.10±5.29**	39.10
S4组	17.11±6.14**	39.57			

注：与空白对照组比较，**$P<0.01$

Note：vs.blank control group，**$P<0.01$

2.4.3　小鼠足肿胀实验　参照文献方法[6]进行小鼠足肿胀实验。取小鼠156只，按“2.4.2”项下方法分组、给药。于末次给药1 h后，在每只小鼠右后足跖部皮内注射1%角叉菜胶0.1 mL，分别于注入前及注入后1、2、3、4、6 h测定右后足容积，并按以下公式计算足肿胀抑制率：足肿胀抑制率（%）＝[（空白对照组平均足肿胀度－给药组平均足肿胀度）/空白对照组平均足肿胀度]×100%[8]。按“2.4.2”项下方法对数据进行统计分析。结果，10批金银花对角叉菜胶所致的小鼠足炎症肿胀均有抑制作用，其中河南新乡产金银花的抗炎作用相对较强（足肿胀抑制率为59.86%～79.51%），详见表4。

表4　各组小鼠足肿胀抑制率的检测结果（n＝12）

Tab 4　Results of inhibition rate of foot swelling in mice of each group（n＝12）

组别	足肿胀抑制率，%				
	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h
空白对照组					
化学药阳性对照组	42.52	43.18	55.87	66.20	84.58
中药阳性对照组	50.77	25.70	38.26	49.41	79.86
S1组	40.99	26.73	28.33	32.45	53.72
S2组	59.89	45.48	58.18	56.74	66.87
S3组	29.98	36.53	46.43	54.44	58.22
S4组	57.33	40.33	45.76	59.91	64.49
S5组	59.86	48.62	57.59	70.62	79.51
S6组	33.45	43.45	48.80	66.19	70.85
S7组	40.27	36.52	52.07	61.90	67.52
S8组	40.51	47.78	53.48	59.16	68.58
S9组	34.68	38.57	56.37	68.82	70.79
S10组	60.26	46.74	53.90	58.61	64.74

2.4.4　棉球肉芽肿实验　参照文献方法[6]进行小鼠棉球

肉芽肿实验。取小鼠156只，按“2.4.2”项下方法分组。适应性喂养5 d后用水合氯醛麻醉，在无菌条件下于腹部正中作一切口，用止血钳剥离皮肤至腋窝处，将预先灭菌的50 mg棉球植入腋窝处，缝合。待小鼠清醒后按“2.4.2”项下方法给药。末次给药1 h后，颈椎脱臼处死小鼠，剥离并取出棉球肉芽肿组织，称定质量，按以下公式计算肉芽肿胀抑制率：肉芽肿胀抑制率(%)=[(空白对照组肉芽肿质量－给药组肉芽肿质量)/空白对照组肉芽肿质量]×100%[9]。按“2.4.2”项下方法对数据进行统计分析。结果，10批金银花对棉球肉芽肿均有抑制作用，其中河南新乡产金银花的抗炎作用相对较强(肉芽肿胀抑制率为59.50%)，详见表5。

表5　各组小鼠棉球肉芽肿胀抑制率的检测结果(n=12)

Tab 5　Results of inhibition rate of cotton granuloma in mice of each group(n=12)

组别	肉芽肿胀抑制率,%	组别	肉芽肿胀抑制率,%
空白对照组		S5组	59.50
化学药阳性对照组	52.40	S6组	49.58
中药阳性对照组	55.98	S7组	49.46
S1组	56.30	S8组	55.28
S2组	46.70	S9组	43.57
S3组	55.41	S10组	49.14
S4组	39.80		

2.4.5　抗炎综合药效值的确定　由于耳肿胀实验和足肿胀实验模拟的是急性炎症，肉芽肿实验模拟的是慢性炎症[10]，因此耳肿胀抑制率、足肿胀抑制率(6 h)和肉芽肿抑制率对评价抗炎效果具有相同的重要性。因此，基于层次分析法[11-12]赋予上述3个指标相同的权重系数，以其平均值作为抗炎综合药效指标，结果见表6。

表6　10批金银花抗炎综合药效指标的评价结果(%)

Tab 6　Evaluation results of integrated efficacy of anti-inflammation of 10 batches of *L. japonica* (%)

编号	综合药效指标	编号	综合药效指标
S1	52.73	S6	51.45
S2	53.68	S7	51.75
S3	49.55	S8	56.52
S4	47.95	S9	54.50
S5	56.20	S10	50.99

2.5　谱-效关系分析

2.5.1　GRA　以金银花抗炎综合药效作为参考数列，指纹图谱中色谱峰的峰面积作为比较数列，以初值化变换法对原始数据进行无量纲化处理，并计算GRA的关联度[13]，结果见表7。由表7可见，金银花各成分对抗炎效果的贡献大小依次为：峰8＞12＞18(芦丁)＞16＞3＞11＞20(金丝桃苷)＞22(异绿原酸B)＞19＞21(木犀草素)＞1＞9(绿原酸)＞10(马钱苷)＞13＞24＞14＞2(新绿原酸)＞17＞25(异绿原酸C)＞23(异绿原酸A)＞5＞4＞15，且其关联度均大于0.7，表明金银花中抗炎成分相对较多，其抗炎作用可能是多组分共同作用的结果。

表7　金银花各共有峰与抗炎药效关联度的分析结果

Tab 7　Analysis results of the correlation of common peaks in *L. japonica* and anti-inflammation efficacy

峰号	关联度	排序	峰号	关联度	排序
1	0.820	11	14	0.799	16
2	0.797	17	15	0.729	23
3	0.859	5	16	0.864	4
4	0.760	22	17	0.784	18
5	0.763	21	18	0.867	3
6	0.689	25	19	0.840	9
7	0.696	24	20	0.856	7
8	0.920	1	21	0.834	10
9	0.818	12	22	0.851	8
10	0.812	13	23	0.774	20
11	0.858	6	24	0.800	15
12	0.892	2	25	0.777	19
13	0.806	14			

2.5.2　PLSR分析　以金银花指纹图谱中各共有峰的峰面积为自变量(X)，以金银花抗炎综合药效为因变量(Y)，采用SIMCA 14.1软件进行PLSR分析，计算X对应Y的回归系数和变量重要性投影(VIP)值，结果见图4。由图4可见，10批金银花样品的25个共有峰中，峰2、4、5、7、8、10、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、24的PLSR模型回归系数均大于0，与抗炎效果成正相关，其中峰5、8、10、16、18、20、24的VIP值＞1，表明上述成分对抗炎效果具有显著影响。

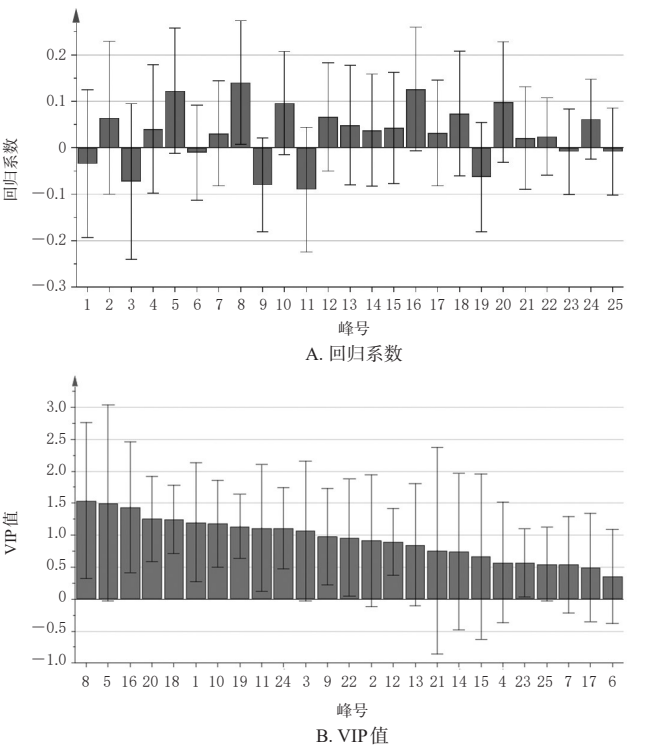


图4　金银花各共有峰与抗炎药效的PLSR模型回归系数和VIP值

Fig 4　PLSR model regression coefficients and VIP values of common peaks in *L. japonica* and anti-inflammation efficacy

2.6 金银花药材质量评价指标的建立

结合“2.5”项下结果，选择同时满足GRA中关联度大于0.7和PLSR中与抗炎药效成正相关的色谱峰为特征峰（色谱峰2、4、5、8、10、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、24），其峰面积之和记为Q。结合药效数据，金银花Q值越大表明其抗炎作用越强[14]。为避免因仪器、检测时间等条件的改变引起色谱峰峰面积的重现性问题所造成的系统误差，本研究采用“峰占比”（特征峰峰面积占共有峰峰面积总和的百分比来评价金银花药材中具有抗炎作用成分的相对比例，结果见表8。由表8可见，10批金银花药材峰占比的平均值为64.73%，按照质量标准研究方法，暂定以峰占比平均值的80%计为金银花质量评价的下限，即特征峰峰占比不得低于51.8%[14]。

表8 10批金银花药材特征峰的峰占比（%）

Tab 8 Peak ratio of charasteristic peaks of 10 batches of *L. japonica*（%）

编号	峰占比	编号	峰占比
S1	60.13	S6	68.15
S2	58.61	S7	70.14
S3	64.45	S8	65.76
S4	71.19	S9	64.47
S5	63.05	S10	61.38

3 讨论

本研究前期分别考察了不同提取方法（超声、回流）、不同提取溶剂（甲醇、乙醇、50%甲醇、50%乙醇和水）对金银花提取率的影响，结果发现以水回流提取2 h的提取率最高。前期还分别考察了不同流速（0.8、1.0、1.2 mL/min）、不同流动相（甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-1%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液）对色谱峰分离效果的影响，结果显示，当流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液、流速为1.0 mL/min时，相邻色谱峰的分离效果最好且峰形对称、无拖尾。

中药谱效关系研究是将中药指纹图谱（活性物质）与药效学研究结合起来，通过合理的谱-效模型和分析方法，系统揭示中药活性成分与药理作用之间的关系[15-16]。GRA是通过灰色关联度来分析和确定系统因素间的影响程度或因素对系统主行为贡献的一种测试方法，当关联度大于0.7时，各共有峰对药效有一定影响；且关联度越大则影响越强[17]。但GRA结果只能表达共有峰对药效的影响程度，具体是促进还是抑制则无法判断。PLSR在建模过程中集中了主成分分析、典型相关分析和线性回归分析方法的特点，通过PLSR模型回归系数的正负来判断各共有峰对药效影响的趋势，即正值为促进作用、负值为抑制作用[18]。因此，将两种分析方法联用，所得同时满足关联度大于0.7且PLSR模型回归系数为正值的共有峰为特征峰，其对应化合物即为对药效有较强促进作用的特征成分。

本研究成功建立了10批金银花药材样品的指纹图谱，确认了25个共有峰，相似度为0.775～0.994，表明此10批金银花药材样品质量基本稳定，其中个别相似度较低的原因可能与栽培方式、采收加工方法等不同有关。通过GRA和PLSR分析进一步明确了25个共有峰中的17个与抗炎药效有密切的正相关性，除峰7外，其余均为特征峰，10批金银花药材的峰占比为58.61%～71.19%，暂定特征峰峰占比不得低于51.8%，作为评价金银花药材是否合格的最低限。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[S]. 2015年版.北京：中国医药科技出版社，2015：172.

[2] 宋英，盛蓉，陈佳，等.金银花压制饮片和传统饮片的比较[J].中国实验方剂学杂志，2013，19(16)：24-26.

[3] 刘惠，杨姣，朱志飞，等.基于总量统计矩分析法的金银花、山银花HPLC指纹图谱评价[J].中国实验方剂学杂志，2019，25(21)：132-139.

[4] 胡璇，李卫东，张硕峰，等.四倍体金银花水提物抗炎作用和急性毒性实验研究[J].中草药，2015，46(11)：1649-1652.

[5] 姜东京，杜伟锋，蔡宝昌.中药谱效关系在中药质量控制方面的应用[J].中华中医药杂志，2015，30(11)：3811-3814.

[6] 洪美玲.病理学[M].北京：人民卫生出版社，1999：50.

[7] 周娟，张梦军，郭嘉伟，等.小鼠耳肿胀模型及药理应用[J].国际检验医学杂志，2012，33(17)：2102-2104.

[8] 包婷雯，左明丽，王敏，等.藏药麻花秦艽不同部位醇提物的抗炎作用研究[J].中国药房，2018，29(22)：3114-3118.

[9] 邹培标，余捷惠，吴少娜，等.野西瓜乙醇提取物的抗炎作用研究[J].现代医院，2010(6)：35-36.

[10] 汪蒙蒙，季兆洁，甘江华，等.霍山石斛的抗炎作用[J].中国实验方剂学杂志，2019，25(20)：76-81.

[11] 罗婷，唐玉，王佳琪，等.层次分析法结合正交试验优化川黄柏炒炭工艺[J].成都中医药大学学报，2018，41(4)：6-11.

[12] 刘莹昕，刘飒，王威尧.层次分析法的权重计算及其应用[J].沈阳大学学报（自然科学版），2014，26(5)：372-375

[13] 徐帮会，徐剑，张永萍，等.天麻HPLC指纹图谱及镇痛活性的谱效关系研究[J].中药材，2019，42(11)：2588-2592.

[14] 范罗嫡，于玲，刘美霞，等.基于谱效关系的党参质量检测方法，中国：201910599103.7[P].2019-09-17.

[15] 李力，潘倩雯，刘宏.灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J].中国药房，2018，29(11)：1581-1584.

[16] 蔡靓，张倩，杨丰庆.中药谱效学的应用进展[J].中草药，2017，48(23)：5005-5011.

[17] 蒋思怡，宋小英，张丹丹，等.菝葜UPLC指纹图谱与其抗大鼠盆腔炎作用的谱效关系研究[J].中国中药杂志，2019，44(15)：3323-3329.

[18] 卞振华，胡敏敏，袁晓航，等.基于偏最小二乘回归法分析五味子抑菌活性部位谱效关系[J].中成药，2019，41(11)：2788-2791.

（收稿日期：2020-05-08 修回日期：2020-09-15）

（编辑：邹丽娟）