

瑶药上山虎成分分析、指纹图谱建立及抗炎谱效关系研究[△]

秦 丹^{1*}, 傅 鹏¹, 曹家杰¹, 唐清晨¹, 高 洁^{2#} (1. 广西中医药大学广西壮瑶药重点实验室, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学图书馆, 南宁 530200)

中图分类号 R917; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)18-2244-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.18.05



摘要 **目的** 分析瑶药上山虎的化学成分, 建立指纹图谱, 并探讨其抗炎作用的谱效关系。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱技术分析上山虎药材(编号S6)的化学成分; 采用高效液相色谱法建立10批广西不同产地上山虎样品(编号S1~S10)的指纹图谱, 并进行相似度评价和化学模式识别分析; 以脂多糖诱导构建RAW264.7炎症细胞模型, 考察上山虎的抗炎活性; 以一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 抑制率为药效学指标, 采用灰色关联度分析和偏最小二乘法回归分析评价上山虎抗炎作用的谱效关系。**结果** 从上山虎药材中共鉴定出黄酮类、酚酸类、脂类等60个化学成分; 从10批样品指纹图谱中共标定了14个共有峰, 相似度为0.883~0.991; 共指认了3个共有峰, 依次为新绿原酸(峰5)、绿原酸(峰7)、丁香醛(峰10)。系统聚类分析和主成分分析的分类结果基本一致; 10批样品均可显著降低细胞上清液中NO、TNF- α 、IL-6(S5除外)、IL-1 β 水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其对上述炎症指标的抑制率分别为10.26%~39.96%、14.96%~31.36%、1.38%~21.27%、18.54%~28.00%; 新绿原酸、丁香醛及峰1、3、9、12、14对应成分与上山虎抗炎作用的关联性较强。**结论** 本研究分析了瑶药上山虎的化学成分, 并建立了10批广西不同产地上山虎样品的HPLC指纹图谱; 各批样品均具有一定的抗炎活性, 其中新绿原酸、丁香醛及峰1、3、9、12、14对应成分可能是其抗炎药效成分。

关键词 瑶药; 上山虎; 化学成分; 指纹图谱; 抗炎作用; 谱效关系; 广西不同产地

Study on component analysis, fingerprint establishment and anti-inflammatory spectrum-effect relationship of Yao ethnic medicine *Pittosporum pauciflorum*

QIN Dan¹, FU Peng¹, CAO Jiajie¹, TANG Qingchen¹, GAO Jie² (1. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Library of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To analyze chemical components of Yao ethnic medicine *Pittosporum pauciflorum*, establish its fingerprint and investigate the spectrum-effect relationship of its anti-inflammatory effect. **METHODS** UHPLC-Q-Orbitrap-MS technology was used to analyze the chemical components of *P. pauciflorum* (batch S6). The fingerprints for 10 batches of *P. pauciflorum* from different producing areas in Guangxi Province (batches S1-S10) were established by HPLC, and similarity assessment and chemometric pattern recognition analysis were conducted. RAW264.7 inflammatory cell model was induced by lipopolysaccharide, and the anti-inflammatory activity of *P. pauciflorum* was investigated. Using inhibition rates of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β as efficacy indicators, grey relational analysis and partial least squares regression analysis were adopted to evaluate the spectrum-effect relationship of the anti-inflammatory effect of *P. pauciflorum*. **RESULTS** There were 60 chemical components, including flavonoids, phenolic acids, lipids, etc., identified in *P. pauciflorum*. The fingerprints for 10 batches of *P. pauciflorum* showed 14 common peaks, with similarity values ranging from 0.883 to 0.991. Three common peaks were assigned neochlorogenic acid (peak 5), chlorogenic acid (peak 7), and syringaldehyde (peak 10). The classification results of the systematic clustering analysis and the principal component analysis were basically consistent.

Batches S1 to S10 of *P. pauciflorum* significantly reduced the levels of NO, TNF- α , IL-6 (except for batch S5) and IL-1 β in the cell supernatant ($P<0.05$ or $P<0.01$). Inhibition rates of above inflammatory indexes were 10.26%-39.96%, 14.96%-31.36%, 1.38%-21.27%, 18.54%-28.00%, respectively. The contents of neochlorogenic acid, syringaldehyde, as well as the components corresponding to peaks 1, 3, 9, 12 and 14, exhibited a strong correlation with the anti-inflammatory effects of *P. pauciflorum*. **CONCLUSIONS** The present study has analyzed the chemical components of *P. pauciflorum* and

[△]基金项目 国家重点研发计划课题(No.2019YFC1712304); 广西壮族自治区重点实验室培育基地建设项目——广西壮瑶药重点实验室(No.桂科基字[2014]32号); 广西协同创新中心建设项目——壮瑶药协同创新中心(No.桂教科研[2014]13号); 广西壮族自治区工程研究中心建设项目——广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心(No.桂发改高技函[2020]2605号)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中药(壮瑶药)鉴定。E-mail: 994292688@qq.com

通信作者 讲师。研究方向: 民族医药研究。E-mail: 709016818@qq.com

established HPLC fingerprints for 10 batches of *P. pauciflorum*. Each batch of medicinal herbs demonstrates certain anti-inflammatory activities, among which neochlorogenic acid, syringaldehyde, and the components corresponding to peaks 1, 3, 9, 12 and 14 are likely to be the active anti-inflammatory components.

KEYWORDS Yao ethnic medicine; *Pittosporum pauciflorum*; chemical components; fingerprint; anti-inflammatory effect; spectrum-effect relationship; different producing areas in Guangxi Province

瑶药上山虎,源自海桐科植物少花海桐 *Pittosporum pauciflorum* Hook. & Arn. 的干燥茎枝^[1],属于药效迅猛的“虎类药”,具有抗炎、镇痛、抑菌、抗肿瘤等药理作用,常用于祛风除湿、活血化瘀和消肿止痛等^[2]。然而,目前针对其化学成分和药理作用的系统研究有限,仅涉及DNA条形码^[1]、药材鉴别^[3]、挥发油化学成分^[4]以及镇痛作用领域^[5],一定程度上制约了该民族药临床应用价值的深度挖掘及科学评价。近年来,探讨中药民族药化学成分群与药效活性之间的关联规律逐渐成为学界的研究热点之一,通过关联指纹图谱与药效学数据,揭示多成分协同作用机制已成为中药现代化研究的重要方向^[6]。本研究以瑶药上山虎为对象,采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UHPLC-Q-Orbitrap-MS)技术分析其化学成分,结合高效液相色谱(HPLC)法构建广西不同产地上山虎药材的指纹图谱,通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的RAW264.7巨噬细胞评价各批上山虎药材的体外抗炎活性,借助灰色关联度分析和偏最小二乘法回归分析评价指纹图谱和抗炎药效之间的关系^[7],以期为阐明瑶药上山虎抗炎作用的物质基础、筛选质量标志物及后续新药研发提供试验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Dionex™ UltiMate 3000 型UHPLC仪、Q Exactive™组合型四极杆-Orbitrap质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、Direct-Q® 5UV型超纯水仪(美国 Millipore 公司)、SQP型十万分之一分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、Agilent 1260型HPLC仪(美国 Agilent 公司)、Epoch2型全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)、CKX53型倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司)、C170型CO₂培养箱(德国 Binder 公司)等。

1.2 主要药品与试剂

新绿原酸对照品(纯度≥98%,批号 Yz080722)购自南京源植生物科技有限公司;绿原酸对照品(纯度98.40%,批号 MUST-21070910)购自曼斯特(成都)生物科技有限公司;丁香醛对照品(纯度≥98%,批号 R09J6Y1)购自上海源叶生物科技有限公司;CCK-8试剂盒(批号 20240228)购自苏州新赛美生物科技有限公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)测定试剂盒(批号 112223240711)购自上海碧云天生物技术有限公司;白细胞介素1β(interleukin-1β, IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子

α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为 JQ-00039A、JQ-00162A、JQ-00131A)均购自上海酶联生物科技有限公司;LPS(批号 3230506004)购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM不完全高糖培养液(批号 20240913)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;甲醇、磷酸、甲酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

10批广西不同产地上山虎药材经广西中医药大学壮医药学院韦松基教授鉴定为海桐科植物少花海桐 *P. pauciflorum* Hook. & Arn. 的干燥茎枝,具体信息见表1。

表1 10批上山虎药材的产地及采集时间

编号	产地	采集时间	编号	产地	采集时间
S1	桂林市资源县两水乡	2024-01-18	S6	桂林市恭城县平安乡	2022-07-21
S2	桂林市永福县	2024-04-24	S7	来宾市金秀县金秀镇六巷	2023-08-03
S3	梧州市藤县狮山森林公园	2023-11-24	S8	来宾市金秀县和平村河口石崖边	2023-08-01
S4	来宾市金秀县三角乡	2023-08-02	S9	百色市田林县百乐乡	2022-05-10
S5	桂林市恭城县三江乡	2024-01-12	S10	玉林市江南区	2023-07-17

1.3 细胞

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由广西中医药大学广西壮瑶药重点实验室提供。

2 方法与结果

2.1 上山虎药材冻干粉末的制备

取上山虎药材,粉碎,过三号筛,称取粗粉 50 g,置于煎药袋内,加入 12 倍量水,煎煮 40 min×2 次,过滤,合并 2 次滤液,于 60 °C 下减压浓缩,得质量浓度为 2 g/mL (以生药量计)的药液;冷却后,加入无水乙醇,使乙醇含量达到 60%,静置后,吸取上清液,回收乙醇至无醇味,得稠膏,经冷冻干燥后研磨成粉末(得率为 16.44%)。

2.2 化学成分分析

采用 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 技术分析。

2.2.1 样品溶液制备

取“2.1”项下上山虎药材(编号 S6)冻干粉末适量,加入 70% 甲醇 1 mL,涡旋 30 s,超声(功率 100 W,频率 40 kHz)20 min 使溶解,再于 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 针头式无菌膜过滤,即得样品溶液,备测。

2.2.2 检测条件

以 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱;以 0.1% 甲酸溶液(A)-甲醇(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 5%B→20%B; 5~18 min,

20%B→95%B; 18~23 min, 95%B; 23~23.1 min, 95%B→5%B; 23.1~25 min, 5%B); 流速为0.30 mL/min; 柱温为35 °C; 进样量为5 μL。

采用电喷雾电离源进行正、负离子扫描和 full mass/dd-MS² 检测; 分辨率分别为70 000(full mass)、17 500(dd-MS²), 扫描范围为 m/z 100.0~1 000.0; 碰撞电压梯度为40、60、80 V(归一化碰撞能量模式)。

2.2.3 数据分析与结构鉴定

取“2.2.1”项下样品溶液, 按“2.2.2”项下检测条件进样分析, 记录色谱、质谱数据, 结合 Compound Discoverer 3.0 软件进行数据库检索及数据分析, 匹配的目标数据库包含 MzCloud 和 ChemSpider 数据库。结合数据库信息并检索相关文献^[8-18], 本研究从上山虎药材中共鉴定出60个化学成分, 包括黄酮类(芦丁等)、酚酸类(绿原酸等)、酯类(棕榈油酸乙酯等)、香豆素类(东莨菪内酯等)和萜类(柠檬醛等)等化学成分(限于篇幅, 成分鉴定结果可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附表1)。

2.3 HPLC 指纹图谱分析

2.3.1 供试品溶液制备

分别精密称取“2.1”项下各批上山虎药材冻干粉末625.00 mg, 置于5 mL 容量瓶中, 加水超声溶解并定容, 即得供试品溶液。

2.3.2 混合对照品溶液制备

分别精密称取新绿原酸、绿原酸、丁香醛对照品1.60、3.95、0.60 mg, 置于5 mL 容量瓶中, 加水超声溶解并定容, 即得混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件

以 Agilent 5 TC-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱; 以0.3% 磷酸溶液(A)-甲醇(B)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min, 10%B→18%B; 15~20 min, 18%B→19%B; 20~28 min, 19%B→25%B; 28~30 min, 25%B→27%B; 30~36 min, 27%B; 36~40 min, 27%B→30%B; 40~50 min, 30%B→36%B; 50~60 min, 36%B→39%B; 60~70 min, 39%B→43%B); 流速为0.9 mL/min; 柱温为30 °C; 检测波长为296 nm; 进样量为10 μL。

2.3.4 方法学考察

取“2.3.1”项下供试品溶液(编号S6), 按“2.3.3”项下色谱条件连续进样6次, 以峰7(峰面积较大、出峰稳定且保留时间适中)为参照峰, 计算得各共有峰相对峰面积的RSD<3%, 相对保留时间的RSD<2%($n=6$), 表明方法精密度良好。取“2.3.1”项下供试品溶液(编号S6), 分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 同法计算得各共有峰相对峰面积的RSD<3%, 相对保留时间的RSD<2%($n=6$), 表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。取“2.1”项下上山虎药材(编号S6)冻干粉末6份, 按“2.3.1”项下方法制备供

试品溶液, 再按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 同法计算得各共有峰相对峰面积的RSD<3%, 相对保留时间的RSD<2%($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.3.5 指纹图谱的建立及化学成分的指认

取上山虎药材(编号S1~S10), 按“2.1”项下方法制备冻干粉末, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。将10批上山虎样品的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》, 以S1作为参照图谱, 经多点校正和 Marker 峰匹配, 生成对照指纹图谱(R)和10批上山虎样品的叠加指纹图谱(图1)。由图1可知, 10批样品共有14个共有峰; 各批次上山虎样品图谱与对照指纹图谱的相似度为0.883~0.991, 表明广西不同产地上山虎药材的成分相似。

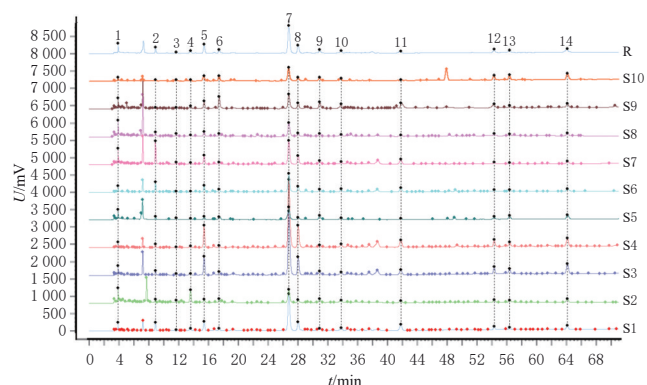
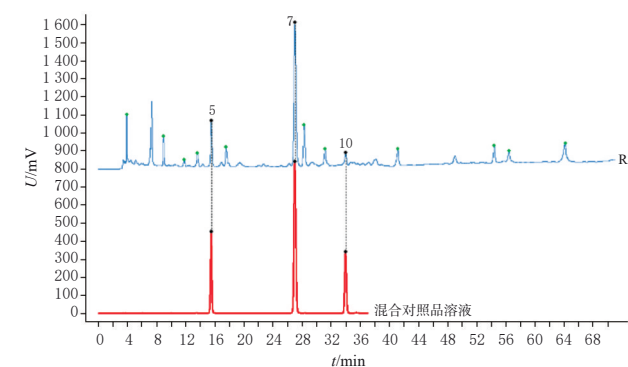


图1 10批上山虎样品的叠加指纹图谱和对照指纹图谱R

取“2.3.2”项下混合对照品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图(图2)。通过将混合对照品溶液图谱与对照指纹图谱进行比对, 共指认3个共有峰, 依次为新绿原酸(峰5)、绿原酸(峰7)、丁香醛(峰10)。



5: 新绿原酸; 7: 绿原酸; 10: 丁香醛。

图2 混合对照品溶液图谱与对照指纹图谱R的比对结果

2.3.6 化学模式识别分析

(1) 系统聚类分析: 分别将10批上山虎药材的共有峰峰面积导入 SPSS 27 软件, 采用组间联接法, 以平方欧氏距离作为度量标准进行系统聚类分析。结果(图3)显示, 当平方欧氏距离为25时, 10批上山虎样品被分为2类, 其中S3、S4为一类, 其余批次为一类; 当平方欧氏距

离为15时,10批样品被分为3类,S3、S4为一类,S9、S10为一类,其余批次为一类;当平方欧氏距离为10时,10批样品被分为4类,S3、S4为一类,S9、S10为一类,S1、S6、S7为一类,S2、S5、S8为一类。这表明S3、S4样品的化学成分始终与其他批次存在明显差异。

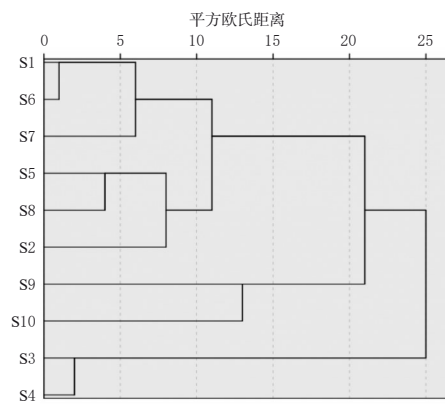


图3 10批上山虎样品的系统聚类分析结果

(2)主成分分析:分别将10批上山虎药材的共有峰峰面积导入SPSS 27.0和SIMCA 14.1软件,以主成分的特征值及累计方差贡献率作为判断标准进行主成分分析。结果显示,主成分特征值>1的前4个成分的方差贡献率分别为41.559%、30.725%、10.886%、7.618%,累计方差贡献率达90.788%,说明这4个成分可以代表14个共有峰90.788%的信息;其中,主成分1和主成分2的累计方差贡献率达72.284%,表明二者在解释总体变异方面具有主导作用。主成分信息归属分析结果显示,主成分1信息源自共有峰12、14、5、7、8、11、1,主成分2信息源自共有峰13、10、6、9、11、2,表明上述色谱峰对应成分可能对上山虎药材的质量具有较大影响。主成分分析得分图(图4)显示,S3、S4为一类,且与其余批次样品相距较远;S9、S10和S1、S2、S5~S8各为一类,与系统聚类分析结果(平方欧氏距离=15)一致。

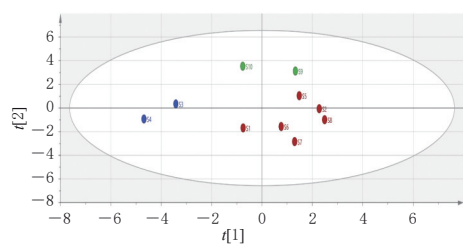


图4 10批上山虎样品的主成分分析得分图

2.4 抗炎作用评价

取对数生长期的RAW264.7细胞,按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,将其分为正常组、模型组(1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS)和上山虎组(S1~S10组,以“2.1”项下上山虎药材冻干粉末质量计60 $\mu\text{g/mL}$ +1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS,上山虎剂量根据本课题组前期CCK-8实验结果设置),每组设置6个复孔。经(含药)培养基孵育24 h后,收集各组细胞培养液,以4 000 r/min离心15 min,取上

清液,按相应试剂盒说明书操作,使用酶标仪检测炎症因子(NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α)水平,并计算10批上山虎药材对各炎症指标的抑制率:抑制率=(模型组指标水平-药物组指标水平)/模型组指标水平 $\times 100\%$ 。采用GraphPad Prism 8软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较使用Tukey多重检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结果(表2、表3)显示,与正常组比较,模型组细胞上清液中NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著升高($P<0.01$),提示炎症细胞模型构建成功;与模型组比较,S1~S10组细胞上清液中NO、IL-1 β 、IL-6(S5组除外)、TNF- α 水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),S1~S10样品对上述炎症因子的抑制率分别为10.26%~39.96%、14.96%~31.36%、1.38%~21.27%、18.54%~28.00%。

表2 10批上山虎药材对RAW264.7细胞上清液中炎症因子水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	NO/($\mu\text{mol/L}$)	IL-1 β /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
正常组	1.77 $\pm$ 0.26	23.34 $\pm$ 0.57	24.19 $\pm$ 0.41	155.42 $\pm$ 4.75
模型组	11.81 $\pm$ 0.49 ^a	36.92 $\pm$ 2.03 ^a	33.21 $\pm$ 0.35 ^a	199.73 $\pm$ 2.11 ^a
S1组	10.60 $\pm$ 0.69 ^a	31.40 $\pm$ 1.37 ^c	29.39 $\pm$ 0.01 ^c	148.60 $\pm$ 5.72 ^c
S2组	7.96 $\pm$ 0.49 ^a	26.66 $\pm$ 0.64 ^c	31.40 $\pm$ 0.36 ^b	156.90 $\pm$ 3.17 ^c
S3组	9.17 $\pm$ 0.34 ^a	28.66 $\pm$ 0.91 ^c	27.08 $\pm$ 0.65 ^c	151.06 $\pm$ 2.56 ^c
S4组	7.44 $\pm$ 0.15 ^a	29.89 $\pm$ 0.33 ^c	26.43 $\pm$ 1.01 ^c	143.81 $\pm$ 3.62 ^c
S5组	9.08 $\pm$ 0.15 ^a	30.41 $\pm$ 0.28 ^c	32.75 $\pm$ 0.14	162.71 $\pm$ 0.92 ^c
S6组	7.09 $\pm$ 0.01 ^a	28.52 $\pm$ 0.83 ^c	26.62 $\pm$ 1.39 ^c	146.32 $\pm$ 0.46 ^c
S7组	8.91 $\pm$ 0.13 ^a	28.74 $\pm$ 0.22 ^c	27.97 $\pm$ 0.10 ^c	160.89 $\pm$ 5.56 ^c
S8组	8.43 $\pm$ 0.07 ^a	25.34 $\pm$ 0.46 ^c	28.81 $\pm$ 0.22 ^c	156.90 $\pm$ 3.17 ^c
S9组	8.35 $\pm$ 0.33 ^a	29.46 $\pm$ 1.23 ^c	27.82 $\pm$ 0.14 ^c	146.13 $\pm$ 3.20 ^c
S10组	7.48 $\pm$ 0.13 ^a	27.14 $\pm$ 0.30 ^c	26.14 $\pm$ 0.43 ^c	156.22 $\pm$ 2.30 ^c

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$ 。

表3 10批上山虎药材对RAW264.7细胞上清液中炎症因子的抑制率(%)

编号	NO	IL-1 β	IL-6	TNF- α
S1	10.26	14.96	11.50	25.60
S2	32.62	27.80	5.43	21.45
S3	22.36	22.39	18.45	24.37
S4	37.02	19.05	20.41	28.00
S5	23.09	17.65	1.38	18.54
S6	39.96	22.76	19.85	26.74
S7	24.56	22.15	15.77	19.45
S8	28.59	31.36	13.24	21.45
S9	29.33	20.20	16.23	26.84
S10	36.66	26.49	21.27	21.78

2.5 上山虎抗炎作用谱效关系分析

2.5.1 灰色关联度分析

采用均值化法对10批上山虎药材的共有峰峰面积和炎症指标(抑制率)进行无量纲化处理,以上山虎各共有峰峰面积作为比较序列,以上山虎对细胞各炎症指标的抑制率作为参考序列,进行灰色关联度分析(当关联度 ≥ 0.6 时,表示共有峰与药效学指标存在关联;当关联

度 ≥ 0.8 时,表示共有峰与药效学指标存在较强关联^[19])。

结果(表4)显示,14个共有峰与NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的抑制率均存在关联。其中,共有峰10、9、1与NO抑制率,共有峰3、1、10、9与IL-1 β 抑制率,共有峰10、12、5、14与IL-6抑制率,以及共有峰10、9、5、12与TNF- α 抑制率的关联性较强。

表4 上山虎药材化学成分与药效学指标的灰色关联度分析结果

关联序号	NO抑制率		IL-1 β 抑制率		IL-6抑制率		TNF- α 抑制率	
	关联度	峰号	关联度	峰号	关联度	峰号	关联度	峰号
1	0.83	10	0.86	3	0.83	10	0.87	10
2	0.82	9	0.85	1	0.82	12	0.82	9
3	0.80	1	0.83	10	0.82	5	0.80	5
4	0.79	3	0.82	9	0.81	14	0.80	12
5	0.78	6	0.77	6	0.79	8	0.79	1
6	0.77	12	0.76	12	0.79	9	0.78	14
7	0.77	14	0.75	14	0.78	13	0.78	6
8	0.74	4	0.75	5	0.78	11	0.78	4
9	0.74	13	0.74	4	0.76	3	0.78	3
10	0.73	5	0.73	13	0.76	7	0.78	7
11	0.70	2	0.70	8	0.76	1	0.77	13
12	0.70	7	0.70	7	0.76	6	0.76	8
13	0.69	11	0.69	11	0.76	4	0.76	11
14	0.69	8	0.68	2	0.74	2	0.74	2

2.5.2 偏最小二乘法回归分析

以10批上山虎药材各共有峰峰面积的无纲量化值为自变量,以上山虎对细胞各炎症指标抑制率的无纲量化值为因变量,采用SIMCA 14.1软件进行偏最小二乘法回归模型拟合,得到各共有峰与炎症指标抑制率的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值和标准化回归系数。

结果(表5)显示,对于NO抑制率,峰1、11、2、3、5的VIP值均大于1。峰1、4、5、8~11、13、14与NO抑制率的标准化回归系数均大于0,提示对应成分含量与NO抑制率呈正相关;其余共有峰与NO抑制率的标准化回归系数均小于0,提示对应成分含量与NO抑制率呈负相关。对于IL-1 β 抑制率,峰3、1、5、8的VIP值均大于1。峰1~3、6、7、14与IL-1 β 抑制率的标准化回归系数均大于0,提示对应成分含量与IL-1 β 抑制率呈正相关;其余共有峰与IL-1 β 抑制率的标准化回归系数均小于0,提示对应成分含量与IL-1 β 抑制率呈负相关。对于IL-6抑制率,峰5、9、8、1、3、4的VIP值均大于1。峰1、2、5~7、10、12、14与IL-6抑制率的标准化回归系数均大于0,提示对应成分含量与IL-6抑制率呈正相关;其余共有峰与IL-6抑制率的标准化回归系数均小于0,提示对应成分含量与IL-6抑制率呈负相关。对于TNF- α 抑制率,峰2、5、4、8、1、3的VIP值均大于1。峰3、6、7、9、11与TNF- α 抑制率的标准化回归系数均大于0,提示对应成分含量与TNF- α 抑制率呈正相关;其余共有峰与TNF- α 抑制率的标准化回归系数均小于0,提示对应成分含量与TNF- α 抑制率呈负相关。

表5 各炎症指标抑制率的VIP值及标准化回归系数

峰号	NO抑制率		IL-1 β 抑制率		IL-6抑制率		TNF- α 抑制率	
	VIP值	标准化回归系数	VIP值	标准化回归系数	VIP值	标准化回归系数	VIP值	标准化回归系数
1	1.340	1.209	1.380	0.217	1.077	0.147	1.025	-1.728
2	1.224	-1.042	0.676	0.737	0.826	0.813	1.366	-0.313
3	1.123	-0.578	1.588	0.095	1.054	-0.571	1.007	1.215
4	0.601	1.025	0.927	-0.039	1.016	-0.180	1.115	-0.944
5	1.038	1.161	1.228	-0.138	1.416	0.723	1.310	-2.015
6	0.695	-1.553	0.924	0.096	0.918	0.291	0.936	1.380
7	0.880	-1.726	0.947	0.578	0.924	0.215	0.965	1.263
8	0.942	1.935	1.218	-1.327	1.195	-0.950	1.044	-0.073
9	0.939	1.012	0.852	-0.393	1.211	-1.013	0.906	0.283
10	0.972	0.405	0.942	-0.485	0.834	0.118	0.871	-0.193
11	1.285	1.081	0.778	-0.939	0.752	-0.555	0.874	0.148
12	0.831	-0.198	0.617	-0.051	0.994	0.546	0.805	-0.334
13	0.872	1.391	0.690	-0.822	0.750	-0.758	0.784	-0.078
14	0.966	0.618	0.664	0.478	0.780	0.367	0.779	-1.509

3 讨论

本研究通过UHPLC-Q-Orbitrap-MS技术从上山虎药材(编号S6)中鉴定出了60个化学成分;采用HPLC法建立了10批上山虎药材的指纹图谱,并从共有峰中指出了3个成分(由于实验条件限制,本研究并未结合对照品指认更多的化学成分)。在初步鉴定出的60个化学成分中,酚酸类(绿原酸、丁香酸等)和黄酮苷类(异槲皮苷、芦丁等)能够通过抑制促分裂原活化的蛋白激酶/核因子 κ B通路、清除自由基来阻止促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6)产生;特征性脂肪酸衍生物(13S-hydroxy-9Z, 11E, 15Z-octadecatrienoic acid、12, 13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid)可转化为消退素,从而激活炎症消退程序并抑制白细胞浸润;香豆素类(东莨菪内酯等)也具有有良好的抗炎作用^[20-21]。这提示瑶药上山虎含有多个抗炎活性成分,为其后续抗炎作用机制的研究提供了新思路。

在建立广西不同产地上山虎药材HPLC指纹图谱前,本课题组对流动相(水-甲醇、水-乙腈、0.1%甲酸溶液-甲醇、0.1%磷酸溶液-甲醇、0.2%磷酸溶液-甲醇、0.3%磷酸溶液-甲醇)、检测波长(214 nm、286 nm、296 nm全波长扫描和310 nm单波长检测)、色谱柱[Gemini[®] C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Athena C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Agilent 5 TC-C₁₈(2)(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)]、流速(0.6、0.9、1.2 mL/min)、柱温(25、30、35 $^{\circ}$ C)进行了考察,最终确定了“2.3.3”项下色谱条件。在该条件下,所得10批上山虎样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度为0.883~0.991,提示广西不同产地上山虎药材的成分相似。

广西地区多为炎热潮湿气候,虽有利于特色药用植物的生长,但也与当地人群类风湿关节炎等慢性炎症性疾病的高发生率有关^[22]。当地少数民族积累了丰富的治疗经验,并发现了诸多可缓解炎症的天然药物,为民族药的进一步开发利用提供了可能^[23]。本研究以RAW264.7巨噬细胞为对象,使用LPS诱导建立炎症细

胞模型,结果显示,与正常组比较,模型组细胞上清液中炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO)水平均显著升高,提示模型构建成功;经上山虎干预后,上述炎症指标的分泌均受到不同程度的抑制,S1~S10对上述炎症因子的抑制率分别为10.26%~39.96%、14.96%~31.36%、1.38%~21.27%、18.54%~28.00%,提示各批药材均具有一定的抗炎活性。

中药谱效关系是基于中药指纹图谱共有峰峰面积,结合药效学指标表达强度,采用生物信息学方法构建谱效关系模型,寻找对药效学指标贡献较大的共有峰,进而分析与药效作用密切相关的物质基础^[24]。本研究结合灰色关联度分析和偏最小二乘法回归分析发现,共有峰1、3、5(新绿原酸)、9、10(丁香醛)、12、14对应成分均与上山虎抗炎作用有较强的关联性,但其含量均不高;共有峰7(绿原酸)含量最高,但其色谱峰的VIP值较小,与药效学指标的关联性有限。这提示药效的强弱并非与成分含量高低成正比,具体药效物质还有待进一步挖掘。此外,本研究仅建立了单一波长下指纹图谱与药效学指标的谱效关系,结果可能存在一定的局限性,故后续将围绕药效成分建立多维指纹图谱进一步完善。

综上所述,本研究分析了瑶药上山虎的化学成分,并建立了10批广西不同产地上山虎样品的HPLC指纹图谱;各批药材均具有一定的抗炎活性,其中新绿原酸、丁香醛及峰1、3、9、12、14对应成分可能是其抗炎药效成分。本研究初步证实了上山虎多成分的抗炎特点,并初步阐释了部分药效物质基础,为后续饮片炮制、生产及质量控制、相关组方研究奠定了基础。

参考文献

[1] 倪秀悦,傅鹏,张强,等.上山虎及其混淆品的DNA条形码鉴定[J/OL].分子植物育种,2024;1-13(2024-03-29)[2025-02-15].<https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=FZZW20240326002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.

[2] 陶伟辰,王志娟,安睿,等.瑶药及其方剂的传统理论基础与现代研究进展[J].中草药,2024,55(17):6051-6068.

[3] 陈义英,屈信成.瑶药少花海桐药材的鉴别研究[J].中药材,2022,45(12):2846-2849.

[4] 赵惠,柴玲,卢覃培,等.瑶药少花海桐茎皮挥发油化学成分研究[J].广西科学院学报,2017,33(2):143-146.

[5] 苏华,何飞,韦韡,等.少花海桐提取物镇痛作用及对胃肠功能影响的研究[J].中国热带医学,2015,15(2):137-140.

[6] 张建锋,侯长周,侯晓杰,等.基于谱效关联技术的中药质量控制研究进展[J].中华中医药学刊,2025,43(3):205-209,301.

[7] 邢耀莹,王姿杨,王露,等.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[J].中草药,2024,55(4):1237-1247.

[8] 肖艳,张婷,张英杰,等.基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS技术及网络药理学探讨化浊散结除痹方治疗痛风性关节炎的药效物质及潜在机制[J].中国中药杂志,2025,50(2):444-488.

[9] 吉生军,星玉秀,王静莹,等.青稞酒中53种塑料添加剂检测研究[J].食品研究与开发,2018,39(1):106-112.

[10] 周德勇,宋京美,王夏,等.UPLC-MS/MS鉴定北葶苈子的化学成分[J].华西药学杂志,2024,39(6):697-704.

[11] 王宇卿,黄涵.UPLC-Q-TOF/MS法分析瓜蒌薤白半夏汤中主要化学成分[J].中国医院药学杂志,2018,38(19):2017-2021.

[12] 费晓云,韦柳明,黎明慧,等.大花序桉树皮化学成分分析及其抗氧化活性研究[J].热带农业科学,2024,44(2):56-63.

[13] 甄丹丹,黄耀斌,卢显兴,等.基于UPLC-Q-TOF-MS和网络药理学探讨丝穗金粟兰水提物抗炎镇痛药效物质及作用机制[J].中草药,2023,54(12):3903-3910.

[14] 冯欣.栀子厚朴汤以及单煎液治疗抑郁的药效物质基础及代谢组学研究[D].北京:北京中医药大学,2023.

[15] 程遥,毕玥琳,冯欣,等.基于UPLC-MS/MS技术和代谢组学方法的苦杏仁“临方捣碎”的潜在质量标志物筛选[J].药学学报,2022,57(10):3195-3202.

[16] 果佳慧,蔡于罗,田伟,等.基于UPLC-Q TOF MS/MS技术结合SWATH采集法同时定性定量分析地胆草中的化学成分[J].药物分析杂志,2024,44(8):1331-1342.

[17] 胡小勤,蒙丹,曾学文,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS和HPLC的广东产广地龙鲜、干品主要化学成分分析[J].天然产物研究与开发,2024,36(12):2051-2063.

[18] 王显菲,林荣锋,钟旋,等.UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS法分析绵萆薢的化学成分[J].中药新药与临床药理,2022,33(5):688-699.

[19] 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.

[20] 王维伊,陈冉,杨翊柠.槐角黄酮调控miR-199a-3p/p38MAPK/NF- κ B对乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和炎症因子分泌的影响[J].实用临床医药杂志,2024,28(4):1-6,13.

[21] 黄旭东,李金坤,袁一峰,等. ω -3多不饱和脂肪酸衍生物消退素在骨保护中的作用[J].中国骨质疏松杂志,2024,30(9):1395-1399.

[22] 李力,张妍,蓝毓营.壮医治疗类风湿关节炎的研究现状[J].中医药导报,2022,28(10):50-53,58.

[23] 田慧.壮族医药理论视野下壮医伤科用药的特色与应用研究[D].南宁:广西民族大学,2022.

[24] 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.

(收稿日期:2025-03-10 修回日期:2025-06-27)

(编辑:张元媛)