

以何首乌为核心配伍药对的指纹图谱建立及多元统计分析^Δ

张慧杰^{1*},任晓亮²,孙浩¹,王雅琦¹,梁颖^{1#}(1.天津市中医药研究院附属医院药学部,天津 300120;2.天津中医药大学中药学院,天津 301617)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)20-2486-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.20.10

摘要 目的:建立何首乌为核心的32个配伍药对的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并进行多元统计分析。方法:采用UPLC法,以何首乌及配伍药物的单味饮片为参照,绘制32个何首乌配伍药对的UPLC指纹图谱;采用相对保留时间及色谱峰紫外吸收光谱确定共有峰。采用SPSS 19.0软件和SIMCA 13.0软件进行无监督的主成分分析(PCA)和有监督的正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。结果:32个何首乌配伍药对的UPLC图谱有12个共有峰。无监督的PCA分析结果显示,前6个主成分的累积方差贡献率为84.633%;PCA综合评分的聚类分析结果显示,何首乌单味饮片以及何首乌与枸杞子、熟地黄、白芍、党参、墨旱莲、当归、甘草、黄芪、麦冬的配伍药对聚为一类,其余聚为一类。有监督的OPLS-DA分析结果显示,4个主成分特征值分别为2.32、2.61、1.58、0.90;在配伍过程中,何首乌与补虚类、非补虚类药物的12个共有成分含量存在差异,且与补虚药配伍后的成分含量变化具有相似性;共有峰7、4、6、3是引起差异的主要原因(变量重要性投影值均大于1)。结论:所建指纹图谱操作简便,结合多元统计分析可用于评价以何首乌为核心的32个配伍药对共有成分的含量变化。

关键词 何首乌;配伍药对;超高效液相色谱法;指纹图谱;主成分分析;正交偏最小二乘法-判别分析

Establishment of Fingerprint and Multivariate Statistical Analysis of Compatible Herb Pairs with *Polygonum multiflorum* as the Core

ZHANG Huijie¹, REN Xiaoliang², SUN Hao¹, WANG Yaqi¹, LIANG Ying¹(1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Tianjin Academy of TCM, Tianjin 300120, China; 2. School of TCM, Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China)

- 国药学:英文版,2015,24(10):647-653.
- [23] 孙冬雪.分心木与青龙衣化学成分的研究[D].长春:吉林农业大学,2019.
- [24] KAMESH V, FANG C, CHUN C, et al. Comparative studies on the hypolipidemic, antioxidant and hepatoprotective activities of catechin-enriched green and oolong tea in a double-blind clinical trial[J]. *Food Funct*, 2018, 9(2): 1205-1213.
- [25] SILVA GF, JAYZE DC, SAMPAIO DS, et al. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains[J]. *Microb Pathog*, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.058.
- [26] 王德兴.绿茶可防丙肝病毒感染[J].东方药膳,2017(11): 53.
- [27] 祝乃强,侯静怡,马桂云,等.基于网络药理学的续断-补骨脂药对治疗骨关节炎作用机制研究[J].中国现代应用药学,2020,37(10):1157-1165.
- [28] 李加兴,吴越,周炎辉,等.多烯酸植物油及其保健功效研究进展[J].食品科学,2014,35(21):350-354.
- [29] 李红霞.几种抗病毒药剂对烟草花叶病毒的抑制作用及相关机理研究[D].保定:河北农业大学,2010.
- [30] 盛清凯,刘雪,朱昌雄,等.螺旋藻对仔猪生长性能、免疫性能及粪便菌群的影响[J].动物营养学报,2017,29(3): 843-849.
- [31] 彭耀文,申兰慧,王丽,等.液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术在药物分析中的应用[J].中南药学,2015,13(9):962-965,992.
- [32] 周贤珍.苏木化学成分及其绝对生物利用度研究[D].广州:广东药科大学,2017.
- [33] 刘超,陈若芸.儿茶素及其类似物的化学和生物活性研究进展[J].中国中药杂志,2004,29(10):92-96.
- [34] WASHIYAMA M, SASAKI Y, HOSOKAWA T, et al. Anti-inflammatory constituents of Sappan lignum[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5):941-944.
- [35] 孙治刚,李志娜,李敏,等.白藜芦醇的药理作用研究进展[J].淮海工学院学报(自然科学版),2017,26(2):40-43.

Δ 基金项目:国家重点研发计划项目(No.2017YFC1703400);天津市科技计划项目(No.17ZXHLSY00060);天津市卫生健康委员会、天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(No.2019025)

* 主管药师,博士。研究方向:中药学、中药分析。电话:022-27339599。E-mail:jyhuijie@163.com

通信作者:主任药师,硕士生导师,硕士。研究方向:中药学、临床药学、药事管理。电话:022-27339599。E-mail:tjszyyxb_ly@163.com

(收稿日期:2020-05-27 修回日期:2020-08-18)

(编辑 邹丽娟)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish UPLC fingerprint of 32 compatible herb pairs with *Polygonum multiflorum* as the core, and to conduct multivariate statistical analysis. METHODS: UPLC method was adopted. Using *P. multiflorum* and single decoction pieces of compatible herb as reference, UPLC fingerprints of 32 compatible herb pairs of *P. multiflorum* were drawn. Common peaks were confirmed by relative retention time and UV absorption spectrum. Non-supervised PCA and supervised OPLS-DA were conducted by using SPSS 19.0 software and SIMCA 13.0 software. RESULTS: There were totally 12 common peaks in UPLC fingerprints of 32 compatible herb pairs of *P. multiflorum*. The results of non-supervised PCA showed that the accumulative variance contribution rate of primary 6 principal components was 84.633%. The results of cluster analysis of PCA comprehensive score showed that single decoction piece of *P. multiflorum*, compatible herb pairs of *P. multiflorum* with *Lycium barbarum*, *Rehmannia glutinosa*, *Paeonia lactiflora*, *Codonopsis pilosula*, *Eclipta prostrate*, *Angelica sinensis*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Astragalus membranaceus* and *Ophiopogon japonicus* were clustered into one category; others were clustered into one category. Results of supervised OPLS-DA analysis showed that eigen values of 4 principal components were 2.32, 2.61, 1.58 and 0.90, respectively. There were differences in the contents of 12 common components in the compatibility of *P. multiflorum* with tonic medicine and non-tonic medicine. The changes of the content of the components after compatibility with tonic medicine were similar. Common peak 7, 4, 6, 3 were main reasons for the differences (variable importance projection value were all higher than 1). CONCLUSIONS: Established fingerprint is simple in operation, and can be combined with multivariate statistical analysis to evaluate the content changes of common components of 32 compatible herb pairs with *P. multiflorum* as the core.

KEYWORDS *Polygonum multiflorum*; Compatible herb pairs; UPLC; Fingerprint; PCA; OPLS-DA

中药复方是在中医理论指导下,依据“七情”及“君臣佐使”原则,由两味或两味以上的中药配伍而成^[1]。复方是中药临床应用的主要形式,由于时、地、人、病、症的不同,中药组方形式多样,且配伍而成的化学成分体系十分复杂^[2-3],因此有必要对配伍机理进行深入研究。随着分析技术的不断发展,采用现代研究手段对中药配伍过程中成分及含量变化进行分析已成为配伍机理研究的重要内容之一,其中指纹图谱技术及多元统计分析方法已被广泛应用于中药多成分分析等领域中^[4-5]。

何首乌又名首乌、地精,为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根^[6]。该药始载于北宋《开宝本草》^[7],其炮制品为中医临床常用的滋补名药,具有补肝肾、益精血、乌髭发的功效,常与牛膝、当归、枸杞子、山楂、泽泻等中药配伍应用,治疗肝肾两虚、精血不足引起的头晕眼花、脱发白发以及高脂血症、白癜风等疾病,疗效显著^[8]。然而,近年来何首乌所导致的肝毒性引起了学者的广泛关注。有研究发现,不同质量的茯苓、甘草、三七与何首乌配伍后,可显著减轻何首乌对肝窦内皮的损伤作用^[9]。这提示,配伍得当可能是减轻何首乌致肝损伤的途径之一。但若配伍不当亦可导致某些不良反应的发生,如莱菔子与何首乌同用可引发头晕、神志恍惚等症状^[10]。因此,配伍研究对于保障何首乌的有效性及安全性具有重要意义^[8,11]。目前,少见有关首乌配伍研究的报道,且也未见有关何首乌在复方配伍过程中化学成分变化的相关研究。

药对是指经过临床应用并被证明行之有效的、具有一定理论依据的、符合一定组合法度的两味相对固定的药物配对,是中医临床遣药组方常用的配伍形式,其组成简单且兼具中药配伍的基本特征^[12-13]。本课题组前期对2015年版《中国药典》(一部)中含有何首乌的61种成

方制剂进行数据挖掘分析,经Apriori算法关联得到36个何首乌药对,配伍药物包括32个植物来源中药以及4个动物来源中药^[14]。基于上述研究,本文拟通过建立32个何首乌配伍药对(植物来源)的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,同时采用无监督的主成分分析(PCA)、有监督的正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),评价何首乌与32个配伍药物在共煎过程中的成分含量变化,旨在为何首乌配伍机理研究和安全用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY 型 UPLC 系统,包括二元溶剂管理系统、样品管理器、二极管阵列检测器(美国 Waters 公司); BT125D 型十万分之一天平(德国 Sartorius 公司); JA31002 型万分之一电子天平(上海精天电子仪器有限公司); KDM 型调温电热套(山东省鄄城永兴仪器厂); TG16-WS 型台式高速离心机(湖南省湘仪离心机仪器有限公司); KH3200B 型超声波清洗器(江苏省昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

何首乌饮片(批号:150802,四川新荷花中药饮片有限公司)、32个单味饮片均经天津市中医药研究院附属医院药学部孙浩副主任药师鉴定分别为蓼科植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根以及相应药材的真品。单味饮片信息见表1,药对配伍信息见表2。甲醇、甲酸均为色谱纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 UPLC 指纹图谱分析

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC BEH Shield RP₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%

甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~1 min,5% A;1~5 min,5% A→15% A;5~10 min,15% A→22% A;10~16 min,22% A→45% A);流速:0.4 mL/min;柱温:45 ℃;检测波长:254 nm;进样量:5 μL。

表1 单味饮片信息

Tab 1 Information of single decoction pieces

单味饮片(简称)	批号	来源
白芍(BS')	140801	安国圣山药业有限公司
炒白术(CBZ')	120802	安国金康迪中药饮片有限公司
大枣(DZ')	14038061111	安国市祁澳中药饮片有限公司
当归(DG')	14025831111	安国市祁澳中药饮片有限公司
党参(DS')	120601	安国金康迪中药饮片有限公司
甘草(GC')	140801	安国圣山药业有限公司
枸杞子(GQZ')	140801	安国圣山药业有限公司
黄芪(HQ')	140801	安国金康迪中药饮片有限公司
麦冬(MD')	140801	安国圣山药业有限公司
墨旱莲(MHL')	140901	安国金康迪中药饮片有限公司
人参(RS')	140801	安国圣山药业有限公司
熟地黄(SD')	140801	安国圣山药业有限公司
淫羊藿(YYH')	14032161111	安国市祁澳中药饮片有限公司
川芎(CX')	14037991111	安国市祁澳中药饮片有限公司
丹参(DanS')	130901	安国金康迪中药饮片有限公司
红花(HH')	140801	安国圣山药业有限公司
鸡血藤(JXT')	140801	安国圣山药业有限公司
牛膝(NX')	1309710131	安国市祁澳中药饮片有限公司
地黄(DH')	120803	安国金康迪中药饮片有限公司
决明子(JMZ')	120901	安国金康迪中药饮片有限公司
赤芍(CS')	14024731111	安国市祁澳中药饮片有限公司
玄参(XS')	140801	安国圣山药业有限公司
葛根(GG')	140801	安国圣山药业有限公司
羌活(QH')	140801	安国圣山药业有限公司
茯苓(FL')	140801	安国圣山药业有限公司
泽泻(ZX')	140801	安国圣山药业有限公司
陈皮(CP')	814083222	安国圣山药业有限公司
桑寄生(SJS')	14037991111	安国市祁澳中药饮片有限公司
三七(SQ')	120401	安国金康迪中药饮片有限公司
山楂(SZ')	14038061111	安国市祁澳中药饮片有限公司
天麻(TM')	14037991111	安国市祁澳中药饮片有限公司
五味子(WWZ')	1403365181	安国市祁澳中药饮片有限公司

表2 药对配伍信息

Tab 2 Information of compatible herb pairs

配伍药对(简称)	配伍药物功效分类	配伍药对(缩写)	配伍药物功效分类
何首乌-白芍(BS)	补虚类	何首乌-鸡血藤(JXT)	活血化痰类
何首乌-炒白术(CBZ)	补虚类	何首乌-牛膝(NX)	活血化痰类
何首乌-大枣(DZ)	补虚类	何首乌-地黄(DH)	清热类
何首乌-当归(DG)	补虚类	何首乌-决明子(JMZ)	清热类
何首乌-党参(DS)	补虚类	何首乌-赤芍(CS)	清热类
何首乌-甘草(GC)	补虚类	何首乌-玄参(XS)	清热类
何首乌-枸杞子(GQZ)	补虚类	何首乌-葛根(GG)	解表类
何首乌-黄芪(HQ)	补虚类	何首乌-羌活(QH)	解表类
何首乌-麦冬(MD)	补虚类	何首乌-茯苓(FL)	利水渗湿类
何首乌-墨旱莲(MHL)	补虚类	何首乌-泽泻(ZX)	利水渗湿类
何首乌-人参(RS)	补虚类	何首乌-陈皮(CP)	理气类
何首乌-熟地黄(SD)	补虚类	何首乌-桑寄生(SJS)	祛风湿类
何首乌-淫羊藿(YYH)	补虚类	何首乌-三七(SQ)	止血类
何首乌-川芎(CX)	活血化痰类	何首乌-山楂(SZ)	消食类
何首乌-丹参(DanS)	活血化痰类	何首乌-天麻(TM)	平肝息风类
何首乌-红花(HH)	活血化痰类	何首乌-五味子(WWZ)	收涩类

2.1.2 样品溶液的制备 分别称取何首乌饮片、32个单味饮片及32个何首乌配伍药对样品(1:1, m/m, 下同)约10 g,加水200 mL浸泡1 h,回流提取1 h,趁热以三层纱布滤过,滤液冷却后,用水定容至200 mL,即得何首乌饮片样品、32个单味饮片样品及32个何首乌配伍药对样品溶液。上述溶液均置于4 ℃冰箱保存,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取何首乌饮片样品4 mL,置于10 mL量瓶中,放至室温,加入50%甲醇稀释至刻度,涡旋混匀,以0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得何首乌饮片供试品溶液。同法操作制得32个单味饮片及32个何首乌配伍药对的供试品溶液。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.3”项下何首乌饮片供试品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以8号峰(响应较强且峰形好)为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对峰面积的RSD均不高于1.52%(n=6),相对保留时间的RSD均不高于1.04%(n=6),表明方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.3”项下何首乌饮片供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以8号峰为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对峰面积的RSD均不高于1.44%(n=6),相对保留时间的RSD均不高于1.15%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取何首乌饮片样品溶液适量,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以8号峰为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对峰面积的RSD均不高于1.95%(n=6),相对保留时间的RSD均不高于1.79%(n=6),表明方法重复性良好。

2.1.7 UPLC指纹图谱的建立 取32个何首乌配伍药对样品,按“2.1.2”“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以何首乌饮片为参照,32个单味饮片为阴性对照,建立32个何首乌配伍药对的UPLC指纹图谱,采用相对保留时间及色谱峰紫外吸收光谱确定共有峰,详见图1、图2。由图1、图2可知,32个何首乌配伍药对中共有12个共有峰。

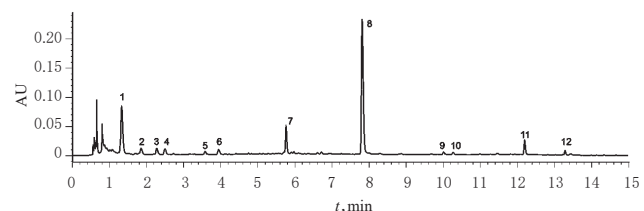
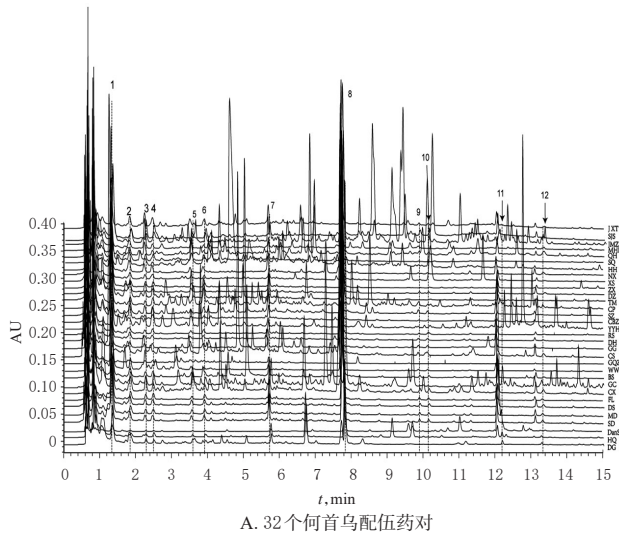
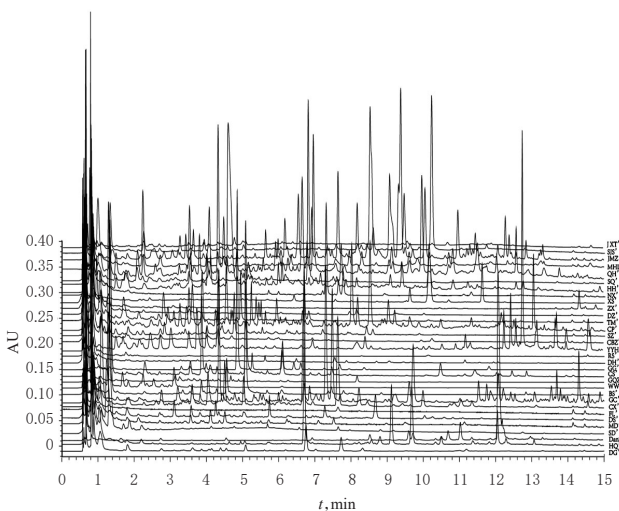


图1 何首乌饮片的对照指纹图谱

Fig 1 Control fingerprint of decoction piece of *P. multiflorum*



A. 32个何首乌配伍药对



B. 32个单味饮片

图2 何首乌配伍药对及单味饮片的UPLC叠加指纹图谱

Fig 2 UPLC superimposed fingerprints of compatible herb pairs of *P. multiflorum* and single decoction pieces

2.2 PCA

以12个共有峰峰面积为变量,采用SPSS 19.0软件进行无监督的PCA分析,结果见表3。由表3可知,前6个主成分的累积方差贡献率为84.63%,表明其可反映样品的基本信息。

表3 PCA结果

Tab 3 Results of PCA

主成分	特征值	方差贡献率, %	累积方差贡献率, %
1	3.293	27.445	27.445
2	2.887	24.055	51.500
3	1.269	10.573	62.074
4	1.118	9.313	71.386
5	0.803	6.690	78.076
6	0.787	6.557	84.633

采用SPSS 19.0软件计算各共有峰的特征向量(λ),按公式计算主成分得分(F_j): $F_j = \sum_{i=1}^{12} \lambda_{ij} \times X_i$ (式中, X_i 为12

个共有峰峰面积经标准化后的变量, $j=1,2,\dots,6$)^[15];根据主成分得分计算32个何首乌配伍药对的综合得分

$$(S): S = \frac{\sum_{j=1}^6 (F_j \times C_j)}{\sum_{j=1}^6 C_j} \quad (\text{式中}, C_j \text{为主成分方差贡献率})^{[15]}.$$

采用SPSS 19.0软件,以离差平方和法对32个何首乌配伍药对样品的综合得分进行聚类分析。结果,何首乌饮片及32个何首乌配伍药对可聚为两类,其中何首乌饮片以及何首乌与枸杞子、熟地黄、白芍、党参、墨旱莲、当归、甘草、黄芪、麦冬的配伍药对聚为一类,其余聚为一类。这表明,共有峰成分在上述9个何首乌配伍药对样品中的含量与何首乌饮片差异较小,且上述9个配伍药物均属补虚类,详见表4、图3。

表4 何首乌及其32个配伍药对的主成分得分及综合得分

Tab 4 Principal component scores and comprehensive scores of *P. multiflorum* and its 32 compatible herb pairs

样品	主成分得分						综合得分
	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	主成分5	主成分6	
BS	1.307	1.680	-0.150	0.427	-0.147	-0.010	0.917
CBZ	-0.573	-1.187	1.063	0.963	-1.097	0.223	-0.357
DZ	-0.483	1.270	0.817	-0.130	-0.373	-1.370	0.147
DG	-0.863	-0.927	0.093	-0.690	0.113	0.693	-0.540
DS	-1.360	-0.323	0.483	2.160	-1.503	-0.907	-0.430
GC	-0.920	-3.150	-0.997	-0.117	-0.817	0.690	-1.337
GQZ	2.740	0.860	0.137	-1.010	-0.137	0.333	1.057
HQ	-3.123	1.533	0.787	-0.007	0.290	2.257	-0.267
MD	1.447	1.650	0.230	-0.453	-0.210	0.490	0.943
MHL	-0.627	-0.620	1.053	0.563	-0.917	0.377	-0.227
RS	1.977	1.213	0.830	0.147	-0.487	-0.063	1.060
SD	-1.663	0.650	-0.537	-0.127	0.300	-0.733	-0.473
YYH	3.870	-0.190	-2.573	2.933	2.043	1.600	1.500
CX	-1.143	-0.160	-0.197	0.073	0.117	0.207	-0.407
DanS	2.147	-0.123	0.027	-0.323	-0.407	0.063	0.600
HH	-0.157	0.707	-0.260	-0.493	0.150	-0.560	0.027
JXT	2.140	-0.863	-0.107	-0.160	-0.407	-0.070	0.380
NX	-0.180	-1.317	-0.630	0.460	-0.470	-1.523	-0.627
DH	0.863	1.737	0.893	-1.257	-0.053	0.917	0.817
JMZ	-4.360	1.570	0.023	1.100	-0.230	1.317	-0.750
CS	-0.243	0.453	-0.657	-0.710	0.290	-0.850	-0.160
XS	-1.533	-0.223	-0.207	-0.067	-0.117	-0.360	-0.633
GG	2.493	2.870	-0.217	0.677	-0.780	-1.293	1.500
QH	2.063	-2.530	0.427	-0.560	-1.047	0.417	-0.107
FL	0.477	-3.023	3.770	0.940	2.237	-0.770	-0.017
ZX	0.417	0.637	0.200	-1.090	0.273	0.430	0.280
CP	-1.323	0.997	-0.773	1.970	0.670	-0.260	0.007
SJS	1.243	-2.677	0.517	-1.223	-0.610	1.167	-0.380
SQ	0.690	-1.353	-1.430	-1.840	1.307	-0.550	-0.483
SZ	-2.980	0.073	-1.420	-1.890	1.380	-0.580	-1.270
TM	-1.057	-2.960	-1.730	0.530	-0.340	-0.800	-1.437
WWZ	0.277	4.100	0.527	-0.370	0.413	-0.387	1.280
何首乌	-1.563	-0.373	0.013	-0.413	0.557	-0.103	-0.620

2.3 OPLS-DA

“2.2”项下研究结果显示,大部分与补虚类药物配伍

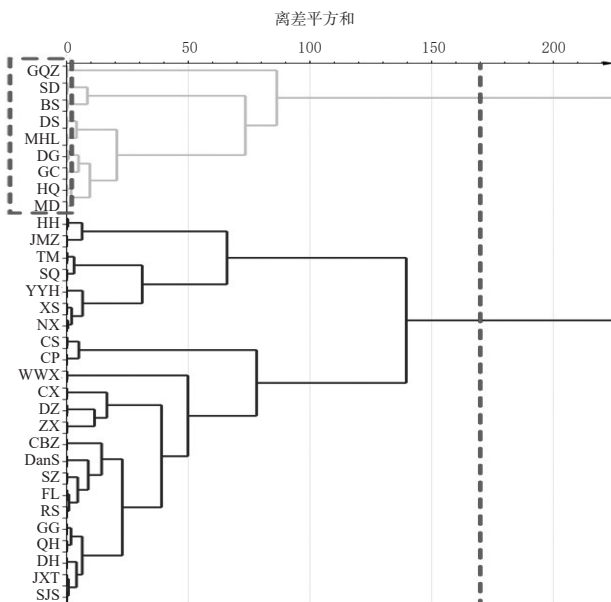


图3 主成分综合得分的聚类分析树状图

Fig 3 Dendrogram of cluster analysis for principal component comprehensive scores

的何首乌药对的成分与何首乌饮片相似,提示何首乌与补虚类及非补虚类药物配伍后其成分变化可能不同。故将32个何首乌配伍药对分为补虚类与非补虚类两类,每种药对样品平行3次,采用SIMCA 13.0软件进行有监督的OPLS-DA分析。结果显示,共得到4个主成分,特征值分别为2.32、2.61、1.58、0.90,模型决定系数(R^2)为0.752、预测优度参数(Q^2)为0.712,均大于0.5,表明所建模型具有良好的识别与预测能力^[16],详见图4。由图4可知,何首乌与补虚类配伍药对分布在得分图的左侧,何首乌与非补虚类配伍药对分布在得分图的右侧。这提示,何首乌与补虚类、非补虚类药物在配伍过程中,12个共有峰对应成分的含量变化存在差异,而何首乌与补虚类药物配伍后的成分含量变化与何首乌饮片具有相似性。

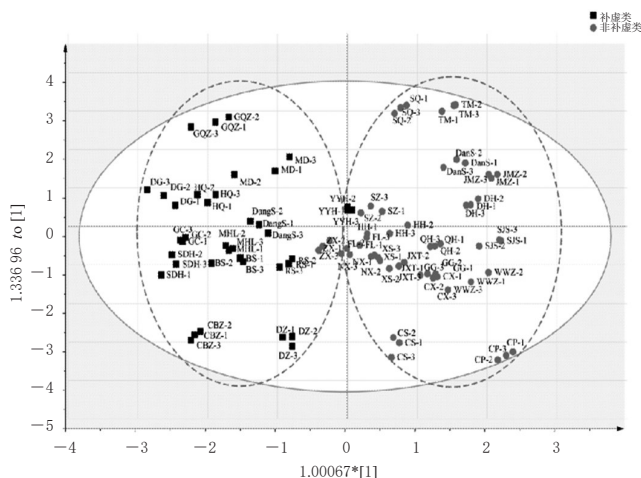


图4 OPLS-DA模型得分图

Fig 4 Score plot of OPLS-DA model

进一步对样品的差异性进行整体分析,得到变量重要性投影值(VIP值,VIP值可反映模型拟合的贡献水平,该值越大表明该变量对结果拟合具有显著意义)^[6],以VIP值>1^[6]为标准筛选造成差异的成分。结果显示,共得到贡献相对较大的4个变量色谱峰,VIP值由大到小依次为7、4、6、3号峰,详见图5。

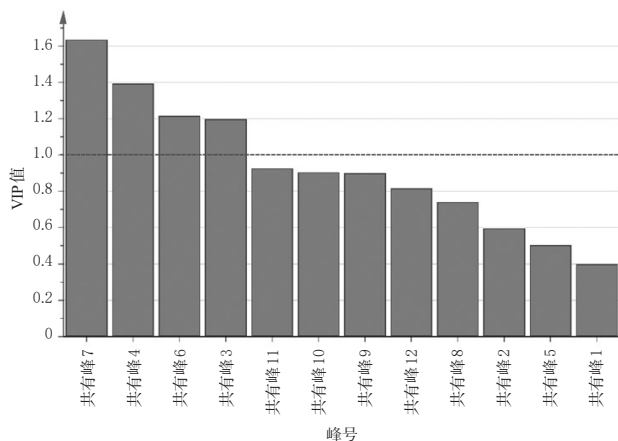


图5 OPLS-DA模型中各共有峰的VIP值

Fig 5 VIP values of common peaks in OPLS-DA model

3 讨论

本研究建立了以何首乌为核心配伍药对的UPLC指纹图谱。经方法学验证,所建方法的精密度、稳定性、重复性均符合中国药典要求;同时,以何首乌饮片为参照,32个配伍药对样品共有12个共有峰。由于配伍药对样品较多,需在建立色谱条件方法过程中通过不断调整梯度洗脱程序来保证32个配伍药对中何首乌的12个共有峰与其他色谱峰的有效分离。但因部分配伍药物存在与何首乌相同的化学成分或者结构类型相似的化学成分,而难以通过调整梯度洗脱程序将色谱峰完全分离,若采用指纹图谱相似度评价软件进行相似度分析,就会使得有些成分的峰面积存在较大误差,故本研究未进行相似度分析。此外,对上述未达到基线分离色谱峰的峰面积进行预处理:当何首乌及单味饮片在同一保留时间处均有色谱峰时,以何首乌饮片溶液中该色谱峰峰面积为a,单味饮片溶液中该色谱峰峰面积为b,何首乌与单味饮片配伍药对溶液中该色谱峰峰面积为c,由于本研究的共有峰均来源于何首乌,假设药对配伍溶液中该色谱峰峰面积的变化为何首乌中该成分的变化,故该色谱峰的峰面积为c-b,如果该值为负数,则以0表示。

PCA可对原始数据所包含的多个变量(即多指标)进行拟合,以新的低维度变量(即主成分)代替原始高维度变量,进而实现样本多指标数据的降维,体现不同中药样品聚类的相似性、中药样品与指标间的关联信息等^[4,17]。PCA结果显示,何首乌单味饮片以及何首乌与枸杞子、熟地黄、白芍、党参、墨旱莲、当归、甘草、黄芪、

麦冬的配伍药对聚为一类,配伍药物均为补虚类药物,提示何首乌与补虚类药物配伍后的成分含量变化具有相似性。

OPLS-DA可在有监督的情况下提取利于样品分类的变量信息,能较大程度地降低系统噪声的干扰,提高分类效能,具有较好的样本分组能力^[18]。OPLS-DA结果显示,何首乌与补虚类、非补虚类药物在配伍过程中,其成分分散在两个不同区域,具有明显的差异。笔者曾尝试采用液质联用技术对VIP值>1的成分(7、4、6、3号峰)进行鉴定,但4、6号峰对应的成分在正负离子下均无响应,7、3号峰的分子质量分别为406、246,由于试验条件有限未能获得二级质谱图,故暂无法根据一级质谱推断其成分结构。虽然8号峰的质谱信息显示其结构为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷,但该成分的VIP值小于0.5,提示该成分不是引起何首乌与补虚类、非补虚类药物配伍后含量差异的主要原因。

《神农本草经》中将药物的配伍关系归纳为“七情”,其中“相须”是指两种功效类似的药物配合应用,以增强原有药物的功效^[19]。本研究前期试验发现,何首乌多与补虚类药物“相须”配伍入药^[14]。何首乌与补虚类药物在“相须”配伍过程中其成分含量变化具有相似性,这为何首乌“相须”配伍机理研究提供了新的思路。此外,本研究中,何首乌与配伍药材均以质量比1:1进行配伍共煎,而临床实际应用中药配伍的比例较为多样。有研究认为,不同比例的何首乌-牛膝配伍对何首乌所含成分的影响有所差异^[20]。因此,不同配伍比例下的含量变化规律还有待后续研究进一步探讨。

综上所述,所建指纹图谱操作简便,结合多元统计分析可用于评价以何首乌为核心的32个配伍药对共有成分的含量变化。

参考文献

- [1] 周远,苏式兵.中药复方配伍的研究方法及其进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):202-208.
- [2] 罗光芝,季旭明,马婷,等.基于中医传承辅助平台分析含黄连-干姜药对方剂的组方规律[J].中国药房,2019,30(1):99-103.
- [3] 任素剑,林江,丘志良,等.中药组分配伍与方剂配伍的相关性研究[J].辽宁中医杂志,2019,46(4):711-714.
- [4] 刘娜,李军,李宝国.多元统计分析在中药质量控制中的应用和思考[J].中国中药杂志,2014,39(21):4268-4271.
- [5] 黄萌萌,王琪,李晓琦,等.基于全-精细指纹图谱与多元统计分析的栀子炒制前后差异评价[J].中草药,2020,51(9):2460-2466.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:175-177.
- [7] 卢多逊,李昉.开宝本草辑复本[M].尚志钧,辑校.合肥:安徽科学技术出版社,1998:253.
- [8] 吴成胜,孙蓉.何首乌临床研究进展与安全应用思考[J].中国中药杂志,2017,42(2):259-263.
- [9] 庞晶瑶,李雨萌,柏兆方,等.基于高内涵分析何首乌对肝窦内皮细胞损伤的配伍减毒研究[J].中国现代中药,2015,17(4):331-334.
- [10] 蔡新荣.莱菔子与何首乌、熟地配伍致不良反应1例[J].中国中西医结合杂志,1996,16(10):633.
- [11] 罗春颖,黄晓婧,史翌川,等.何首乌及其制剂的安全性研究进展及风险因素分析[J].亚太传统医药,2018,14(1):53-56.
- [12] 唐于平,尚尔鑫,陈艳琰,等.药对配伍效应与功效物质现代研究方法策略[J].药学报,2019,54(9):1564-1573.
- [13] 郭玲玲,颜永刚,王红艳,等.桃仁-大黄药对在中药方剂中发挥功效的相关因素分析[J].中国药房,2017,28(23):3188-3191.
- [14] 张慧杰,孙浩,安雅婷,等.《中国药典》成方制剂中何首乌药对配伍规律分析[J].中南药学,2019,17(4):622-625.
- [15] JAYARAMANN U, GUPTA AK. An efficient minutiae based geometric hashing for fingerprint database[J]. *Neurocomputing*, 2014, 137(5):115-126.
- [16] 李园,李秀丽,王淑,等.不同淫羊藿羊脂油烘制品的HPLC指纹图谱建立、多元统计分析及烘制工艺优化[J].中国药房,2020,31(12):1480-1486.
- [17] TRYGG J, WOLD S. Orthogonal projections to latent structures: O-PLS[J]. *J Chemometrics*, 2002(16):119-128.
- [18] WIKLUND S, JOHANSSON E, SJÖSTRÖM L, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(1):115-122.
- [19] 孙鑫,钱会南.《神农本草经》中药理论体系框架研究:上[J].中华中医药杂志,2015,30(6):1871-1874.
- [20] 孙艳涛,王冰,张明波,等.不同配比何首乌、牛膝药对指纹共有模式和基于主成分分析的等级评价研究[J].中国医院药学杂志,2020,40(5):510-514.

(收稿日期:2020-05-15 修回日期:2020-09-01)

(编辑:陈宏)