

基于偏最小二乘法对三果汤抗氧化作用谱-效关系的分析

姜红¹, 史亚军², 赵生玉¹, 林俊芝³, 韩丽^{1*}, 张定堃^{1*}, 杨明⁴, 李红彦¹

- (1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;
2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 3. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072;
4. 江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:通过建立三果汤 HPLC 指纹图谱并测定其抗氧化活性,探讨其抗氧化活性的物质基础,为建立三果汤的质控评价指标提供依据。方法:采用正交试验,通过回流提取得到 9 个三果汤样品,采用 HPLC 进行分析得到指纹图谱,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法测定其抗氧化活性。应用偏最小二乘法研究三果汤中特征色谱峰和抗氧化活性的相关性,筛选活性色谱峰。结果:建立了三果汤 HPLC 指纹图谱方法,相似度均 >0.9,确定了其中 27 个色谱峰为共有峰,其中 12 个峰的变量投影重要性(VIP)均 >1.0,说明三果汤指纹图谱中 12 个色谱峰对三果汤抗氧化活性发挥重要活性。通过与对照品比对,确定了峰 5 为没食子酸、峰 10 为没食子儿茶素、峰 20 为柯里拉京、峰 23 为表儿茶素没食子酸酯、峰 27 为鞣花酸。结论:三果汤抗氧化作用是多个成分协同起效的结果,通过谱-效关系分析得到三果汤的抗氧化物质基础,可为三果汤的质量控制提供实验依据。

[关键词] 三果汤; 指纹图谱; 抗氧化活性; 谱效关系; 偏最小二乘法; 没食子酸; 变量投影重要性

[中图分类号] R283.6;R945;R285.5;R284;R944.6+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0008-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030008

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171113.1516.018.html>

[网络出版时间] 2017-11-13 15:16

Analysis of Spectrum-effect Relationship of Antioxidant Activity of Sanguotang Based on Partial Least Square Method

JIANG Hong¹, SHI Ya-jun², ZHAO Sheng-yu¹, LIN Jun-zhi³, HAN Li^{1*},
ZHANG Ding-kun^{1*}, YANG Ming⁴, LI Hong-yan¹

- (1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China;
2. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;
3. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China;
4. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the material basis of antioxidant activity of Sanguotang by establishing its HPLC fingerprints and determining its antioxidant activity. **Method:** Nine samples of Sanguotang were extracted by reflux method and orthogonal test. Fingerprints were analyzed by HPLC, 1, 1-diphenyl-2-

[收稿日期] 20170727(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403115,81274098);国家基础科学人才培养基金项目(J13100340-19)

[第一作者] 姜红,在读硕士,从事中药制剂新技术研究,Tel:18215529226,E-mail:784820906@qq.com

[通信作者] *韩丽,博士,教授,博士生导师,从事中药新技术、新工艺研究,Tel:13982185413,E-mail:hanliy@163.com;

*张定堃,博士,讲师,从事中药新技术、新工艺研究,Tel:13568982018,E-mail:465790643@qq.com

trinitrophenylhydrazine (DPPH) assays was established to determine the antioxidant activity of Sanguotang. The spectrum-effect correlation was investigated by partial least square method, and the active chromatographic peaks were screened out. **Result:** HPLC fingerprints of Sanguotang was established, and the similarities were more than 0.90. And 27 common peaks were identified, the variable projection importance (VIP) values of these 12 peaks were more than 1.0, indicating that the 12 peaks played an important role in the antioxidant activity of Sanguotang. By comparison with the reference substances, the peak 5, 10, 20, 23, 27 were determined as gallic acid, galloocatechin, corilagin, epicatechin gallate and ellagic acid, respectively. **Conclusion:** The antioxidant activity of Sanguotang is the result of synergistic effect of multiple components, its material basis can be analyzed by spectrum-effect relationship, which can provide basis for the quality control of Sanguotang.

[Key words] Sanguotang; fingerprint; antioxidant activity; spectrum-efficacy relationship; partial least square method; variable projection importance

三果汤又名哲布松散,由诃子、毛诃子和余甘子 3 味中药组成,首次收录于藏族医药著作《四部医典》中,是众多常用藏族药复方的基础方,已被广泛应用于我国藏族医药和印度传统医学^[1-2],具有抗氧化、抗菌和抗肿瘤等多种活性^[3-6],在治疗高原病、咽喉类疾病、补虚劳损及补脑等方面有很好应用^[7],因而具有较好的研究价值。诃子、毛诃子和余甘子为常用藏族药,均含有大量的多酚类化合物,使三果汤具有良好的抗氧化活性及清除自由基的作用^[8]。

目前,关于三果汤的研究主要围绕其防治高原红细胞增多症和抗氧化作用展开^[9-10]。部分研究已表明三果汤中 3 味药材抗 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基活性能力强弱为毛诃子 > 余甘子 > 诃子;并且测定了部分单体成分的抗氧化性,发现没食子酸的活性较强^[3,11]。但目前对三果汤抗氧化作用的机制缺乏系统研究,本实验拟通过建立三果汤 HPLC 指纹图谱,测定其抗 DPPH 活性,采用偏最小二乘法对两者进行相关性分析,筛选活性色谱峰,探寻其抗氧化活性的物质基础,以期对三果汤及以三果汤为基础方的中成药的质量控制提供依据。

1 材料

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),BS110S 型电子分析天平和 BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。诃子、余甘子、毛诃子均购于四川中庸药业有限公司,产地分别为广西、四川、云南,批号依次为 Z00216N01, Z16116N01 和 Z10016N01,经成都中医药大学药学院许润春副教授鉴定分别为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* 的干燥成熟果实,大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* 的干燥成熟果实及使君子科植物毗黎勒 *T. bellirica* 的干燥成熟果实;没食子酸、没食子儿茶素、

柯里拉京、表儿茶素没食子酸酯及鞣花酸对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,批号分别为 4051109, 14092403, PRF7102406, 14050602, PRF7101305,纯度均 >98%),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,美国 Sigma 公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量,加 50% 甲醇配成每 1 μL 溶液中含有没食子酸 914.0 μg ,没食子儿茶素 756.0 μg ,柯里拉京 737.5 μg ,表儿茶素没食子酸酯 688.0 μg ,鞣花酸 684.0 μg 的混合对照品溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备 称取诃子 5 g,余甘子 4 g 和毛诃子 3 g,按表 1 的设计进行回流提取,提取溶剂为水,最终均加水定容至 500 mL,摇匀,利用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得,分别标记为 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 和 S9。

表 1 三果汤样品制备工艺的正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of preparation process of Sanguotang samples

No.	A 料液比	B 提取时间/h	C 提取数/次	D (空白)
1	1:8	1	1	1
2	1:8	2	2	2
3	1:8	3	3	3
4	1:10	1	2	3
5	1:10	2	3	1
6	1:10	3	1	2
7	1:12	1	3	2
8	1:12	2	1	3
9	1:12	3	2	1

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.05% 磷酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~6 min, 5% B; 6~15 min, 5%~7% B; 15~20 min, 7%~15% B; 20~25 min, 15%~21% B; 25~31 min, 21%~22% B; 31~41 min, 22% B; 41~47 min, 22%~28% B; 47~51 min, 28%~32% B; 51~57 min, 32%~38% B; 57~70 min, 38%~45% B; 70~80 min, 45%~65% B), 检测波长 270 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.3.2 方法学考察 取 2.2 项下供试品溶液按 2.3.1 项下条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 结果各色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明仪器精密度良好。取 2.2 项下同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 3, 6, 9, 15, 18, 24 h 按 2.3.1 项下条件进样, 记录色谱图, 结果各色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 4.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。按处方比例称取三果汤药材各 6 份, 按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.3.1 项下条件测定, 结果各色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明该方法重复性良好。

2.4 DPPH 法测定三果汤的抗氧化作用

2.4.1 DPPH 溶液的配制 称取 DPPH 适量, 加入无水乙醇配制成 23.8 mg·L⁻¹ 的溶液, 避光保存。

2.4.2 抗 DPPH 氧化活性的测定 将 2.2 项下各供试品溶液稀释至 6 个不同质量浓度, 分别吸取样品 0.1 mL 至 3 mL 的 DPPH 溶液中, 40 °C 下避光反应 30 min, 于 516 nm 处测定吸光度, 记为 A_s, 同时测定水 0.1 mL + DPPH 溶液 3 mL 的吸光度, 记为 A₀, 按清除率 = (A₀ - A_s)/A₀ × 100% 计算样品的清除率。以清除率为纵坐标, 生药量为横坐标, 建立两者的函数方程, 计算三果汤样品 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 和 S9 清除 DPPH 自由基的半抑制浓度(IC₅₀) 分别为 2.24, 1.62, 1.54, 1.66, 1.80, 1.81, 1.78, 2.16, 1.95 g·L⁻¹。

2.5 数据分析 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 年版)校正特征图谱的各峰保留时间并进行数据匹配, 得到量化特征峰的数据。采用 SIMCA-P 13.0 软件, 以色谱峰峰面积为自变量, 抗氧化活性数据为因变量, 进行偏最小二乘回归分析, 得回归方程, 筛选三果汤中与清除 DPPH 自由基显著相关的色谱峰。

2.6 指纹图谱的建立及色谱峰的确定 采用“中

药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 年版)软件, 以表 1 中 5 号样品的色谱图为参照谱, 时间窗口 0.5 min, 选择各图谱中均含有且峰形相对好的色谱峰进行多点校正, 运用平均数法生成对照图谱。结果从 9 张图谱中筛选了 27 个特征峰(X₁~X₂₇)作为研究对象, 见图 1, 三果汤药材指纹图谱色谱峰匹配数据见表 2。

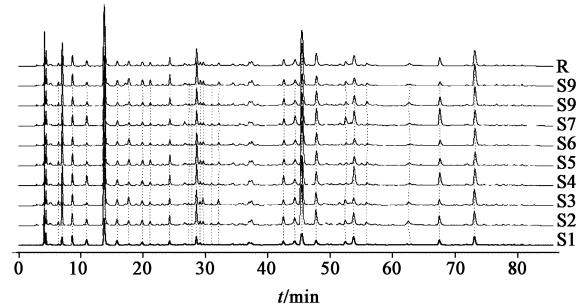


图 1 三果汤的 HPLC 指纹谱及其对照指纹谱(R)

Fig. 1 HPLC fingerprints of Sanguotang and its reference fingerprint(R)

2.7 偏最小二乘法回归分析

2.7.1 偏最小二乘回归方程的建立 以三果汤抗氧化活性数据为因变量, 各特征图谱峰面积信息为自变量, 采用 SIMCA-P 13.0 软件对其进行偏最小二乘回归分析, 见图 2, 得方程 $Y = 0.0413X_1 + 0.0739X_2 + 0.0734X_3 + 0.0884X_4 + 0.1271X_5 + 0.1238X_6 + 0.0211X_7 + 0.004X_8 - 0.032X_9 - 0.0148X_{10} - 0.0547X_{11} + 0.0303X_{12} - 0.0067X_{13} - 0.1094X_{14} + 0.0749X_{15} + 0.086X_{16} + 0.030X_{17} + 0.093X_{18} + 0.1724X_{19} + 0.0837X_{20} + 0.1012X_{21} + 0.0086X_{22} + 0.1014X_{23} - 0.0749X_{24} + 0.114X_{25} + 0.0855X_{26} - 0.0578X_{27}$, 式中 Y 表示 DPPH 法中 IC₅₀ 的相反数, X 表示对应色谱峰的峰面积。其中系数越大表明该自变量对药效影响越大, 并且系数为正值说明其与药效呈正相关, 负数则表示与药效呈负相关。

2.7.2 变量投影重要性分析 变量投影重要性(variable importance in projection, VIP) 是反映自变量对因变量解释能力的 1 个重要指标, 其值越大说明该自变量对因变量的解释能力越强。一般认为当 VIP > 1 时, 自变量在解释因变量时具有显著重要性^[12]。VIP 分析结果见图 3。偏最小二乘回归分析结果表明 X₂, X₃, X₅, X₆, X₉, X₁₁, X₁₄, X₁₆, X₁₉, X₂₀, X₂₁ 和 X₂₅ 的 VIP 值均 > 1, 排序为 X₁₉ > X₅ > X₆ > X₁₄ > X₂₀ > X₂₅ > X₂ > X₁₆ > X₂₁ > X₁₁ > X₉ > X₃, 其中 X₂, X₃, X₅, X₆, X₁₆, X₁₉, X₂₀, X₂₁, X₂₅ 与 DPPH 法中 IC₅₀ 的

表 2 三果汤指纹图谱色谱峰的匹配数据

Table 2 Matching data of chromatographic peaks in fingerprints of Sanguotang samples

样品	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}
S1	5.53	34.28	44.69	32.85	153.78	31.55	11.13	22.94	8.66	20.43	6.35	5.05	47.29	14.39
S2	15.38	113.49	55.04	35.88	382.63	39.36	31.88	36.89	25.06	48.82	9.33	9.94	105.64	23.00
S3	18.73	130.10	57.62	18.06	513.12	40.68	55.04	34.06	23.79	34.86	12.15	9.97	76.94	21.12
S4	11.47	80.16	57.02	57.03	314.15	38.47	23.06	31.93	19.84	47.65	7.40	8.31	106.13	20.67
S5	18.82	120.74	59.23	25.96	413.54	37.40	43.39	40.61	35.94	55.25	12.32	12.65	118.52	32.43
S6	15.90	105.33	42.67	17.70	413.24	30.66	47.12	24.86	18.13	30.80	10.25	9.56	67.59	20.70
S7	10.76	83.70	51.19	56.58	368.24	33.35	21.81	24.17	14.07	33.27	8.41	10.83	91.18	9.70
S8	12.65	86.92	42.75	23.06	285.88	24.05	28.74	21.79	16.97	39.12	10.02	7.39	87.63	27.09
S9	19.04	123.92	61.06	24.10	421.84	41.54	57.25	46.77	38.62	57.36	14.31	12.48	123.46	33.42

样品	X_{15}	X_{16}	X_{17}	X_{18}	X_{19}	X_{20}	X_{21}	X_{22}	X_{23}	X_{24}	X_{25}	X_{26}	X_{27}
S1	8.99	9.24	10.13	31.64	48.18	104.64	48.65	36.83	77.29	10.45	8.75	42.80	69.10
S2	24.73	17.37	27.16	63.84	68.73	347.77	124.75	42.36	108.70	27.17	41.68	67.78	103.78
S3	41.38	14.10	43.18	39.69	72.14	415.27	104.82	47.47	66.81	23.42	35.17	42.07	120.89
S4	15.85	13.90	13.92	64.46	66.17	250.54	108.50	22.09	158.72	21.73	23.98	99.29	135.39
S5	33.60	17.90	38.90	52.95	65.67	379.26	125.13	31.44	85.92	31.06	33.39	60.65	107.48
S6	25.75	12.34	27.78	38.32	60.14	324.39	101.90	25.16	63.24	16.60	27.30	40.38	139.36
S7	11.42	10.61	17.52	48.76	84.50	272.78	136.12	74.20	127.44	16.14	30.25	130.70	132.75
S8	10.94	9.34	18.89	47.54	51.78	274.29	115.53	34.58	89.32	35.88	34.56	67.10	157.02
S9	33.42	15.51	38.52	48.68	62.40	370.95	92.50	45.75	77.95	28.13	20.91	36.23	181.57

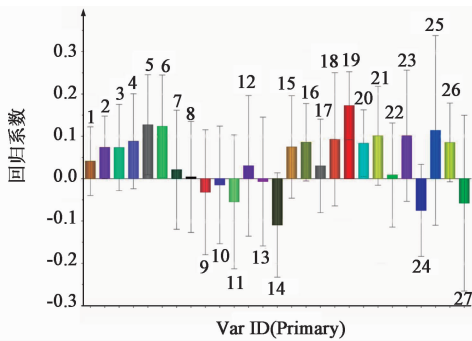


图 2 三果汤抗氧化谱-效相关性的 PLSR 模型回归系数

Fig. 2 Regression coefficients of PLSR model for antioxidant spectrum-effect correlation of Sanguotang

相反数呈正相关, $X_5, X_6, X_{19}, X_{21}, X_{25}$ 的回归系数和 VIP 较大, 当他们含量增加时, 三果汤清除 DPPH 自由基的能力则会显著增强; X_9, X_{11}, X_{14} 与 DPPH 法中 IC_{50} 的相反数呈负相关, X_{14} 的回归系数的绝对值和 VIP 较大, 当他们的含量增加时, 三果汤清除 DPPH 自由基的能力则会减弱。

2.8 色谱峰成分的鉴定 采用已有对照品进行 HPLC 分析, 匹配出峰 5 为没食子酸、峰 10 为没食子儿茶素、表 20 为柯里拉京、峰 23 为表儿茶素没食子酸酯、峰 27 为鞣花酸。见图 4。

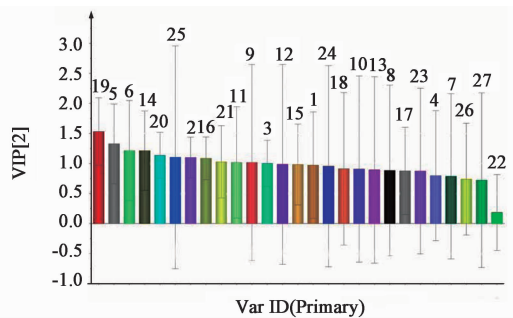
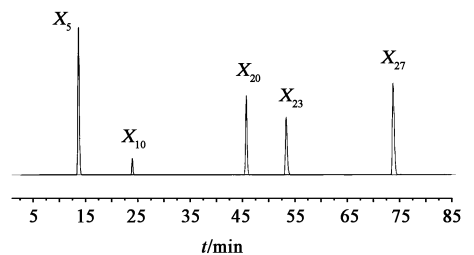


图 3 各特征峰对三果汤抗氧化活性的 VIP 贡献

Fig. 3 VIP contribution of each characteristic peak to antioxidant activity of Sanguotang



X_5 . 没食子酸; X_{10} . 没食子儿茶素; X_{20} . 柯里拉京; X_{23} . 表儿茶素没食子酸酯; X_{27} . 鞣花酸

图 4 混合对照品的 HPLC

Fig. 4 HPLC chromatogram of mixed reference substances

3 讨论

在方法建立过程中系统地考察了色谱条件,包括色谱柱、流动相、波长、流速及柱温等,最终发现以甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相,检测波长270 nm,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下,三果汤中各成分分离效果好、重复性良好,可为三果汤的质量标准研究提供参考。

合理的数据处理方法是谱-效关系研究过程中的核心,目前应用较多的数据处理分析方法主要有相关分析、人工神经网络、偏最小二乘回归分析、主成分分析、聚类分析、灰色关联度分析等^[13-14]。偏最小二乘回归分析可综合多元回归分析、典型相关分析和主成分分析,通过这三者来简化数据、分析变量间的相关关系并建立回归模型,具有计算量小和预测精度高等优点,可用于样本数量少于自变量数量的数据分析。故本文采用偏最小二乘回归分析来反映HPLC特征峰与抗氧化活性之间的联系,结果显示三果汤抗氧化作用中有12个成分较为重要,也解释了三果汤中抗氧化作用并非某一具体成分的药效,而是多成分协同起效的结果。

目前已有文献通过测定三果汤散血清指纹图谱初步确定了没食子酸、柯里拉京是三果汤散抗氧化的有效成分^[15]。本实验结果也进一步证明没食子酸和柯里拉京对三果汤抗氧化活性的贡献度较大,且没食子酸的活性大于柯里拉京。但在实验过程中通过对照品匹配,仅指出5个色谱峰,且与活性显著相关的色谱峰指认较少。在后续研究中,将通过Q-TOF或LC-MS/MS等研究手段对这些色谱峰进行结构鉴定,以确定三果汤中与抗氧化活性相关的物质基础,为三果汤的质量控制提供了一定的理论依据。本文通过建立三果汤的指纹图谱,测定其抗氧化作用,采用偏最小二乘回归分析进行谱-效关联分析,发现了12个成分对其抗氧化作用贡献度较高,初步确定了三果汤抗氧化的物质基础。

[参考文献]

[1] 杨继家,张艺,冀静,等. 藏医药与印度传统医药对三果汤传统应用及现代研究概述[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2012,14(1):1311-1316.
[2] 卓方文. 藏药三果汤含片[N]. 医药养生保健报,

2005-10-10(6).

[3] 项朋志,余洪,刘琼,等. 藏药大三果抗氧化活性研究[J]. 化学与生物工程,2013,30(11):27-30.
[4] Kumar M S, Kirubanandan S, Sripriya R, et al. Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound [J]. J Surg Res, 2008, 144(1):94-101.
[5] Singhal P, Nesari T, Gupta G S. Efficacy of herbomineral compounds and pathya (Ayurvedic dietary regime and physical exercise) in the management of Yakrt Roga (non-alcoholic fatty liver disease) [J]. Anc Sci Life, 2015, 34(4):216-222.
[6] Chandran U, Mehendale N, Tillu G, et al. Network pharmacology of Ayurveda formulation triphala with special reference to anti-cancer property [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2015, 18(9):846-854.
[7] 杨继家. 藏药三果汤散的化学成分分析及代谢组学初步研究[D]. 成都:成都中医药大学,2012.
[8] 德洛,姚喆,杨继家,等. 藏药三果汤散抗氧化有效成分的薄层色谱-生物自显影及HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):98-102.
[9] 聂佳,郭伟晨,唐策,等. 藏药三果汤防治高原红细胞增多症作用机制的网络药理学研究[J]. 中药材,2017,40(6):1425-1433.
[10] 邝婷婷,张海伟,陈一龙,等. 藏药三果汤散干预高原红细胞增多症模型大鼠的代谢组学研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2014,16(1):171-176.
[11] 张海伟,张艺,杨继家,等. HPLC测定不同批次藏药三果汤中没食子酸和鞣花酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):95-98.
[12] ZHU C S, LIN Z J, XIAO M L, et al. The spectrum-effect relationship—a rational approach to screening effective compounds and reflecting the internal quality of Chinese herbal medicine [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(3):177-184.
[13] 曾令军,林兵,宋洪涛. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J]. 中国中药杂志,2015,40(8):1425-1432.
[14] 吕邵娃,董书羽,郭玉岩,等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):226-230.
[15] 姚喆. 藏药三果汤散抗氧化有效成分研究[D]. 成都:成都中医药大学,2011.

[责任编辑 刘德文]