玉叶金花总皂苷指纹图谱及其肝保护作用的谱效关系研究Δ

张　颖[1,2*]，罗金荣[1,2]，张赟赟[1,2]，陈　锋[1,2]，何　飞[1,2]，李　嘉[1,2#]（1.广西壮族自治区中医药研究院，南宁 530022；2.广西中药质量标准研究重点实验室，南宁　530022）

中图分类号　R917；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）22-2715-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.22.05

摘　要　目的　建立玉叶金花总皂苷指纹图谱，并进行其肝保护作用的谱效关系研究。**方法**　取不同产地的玉叶金花药材，以75%乙醇为溶剂，制备10批玉叶金花总皂苷。采用高效液相色谱法测定，利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》绘制10批玉叶金花总皂苷的指纹图谱，并进行相似度评价、共有峰指认。采用同一高效液相色谱法，测定其中5种三萜皂苷类成分（mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O）的含量。以四氯化碳致急性肝损伤小鼠模型考察玉叶金花总皂苷的肝保护作用，并通过灰色关联度分析法进行谱效关系研究。**结果**　10批玉叶金花总皂苷共有11个共有峰，指认了其中5个，分别为mussaendoside H（3号峰）、mussaendoside U（7号峰）、mussaglaoside C（8号峰）、mussaendoside G（9号峰）、mussaendoside O（11号峰）；10批样品的相似度为0.940～0.991。mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的平均含量分别为0.01～0.05、0.10～0.21、0.10～0.18、0.03～0.08、0.20～0.40 mg/g。10批玉叶金花总皂苷可普遍降低模型小鼠血清中丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）含量和肝组织中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）、IL-1β含量（$P<0.05$或$P<0.01$）。各共有峰峰面积与ALT、AST、TNF-α、IL-6、IL-1β含量的关联度分别为0.602～0.757、0.585～0.833、0.593～0.795、0.618～0.820、0.607～0.804，关联度均较大的依次为11、9、8号峰。**结论**　10批玉叶金花总皂苷成分相似，mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的平均含量不一；10批样品均有一定的肝保护作用，mussaendoside O、mussaendoside G、mussaglaoside C可能是其主要药效成分。

关键词　玉叶金花；总皂苷；指纹图谱；含量测定；肝保护作用；谱效关系

Study on the fingerprint of total saponins from *Mussaenda pubescens* and the spectrum-effect relationship of its hepatoprotective activity

ZHANG Ying[1,2], LUO Jinrong[1,2], ZHANG Yunyun[1,2], CHEN Feng[1,2], HE Fei[1,2], LI Jia[1,2]（1. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of the Quality Standard of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish the fingerprint of total saponins from *Mussaenda pubescens*, and to study the spectrum-effect relationship of its hepatoprotective activity. **METHODS** Ten batches of total saponins from *M. pubescens* from different origins were prepared using 75% ethanol as solvent. High-performance liquid chromatography (HPLC) and the *Similarity Evaluation System for Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprints* (2012 edition) were used to draw the fingerprints of 10 batches of total saponins from *M. pubescens*. The similarity evaluation and identification of common peaks were conducted. The same HPLC method was adopted to determine the contents of five triterpenoid saponins (mussaendoside H, mussaendoside U, mussaglaoside C, mussaendoside G and mussaendoside O). The hepatoprotective effect of total saponins from *M. pubescens* was investigated by establishing carbon tetrachloride-induced acute liver injury model mice, and the spectrum-effect relationship was studied by using grey correlation analysis. **RESULTS** There were 11 common peaks in 10 batches of total saponins from *M. pubescens*, 5 of which were identified, i.e. mussaendoside H (peak 3), mussaendoside U (peak 7), mussaglaoside C (peak 8), mussaendoside G (peak 9) and mussaendoside O (peak 11); the similarities of 10 batches of samples ranged 0.940-0.991. Average contents of mussaendoside H, mussaendoside U, mussaglaoside C, mussaendoside G, mussaendoside O were 0.01-0.05, 0.10-0.21, 0.10-0.18, 0.03-0.08, 0.20-0.40 mg/g, respectively. Ten batches of total saponins from *M. pubescens* could generally reduce the contents of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, and tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1β in liver tissue of model mice ($P<0.05$ or $P<0.01$). The correlation between the common peak areas and the contents of

Δ**基金项目**　广西自然科学基金项目（No.2020GXNSFAA297180）

＊**第一作者**　副主任药师，硕士。研究方向：中药、民族药物质基础。E-mail：ying_zi_0505@163.com

＃**通信作者**　主任药师，硕士。研究方向：中药、民族药物质基础。E-mail：13878195336@139.com

ALT, AST, TNF-α, IL-6 and IL-1β were 0.602-0.757, 0.585-0.833, 0.593-0.795, 0.618-0.820, 0.607-0.804, respectively; the peaks with high correlation were peaks 11, 9 and 8 in order. **CONCLUSIONS** Ten batches of total saponins from *M. pubescens* have similar components, and the average contents of mussaendoside H, mussaendoside U, mussaglaoside C, mussaendoside G and mussaendoside O are different. The batches of samples have a certain degree of hepatoprotective effect; mussaendoside O, mussaendoside G and mussaglaoside C may be its main active components.

KEYWORDS *Mussaenda pubescens*; total saponins; fingerprint; content determination; hepatoprotective activity; spectrum-effect relationship

玉叶金花是广西特色瑶药，为茜草科植物玉叶金花 *Mussaenda pubescens* Ait. f. 的干燥茎和根，具有清热解毒、利湿消肿、化痰止咳、凉血解暑、生津、拔异物的功效，主要用于治疗胃肠感冒、气管炎、肝炎、小儿疳积、肾炎水肿、咽喉肿痛等症[1]。由于该药具有较好的清热解毒作用，被广泛应用于中成药制剂（如玉叶解毒颗粒、玉叶清火片等）领域[2]。现代研究表明，玉叶金花主要含有三萜及其皂苷、单萜、环烯醚萜、有机酚酸等成分，以及钙、镁、铁等微量元素[3]。其中，mussaendoside G、mussaendoside U可调节机体促炎因子的分泌，具有一定的体外抗炎活性[4]；mussaendoside O为M胆碱受体拮抗剂，可减弱核因子κB受体激活蛋白配体（receptor activator of NF-κB ligand，RANKL）诱导的破骨细胞生成，抑制脂多糖诱导的骨丢失[5]，可显著抑制加兰他敏引起的泪腺、唾液腺分泌和卡巴胆碱诱导的豚鼠回肠肌收缩[6]；mussaendoside U能抑制M胆碱能神经兴奋，可降低回肠平滑肌收缩力，抑制唾液腺分泌[7]。研究指出，玉叶金花总皂苷具有肝保护作用，但具体药效成分尚不清楚[8]。此外，现有研究对玉叶金花的质量控制多限于化学分析，与药效结合的整体性探索有限[4,9]。鉴于此，本研究拟采用高效液相色谱（HPLC）法，建立不同产地玉叶金花总皂苷的指纹图谱并测定其中5种三萜皂苷类成分（mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O）的含量；拟采用四氯化碳（CCl_4）致小鼠肝损伤模型评价总皂苷的肝保护作用，并结合灰色关联度分析法进行谱效关系研究，以期为更好地开发利用玉叶金花资源提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Agilent 1260型HPLC仪（美国Agilent公司）、Multiskan GO型全波长全自动多功能酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、DHG型干燥箱（余姚市金电仪表有限公司）、XS-205型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）、Milli-Q型超纯水系统（美国Millipore公司）等。

1.2 主要药品与试剂

mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O对照品（纯度均大于95.0%）均由本实验室自制；D101型大孔树脂购自上海麦克林生化科技有限公司；联苯双酯滴丸（批号19J200607，规格1.5 mg）购自万邦德制药集团有限公司；丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）试剂盒、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；小鼠肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒均购自凡科维（上海）科技有限公司；乙腈为色谱纯，乙醇为分析纯，水为超纯水。

10批玉叶金花药材（编号S1～S10）采自广西不同地区，经广西壮族自治区中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为玉叶金花 *M. pubescens* Ait. f. 的干燥茎和根。10批玉叶金花药材的来源信息见表1。

表1 10批玉叶金花药材的来源信息

编号	采集地区	采收时间	编号	采集地区	采收时间
S1	玉林市博白县	2021年7月	S6	柳州市黄冕镇	2021年8月
S2	钦州市贵台镇	2021年7月	S7	来宾市金秀县	2021年8月
S3	桂林市临桂区	2021年7月	S8	防城港市	2021年9月
S4	来宾市忻城县	2021年8月	S9	柳州市洛满镇	2021年9月
S5	桂林市荔浦市	2021年8月	S10	河池市凤山县	2021年11月

1.3 实验动物

SPF级雄性昆明小鼠，体重18～20 g，购自长沙市天勤生物技术有限公司，生产许可证号为SCXK（湘）2019-0014。本研究动物实验方案已通过广西壮族自治区中医药研究院实验动物伦理委员会审核，审查受理号为2023030101。

2 方法与结果

2.1 玉叶金花总皂苷的制备

取10批玉叶金花药材各100 g，粉碎，置圆底烧瓶中，以75%乙醇加热回流提取2 h×2次，合并提取液，回收溶剂得浸膏，加水分散至30 mL；取上述分散物，经D101型大孔树脂柱，依次用水、40%乙醇、95%乙醇洗脱，收集95%乙醇洗脱部分，回收溶剂，即得玉叶金花总皂苷（每克总皂苷相当于生药320～385 g）。

2.2 指纹图谱的建立

采用HPLC法建立10批玉叶金花总皂苷样品的指纹图谱。

2.2.1 色谱条件

以Techmate C_{18}-ST（250 mm×4.6 mm，5.0 μm）为色谱柱，乙腈（A）-水（B）为流动相进行梯度洗脱（0～25 min，36%A；25～50 min，36%A→38%A；50～60 min，38%A→40%A；60～70 min，40%A→45%A）；流速为1 mL/min；柱温为25 ℃；检测波长为265 nm；进样体积为10 μL。

2.2.2 溶液的制备

（1）混合对照品溶液：精密称取mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为33.02、53.40、68.28、40.96、88.17 μg/mL的混合对照品溶液，备用。

（2）供试品溶液：取玉叶金花总皂苷，粉碎，精密称取粉末10 mg至具塞三角瓶中，精密加入甲醇25 mL，称重，超声处理40 min，放至室温，再次称重后用甲醇补足失重，摇匀，以0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 方法学考察

（1）精密度试验：取同一批玉叶金花总皂苷（编号S1），粉碎，取粉末约10 mg，精密称定，按“2.2.2（2）”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次，以11号峰（峰面积较大且出峰稳定）为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.0%（n=6），表明方法精密度良好。

（2）稳定性试验：取同一批玉叶金花总皂苷（编号S1），粉碎，取粉末约10 mg，精密称定，按“2.2.2（2）”项下方法制备供试品溶液，分别于室温放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，以11号峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于1.0%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

（3）重复性试验：取同一批玉叶金花总皂苷（编号S1），粉碎，取粉末约10 mg，共6份，精密称定，按“2.2.2（2）”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，以11号峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.0%（n=6），表明方法重复性良好。

2.2.4 指纹图谱的建立与分析

（1）指纹图谱的建立和共有峰的标定：取10批玉叶金花总皂苷，粉碎，取粉末，分别按“2.2.2（2）”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。将所得色谱信息导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》进行色谱峰匹配，以S1样品图谱为参照图谱，共标定11个共有峰；采用中位数法生成对照指纹图谱（R），采用多点校正法生成叠加图谱。结果见图1。

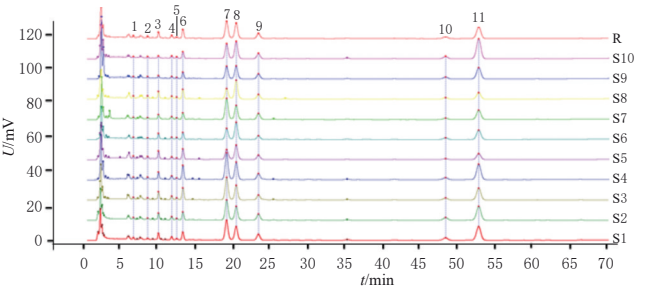
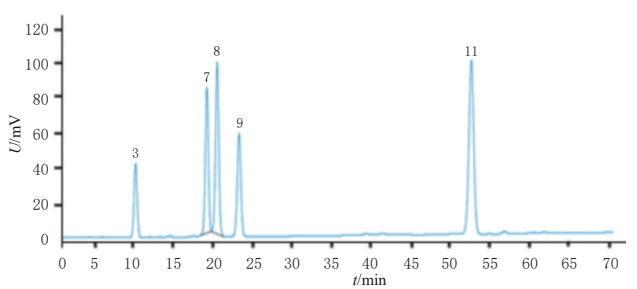


图1 10批玉叶金花总皂苷HPLC叠加图谱及对照指纹图谱

（2）相对保留时间和相对峰面积的计算：以11号峰为参照峰，计算得10批玉叶金花总皂苷指纹图谱中各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.0%（n=10），提示10批样品的成分种类相对稳定；相对峰面积的RSD为1.37%～2.61%（n=10），提示10批样品各成分的含量差异不大。

（3）相似度评价：采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》对10批玉叶金花总皂苷样品进行相似度评价。结果显示，与对照指纹图谱相比，10批玉叶金花总皂苷样品的相似度分别为0.991、0.986、0.989、0.989、0.960、0.980、0.978、0.940、0.991、0.957，提示10批玉叶金花总皂苷的整体品质基本稳定。

（4）共有峰指认：以混合对照品溶液的色谱图（按“2.2.1”项下色谱条件进样分析所得，图2）为参照，通过比较各色谱峰的保留时间和紫外吸收光谱特征，共指认出5个共有峰，3、7、8、9、11号峰依次为mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O。



3：mussaendoside H；7：mussaendoside U；8：mussaglaoside C；9：mussaendoside G；11：mussaendoside O。

图2 混合对照品溶液的HPLC图

2.3 5种三萜皂苷类成分的定量分析

采用HPLC法进行定量分析。

2.3.1　色谱条件

色谱条件同“2.2.1”项。

2.3.2　溶液的制备

（1）不同质量浓度的混合对照品溶液：精密称取mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O对照品适量，加甲醇溶解，制成质量浓度分别为201.12、1 995.40、1 010.75、502.05、2 000.90 μg/mL的混合对照品贮备溶液。取上述混合对照品贮备溶液5 mL至50 mL容量瓶中，用甲醇稀释并定容；然后分别取上述混合对照品溶液1、2、4、6、8、10 mL，用甲醇定容至10 mL，得不同质量浓度的混合对照品溶液。

（2）供试品溶液：制备同“2.2.2（2）”项。

2.3.3　方法学考察

（1）线性关系考察：取“2.3.2（1）”项下不同质量浓度的混合对照品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样分析并记录峰面积。以各待测成分的峰面积为纵坐标（Y）、其质量浓度为横坐标（X）进行线性回归，得mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的回归方程分别为Y=10 158.9X+254.3（R^2=0.999 5）、Y=15 616.4X+825.9（R^2=0.999 6）、Y=6 359.2X+1 033.4（R^2=0.999 8）、Y=18 062.9X+165.1（R^2=0.999 5）、Y=16 553.8X−528.7（R^2=0.999 7），上述成分检测质量浓度的线性范围分别为2.01～20.11、19.95～199.54、10.11～101.08、5.02～50.21、20.01～200.09 μg/mL。

（2）精密度试验：取同一混合对照品溶液[mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的质量浓度分别为4.02、39.91、20.22、10.04、40.02 μg/mL，按“2.3.2（1）”项下方法制得]适量，按“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次，记录峰面积。结果显示，mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O峰面积的RSD分别为0.48%、0.35%、0.51%、0.63%、0.26%（n=6），表明仪器精密度良好。

（3）稳定性试验：取玉叶金花总皂苷样品（编号S1），按“2.3.2（2）”项下方法制备供试品溶液，分别于室温放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。结果显示，mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O峰面积的RSD分别为0.58%、0.34%、0.46%、0.72%、0.66%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

（4）重复性试验：取玉叶金花总皂苷样品（编号S1），按“2.3.2（2）”项下方法平行制备供试品溶液6份，再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积并按外标法计算mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的含量。结果显示，上述成分平均含量的RSD分别为1.77%、1.21%、1.93%、1.82%、1.36%（n=6），表明方法重复性良好。

（5）加样回收率试验：精密称取已知含量的玉叶金花总皂苷样品（编号S1）5 mg，共6份，加入与已知量相等的各成分对照品，按“2.3.2（2）”项下方法制备供试品溶液，再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积并计算加样回收率。结果显示，mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的平均加样回收率分别为100.67%、100.10%、99.30%、100.96%、100.79%，RSD分别为1.83%、1.78%、1.71%、1.25%、1.53%（n=6），表明方法准确度良好。

2.3.4　样品测定

取10批玉叶金花总皂苷样品，按“2.3.2（2）”项下方法平行制备供试品溶液3份，再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积并按外标法计算各成分含量，结果以平均值展示，具体见表2。

表2　10批玉叶金花总皂苷中5种三萜皂苷类成分的含量测定结果（mg/g，n=3）

编号	mussaendoside H	mussaendoside U	mussaglaoside C	mussaendoside G	mussaendoside O
S1	0.04	0.15	0.10	0.05	0.32
S2	0.02	0.17	0.12	0.06	0.30
S3	0.03	0.19	0.18	0.05	0.28
S4	0.03	0.21	0.16	0.08	0.33
S5	0.05	0.11	0.15	0.04	0.20
S6	0.01	0.16	0.18	0.03	0.27
S7	0.01	0.18	0.16	0.06	0.26
S8	0.03	0.10	0.18	0.04	0.21
S9	0.01	0.12	0.13	0.05	0.31
S10	0.02	0.14	0.18	0.07	0.40

2.4　肝保护作用评价

2.4.1　药液的配制

分别取10批玉叶金花总皂苷适量，用0.5%羧甲基纤维素钠溶液稀释，制得所需浓度的药液；取阳性对照药联苯双酯适量，用0.5%羧甲基纤维素钠溶液稀释，制得所需浓度的药液。

2.4.2　玉叶金花总皂苷对小鼠肝功能指标和炎症因子的影响

将小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组（联苯双酯，200 mg/kg[10]）、不同批次玉叶金花总皂苷组（即S1～S10组，剂量分别为104、108、102、115、85、125、115、87、113、124 mg/kg，均相当于生药量40 g/kg[1]），每组10只。各药物组小鼠每天灌胃相应药液1次，连续

7 d，空白组和模型组小鼠灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液。末次给药后1 h，模型组和各药物组小鼠均单次灌胃0.35%CCl_4-花生油溶液10 mL/kg以复制急性肝损伤模型（以血清ALT、AST含量较空白组显著升高为造模成功），空白组小鼠单次灌胃等体积花生油。

造模后，各组小鼠禁食16 h，摘眼球取血，以3 000 r/mim离心10 min，分离血清；小鼠脱颈椎处死，分离其肝组织，保存于液氮中。取血清样品，使用酶标仪检测其中ALT、AST含量。取保存于液氮中的肝组织适量，加生理盐水制成10%组织匀浆，于4 ℃下以3 000 r/min离心10 min，取上清液，使用酶标仪检测其中TNF-α、IL-6、IL-1β含量。上述检测均严格按照相应试剂盒说明书操作。采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验，检验水准$\alpha=0.05$。

结果（表3）显示，与空白组比较，模型组小鼠血清中ALT、AST含量和肝组织中TNF-α、IL-6、IL-1β含量均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各药物组小鼠的上述指标均普遍降低，大部分差异有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。

表3　各组小鼠血清中ALT、AST含量和肝组织中TNF-α、IL-6、IL-1β含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TNF-α/(pg/mg)	IL-6/(pg/mg)	IL-1β/(pg/mg)
空白组	6.33±2.73	35.92±13.29	61.93±13.55	12.76±3.63	12.65±2.34
模型组	149.59±12.81[a]	161.07±12.01[a]	95.50±20.63[a]	17.59±7.22[a]	18.06±5.77[a]
阳性对照组	32.54±13.26[b]	100.53±24.95[b]	73.81±18.57[b]	14.55±5.43[b]	15.73±4.32[b]
S1组	100.49±47.64[c]	157.56±4.99[b]	81.62±22.61[c]	16.03±8.31[b]	16.98±6.05[c]
S2组	50.29±14.84[b]	127.08±8.50[b]	75.44±17.58[b]	15.78±5.54[b]	17.51±5.79[b]
S3组	45.50±19.39[b]	137.43±20.35[b]	69.36+13.45[b]	14.12±6.55[b]	16.46±4.51[c]
S4组	49.75±21.25[b]	145.24±11.33[b]	74.69±16.36[b]	15.98±5.21[c]	15.87±4.08[b]
S5组	40.07±9.68[b]	97.60±1.88[b]	66.51±10.22[b]	13.92±6.03[c]	15.90±6.11[c]
S6组	53.45±16.70[b]	147.94±5.51[b]	80.03±20.09[c]	16.36±6.54	17.33±7.23[b]
S7组	45.93±17.57[b]	129.01±12.70[c]	77.96±15.17[b]	16.23±7.89[c]	17.59±4.09[c]
S8组	44.02±8.86[b]	115.72±37.69[b]	68.39±23.75[c]	15.01±4.33[b]	14.98±4.24[c]
S9组	62.32±20.95[c]	149.17±1.56[b]	83.77±19.84	19.88±8.09	18.03±7.13
S10组	95.12±64.08[c]	156.95±2.51[b]	92.13±18.62	14.34±8.11[c]	17.94±8.49

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

2.5　玉叶金花总皂苷肝保护作用的谱效关系分析

采用灰色关联度分析法[11]，以各组肝损伤小鼠血清中ALT、AST含量和肝组织中TNF-α、IL-6、IL-1β含量为母序列，以玉叶金花总皂苷指纹图谱的11个共有峰峰面积为子序列，设分辨系数ρ为0.5，计算各共有峰峰面积与各药效指标的关联度。结果（表4）显示，各共有峰峰面积与ALT、AST、TNF-α、IL-6、IL-1β含量的关联度分别为0.602～0.757、0.585～0.833、0.593～0.795、0.618～0.820、0.607～0.804，关联度均较大的依次为11、9、8号峰；各共有峰对上述指标的贡献大小不一，提示玉叶金花总皂苷的肝保护作用是通过不同成分协同实现的，11、9、8号峰对应成分（即mussaendoside O、mussaendoside G、mussaglaoside C）可能是玉叶金花总皂苷发挥肝保护作用的主要药效成分。

表4　玉叶金花总皂苷指纹图谱各共有峰与肝保护药效指标的关联度

共有峰峰号	ALT含量	AST含量	TNF-α含量	IL-6含量	IL-1β含量
1	0.602	0.622	0.601	0.687	0.630
2	0.646	0.637	0.593	0.618	0.612
3	0.622	0.757	0.676	0.758	0.765
4	0.610	0.585	0.623	0.635	0.607
5	0.668	0.611	0.689	0.717	0.679
6	0.651	0.717	0.658	0.742	0.642
7	0.639	0.697	0.723	0.792	0.691
8	0.690	0.833	0.722	0.779	0.792
9	0.691	0.806	0.754	0.820	0.804
10	0.735	0.672	0.644	0.654	0.710
11	0.757	0.789	0.795	0.804	0.733

3　讨论

本研究参照相关文献[12]建立了玉叶金花总皂苷HPLC指纹图谱，方法学考察结果显示，该方法的精密度、重复性、稳定性均较好。相似度评价结果表明，不同批次玉叶金花总皂苷样品的化学成分组成一致性较好，含量差异不大。通过与混合对照品比对，指认了其中5个共有峰，分别为mussaendoside O（11号峰）、mussaendoside G（9号峰）、mussaglaoside C（8号峰）、mussaendoside U（7号峰）、mussaendoside H（3号峰）。含量测定结果显示，10批玉叶金花总皂苷样品中，mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的平均含量分别为0.01～0.05、0.10～0.21、0.10～0.18、0.03～0.08、0.20～0.40 mg/g。

血清ALT、AST含量是评估肝损伤的常用指标。当肝细胞出现轻微损伤时，细胞发生裂解，大量的ALT、AST等转氨酶便会游离出来，从而导致肝细胞外及血清中的转氨酶含量急剧升高，故上述指标含量的上升程度可反映肝细胞的受损程度[13]。研究发现，肝病患者体内促炎因子的含量较高，其中TNF-α、IL-6、IL-1β等由肝巨噬细胞和外周血单核细胞分泌，是重要的炎症因子[14]。因此，本研究以血清中ALT、AST含量和肝组织中TNF-α、IL-1β、IL-6含量为指标，初步评价了玉叶金花总皂苷的肝保护作用。结果显示，玉叶金花总皂苷具有一定的肝保护作用，可能通过抑制小鼠炎症因子的释放来减轻CCl_4所致的急性肝损伤。本研究进一步采用灰色关联度分析法对玉叶金花总皂苷肝保护作用的谱效关系进行了评价，结果表明，玉叶金花总皂苷的肝保护作用是多种成分共同作用的结果，其中mussaendoside O、mussaendoside G、mussaglaoside C可能是其主要药效成分。

综上所述，本研究建立了玉叶金花总皂苷HPLC指纹图谱，各批样品成分一致性较好，含量差异不大；10批样品中，mussaendoside H、mussaendoside U、mussaglaoside C、mussaendoside G、mussaendoside O的平均含量不一；10批样品均有一定的肝保护作用，mussaendoside O、mussaendoside G、mussaglaoside C可能是其主要药效成分。

参考文献

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准：第一卷[M]. 2014年版. 南宁：广西科学技术出版社，2014：68.
Guangxi Zhuang Autonomous Region Drug Administration. Quality standard of Yao medicinal materials in Guangxi Zhuang Autonomous Region：volume Ⅰ[M]. 2014 edition. Nanning：Guangxi Science and Technology Publishing House，2014：68.

[2] 罗疆南，李靖云，陈俊，等. 玉叶解毒颗粒质量标准的建立[J]. 中国药师，2019，22(7)：1344-1345，1377.
LUO J N，LI J Y，CHEN J，et al. Study on the quality standard for Yuye jiedu granules[J]. China Pharm，2019，22(7)：1344-1345，1377.

[3] 李嘉，卢覃培，张颖. 玉叶金花属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药，2016，25(15)：39-48.
LI J，LU Q P，ZHANG Y. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Mussaenda* plants[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy，2016，25(15)：39-48.

[4] 王遥. 玉叶金花化学成分及其体外抗流感病毒抗炎活性研究[D]. 广州：广州中医药大学，2017.
WANG Y. Studies on the chemical constituents and its *in vitro* anti-influenza virus and anti-inflammatory activity of *Mussaenda pubescens*[D]. Guangzhou：Guangzhou University of Chinese Medicine，2017.

[5] GAL M，KIM O，TRAN P T，et al. Mussaendoside O，a N-triterpene cycloartane saponin，attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and inhibits lipopolysaccharide-induced bone loss[J]. Phytomedicine，2022，105：154378.

[6] XU R，ZHAO W，XU J，et al. Studies on bioactive saponins from Chinese medicinal plants[J]. Adv Exp Med Biol，1996，404：371-382.

[7] 曾宪彪，李嘉，韦桂宁，等. 玉叶金花皂苷U对M胆碱能神经支配器官的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21(20)：159-162.
ZENG X B，LI J，WEI G N，et al. Effect of mussaendoside U on M cholinergic innervation organs[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2015，21(20)：159-162.

[8] 张颖，李嘉，杨海船，等. 玉叶金花提取物及其制备方法和应用：CN111743944A[P]. 2021-10-15.
ZHANG Y，LI J，YANG H C，et al. *Mussaenda pubescens* extract as well as preparation method and application thereof：CN111743944A[P]. 2021-10-15.

[9] 张谦华. 玉叶金花化学成分及抗炎活性研究[D]. 南宁：广西中医药大学，2019.
ZHANG Q H. Chemical constituents from *Mussaenda pubescens* and anti-inflammatory activity[D]. Nanning：Guangxi University of Chinese Medicine，2019.

[10] 于伟凡. 马鞭草总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的影响[J]. 医药导报，2013，32(10)：1289-1292.
YU W F. Protective effect of total flavones of Herba Verbenae against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. Her Med，2013，32(10)：1289-1292.

[11] 林梦雅，张玉萍，李雅，等. 基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究[J]. 中草药，2017，48(16)：3447-3452.
LIN M Y，ZHANG Y P，LI Y，et al. Spectra-effect relationship of anti-inflammation of *Salvia miltiorrhiza* extract based on gray correlation analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2017，48(16)：3447-3452.

[12] 沈成英，吴文明，侯雄军，等. 黄芩汤指纹图谱建立及不同相态抗皮肤癣菌活性谱效关系研究[J]. 中国药房，2023，34(6)：687-692.
SHEN C Y，WU W M，HOU X J，et al. Fingerprint establishment of Huangqin decoction and study on spectrum-effect relationship of its antidermatophytic activity in different phase states[J]. China Pharm，2023，34(6)：687-692.

[13] 郑庆范. 二甲双胍通过应激反应减轻小鼠CCl_4急性肝损伤机制的研究[D]. 长春：吉林大学，2022.
ZHENG Q F. Mechanism of metformin alleviates CCl_4-induced acute liver injury in mice by regulating stress response[D]. Changchun：Jilin University，2022.

[14] 冯耀培，宋娟，郑斯文，等. 云芝浸膏对小鼠CCl_4肝损伤保护作用机制研究[J]. 特产研究，2020，42(1)：15-20.
FENG Y P，SONG J，ZHENG S W，et al. Study on the protective mechanism underlying the extract of *Coriolus versicolor* on CCl_4-induced liver injury in mice[J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res，2020，42(1)：15-20.

（收稿日期：2023-05-10　修回日期：2023-09-01）
（编辑：张元媛）