

# 拳卷地钱乙醇提取物 HPLC 指纹图谱与其抗急性肝损伤的谱效关系

李平凤, 黎理, 谢凤凤, 李鹏, 刘婧曦, 赵凌, 龚登美, 朱华\*  
(广西中医药大学, 广西南宁 530001)

**摘要:** 目的 考察拳卷地钱乙醇提取物 HPLC 指纹图谱与其抗急性肝损伤的谱效关系。方法 建立 HPLC 指纹图谱后, 探讨药材乙醇提取物对四氯化碳诱导急性肝损伤大鼠的保护作用, 对指纹图谱中共有峰成分含量与其抗急性肝损伤活性进行灰色关联分析和多元线性回归分析。结果 11 批样品指纹图谱中有 11 个共有峰, 与其抗急性肝损伤作用的关联度均大于 0.740, 以芹菜素最高。与模型组比较, 各样品均可降低血清 AST、ALT 水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 抗 AST、ALT 谱效关系方程  $P < 0.01$ ,  $R^2$  分别为 0.960、0.929。结论 拳卷地钱乙醇提取物及其中某些成分与该药材抗急性肝损伤有关, 以芹菜素作用最强。

**关键词:** 拳卷地钱; 乙醇提取物; HPLC 指纹图谱; 抗急性肝损伤; 谱效关系

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)02-0524-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.046

地钱又称地衣, 喜生于阴湿之地, 广泛分布于全国各地, 其药用始载于《名医别录》, 其味淡, 性凉, 归肝经, 具有清热利湿、解毒敛疮之功效, 主治湿热黄疸、疮痈肿毒、毒蛇咬伤、水火烫伤、骨折、刀伤等<sup>[1]</sup>。广西境内有地钱 *Marchantia polymorpha* L.、粗裂地钱 *Marchantia paleacea* Bert.、拳卷地钱 *Marchantia convoluta* Gao et Chang<sup>3</sup> 种地钱属植物, 以拳卷地钱为主, 为广西民间常用中草药<sup>[2]</sup>, 常用其外治烫伤骨折、体癣、溃疡不愈合, 内治黄疸型肝炎, 均取得良好效果<sup>[3]</sup>。

中药化学成分复杂多样, 不同成分协同发挥药效作用。在研究谱效关系时, 需要将能展现中药“有效组分群”的指纹图谱与功效相结合来反映其中化学成分与药效的内在联系, 才能建立起中药与药效基本一致的、能全面反映产品内在质量的质量标准<sup>[4-6]</sup>, 但尚无拳卷地钱在该方面的报道。因此, 本实验建立了 11 个产地的拳卷地钱乙醇提取物的 HPLC 指纹图谱, 通过灰色关联分析、多元线性回归分析与其四氯化碳诱导大鼠急性肝损伤保护作用的谱效关系, 以期为该药材用于衡量抗急性肝损伤保护作用的程度提供条件, 对评价其内部质量具有重要意义。

## 1 材料

1.1 试剂与药物 从广西采集 11 批拳卷地钱 (编号 A1~A11), 经广西中医药大学韦松基教授鉴定为拳卷地钱 *Marchantia convoluta* Gao et Chang, 具体信息见表 1。芹菜素对照品 (20 mg, 纯度 99.2%, 中国食品药品检定研究院, 批号 111901-201603)。吐温-80 购自天津富宇精细化学试剂

有限公司;  $CCl_4$ 、水合氯醛均购于国药集团化学试剂有限公司; 联苯双酯滴丸 (1.5 mg × 250 丸/瓶, 批号 A02150123, 日用量 22.5~45 mg) 购于万邦德制药集团股份有限公司; ALT/GPT 试剂盒 (批号 180915)、AST 试剂盒 (批号 180811) 均购自南京建生物工程有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 甲醇、95% 乙醇、无水乙醇为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 磷酸为色谱纯 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 冰乙酸为色谱纯 (天津大茂化学试剂厂)。

表 1 样品信息

编号	来源	采集时间
A1	贺州市昭平县	2017.05
A2	梧州市苍梧县	2018.03
A3	贵港市港北区	2018.05
A4	贺州市八步区	2018.04
A5	河池市环江县	2017.05
A6	南宁市马山县	2017.05
A7	梧州市蒙山县	2018.04
A8	桂林市平乐县	2017.05
A9	桂平市平南县	2017.05
A10	玉林市容县	2018.04
A11	南宁市宾阳县	2017.05

1.2 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配置 G-1311C 四元泵、二极管阵列检测器、Agilent 1260 series 色谱工作站 (美国安捷伦科技公司); KQ-5200 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 电子分析天平 [赛多利斯科学

收稿日期: 2019-09-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260620); 壮瑶药协同创新中心项目 (桂教科研 [2013] 20); 广西壮瑶药重点实验室项目 (桂科基字 [2014] 32); 广西重点学科壮药学资助项目 (桂教科研 [2013] 16); 广西八桂学者中药创新理论与药效研究项目 (J13162)

作者简介: 李平凤 (1988—), 女, 硕士, 研究为中药及民族药的鉴定与开发。E-mail: 281836025@qq.com

\* 通信作者: 朱华 (1957—), 男 (壮族), 博士生导师, 从事壮瑶药资源开发与利用方向研究

仪器(北京)有限公司];电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);HH-A6数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);TGL-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Millipore Direct-Q3, 5, 8纯水/超纯水一体机(德国默克公司);5810R低温冷冻离心机(德国Eppendorf公司);动物电子天平(美国双杰公司)。

1.3 动物 SPF级健康SD大鼠,雄性,体质量(200±20)g,由湖南斯柯达生物科技股份有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2016-0002,实验动物质量合格证号43004700050126,于通风、清洁、安静、温湿度适宜的环境中适应性喂养1周,其间自由饮水进食。

## 2 方法与结果

2.1 乙醇提取物制备 取11批前期处理好的药材。按照文献[7]报道的方法进行提取。250g样品用80%乙醇回流提取3次,每次0.5h,料液比为1:15,过滤合并滤液,减压蒸馏回收乙醇,蒸至约400mL后转入蒸发皿,蒸至浸膏状,即得。再采用萃取硅胶柱层析法纯化提取物,干法装柱,将浸膏状提取物与硅胶按1:1比例拌样,70%甲醇洗脱,减压蒸馏回收甲醇,药液浓缩至浸膏状进行冷冻干燥,得到冻干粉,编号与表1一致。

### 2.2 HPLC指纹图谱建立

2.2.1 色谱条件 InertSustainC<sub>18</sub>色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~30min, 5%~28%A; 30~78min, 28%~80%A; 78~88min, 80%A; 88~100min, 20%~100%A);柱温30℃;体积流量1.0mL/min;检测波长270nm;进样量10μL。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称定“2.1”项下冻干粉(A10)0.2g,置于50mL锥形瓶中,25mL甲醇超声(100Hz、30Hz)提取5min,溶解后冷却静置至室温,甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的芹菜素对照品0.58mg,置于25mL量瓶中,甲醇溶解定容至刻度,摇匀,即得(0.0232mg/mL)。

2.2.4 图谱生成 将对照品、供试品溶液按在2.2.1”项色谱条件下进样测定,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)”,将供试品溶液中的色谱峰数据以中位数法生成对照指纹图谱,得到11个共有峰,见图1~3。

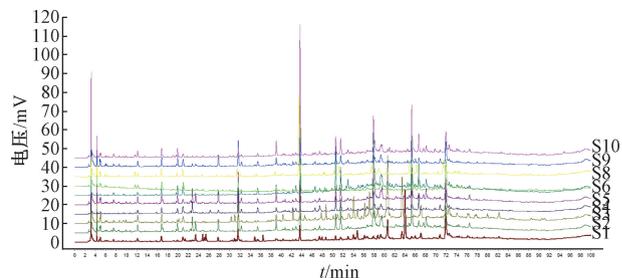


图1 11批样品HPLC指纹图谱

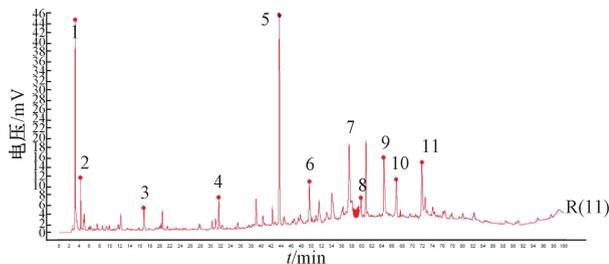
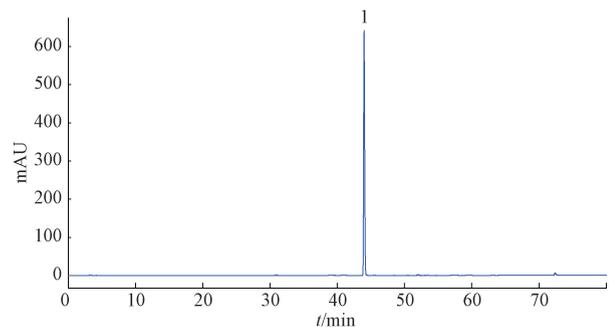


图2 共有峰HPLC色谱图



1. 芹菜素

图3 芹菜素对照指纹图谱

### 2.3 抗急性肝损伤研究

2.3.1 分组 140只大鼠随机分成14组,每组10只,分别为空白组(正常大鼠灌胃给予1mL/100g蒸馏水,每天1次,连续10d)、模型组(造模大鼠灌胃给予1mL/100g蒸馏水,每天1次,连续10d)、阳性药组(造模大鼠灌胃给予3mg/kg联苯双酯滴丸混悬液<sup>[8-9]</sup>,每天1次,连续10d)、乙醇提取物组A1~A11(造模大鼠灌胃给予100mg/kg乙醇提取物混悬液<sup>[10]</sup>,每天1次,连续10d)。

2.3.2 模型建立 各组大鼠连续灌胃给药10d,于第10天给药后2h开始造模,当天大鼠禁食不禁水。除空白组外,其余各组大鼠均腹腔注射含10%四氯化碳的花生油液,剂量5mL/kg<sup>[10]</sup>,建立急性肝损伤模型。

2.3.3 指标检测 大鼠末次灌胃给药后禁食,24h后采集指标,称定体质量,腹腔注射10%水合氯醛溶液麻醉后,腹主动脉取血,4℃下5000r/min离心15min,取血清,-80℃下冷冻保存。采用ELISA法,检测ALT、AST水平<sup>[11]</sup>。

2.3.4 结果分析 通过SPSS 21.0软件进行处理,组间比较采用两样本均数t检验,以P<0.05为差异具有统计学意义,结果见表2。由此可知,与空白组比较,模型组AST、ALT水平升高(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,各给药组AST、ALT水平均降低(P<0.05, P<0.01)。

### 2.4 谱效关系研究

2.4.1 灰色关联度分析 灰色关联分析法是衡量因素间关联程度的分析方法,亦称“灰色关联度”,来自于20世纪80年代邓聚龙教授提出并创立的一门新兴学科——灰色系统理论<sup>[12]</sup>,近年来该方法在中药谱效关系研究中的应用较为广泛。

表2 乙醇提取物对血清ALT、AST水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	ALT/(IU·L <sup>-1</sup> )	AST/(IU·L <sup>-1</sup> )
空白组	—	9.852±5.941	10.344±1.434
模型组	—	31.327±21.123 <sup>**</sup>	21.170±4.246 <sup>##</sup>
阳性药组	3	11.124±9.628 <sup>##</sup>	13.876±2.745 <sup>**</sup>
乙醇提取物组 A1	100	19.567±16.186 <sup>#</sup>	14.034±1.505 <sup>#</sup>
乙醇提取物组 A2	100	17.572±13.338 <sup>##</sup>	13.958±1.254 <sup>#</sup>
乙醇提取物组 A3	100	15.759±13.437 <sup>##</sup>	12.554±1.758 <sup>##</sup>
乙醇提取物组 A4	100	11.534±9.596 <sup>##</sup>	12.715±1.476 <sup>##</sup>
乙醇提取物组 A5	100	9.498±7.777 <sup>##</sup>	13.307±1.599 <sup>#</sup>
乙醇提取物组 A6	100	14.769±11.407 <sup>##</sup>	13.347±1.604 <sup>#</sup>
乙醇提取物组 A7	100	17.659±7.450 <sup>##</sup>	11.315±2.337 <sup>##</sup>
乙醇提取物组 A8	100	15.592±8.591 <sup>##</sup>	9.856±1.625 <sup>##</sup>
乙醇提取物组 A9	100	18.858±10.211 <sup>#</sup>	13.136±3.559 <sup>#</sup>
乙醇提取物组 A10	100	21.252±10.386 <sup>#</sup>	11.400±3.670 <sup>##</sup>
乙醇提取物组 A11	100	18.117±10.576 <sup>#</sup>	13.190±2.944 <sup>#</sup>

注:与空白组比较,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

本实验将指纹图谱共有峰的相对峰面积作为子序列(表3),抗急性肝损伤的药效指标(AST、ALT)作为母序列(表4),采用均值法分别对参考序列、比较序列进行无量纲化处理,计算灰色关联系数、关联序,结果见表5。由此可知,各共有峰与AST、ALT的相关系数均大于

0.749,即与药效具有较密切的相关性,其中5、1号峰关联度较高( $>0.9$ ),表明乙醇提取物抗急性肝损伤的作用是通过其内部“有效组分群”的协同作用所致,贡献值依次为5号峰(芹菜素) $>1$ 号峰 $>9$ 号峰 $>6$ 号峰 $>7$ 号峰 $>2$ 号峰 $>11$ 号峰 $>4$ 号峰 $>9$ 号峰 $>8$ 号峰 $>3$ 号峰。

表3 各共有峰相对峰面积

编号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
1	1.506	0.744	0.050	0.854	0.744	0.150	0.160	0.211	0.668	0.605	0.160
2	0.234	0.188	0.239	0.123	0.188	0.234	0.034	0.053	0.119	0.310	0.034
3	0.392	0.215	0.268	0.520	0.080	0.161	0.171	0.114	0.169	0.395	0.171
4	0.922	0.662	0.570	2.015	0.662	0.323	0.343	0.113	0.568	0.959	0.343
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	0.259	0.337	0.214	1.164	0.337	1.025	1.225	0.068	0.353	0.608	1.225
7	0.297	0.990	0.136	1.574	0.990	1.329	1.429	0.108	0.999	0.601	1.429
8	0.509	0.308	0.594	0.968	0.308	0.378	0.478	0.118	0.152	0.544	0.478
9	3.783	1.522	1.624	1.895	1.522	1.886	1.586	0.226	1.442	0.643	1.586
10	0.620	0.196	0.641	1.424	0.196	0.867	0.767	0.153	0.176	0.177	0.767
11	2.312	0.934	1.145	2.837	0.934	1.178	1.168	0.228	0.458	1.111	1.168

表4 11批样品血清ALT、AST水平降低率

编号	AST/%	ALT/%	编号	AST/%	ALT/%
A1	34	21	A7	25	19
A2	32	24	A8	19	12
A3	24	29	A9	28	36
A4	29	29	A10	24	23
A5	26	34	A11	28	17
A6	37	12			

表5 各共有峰与AST、ALT水平降低率的关联度

AST	关联度	关联序	ALT	关联度	关联序
1	0.949	2	1	0.907	2
2	0.867	6	2	0.896	6
3	0.748	11	3	0.766	11
4	0.847	8	4	0.818	8
5	0.960	1	5	0.999	1
6	0.877	4	6	0.907	4
7	0.871	5	7	0.873	5
8	0.759	10	8	0.820	10
9	0.894	3	9	0.900	3
10	0.826	9	10	0.803	9
11	0.861	7	11	0.851	7

2.4.2 多元线性回归分析 选择各共有峰相对峰面积的量化特征峰数据作为自变量( $X$ ),成分峰依次设为 $X_1、X_2、\dots、X_{11}$ ,给药组AST、ALT水平降低率分别作为 $Y_1、Y_2$ ,采用SPSS 21.0软件,通过后退法建立多元线性回归方程。结果, $X_1、X_8$ 与抗AST呈正相关,而 $X_2$ 与抗AST效应呈负相关,谱效关系方程为 $Y_1 = 0.289 + 0.008X_1 - 0.015X_2 + 0.008X_8$  ( $P<0.01, R^2 = 0.960$ ); $X_3、X_8$ 与抗ALT效应呈正相关,谱效关系方程为 $Y_2 = 0.245 + 0.015X_3 - 0.034X_8$  ( $P<0.01, R^2 = 0.929$ ),表明方程中各自变量均有显著相关性。

### 3 讨论

灰色关联度分析作为一种对模糊系统研究的有效手段,目前在各个行业领域中得到了广泛应用<sup>[13]</sup>,将其应用于中药材质量差异评价也是一种趋势,它能描述系统发展过程中各因素之间的相对变化,适用于解决中药多成分、多类别、多指标的复杂体系的问题,而多元线性回归分析是研究1个因变量( $Y$ )与1个或多个自变量( $X$ )之间是否存在

在线性关系的方法<sup>[14]</sup>。由于相关分析方法中包括灰色关联度分析,而多元线性回归分析是其中1个分支,是将变量相关关系转变为函数关系并建立表达式,用于研究变量间数量变动关系的分析方法,故灰色关联分析是多元线性回归分析的基础,两者既相互区别,又相辅相成。因此,本实验采用灰色关联分析和多元线性回归分析研究拳卷地钱乙醇提取物 HPLC 指纹图谱与其对四氯化碳诱导大鼠急性肝损的保护作用的谱效关系,以期探索指纹图谱和药效之间的相关性。

结果,各色谱峰与药效的相关系数均大于 0.7,指纹图谱所建立的特征峰与拳卷地钱乙醇提取物抗急性肝损伤药效均呈正相关,表明芹菜素及其他未确定结构的化合物是其活性的基础物质,与其药效有较大关联。根据关联度大小,确定 11 个特征峰对抗急性肝损伤作用贡献的依次序为 5 号峰(芹菜素) > 1 号峰 > 9 号峰 > 6 号峰 > 7 号峰 > 2 号峰 > 11 号峰 > 4 号峰 > 9 号峰 > 8 号峰 > 3 号峰,关联度越大,活性越强。

多元线性回归后退法是在灰色关联分析结果的基础上,通过 SPSS 21.0 软件将拳卷地钱乙醇提取物 HPLC 指纹图谱峰信息与抗急性肝损伤药效相结合,建立谱效关系方程,以进一步了解各共有峰与抗急性肝损伤药效的关系,同时验证灰色关联度分析的可行性与可靠性。本实验通过 8 批样品的共有峰和药效数据建立拳卷地钱乙醇提取物抗急性肝损伤谱效关系方程,分别为抗 AST,  $Y_1 = 0.289 + 0.008X_1 - 0.015X_2 + 0.008X_8$  ( $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.960$ ),  $X_1 > X_2 > X_8$ ; 抗 ALT,  $Y_2 = 0.245 + 0.015X_5 - 0.034X_8$  ( $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.929$ ),  $X_5 > X_8$ , 与灰色关联度分析结果基本一致,而且该方程合理有效,可用于抗急性肝损伤药效的预测,并对各共有特征峰所代表化学成分与抗急性肝损伤药效的关系有更深入的了解,在一定程度上解决了成分与药效断层的问题,对该药材全面的质量分析具有重要的理论意义和实践价值。

## 参考文献:

- [1] 朱 华. 广西地钱属药用植物资源调查和形态构造研究 [C] // 第 7 届全国中药标本馆专业学术讨论会 (第三届全国《中药鉴定学》研讨会) 论文集. 成都: 中国中药药学会, 2002: 161-165.
- [2] Zinsmeister H D, 王 洁. 苔藓植物是生物活性物质的一个资源吗? [J]. 国外医药 (植物药分册), 1994, 9(5): 203-209.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编写组. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 324-325.
- [4] 程青云. 布渣叶总黄酮调血脂谱效关系研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [5] 秦子茹. 一枝蒿黄酮类成分抗病毒作用的谱效关系研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015.
- [6] 许雯雯, 王 帅, 孟宪生, 等. 神经网络结合灰色关联度法对气滞胃痛颗粒复方药材抗炎活性谱效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1806-1811.
- [7] 朱 华. 拳卷地钱中黄酮类化合物的分离纯化、结构表征及生物活性研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2004.
- [8] 刘建勋. 中药新药药效学实验研究方法 with 要求 [J]. 中药新药与临床药理, 1998, 9(2): 114-117.
- [9] 白关亚. 基于谱效关联研究青翘与老翘的药效物质基础 [D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2017.
- [10] 王跃峰, 张可锋, 周雨晴, 等. 拳卷地钱总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用及其作用机制 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 277-279.
- [11] 乔靖怡, 李汉伟, 付双楠, 等. 山楂总黄酮对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(5): 52-55.
- [12] 邓聚龙. 灰色系统理论教程 [M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1990: 1-20.
- [13] 李 峰, 张振秋. 动物药材品质评价体系的构建 [J]. 中药材, 2011, 34(11): 1653-1656.
- [14] 马志庆, 周介南. 医药数理统计 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 146-148.