

丹参成分组合与抗氧化活性相关性分析

吴宏伟¹, 陈建新², 杨洪军^{1*}, 李德凤¹, 唐仕欢¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探索适合中药“组效关系”的分析方法。方法与结果: 以丹参为范例, 基于 LARS 回归算法, 按照均匀试验设计-药效试验-数学建模(模型验证)程序, 得到丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸 3 种成分不同组合与清除 1, 1-二苯基-2-苦肼基 (DPPH) 自由基活性的关系, 实现了成分组合的活性预测。结论: LARS 回归算法是中药“组效关系”研究的有效方法之一。

[关键词] 组效关系; LARS 回归算法; 丹参; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)08-0068-04

The Relationship Between Compositions of *Salvia Miltiorhiza* and Antioxidative Capacity

WU Hong-wei¹, CHEN Jian-xin², YANG Hong-jun^{1*}, LI Defeng¹, TANG Shi-huan¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To find a suitable way of discovering the connection between different combinations of danshensu protocatechualdehyde caffeic acid and their antioxidative capacity. **Methods and Results:** The Antioxidative capacity was tested by scavenging the free radical of DPPH. And the mathematical model was constructed to describe the connection between different combinations and their antioxidative capacity by the method of LARS regression. **Conclusions:** LARS regression is one of efficient way to describe the connection between combinations of compounds and pharmaceutical effect.

[Key words] Combination-activity relationship; LARS regression; *Salvia miltiorhiza*; Antioxidative capacity

丹参为中药活血化瘀常用药, 现代药理研究表明其抗氧化活性主要有效成分为水溶性的丹酚酸类成分^[1], 目前市场上已有多种以总丹酚酸为主要成分的注射液, 其质控指标多为丹参素、原儿茶醛, 所以我们选取丹参素、原儿茶醛、咖啡酸 3 种有效成分, 探索中药多种有效成分综合作用与药效的关系, 建立研究中药“组效关系”的方法, 为中药的多指标质量控制打下基础。

本文以丹参为范例, 基于 LARS 回归算法^[2], 按照均匀试验设计-药效试验-数学建模(模型验证)程序, 分析丹参素、原儿茶醛、咖啡酸 3 种成分组合与清除 1, 1-二苯基-2-苦肼基(DPPH) 自由基的抗氧化活性关系, 以优化配比。

1 材料

1.1 样品及试剂 丹参素, 规格 98%, 批号 1089; 原儿茶醛, 规格 98%, 批号 1070。咖啡酸, 规格 98%, 批号 1071, 中国固体制剂制造技术国家工程研究中心提供。DPPH (1, 1-二苯基-2-苦肼基自由基; 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical), Sigma 公司产品。

1.2 仪器 UV-T6 新世纪紫外分光光度器, BP110S 型电子天平, 德国塞多利斯公司。

2 方法及结果

2.1 清除 DPPH 自由基的检测方法^[3-4] 分别精密称定 2.1 mg 丹参素钠, 2.4 mg 原儿茶醛, 2.2 mg 咖啡酸, 分别溶于 10 mL 量瓶中, 用乙醇定容, 制成浓度分别为 $0.21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.22 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 再把以上待测液稀释成系列浓度备用。精密称取 8.4 mg DPPH 于 100 mL 量瓶中, 乙醇定容, 配制 $0.084 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($2.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 母液备用。

分别精密吸取各待测液 2 mL, 加入 2 mL 的 DPPH 溶液, 摇匀后放置 30 min, 以溶剂为空白对照, 测定 517 nm 处的吸光度值 A1; 同时测定上述待测液 2 mL 与 2 mL 空白溶剂混合后 517 nm 的吸光度值记为 A2; 再测定 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 空白溶剂混合后 517 nm 的吸光度值记为 A3; 将 3 值根据下式计算对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A1 - A2)/A3] \times 100\%$$

2.2 3 种成分的抗氧化活性 按 2.1 项下分别测丹参素钠、咖啡酸、原儿茶醛 3 种成分对 DPPH 自由基清除率, 采用 GraphPad Prism 4.0 软件计算 IC₅₀, 如表 1 所示。

表 1 3 种成分对 DPPH 自由基的清除率($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

实验号	原儿茶醛		丹参素钠		咖啡酸	
	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	清除率 (%)	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	清除率 (%)	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	清除率 (%)
1	240	92.17 ± 0.53	84	84.09 ± 0.32	220	97.75 ± 0.50
2	80	91.60 ± 0.54	28	76.62 ± 2.70	73.3	97.45 ± 0.08
3	26.7	91.79 ± 0.19	9.33	31.13 ± 2.11	24.4	96.85 ± 0.05
4	8.9	91.66 ± 0.11	3.11	12.48 ± 0.74	8.1	70.61 ± 0.60
5	2.96	53.92 ± 2.49	1.04	6.36 ± 1.20	2.7	24.30 ± 0.38
6	0.988	19.62 ± 1.57	0.346	3.92 ± 0.44	0.905	8.34 ± 0.39
7	0.329	7.42 ± 0.77	0.115	2.73 ± 0.46	0.302	3.78 ± 0.31
IC ₅₀ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		2.68 ± 0.87	12.52 ± 1.13		5.22 ± 0.34	

2.3 均匀试验设计及成分组合的抗氧化活性检测

依据丹参素钠、咖啡酸、原儿茶醛 3 种成分单独作用的试验数据, 按照均匀设计试验表, 进行 3 因素、9 水平的均匀试验设计。分别称定丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸 1.2 mg, 分别定溶于 5 mL 量瓶中, 再分别精密吸取 0.4 mL 稀释至 25 mL 容量瓶中, 得 3 种对照品的母液, 浓度均为 $3.84 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

按表 2 所示分别取相应体积的各对照品母液混合, 得到 9 份混合待测液, 总浓度均为 $3.84 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按照 2.1 项下方法, 对均匀试验设计所确定的 9 个组合, 进行实验, 结果见表 3。

表 2 3 因素 9 水平均匀试验设计表

试验组 合序号	因素		
	原儿茶醛	丹参素钠	咖啡酸
1	3	7	9
2	6	4	8
3	9	1	7
4	2	8	6
5	5	5	5
6	8	2	4
7	1	9	3
8	4	6	2
9	7	3	1

表 3 均匀设计试验组合对 DPPH 自由基的清除率($\bar{x} \pm s, n=4$)

试验组 合序号	原儿茶醛 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	丹参素钠 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	咖啡酸 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	合计 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	清除率 (%)
1	0.61	1.41	1.82	3.84	52.7±2.1
2	1.28	0.85	1.71	3.84	46.0±4.3
3	2.03	0.23	1.58	3.84	42.3±5.2
4	0.48	1.92	1.44	3.84	56.6±1.2
5	1.28	1.28	1.28	3.84	51.5±2.4
6	2.19	0.55	1.10	3.84	46.4±3.2
7	0.30	2.66	0.89	3.84	60.8±2.2
8	1.28	1.92	0.64	3.84	56.9±3.1
9	2.44	1.05	0.35	3.84	51.6±4.1

由表 3 可知:原儿茶醛、丹参素、咖啡酸组合后,总浓度一致,由于 3 种成分间的比例不同,其抗氧化活性也不同,为近一步的数学建模优化提供了基础。

2.4 数学建模^[4]

2.4.1 LARS 算法的定义 LARS 是 least angle regression 最小角度回归的缩写,是 2004 年由美国学者提出,LARS 算法是一种回归算法^[4],是求解下面的方程

$$\min_{\beta} \sum_{i=1}^n (y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^p x_{ij} \beta_j)^2$$

$$s. t. : \sum_{j=1}^p |\beta_j| \leq c$$

LARS 算法是一个残差拟合过程,当选择了一个变量以后,便把结果中减去该变量的影响,得到的便是残差;然后再在该残差的基础上选择新的特征。因此拟合过程也就是残差不断减小的过程。

2.4.2 数学模型的建立 根据表 3 的均匀设计实验结果,把 3 种成分总浓度设定为 100,原儿茶醛为 X_1 ,丹参素钠为 X_2 ,咖啡酸为 X_3 ,平均清除率为 Y ,采用 LARS 回归运算,得到的方程如下

$$Y = 0.097\ 051 * 0.01 * X_1 * X_2 + 0.069\ 333 * 0.01 * X_1 * X_3 + 0.112\ 56 * 0.01 * X_2 * X_3 -$$

$$0.029\ 789 * 0.000\ 1 * X_1 * X_2 * X_3 + 0.025\ 913 * 0.01 * X_1^2 + 0.036\ 113 * 0.01 * X_2^2 + 0.010\ 978 * 0.01 * X_3^2$$

由于 LARS 回归的性能比较强大,为了避免出现由于小样本带来的误差,我们计算了各回归项的系数的平均值和方差,分别是 0.054 和 0.038 9,可见回归参数基本在 0.054 左右,方差比较小,因此模型比较稳定(见图 1)。

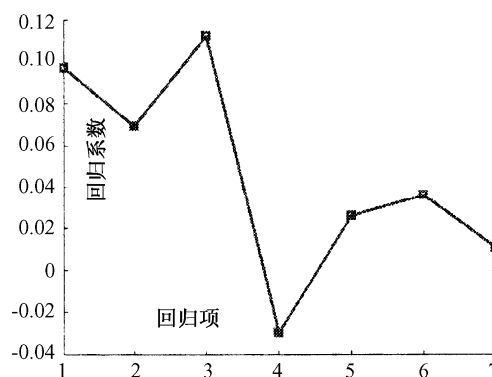


图 1 各回归项系数

2.4.3 模型的验证 依据所建模型,随机选取 4 组数据对模型进行验证。根据实验设计,我们将 3 种成分之和确定在 $3.84 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行验证,如表 4 所示。

由以上验证结果可以看出,实测活性与预测活性基本一致,说明基于 LARS 算法所建立的数学模型对本实验的预测非常准确。从所建立的成分组合与活性间的数学模型中可以看出,没有各成分的 1 次项,说明在清除 DPPH 自由基方面主要通过 3 种成分的共同作用来完成,它们两两之间以及三者之间均具有交互作用,反应出中药多成分协同作用的特点。

3 讨论

药效指标选取清除 DPPH 自由基,因为该指标比体内指标易于操作,实验误差小,数据重现性好、稳定,有利于数学模型的建立与修正。

中药作用的特点是多种成分共同作用,这体现

表 4 组合预测实际结果

组 合	原儿茶醛 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	丹参素钠 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	咖啡酸 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	合计 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	预测清除率 (%)	实测清除率 (%)
1	0.30	2.50	1.04	3.84	60.38	60.84
2	0.47	2.48	0.89	3.84	59.62	59.40
3	1.40	1.41	1.03	3.84	52.87	55.18
4	2.50	0.47	0.87	3.84	45.87	46.45

了中药与西药的本质区别。中药“组效关系”是相对于“构效关系”而言,即定量研究中药有效成分组合与相关药效间的关联规律,对于揭示中药的作用特点以及中药多指标的质量控制都有现实意义。但是由于中药物质基础的复杂性,在定量描述中药组合与药理效应之间关系时,必须借助复杂系统建模的方法。本实验中所采用的 LARS 算法是一种非线性多元回归算法,适合“非线性、小样本”数据分析,对于偏差较大的数据依然能够给出良好的拟合能力,吻合生物实验数据高度离散的特点。因此应用于中药多组分与活性间关系的描述是非常适合的,也是一个很好的工具和手段,同时也为探索中药作用规律、合理评价中药质量提供了有益的帮助。

总之本文以丹参为范例,基于 LARS 回归算法,按照均匀试验设计-药效试验-数学建模(模型验证)

程序,分析丹参素、原儿茶醛、咖啡酸 3 种成分组合与清除 DPPH 自由基的抗氧化活性的关系,并经过试验验证,证实方法的可靠性,为寻找中药多成分组合与药效之间的关系提供了很好的研究思路和模式。

[参考文献]

- [1] 郑虎占,董泽宏,余 靖. 中药现代研究[M]. 北京:学苑出版社,1998: 1039-1194.
- [2] Bradley Efron, Trevor Hastie, Iain Johnstone, etc. Least angle regression[J]. The Annals of Statistics, 2004, 32 (2): 407-451.
- [3] 宋怀恩,闻 韧. 抗氧化剂筛选方法的研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2003, 13(2): 119-122.
- [4] 向志军,赵广荣,元英进,等. 复方丹参的体外抗氧化活性研究[J]. 中草药,2006, 37(2): 211-213.