

指纹图谱结合化学计量法对葛根抗氧化活性部位的药效物质筛选^Δ

庞会娜^{1,2*}, 范琳^{1,2}, 肖凤琴², 于倩², 王海东², 沈颖昕², 韩荣欣², 严铭铭^{2#}, 邵帅^{1,2#}(1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 吉林省中药保健食品科技创新中心, 长春 130117)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0839-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.12

摘要 目的: 筛选葛根抗氧化活性部位的药效物质。方法: 制备20批葛根抗氧化活性部位样品(S1~S20)。采用高效液相色谱法(HPLC)法测定, 色谱柱为SepaxBio-C₁₈, 柱温为25℃, 检测波长为250 nm, 流动相为甲醇-水(梯度洗脱), 流速为0.6 mL/min。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)建立20批葛根抗氧化活性部位的HPLC指纹图谱并进行共有峰指认。结合聚类分析法、主成分分析(PCA)法和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)法, 筛选葛根抗氧化活性部位的药效物质。结果: 20批葛根抗氧化活性部位HPLC指纹图谱共有18个共有峰, 相似度均大于0.99。共指认了8个共有峰, 分别为3'-羟基葛根素(峰2)、葛根素(峰3)、3'-甲氧基葛根素(峰4)、大豆苷(峰5)、染料木苷(峰7)、芒柄花苷(峰11)、大豆苷元(峰13)、染料木素(峰16); 经聚类分析、PCA法分析发现, 样品S1、S3、S4、S6、S8、S18、S19聚为一类, 样品S2、S5、S7、S9~S17、S20聚为一类, 对主成分1影响较大的有峰2、峰3、峰10、峰11、峰13, 对主成分2影响较大有峰8、峰9; 经OPLS-DA分析发现, 峰4、峰3、峰2、峰16、峰13、峰11对葛根抗氧化活性部位质量的影响较大。结论: 本研究建立了葛根抗氧化活性部位的HPLC指纹图谱, 指认了8个成分, 其中葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷元和芒柄花苷可能为葛根抗氧化作用的药效物质基础。

关键词 葛根; 抗氧化活性部位; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学计量法

Effective Component Screening in Antioxidant Active Fraction of *Pueraria lobata* by Fingerprint Combined with Chemometrics

PANG Huina^{1,2}, FAN Lin^{1,2}, XIAO Fengqin², YU Qian², WANG Haidong², SHEN Yingxin², HAN Rongxin², YAN Mingming², SHAO Shuai^{1,2}(1. School of Medicine, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2. Jilin Province Center for TCM Health Food Science and Technology Innovation, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen the effective component in antioxidant active fraction of *Pueraria lobata*. METHODS: The antioxidant active fraction sample (S1-S20) of 20 batches of *P. lobata* were prepared. HPLC method was adopted. The determination was performed on SepaxBio-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water (gradient elution) at the flow rate of 0.6 mL/min. The column temperature was set at 25 °C, and detection wavelength was set at 250 nm. HPLC fingerprints of 20 batches of *P. lobata* were established by the *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprints* (2012 edition), and common peaks were identified. Cluster analysis, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to screen the effective components in antioxidant active fraction of *P. lobata*. RESULTS: There were 18 common peaks in HPLC fingerprints of 20 batches of antioxidant active fraction in *P. lobata*, and the similarity was more than 0.99. Eight common peaks were identified, which were 3'-hydroxy puerarin (peak 2), puerarin (peak 3), 3'-methoxy puerarin (peak 4), daidzein (peak 5), genistein (peak 7), formononetin (peak 11), daidzein (peak 13) and genistein (peak 16). The results of cluster analysis and PCA analysis showed that samples S1, S3, S4, S6, S8, S18 and S19 were clustered into one category, and samples S2, S5, S7, S9-S17 and S20 were clustered into one category; peak 2, peak 3, peak 10, peak 11 and peak 13 had great influence on principal component 1; peak 8 and peak 9 had great influence on principal component 2. OPLS-DA analysis showed that peak 4, peak 3, peak 2, peak 16, peak 13 and peak 11 had great influence on the quality of antioxidant active fraction of *P. lobata*. CONCLUSIONS: HPLC fingerprint for active fraction of *P. lobata* is established in the study and 8 components are identified; among them, puerarin, 3'-hydroxy puerarin, daidzein and formononetin may be the material basis of antioxidant fraction of *P. lobata*.

KEYWORDS *Pueraria lobata*; Antioxidant fraction; HPLC; Fingerprint; Chemometrics

Δ 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No.20180623041TC)

* 硕士研究生。研究方向: 药物化学。E-mail: 1812622556@qq.com

#a 通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 药物化学、中药化学、新药及保健食品。E-mail: yanmm595@126.com

#b 通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 药物化学、中药化学及保健食品。E-mail: 36038612@qq.com

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 历代本草均有记载, 具有解肌退热、生津止渴、升阳止泻等功效^[1]。现代研究表明, 葛根含有葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木素、染料木苷、芒柄花苷等异黄酮类活性成分^[2-3], 具有抗癌^[4]、保护心肌^[5]、解酒保肝^[6]、降血脂^[7]、降血糖^[8]、抗衰老^[9]等多种药理作用。近年来, 研究发现, 人体细胞在氧化还原代谢过程中可产生少量自由基, 当超过人体自身清除能力时, 多余的自由基就会残留人体内, 产生氧化应激, 从而引起多种疾病^[10-11]。相关研究发现, 葛根的多糖和总黄酮均具有明显的抗氧化活性, 但研究主要集中在其有效物质的提取及活性研究方面^[12], 并未针对其具体的氧化活性部位进行深入研究。

中药是通过多种成分的协同作用来发挥疗效的, 因此有必要对其药效确切的活性部位开展质量控制研究。指纹图谱因其整体性、全面性、关联性、层次性, 能够较完整地获得中药的化学成分信息, 常与化学计量学相结合以从多个方面评价中药的质量, 且这种方法目前已成为国际公认的控制中药质量的有效手段之一^[13-14]。本课题组前期筛选了葛根抗氧化活性部位, 基于此, 本研究制备了20批葛根药材的抗氧化活性部位, 以建立其高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并结合聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等化学计量法筛选葛根抗氧化作用的药效物质, 以期为葛根抗氧化活性成分的确定提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有: Agilent1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、ALB-224型万分之一分析天平(德国Sartorius公司)、RT-12型粉碎机(河北本辰科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用20批葛根药材(编号A1~A20)均购自北京本草方源药业集团有限公司(药材产地均为河南, 批号分别为20190321、20190415、20190506、20190913、20190930、20191010、20191020、20191108、20191123、20191207、20191218、20200105、20200116、20200308、20200322、20200516、20200526、20200603、20200613、20200625), 经长春中医药大学人参科学研究院姜大成教授鉴定为豆科植物野葛 *P. lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根; 所用主要试剂为葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木素、染料木苷、芒柄花苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为S02M9B54875、P14M10F83057、C06N6Y5504、H30A9Z69019、P09M8F31018、M02A11-

S120167), 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号分别为wkq-00019、wkq-01640); 乙酸乙酯、正丁醇为分析纯, 甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯或实验室常用规格, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 葛根抗氧化活性部位样品的制备

参考文献[15]方法, 取葛根药材100 g, 粉碎, 过100目筛, 以70%乙醇回流提取3次, 每次1.0 h; 合并滤液, 于50℃条件下减压浓缩, 得葛根醇提取物浸膏。取上述浸膏, 加适量水溶解, 并用乙酸乙酯萃取3次; 合并萃取液, 于50℃条件下减压浓缩, 干燥, 即得葛根抗氧化活性部位粉末[得率为3%~4%(以生药量计)], 于4℃保存, 备用。本研究以20批葛根药材分别制得20批葛根抗氧化活性部位样品(编号S1~S20)。

2.2 葛根抗氧化活性部位 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 色谱柱为SepaxBio-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱(0~10 min, 25% A; 10~15 min, 25% A→27% A; 15~25 min, 27% A→30% A; 25~50 min, 30% A→100% A; 50~60 min, 100% A→25% A); 流速为0.6 mL/min; 检测波长为250 nm; 柱温为25℃; 进样量为10 μL。

2.2.2 溶液的制备 (1)混合对照品溶液: 分别精密称取葛根素、染料木素、染料木苷、大豆苷、大豆苷元、芒柄花苷、3'-甲氧基葛根素、3'-羟基葛根素对照品各适量, 置于同一量瓶中, 加甲醇溶解制成质量浓度分别为0.071、0.023、0.042、0.076、0.017、0.087、0.022、0.019 mg/mL的混合对照品溶液。(2)供试品溶液: 分别精密称取葛根抗氧化活性部位样品适量, 加适量甲醇溶解, 超声(功率为200 W, 频率为45 kHz)处理15 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为2.02 mg/mL(以提取物计, 下同)的供试品溶液。

2.2.3 精密度试验 取“2.2.2(2)”项下供试品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次。以峰11(该峰峰形较好且分离度良好、峰面积稳定, 故选此峰为参照峰, 下同)的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 18个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.4% ($n=6$), 相对峰面积的RSD均小于3.0% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取葛根抗氧化活性部位样品(编号S19), 共6份, 按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。以峰11的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 18个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.5% ($n=6$), 相对峰面积的RSD均小于3.0% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 取“2.2.2(2)”项下供试品溶液(编号S19)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h后,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以峰11的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,18个共有峰相对保留时间的RSD均小于1.3% ($n=6$),相对峰面积的RSD均小于3.0% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.6 葛根抗氧化活性部位HPLC指纹图谱的生成 分别取20批葛根抗氧化活性部位样品适量,按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对20批样品的HPLC图谱进行处理,采用平均数法,将时间窗设置为0.1 min,以编号S10样品的色谱图为参照图谱,经多点校正后,进行色谱峰的匹配,生成对照图谱(R),得到葛根抗氧化活性部位HPLC叠加指纹图谱,详见图1。

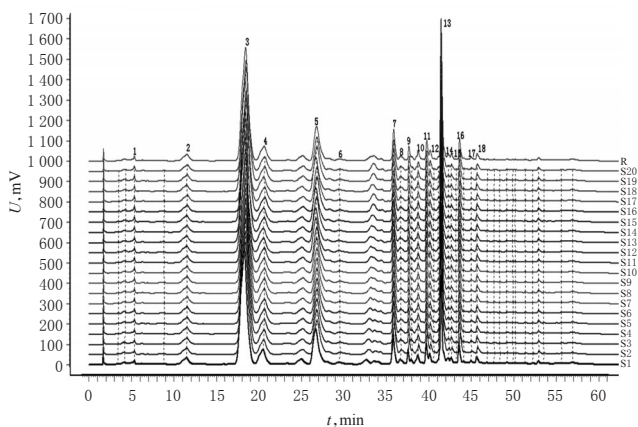
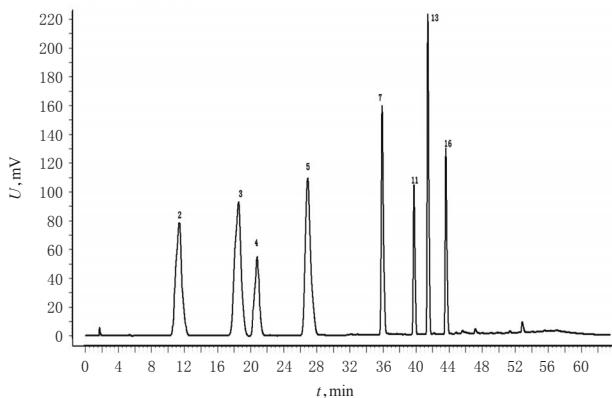


图1 20批葛根抗氧化活性部位样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprint for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

2.2.7 共有峰的指认及相关分析 取“2.2.2(1)”项下混合对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图2。将图1与图2比对可知,20批葛根抗氧化活性部位样品共含18个共有峰,其中峰2为3'-羟基葛根素、峰3为葛根素、峰4为3'-甲氧基葛根素、峰5为大豆苷、峰7为染料木苷、峰11为芒柄花苷、峰13为大豆苷元、峰16为染料木素。20批葛根抗氧化活性部位共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表1、表2。

2.2.8 相似度评价 将20批葛根抗氧化活性部位样品的HPLC指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价。结果,20批葛根抗氧化活性部位样品的HPLC指纹图谱与对照图谱(R)的相似度均大于0.99,表明各批样品的化学成分一致性较好,详见表3。



注:2. 3'-羟基葛根素;3. 葛根素;4. 3'-甲氧基葛根素;5. 大豆苷;7. 染料木苷;11. 芒柄花苷;13. 大豆苷元;16. 染料木素

Note: 2. 3'-hydroxypterarin; 3. puerarin; 4. 3'-methoxypterarin; 5. daidzin; 7. genistein; 11. formononetin; 13. daidzein; 16. genistein

图2 混合对照品的HPLC图谱

Fig 2 HPLC fingerprint of mixed control

2.3 葛根抗氧化活性部位的药效物质筛选

2.3.1 聚类分析 以20批葛根抗氧化活性部位的HPLC指纹图谱中18个共有峰的峰面积为原始数据,采用SPSS 21.0软件对原始数据进行标准化,以组间均联法结合平方欧氏距离对20批葛根抗氧化活性部位样品进行聚类分析。结果,当平方欧氏距离为15时可将20批样品聚为2类:样品S1、S3、S4、S6、S8、S18、S19聚为一类;样品S2、S5、S7、S9~17、S20号聚为一类,详见图3。

2.3.2 主成分分析 以葛根抗氧化活性部位的HPLC指纹图谱中18个共有峰的峰面积为变量,建立20×18的原始数据矩阵,并使用多元统计软件SIMCA 14.1对20批葛根抗氧化活性部位进行主成分分析,计算其主成分得分。结果,20批葛根抗氧化活性部位可聚为2类:样品S1、S3、S4、S6、S8、S18、S19聚为一类;样品S2、S5、S7、S9~S17、S20聚为一类。这与聚类分析结果相一致。20批葛根抗氧化活性部位的主成分得分图见图4。

以18个共有峰为变量,使用SIMCA 14.1软件进行分析,筛选出贡献最大的2个主成分,贡献率之和为77.169%(即这2个主成分能反映葛根抗氧化活性部位的基本特征),并得到20批葛根抗氧化活性部位的主成分荷载图,详见图5(图中每个点代表1个色谱峰,表示每个色谱峰对主成分综合作用的贡献;距离载荷图原点越远的点,其变量权重越大,即表明化学成分与样品质量的相关性越强^[16-17])。由图5可知,对主成分1影响较大有峰2(3'-羟基葛根素)、峰3(葛根素)、峰10、峰11(芒柄花苷)、峰13(大豆苷元),对主成分2影响较大有峰8、峰9。

2.3.3 OPLS-DA 为了更好地分析样品间的差异,使用SIMCA14.1软件对20批葛根抗氧化活性部位进行

表1 20批葛根抗氧化活性部位共有峰相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of common peak for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

| 样品编号 | 峰号 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S1 | 0.135 | 0.289 | 0.461 | 0.516 | 0.672 | 0.740 | 0.902 | 0.922 | 0.945 | 0.975 | 1.000 | 1.012 | 1.043 | 1.063 | 1.074 | 1.098 | 1.133 | 1.150 |
| S2 | 0.135 | 0.289 | 0.462 | 0.517 | 0.675 | 0.745 | 0.905 | 0.924 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.014 | 1.043 | 1.066 | 1.078 | 1.099 | 1.134 | 1.152 |
| S3 | 0.135 | 0.291 | 0.462 | 0.519 | 0.675 | 0.743 | 0.903 | 0.924 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.072 | 1.096 | 1.131 | 1.148 |
| S4 | 0.135 | 0.291 | 0.464 | 0.519 | 0.675 | 0.743 | 0.903 | 0.924 | 0.945 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.043 | 1.064 | 1.074 | 1.097 | 1.131 | 1.148 |
| S5 | 0.135 | 0.291 | 0.464 | 0.519 | 0.675 | 0.743 | 0.903 | 0.922 | 0.945 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.072 | 1.096 | 1.133 | 1.150 |
| S6 | 0.135 | 0.291 | 0.464 | 0.519 | 0.675 | 0.745 | 0.903 | 0.922 | 0.945 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.074 | 1.097 | 1.133 | 1.148 |
| S7 | 0.135 | 0.291 | 0.464 | 0.519 | 0.675 | 0.743 | 0.903 | 0.924 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.070 | 1.096 | 1.133 | 1.150 |
| S8 | 0.135 | 0.291 | 0.466 | 0.519 | 0.675 | 0.745 | 0.903 | 0.922 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.043 | 1.062 | 1.072 | 1.097 | 1.131 | 1.150 |
| S9 | 0.135 | 0.290 | 0.464 | 0.519 | 0.674 | 0.743 | 0.903 | 0.922 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.072 | 1.097 | 1.133 | 1.148 |
| S10 | 0.135 | 0.291 | 0.464 | 0.519 | 0.673 | 0.741 | 0.903 | 0.922 | 0.945 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.043 | 1.064 | 1.072 | 1.097 | 1.133 | 1.150 |
| S11 | 0.133 | 0.291 | 0.464 | 0.519 | 0.674 | 0.741 | 0.903 | 0.922 | 0.945 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.074 | 1.095 | 1.131 | 1.150 |
| S12 | 0.135 | 0.289 | 0.463 | 0.518 | 0.674 | 0.740 | 0.902 | 0.924 | 0.947 | 0.977 | 1.000 | 1.012 | 1.045 | 1.064 | 1.076 | 1.100 | 1.135 | 1.152 |
| S13 | 0.135 | 0.289 | 0.463 | 0.518 | 0.672 | 0.740 | 0.902 | 0.924 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.043 | 1.064 | 1.076 | 1.098 | 1.133 | 1.150 |
| S14 | 0.135 | 0.290 | 0.464 | 0.519 | 0.673 | 0.741 | 0.901 | 0.924 | 0.945 | 0.973 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.074 | 1.095 | 1.133 | 1.148 |
| S15 | 0.135 | 0.289 | 0.463 | 0.518 | 0.672 | 0.740 | 0.902 | 0.924 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.043 | 1.062 | 1.074 | 1.100 | 1.133 | 1.150 |
| S16 | 0.135 | 0.291 | 0.466 | 0.521 | 0.674 | 0.745 | 0.903 | 0.920 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.072 | 1.097 | 1.131 | 1.148 |
| S17 | 0.135 | 0.291 | 0.466 | 0.521 | 0.675 | 0.743 | 0.903 | 0.922 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.043 | 1.062 | 1.074 | 1.097 | 1.133 | 1.148 |
| S18 | 0.133 | 0.289 | 0.463 | 0.518 | 0.672 | 0.742 | 0.902 | 0.924 | 0.947 | 0.975 | 1.000 | 1.008 | 1.043 | 1.062 | 1.074 | 1.098 | 1.133 | 1.152 |
| S19 | 0.135 | 0.291 | 0.466 | 0.521 | 0.674 | 0.743 | 0.903 | 0.924 | 0.947 | 0.977 | 1.000 | 1.010 | 1.041 | 1.062 | 1.072 | 1.096 | 1.131 | 1.150 |
| S20 | 0.135 | 0.291 | 0.464 | 0.521 | 0.674 | 0.745 | 0.901 | 0.926 | 0.949 | 0.975 | 1.000 | 1.010 | 1.043 | 1.064 | 1.074 | 1.097 | 1.133 | 1.148 |

表2 20批葛根抗氧化活性部位共有峰的相对峰面积

Tab 2 Relative peak areas of common peak for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

| 样品编号 | 峰号 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S1 | 0.267 | 1.178 | 21.674 | 2.733 | 5.731 | 0.258 | 2.159 | 0.394 | 0.634 | 0.607 | 1.000 | 0.459 | 7.742 | 0.284 | 0.296 | 1.024 | 0.115 | 0.374 |
| S2 | 0.263 | 1.177 | 21.682 | 2.739 | 5.717 | 0.256 | 2.161 | 0.393 | 0.641 | 0.609 | 1.000 | 0.463 | 7.754 | 0.277 | 0.291 | 1.028 | 0.114 | 0.377 |
| S3 | 0.268 | 1.176 | 21.669 | 2.738 | 5.707 | 0.257 | 2.178 | 0.394 | 0.644 | 0.599 | 1.000 | 0.462 | 7.753 | 0.279 | 0.297 | 1.031 | 0.115 | 0.374 |
| S4 | 0.267 | 1.178 | 21.674 | 2.733 | 5.731 | 0.259 | 2.159 | 0.394 | 0.634 | 0.607 | 1.000 | 0.459 | 7.742 | 0.284 | 0.296 | 1.024 | 0.115 | 0.374 |
| S5 | 0.260 | 1.177 | 21.682 | 2.739 | 5.717 | 0.260 | 2.161 | 0.393 | 0.641 | 0.609 | 1.000 | 0.463 | 7.754 | 0.277 | 0.291 | 1.028 | 0.114 | 0.377 |
| S6 | 0.268 | 1.176 | 21.669 | 2.738 | 5.707 | 0.256 | 2.178 | 0.394 | 0.644 | 0.599 | 1.000 | 0.462 | 7.753 | 0.279 | 0.296 | 1.031 | 0.115 | 0.374 |
| S7 | 0.261 | 1.177 | 21.615 | 2.724 | 5.731 | 0.256 | 2.160 | 0.391 | 0.631 | 0.613 | 1.000 | 0.453 | 7.740 | 0.287 | 0.290 | 1.027 | 0.114 | 0.373 |
| S8 | 0.263 | 1.177 | 21.582 | 2.713 | 5.746 | 0.263 | 2.160 | 0.391 | 0.625 | 0.614 | 1.000 | 0.452 | 7.729 | 0.284 | 0.295 | 1.025 | 0.115 | 0.372 |
| S9 | 0.258 | 1.173 | 21.527 | 2.706 | 5.597 | 0.263 | 2.154 | 0.389 | 0.628 | 0.614 | 1.000 | 0.454 | 7.710 | 0.282 | 0.289 | 1.021 | 0.114 | 0.371 |
| S10 | 0.253 | 1.174 | 21.524 | 2.706 | 5.725 | 0.260 | 2.152 | 0.388 | 0.627 | 0.614 | 1.000 | 0.454 | 7.710 | 0.284 | 0.289 | 1.023 | 0.116 | 0.372 |
| S11 | 0.253 | 1.172 | 21.508 | 2.702 | 5.625 | 0.259 | 2.151 | 0.388 | 0.626 | 0.613 | 1.000 | 0.456 | 7.696 | 0.282 | 0.287 | 1.023 | 0.112 | 0.372 |
| S12 | 0.250 | 1.172 | 21.493 | 2.699 | 5.604 | 0.260 | 2.150 | 0.386 | 0.626 | 0.616 | 1.000 | 0.456 | 7.704 | 0.286 | 0.289 | 1.021 | 0.116 | 0.372 |
| S13 | 0.247 | 1.172 | 21.493 | 2.697 | 5.338 | 0.262 | 2.163 | 0.385 | 0.624 | 0.616 | 1.000 | 0.454 | 7.701 | 0.287 | 0.287 | 1.020 | 0.115 | 0.373 |
| S14 | 0.246 | 1.173 | 21.512 | 2.696 | 5.613 | 0.264 | 2.166 | 0.382 | 0.623 | 0.618 | 1.000 | 0.455 | 7.708 | 0.284 | 0.289 | 1.019 | 0.114 | 0.372 |
| S15 | 0.251 | 1.170 | 21.449 | 2.684 | 5.320 | 0.266 | 2.167 | 0.380 | 0.620 | 0.617 | 1.000 | 0.453 | 7.685 | 0.286 | 0.287 | 1.011 | 0.114 | 0.368 |
| S16 | 0.256 | 1.171 | 21.485 | 2.683 | 5.324 | 0.271 | 2.174 | 0.376 | 0.618 | 0.617 | 1.000 | 0.452 | 7.708 | 0.283 | 0.287 | 1.019 | 0.115 | 0.386 |
| S17 | 0.251 | 1.169 | 21.455 | 2.677 | 5.440 | 0.270 | 2.180 | 0.373 | 0.615 | 0.612 | 1.000 | 0.446 | 7.704 | 0.281 | 0.287 | 1.016 | 0.113 | 0.385 |
| S18 | 0.252 | 1.169 | 21.483 | 2.674 | 5.411 | 0.271 | 2.188 | 0.369 | 0.615 | 0.615 | 1.000 | 0.445 | 7.705 | 0.281 | 0.292 | 1.015 | 0.115 | 0.383 |
| S19 | 0.256 | 1.169 | 21.491 | 2.676 | 5.448 | 0.279 | 2.191 | 0.359 | 0.620 | 0.607 | 1.000 | 0.450 | 7.691 | 0.277 | 0.290 | 1.022 | 0.108 | 0.383 |
| S20 | 0.248 | 1.169 | 21.486 | 2.695 | 5.343 | 0.261 | 2.176 | 0.363 | 0.611 | 0.617 | 1.000 | 0.437 | 7.708 | 0.287 | 0.286 | 1.012 | 0.114 | 0.370 |

OPLS-DA,结合主成分分析的结果,使用OPLS-DA法建模分析。结果,OPLS-DA得分矩阵图见图6;数据矩阵的模型区分参数 $R^2X=0.77$ 、 $R^2Y=0.964$,模型预测参数 $Q^2=0.946$ (其中, R^2X 表示概括X矩阵的结实率; R^2Y 表示模型的稳定性; Q^2 cum表示模型的预测性; R^2Y 和 Q^2 越接近1说明模型的稳定性和预测性越好^[19]),表明本研究所建立的OPLS-DA模型稳定,具有较强的预测能力。

为确定各共有峰对葛根抗氧化活性部位质量差异

产生的影响,采用变量重要性投影法(VIP)进行分析,提取OPLS-DA模型中18个共有峰的VIP值,以 $VIP>1.0$ 且误差线不超过原点为选取原则^[19]进行筛选。结果,共筛选得到6个影响较大的峰,从大到小依次为峰4、峰3、峰2、峰16、峰13、峰11,详见图7。

另以18个共有峰面积为变量,使用SIMCA14.1软件进行分析,得到OPLS-DA模型中各共有峰的载荷图,详见图8。由图8可知,峰4(3'-甲氧基葛根素)、峰3(葛

表3 20批葛根抗氧化活性部位相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation result for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

| 样品编号 | 相似度 | 样品编号 | 相似度 |
|------|-------|------|-------|
| S1 | 0.995 | S11 | 0.998 |
| S2 | 0.996 | S12 | 0.997 |
| S3 | 0.994 | S13 | 0.995 |
| S4 | 0.996 | S14 | 0.999 |
| S5 | 0.993 | S15 | 0.996 |
| S6 | 0.997 | S16 | 0.993 |
| S7 | 0.999 | S17 | 0.997 |
| S8 | 0.998 | S18 | 0.995 |
| S9 | 0.999 | S19 | 0.996 |
| S10 | 0.999 | S20 | 0.994 |

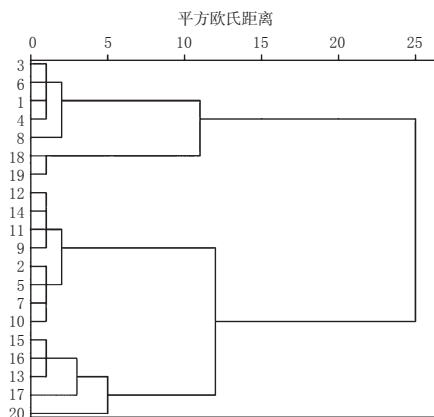


图3 20批葛根抗氧化活性部位聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis dendrogram for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

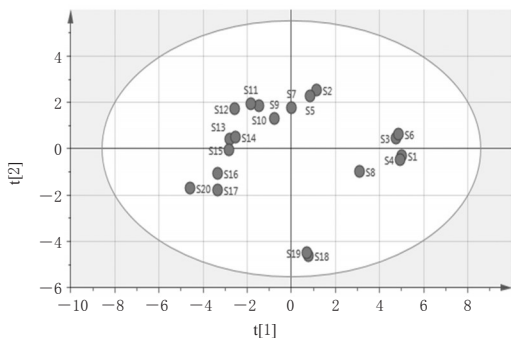


图4 20批葛根抗氧化活性部位的主成分得分图

Fig 4 Principal component score diagram for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

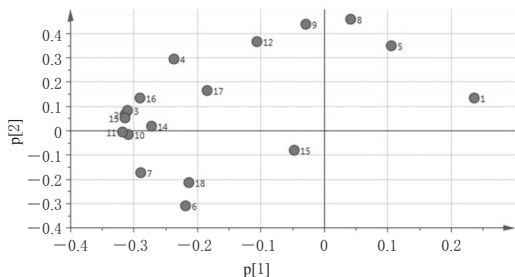


图5 20批葛根抗氧化活性部位的主成分荷载图

Fig 5 Principal component load diagram for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

根素)、峰2(3'-羟基葛根素)、峰16(染料木素)、峰13(大豆苷元)、峰11(芒柄花苷)离原点较远,表明这6个峰对葛根抗氧化活性部位质量的影响较大。结合主成分分析结果,推测葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷元和芒柄花苷可能为葛根抗氧化作用的药效物质。

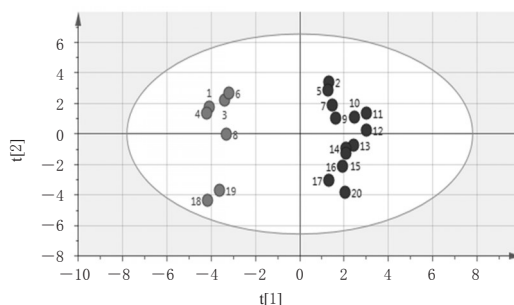


图6 20批葛根抗氧化活性部位 OPLS-DA 得分矩阵图

Fig 6 OPLS-DA score matrix diagram for 20 batches of antioxidant fraction of *P. lobata*

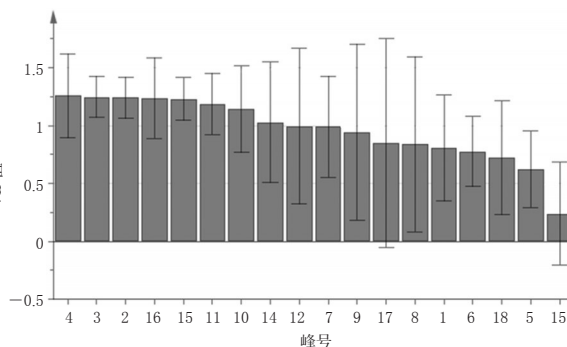


图7 OPLS-DA 模型中各色谱峰的VIP值

Fig 7 VIP of each peak in OPLS-DA model

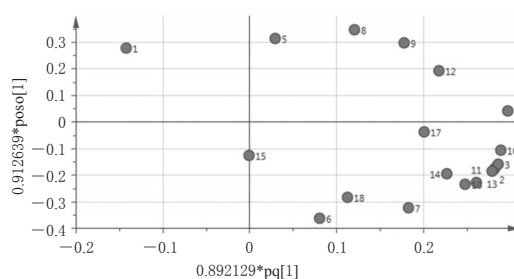


图8 OPLS-DA 模型中各共有峰的载荷图

Fig 8 Load diagram for each common peak in OPLS-DA model

3 讨论

3.1 HPLC 色谱条件优化

本课题组前期在葛根抗氧化活性部位 HPLC 指纹图谱研究中,考察了流动相等度洗脱,结果发现其分离时间较长,且分离效果不佳。基于此,选择流动相为甲醇(A)-水(B)进行梯度洗脱。同时,考察了4种不同洗脱程序:程序1(0~30 min, 30% A; 30~50 min, 30% A→100% A; 50~60 min, 100% A→30% A)、程序2(0~25 min, 30% A; 25~50 min, 30% A→100% A; 50~60 min,

100% A→30% A)、程序3(0~10 min, 20% A; 10~25 min, 20% A→25% A; 25~50 min, 25% A→100% A; 50~60 min, 100% A→20% A)、程序4(0~10 min, 25% A; 10~15 min, 25% A→27% A; 15~25 min, 27% A→30% A; 25~50 min, 30% A→100% A; 50~60 min, 100% A→25% A)。结果发现,按程序4进行梯度洗脱,各色谱峰分离度较好且基线平稳,有利于指纹图谱的研究。

3.2 指纹图谱结合化学计量法筛选葛根抗氧化活性部位的药效物质

本研究采用HPLC法建立了葛根抗氧化活性部位的指纹图谱,确定了18个共有峰,各批样品色谱图的相似度均大于0.99,且20批样品共有峰的相对保留时间、相对保留峰面积的RSD均小于3.0%。通过与混合对照品溶液对比,指出8个共有峰成分,分别为葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木素、染料木苷、芒柄花苷、3'-甲氧基葛根素、3'-羟基葛根素。为了进一步比较20批葛根抗氧化活性部位化学成分的差异,并寻找其可能的药效物质,笔者进一步采用聚类分析、主成分分析和OPLS-DA等化学计量学方法,对20批样品进行分析比较。结果发现,20批葛根抗氧化活性部位样品可聚为2类,其中S1、S3、S4、S6、S8、S18、S19聚为一类,S2、S5、S7、S9~S17、S20聚为一类;峰3(葛根素)、峰2(3'-羟基葛根素)、峰13(大豆苷元)、峰11(芒柄花苷)可能为葛根抗氧化作用的药效物质。相关文献也表明,上述4种成分在抗氧化方面均具有显著疗效^[20-23]。

综上所述,本研究成功建立了葛根抗氧化活性部位的HPLC指纹图谱,指出了8个共有峰成分;结合化学计量法发现,葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷元和芒柄花苷可能为葛根抗氧化作用的药效物质。

参考文献

[1] 咎丽霞.葛根的药理作用与综合利用研究进展[J].亚太传统医药,2010,6(12):161-162.

[2] 季鹏,张蕾,李民.葛根化学成分研究[J].中国药师,2020,23(6):1184-1188.

[3] 郭丽娜,王单单,裴媛,等.葛根主要活性成分及作用机制的网络药理学研究[J].药物评价研究,2019,42(9):1741-1748.

[4] ZHANG J L, XU W, ZHOU Z R, et al. Antineoplastic constituents from the chemical diversified extract of radix puerariae[J]. Chem Biodiversity, 2019, 16(1): e1800408.

[5] 王湘,郭玉芳,王爽,等.葛根素对妊娠期糖尿病大鼠心肌损伤的影响[J].中国临床药理学杂志,2020,36(17):2643-2645.

[6] 张国哲,季建伟,刘平平,等.葛根、葛花及其总黄酮对酒精性肝病大鼠防治作用研究[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(11):29-32.

[7] 治丁铭,隋殿军,岂蕊,等.基于网络药理学探讨葛根治疗高脂蛋白血症的潜在作用靶点[J].吉林大学学报(医学版),2018,44(4):724-730,891.

[8] 张路煜,刘玉晖,游宇,等.葛根对2型糖尿病大鼠胰腺内质网应激相关蛋白GRP78、ATF6表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(20):82-87.

[9] 吴迪,刘平平,李萌,等.葛根水提液及葛根发酵液的体外抗氧化及抗衰老功效评价[J].食品工业科技,2019,40(12):285-290,294.

[10] 汪启兵,许凡萍,魏超贤,等.人体内自由基的研究进展[J].中华流行病学杂志,2016,37(8):1175-1182.

[11] 周宗灿.氧化还原信号和氧化应激/还原应激[J].毒理学杂志,2015,29(1):1-14.

[12] 李玲,谭力,全沁果,等.野葛块根异黄酮的提取及抗氧化研究[J].浙江农业学报,2016,28(3):496-501.

[13] 李强,杜思邈,张忠亮,等.中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J].中草药,2013,44(22):3095-3104.

[14] 孙国祥,闫波,侯志飞,等.中药色谱指纹图谱评价方法研究进展[J].中南药学,2015,13(7):673-681.

[15] 李现日,张杰,张英美,等.金花葵花黄酮提取物不同溶剂萃取物的抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(11):120-125.

[16] 姜建萍,王美琪,马雯芳,等.基于多种分析模式构建壮药滇桂艾纳香HPLC指纹图谱[J].中药材,2018,41(1):124-128.

[17] 杨光.基于物质基础表征与新型化学模式识别方法的辛夷质量控制与药物动力学研究[D].上海:第二军医大学,2017.

[18] 李潮,于欢,温柔,等.江西不同产区车前子药材的HPLC指纹图谱及其多成分化学模式识别分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(15):161-167.

[19] 周昱杉,梁洁,黄光强,等.基于化学模式识别方法分析止咳颗粒的抗炎谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(22):156-163.

[20] 张威,王帅,王喜梅,等.葛根素调控miR-7抗小鼠肝细胞缺氧-复氧存活和细胞凋亡的作用机制[J].安徽医药,2020,24(9):1718-1724,1911.

[21] ZHANG H Y, LIUYH, LAO M L, et al. Puerarin protects Alzheimer's disease neuronal cybrids from oxidant-stress induced apoptosis by inhibiting pro-death signaling pathways[J]. Exp Gerontol, 2011, 46(1): 30-37.

[22] 刘科梅,聂挺,潘栋梁,等.4种异黄酮抗氧化活性的构效关系[J].食品科学,2016,37(23):1-6.

[23] 赵森铭,李慧晓,张志超,等.甘草水提后药渣的化学成分及抗氧化活性研究[J].广东药科大学学报,2019,35(5):614-618.

(收稿日期:2021-01-04 修回时间:2021-02-02)

(编辑:唐晓莲)