

地瓜藤的UPLC指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[△]

徐 锋*, 杨 澜, 成婷婷, 黄旭龙, 范东生, 吴红梅#, 王祥培(贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R931.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)24-3388-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.24.13

摘要 目的:建立地瓜藤的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱。方法:采用UPLC法。色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEF C₁₈,流动相为0.2%乙酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),检测波长为254 nm,流速为0.1 mL/min,柱温为25 ℃,进样量为2 μL。以14号峰为参照,绘制10批地瓜藤药材样品及2批混淆品的UPLC指纹图谱;采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价,确定共有峰;采用SPSS 20.0软件进行聚类分析,运用SIMCA 13.1软件进行主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析。结果:10批地瓜藤药材样品共有28个共有峰,相似度在0.839~0.935之间,2批混淆品的相似度分别为0.503、0.173,表明本方法可区别地瓜藤与混淆品。聚类分析和主成分分析结果均显示,10批地瓜藤药材样品可聚为2类,S3~S5、S9、S10聚为一类,其余聚为一类。正交偏最小二乘法判别分析结果显示,共筛选出变量投影值>1的7个成分,这7个成分可能是引起10批地瓜藤药材样品质量差异的主要成分。结论:所建指纹图谱及聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法判别分析可用于地瓜藤药材的鉴别和质量控制。

关键词 地瓜藤;指纹图谱;超高效液相色谱法;聚类分析;主成分分析;正交偏最小二乘法判别分析

Establishment of UPLC Fingerprint of *Ficus tikoua* and Its Cluster Analysis and Principle Component Analysis

XU Feng, YANG Lan, CHENG Tingting, HUANG Xulong, FAN Dongsheng, WU Hongmei, WANG Xiangpei (College of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a UPLC fingerprint of *Ficus tikoua*. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLC BEF C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.2% aqueous acetic acid-acetonitrile (gradient elution); the detection wavelength was 254 nm; the flow rate was 0.1 mL/min; the column temperature was 25 ℃, and sample size was 2 μL. UPLC fingerprints of 10 batches of samples and 2 batches of adulterants were determined by using No. 14 peak as reference. The similarity evaluation was carried out by using the *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition) so as to determine common peak. The cluster analysis was performed by using SPSS 20.0 software. SIMCA 13.1 software was used to conduct the principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). RESULTS: There were 28 common peaks in UPLC fingerprint of 10 batches of *F. tikoua*. The similarity of 10 batches of *F. tikoua* was between 0.839 and 0.935, and the similarities of the 2 batches of adulterants were 0.503 and 0.173 respectively, which indicated that *F. tikoua* could be distinguished from adulterants. 10 batches of *F. tikoua* could be divided into 2 categories by cluster analysis and principle component analysis, and S3-S5, S9 and S10 were grouped into one category, and the remaining batches were grouped into one category. 7 components with a variable importance in projection (VIP) value >1 were screened by OPLS-DA analysis. These 7 components may be the main components that caused the quality difference of 10 batches of *F. tikoua* samples. CONCLUSIONS: Established fingerprint, cluster analysis, principle component analysis and OPLS-DA can be used for the identification and quality control of *F. tikoua*.

KEYWORDS *Ficus tikoua*; Fingerprint; UPLC; Cluster analysis; Principle component analysis; OPLS-DA

地瓜藤(*Ficus tikoua* Bur.)又称地果藤、地板藤,为桑科植物地瓜藤的新鲜或干燥地上部分,具有清热利湿、活血通络、解毒消肿的功效,临床上主要用于治疗风

湿疼痛、跌扑损伤等^[1]。地瓜藤主要含有黄酮类、三萜类、甾体类、香豆素类、有机酸类等成分^[2-5]。现代药理研究表明,地瓜藤具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒和抑菌等活性,具有较高的药用价值^[6-10]。湖南、云南、四川和贵州等省的药材标准均收载了地瓜藤,主要记载了地瓜藤的来源、名称、性状、显微鉴别、理化鉴别和薄层鉴别等项目^[1,11-12]。但由于其产地和用药习惯的差异,故存在同药异名和异药同名的现象,因此如何对地瓜藤进行准确、全面和快速的品种鉴别及质量评价是值得探讨的问题。

中药指纹图谱是指某种中药材或中成药经适当处

[△] 基金项目:贵州省国内一流建设学科项目(No.GNYL[2017]008号);贵州省一流大学(一期)重点建设项目(No.黔教高发[2017]158号);贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(No.黔省专合字[2011]60号);贵阳中医学院博士(硕士)启动基金项目

* 讲师,博士。研究方向:中药、民族药的质量控制。电话:0581-88308059。E-mail:xf333666999@sina.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:民族药的品种鉴定与质量控制。电话:0581-88308059。E-mail:whm0425@126.com

理后,能够标示出该中药材或中成药特征的某类或数类成分的色谱或光谱的图谱,可用于鉴别药材真伪,评价原料药材、半成品和成品质量的均一性与稳定性^[3]。超高效液相色谱法(UPLC)相对于高效液相色谱法(HPLC)具有更好的分离效果、峰容量和灵敏度^[4]。目前未见地瓜藤指纹图谱研究的报道,基于此,本研究建立了地瓜藤药材的UPLC指纹图谱,并进行聚类分析、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),以期为高效、准确地鉴别地瓜藤药材及其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

H-Class型UPLC仪,包括四元泵洗脱系统、自动进样系统、柱温箱、二极管阵列检测器(美国Waters公司);KQ-100E型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);HH-4型四孔电热恒温水浴锅(常州华普达教学仪器有限公司);AL204-IC型电子分析天平(美国Mettler-Toledo公司);QJ-02A型粉碎机(上海兆申科技有限公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯(美国Tedia公司),其他试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 药材

地瓜藤(编号:S1~S10)、红薯藤(混淆品1,编号:S11)、沙葛藤(混淆品2,编号:S12)药材均经贵州中医药大学药学院王祥培教授鉴定分别为桑科植物地瓜藤(*F. tikoua* Bur.)的干燥茎叶、旋花科植物番薯[*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]的干燥茎叶和豆科植物沙葛[*Pachyrhizus erosus* (Linn.) Urb.]的干燥茎叶。药材样品均密封保存于阴凉干燥处,其来源见表1。

表1 药材来源

Tab 1 Source of medicinal material

编号	样品	产地	采收时间
S1	地瓜藤	贵州中医药大学校园内(1)	2019年1月
S2	地瓜藤	重庆市永川区陈食镇朱龙村	2019年2月
S3	地瓜藤	重庆市永川区陈食镇双河村	2019年2月
S4	地瓜藤	贵州省六盘水市盘县西冲镇胜家庄村	2018年8月
S5	地瓜藤	贵州省黔南州福泉市双各村叶家寨组	2018年8月
S6	地瓜藤	贵州中医药大学校园内(2)	2019年1月
S7	地瓜藤	重庆市永川区胜利路办事处棕耙五社	2019年2月
S8	地瓜藤	贵州省贵阳市乌当区水田镇	2018年7月
S9	地瓜藤	贵州省毕节市七星关区	2018年8月
S10	地瓜藤	贵州省贵阳市花溪区花溪公园	2018年7月
S11	红薯藤	河北省秦皇岛市卢龙县刘田庄后上庄	2019年1月
S12	沙葛藤	贵州省贵阳市集市	2019年2月

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEF C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.2% 乙酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~3 min, 95% A→90% A; 3~5 min, 90% A→85% A; 5~10 min, 85% A→76% A; 10~21 min, 76% A→58% A; 21~24 min, 58% A→40% A; 24~

28 min, 40% A→0% A; 28~29 min, 0% A); 流速: 0.1 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 254 nm; 进样量: 2 μL。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取地瓜藤药材样品粉末3.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇30 mL, 超声(功率: 100 W, 频率: 40 kHz)提取30 min, 滤过, 滤液置于蒸发皿中; 药渣加甲醇30 mL, 超声提取30 min, 滤过, 重复提取3次, 合并滤液。将盛有滤液的蒸发皿置于60 °C水浴锅挥干, 挥干后所得固体加甲醇溶解并定容至10 mL, 经0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2”项下供试品溶液(编号: S1)适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次。以14号峰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, 28个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0% (n=6), 表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2”项下供试品溶液(编号: S1)适量, 分别于室温下放置0、9、12、16、21 h时, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。以14号峰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, 28个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0% (n=5), 表明供试品溶液于室温下放置21 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取地瓜藤药材样品(编号: S1)适量, 共6份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定。以14号峰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, 28个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.4 UPLC指纹图谱的建立与相似度、共有峰相关分析

2.4.1 UPLC指纹图谱的生成 取10批药材样品(编号: S1~S10), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“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)进行分析, 得UPLC指纹图谱, 详见图1、图2。

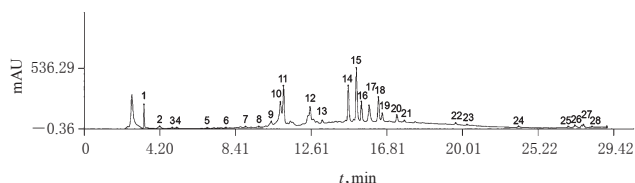


图1 10批药材样品的UPLC对照指纹图谱

Fig 1 UPLC control fingerprint of 10 batches of medicinal material

2.4.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批药材样品(编号: S1~S10)进行相似度分析。结果表明, 10批药材样品相似度在0.839~0.935之间, 表明各批药材间主要化学成分较为一致, 结果见表2。

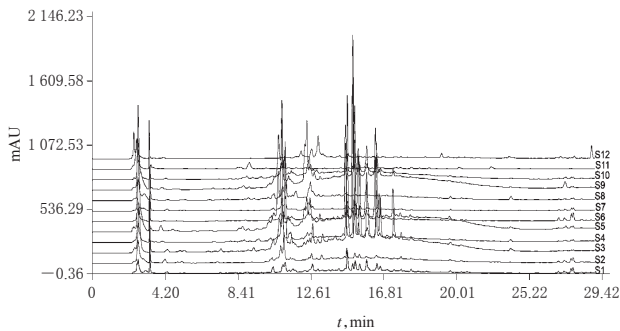


图2 10批药材样品及2批混淆品的UPLC叠加指纹图谱

Fig 2 UPLC superimposed fingerprint of 10 batches of medicinal materials and 2 batches of adulterants

表2 10批药材样品的相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation of 10 batches of medicinal materials

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1	0.833	0.773	0.736	0.772	0.909	0.796	0.815	0.778	0.825	0.868
S2	0.833	1	0.731	0.776	0.826	0.798	0.828	0.805	0.769	0.771	0.885
S3	0.773	0.731	1	0.856	0.860	0.769	0.624	0.664	0.811	0.774	0.869
S4	0.736	0.776	0.856	1	0.88	0.802	0.656	0.693	0.860	0.797	0.902
S5	0.772	0.826	0.860	0.880	1	0.808	0.733	0.723	0.866	0.830	0.935
S6	0.909	0.798	0.769	0.802	0.808	1	0.841	0.861	0.828	0.846	0.911
S7	0.796	0.828	0.624	0.656	0.733	0.841	1	0.922	0.787	0.817	0.852
S8	0.815	0.805	0.664	0.693	0.723	0.861	0.922	1	0.784	0.798	0.839
S9	0.778	0.769	0.811	0.860	0.866	0.828	0.787	0.784	1	0.843	0.906
S10	0.825	0.771	0.774	0.797	0.830	0.846	0.817	0.798	0.843	1	0.906
对照指纹图谱	0.868	0.885	0.869	0.902	0.935	0.911	0.852	0.839	0.906	0.906	1

2.4.3 共有峰的确定及相关分析 10批药材样品(编号:S1~S10)共有28个共有峰,其峰面积占色谱峰总面积的90%以上,提示该方法可用于评价药材的整体质量。以峰面积较大和分离度较好的14号峰为参照峰,计算其他峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表3、表4。

2.4.4 地瓜藤药材与混淆品的UPLC图谱比较 将10批药材样品(编号:S1~S10)与2批混淆品(编号:S11~S12)的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版),生成12批样品的UPLC指纹图谱,详见图2。软件分析结果显示,红薯藤(编号:S11)相似度为0.503,沙葛藤(编号:S12)相似度为0.173,表明建立的指纹图谱可用于鉴别地瓜藤药材与其混淆品。

2.5 聚类分析

以14号峰为参照,以10批药材样品(编号:S1~S10)中28个共有峰的相对峰面积为变量,标准化组成 10×28 阶原始数据矩阵,采用SPSS 20.0软件进行聚类分析,采用组间连接法,以欧式距离作为样品的测度^[15]。结果,10批药材样品可聚为2类,S3~S5、S9、S10聚为一类,S1、S2、S6~S8聚为一类,详见图3。

2.6 PCA分析

以14号峰为参照,以10批药材样品(编号:S1~

表3 10批药材样品UPLC指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in UPLC chromatograms of 10 batches of medicinal materials

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.225 4	0.225 9	0.226 6	0.225 8	0.225 1	0.225 8	0.225 9	0.228 3	0.225 7	0.226 1
2	0.292 9	0.285 5	0.294 8	0.277 0	0.270 8	0.284 1	0.264 8	0.299 1	0.275 4	0.289 1
3	0.327 9	0.335 2	0.343 5	0.327 0	0.318 4	0.317 1	0.293 1	0.349 9	0.323 6	0.337 2
4	0.343 3	0.351 7	0.360 8	0.343 4	0.335 6	0.331 5	0.343 1	0.366 3	0.340 5	0.355 6
5	0.455 8	0.467 9	0.455 2	0.456 4	0.467 8	0.465 4	0.455 3	0.463 1	0.476 8	0.474 6
6	0.539 6	0.532 2	0.525 1	0.545 6	0.544 0	0.537 1	0.528 3	0.534 0	0.542 7	0.536 8
7	0.607 9	0.604 0	0.611 1	0.599 1	0.594 2	0.602 6	0.594 2	0.582 8	0.597 1	0.606 2
8	0.662 3	0.661 2	0.632 8	0.656 5	0.652 6	0.661 4	0.632 5	0.639 6	0.655 9	0.663 0
9	0.708 5	0.706 3	0.710 3	0.703 5	0.718 0	0.698 9	0.691 4	0.693 8	0.735 4	0.741 1
10	0.747 6	0.739 8	0.743 4	0.737 2	0.734 3	0.739 2	0.742 5	0.750 8	0.749 0	0.754 3
11	0.756 4	0.753 1	0.756 4	0.750 2	0.747 8	0.752 4	0.755 7	0.764 3	0.763 5	0.768 8
12	0.863 4	0.861 3	0.864 4	0.848 4	0.846 6	0.849 5	0.852 2	0.860 7	0.847 0	0.851 0
13	0.902 1	0.901 2	0.903 2	0.899 4	0.899 2	0.881 8	0.883 7	0.892 7	0.876 7	0.880 2
14(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1.031 4	1.031 4	1.028 9	1.029 7	1.029 4	1.021 0	1.030 7	1.039 8	1.028 8	1.030 2
16	1.048 7	1.049 1	1.048 9	1.049 9	1.050 2	1.049 6	1.048 8	1.057 1	1.050 2	1.049 3
17	1.076 1	1.076 8	1.076 7	1.084 5	1.084 3	1.077 7	1.076 0	1.082 2	1.084 2	1.077 0
18	1.116 2	1.116 8	1.115 0	1.119 0	1.118 8	1.117 6	1.100 7	1.121 1	1.118 6	1.116 4
19	1.129 3	1.126 4	1.129 8	1.133 3	1.133 8	1.131 9	1.115 9	1.146 9	1.133 6	1.130 6
20	1.183 0	1.185 1	1.182 2	1.187 4	1.188 0	1.185 3	1.182 6	1.183 5	1.187 7	1.183 8
21	1.210 6	1.212 8	1.211 1	1.215 6	1.216 8	1.213 7	1.210 3	1.213 0	1.216 5	1.204 5
22	1.402 8	1.405 2	1.404 4	1.409 2	1.411 5	1.407 2	1.403 0	1.413 5	1.410 4	1.404 2
23	1.446 8	1.449 8	1.445 8	1.453 6	1.456 0	1.451 8	1.446 4	1.457 1	1.454 3	1.447 6
24	1.639 5	1.642 4	1.640 9	1.648 8	1.653 0	1.647 1	1.640 2	1.652 6	1.651 8	1.642 9
25	1.827 6	1.831 3	1.829 1	1.838 6	1.842 9	1.834 4	1.827 1	1.841 1	1.841 3	1.830 1
26	1.849 6	1.854 0	1.858 8	1.867 6	1.872 2	1.856 6	1.849 4	1.863 4	1.867 5	1.859 0
27	1.885 1	1.889 2	1.886 5	1.896 3	1.900 6	1.892 1	1.884 3	1.898 8	1.899 5	1.887 3
28	1.918 2	1.922 0	1.918 0	1.928 8	1.932 7	1.925 5	1.917 0	1.931 1	1.933 0	1.920 0

S10)中28个共有峰的相对峰面积为变量,导入SIMCA 13.1软件,采用非监督模式识别法进行PCA分析,模型自动拟合选择4个主成分,其累积方差贡献率为79.87%,提示模型预测良好,详见图4。由图4可知,10批药材样品可分为2组,S3~S5、S9、S10为一组,S1、S2、S6~S8为一组,该结果与聚类分析结果一致。

2.7 OPLS-DA分析

为更好地观察组间差异,基于主成分分析结果,采用监督模式识别法进行两组间OPLS-DA分析,绘制OPLS-DA模型得分图,详见图5。由图5可知,不同产地的地瓜藤药材样品集中在不同区域,S1、S2、S6~S8在模型得分图的左侧,其余样品(S3~S5、S9、S10)在右侧,与PCA分析结果一致。OPLS-DA模型中的拟合参数 $R^2X=0.795$, $R^2Y=0.991$,模型预测参数(Q^2)=0.823,均大于0.5,表明所建模型稳定且预测能力较强。以模型变量投影(VIP)值为指标对引起组间差异的成分进行分析,筛选贡献较大的7个变量(以VIP值>1为标准^[16]),分别为15号峰(VIP=2.304 5)、1号峰(VIP=1.942 8)、12号峰(VIP=1.901 7)、18号峰(VIP=1.719 1)、27号峰(VIP=1.371 9)、10号峰(VIP=1.357 1)和9号峰(VIP=

表4 10批药材样品UPLC指纹图谱共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative peak areas of common peaks in UPLC chromatograms of 10 batches of medicinal materials

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.750 2	0.946 6	0.061 4	0.235 2	0.242 2	0.385 2	0.977 8	0.646 1	0.116 2	0.214 2
2	0.149 3	0.357 4	0.047 5	0.037 2	0.129 5	0.063 2	0.370 9	0.053 1	0.055 3	0.064 4
3	0.031 3	0.133 9	0.038 9	0.007 5	0.083 6	0.057 0	0.135 5	0.018 0	0.019 6	0.036 3
4	0.038 6	0.137 8	0.037 1	0.006 5	0.003 2	0.023 7	0.138 7	0.035 4	0.008 7	0.015 3
5	0.005 8	0.045 8	0.042 3	0.027 3	0.025 0	0.023 0	0.017 1	0.037 6	0.023 1	0.006 0
6	0.057 9	0.048 8	0.024 3	0.040 8	0.004 1	0.050 1	0.019 4	0.074 4	0.001 2	0.017 3
7	0.164 4	0.123 4	0.049 4	0.060 1	0.031 7	0.080 4	0.121 9	0.170 9	0.052 6	0.163 8
8	0.102 4	0.130 0	0.064 0	0.201 3	0.036 2	0.100 7	0.132 8	0.136 9	0.055 5	0.181 6
9	0.366 0	0.471 0	0.124 3	0.202 5	0.372 1	0.349 5	0.464 9	0.469 5	0.139 7	0.312 4
10	1.057 6	1.729 0	0.479 2	1.074 9	0.934 6	0.910 9	1.607 9	1.043 0	0.886 0	1.010 6
11	0.052 8	1.927 1	0.696 8	1.095 7	1.389 0	0.185 0	1.711 8	0.934 4	0.803 6	0.851 8
12	0.861 5	1.206 7	0.218 6	0.473 3	0.380 6	1.066 8	3.038 5	2.032 9	1.256 8	1.828 9
13	0.393 8	0.879 2	0.260 6	0.325 5	0.284 6	0.194 5	0.502 9	0.395 6	0.220 3	0.463 5
14(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	0.657 9	1.294 0	0.988 2	2.764 7	1.669 0	0.860 9	0.828 1	0.713 6	1.568 7	1.975 1
16	0.629 2	0.972 0	0.628 2	0.679 5	0.875 8	0.658 3	0.714 7	0.492 3	0.568 1	0.835 5
17	0.935 5	1.013 3	0.725 8	1.191 7	1.045 8	0.953 5	0.764 9	0.792 4	0.809 8	1.567 7
18	0.574 8	0.681 8	0.759 0	1.148 5	0.862 1	0.417 5	0.248 5	0.362 9	0.811 3	0.994 0
19	0.515 4	0.503 2	0.515 9	0.297 9	0.419 7	0.426 0	0.831 6	0.605 6	0.469 2	1.461 7
20	0.371 4	0.669 6	0.511 0	0.363 3	0.557 6	0.208 2	0.404 5	0.338 6	0.301 4	0.896 2
21	0.507 4	0.700 5	0.201 4	0.356 8	0.201 0	0.245 7	0.845 1	0.672 8	0.303 7	1.608 9
22	0.189 2	0.443 6	0.242 8	0.250 8	0.055 9	0.171 4	0.255 8	0.298 6	0.355 8	0.267 7
23	0.117 0	0.230 4	0.442 1	0.126 6	0.019 8	0.102 3	0.169 6	0.159 3	0.122 1	0.149 3
24	0.032 2	0.081 7	0.040 5	0.079 0	0.033 5	0.041 2	0.023 0	0.195 3	0.019 8	0.040 9
25	0.087 0	0.114 2	0.007 4	0.029 3	0.066 5	0.131 3	0.105 4	0.037 5	0.006 0	0.031 0
26	0.144 2	0.202 3	0.017 7	0.072 7	0.080 0	0.128 4	0.200 3	0.066 0	0.082 5	0.087 3
27	0.356 5	0.390 5	0.016 4	0.076 5	0.091 3	0.422 4	0.242 2	0.105 0	0.017 1	0.085 3
28	0.078 4	0.106 8	0.016 7	0.038 8	0.079 3	0.067 1	0.067 5	0.030 6	0.006 9	0.024 6

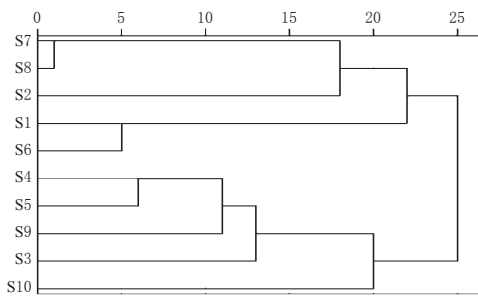


图3 聚类分析树状图

Fig 3 Dendrogram of cluster analysis

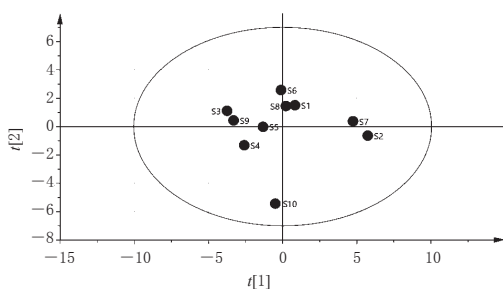


图4 10批药材样品的PCA得分图

Fig 4 PCA score chart of 10 batches of medicinal materials

1.088 9),提示上述7个成分是引起10批地瓜藤药材样品质量差异的主要成分,详见图6。

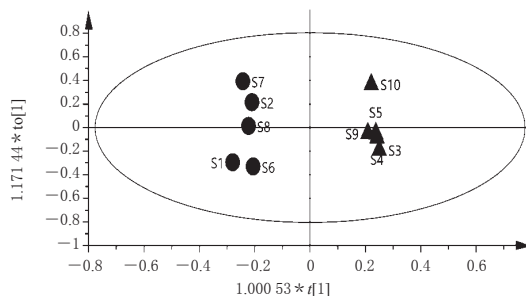


图5 10批药材样品的OPLS-DA模型得分图

Fig 5 OPLS-DA score chart of 10 batches of medicinal materials

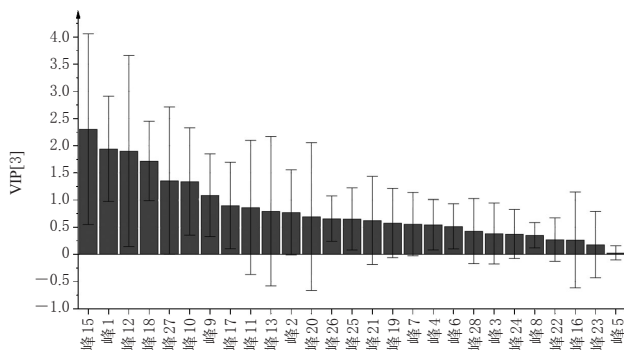


图6 10批药材样品OPLS-DA模型中共有峰的VIP值

Fig 6 VIP value of common peaks in OPLS-DA model of 10 batches of medicinal materials

3 讨论

本研究前期预试验中比较了水-甲醇、水-乙腈、0.2%乙酸水溶液-甲醇、0.1%乙酸水溶液-乙腈、0.2%乙酸水溶液-乙腈等不同流动相系统的分离效果。结果发现,以0.2%乙酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱时,各峰分离度较好,且保留时间较短。通过全波长扫描和多通道波长检测,结果发现检测波长为254 nm时色谱峰较多,基线平稳,特征峰信号较明显,故选择254 nm为检测波长。此外,又考察了不同流速(0.1、0.2 mL/min)对色谱峰分离度的影响,结果发现流速为0.1 mL/min时,各成分分离度较好,对色谱柱柱压适中。

相似度评价结果显示,10批地瓜藤药材样品的相似度为0.839~0.935,共有28个共有峰,但各峰的相对峰面积差异较大,这可能与不同生长环境下地瓜藤药材的化学成分积累的差异有关,提示地瓜藤药材的生长环境可能会影响其质量和临床效果。此外,2批混淆品的相似度均小于0.6,表明本文建立的指纹图谱专属性较强,可用于地瓜藤药材的鉴别,也可为控制和评价地瓜藤药材的整体质量提供参考。

聚类分析和PCA分析结果均显示,10批地瓜藤药材样品分为2类,S3~S5、S9、S10为一类,S1、S2、S6~S8为一类。OPLS-DA分析发现,有7个成分的VIP值均大于1,提示地瓜藤药材中这7个成分受生长环境的影

山豆根治疗白血病作用机制的网络药理学研究^Δ

付海荣^{1*}, 庞毅², 谭家华³, 李晶⁴, 邓雪松^{1#}(1.重庆三峡医药高等专科学校基础医学部, 重庆 404120; 2.重庆三峡医药高等专科学校抗肿瘤天然药物工程中心, 重庆 404120; 3.重庆三峡医药高等专科学校公共基础部, 重庆 404120; 4.重庆三峡中心医院中心实验室, 重庆 404120)

中图分类号 R285;R733.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)24-3392-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.24.14

摘要 目的:探讨山豆根治疗白血病的潜在作用机制。方法:运用中药系统药理学分析平台数据库检索山豆根活性成分及其对应靶点蛋白,借助UniProt、PubMed数据库查询活性成分靶点蛋白对应的基因名称,运用Cytoscape 3.6.0软件构建化合物-靶点网络。通过DisGeNET数据库查询与白血病相关的基因(即疾病靶点),借助OmicShare平台筛选山豆根活性成分靶点与白血病疾病靶点的交集基因,利用STRING数据库和Cytoscape 3.6.0软件构建其蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,并进行拓扑学分析;利用DAVID生物信息学数据库进行基因本体(GO)分析和KEGG通路富集分析。结果:共获得山豆根活性成分13个、靶点蛋白204个,节点度值排名靠前的化合物及靶点蛋白包括槲皮素、山柰素以及前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、蛋白质丝氨酸蛋白酶1(PRSS1)、钙调蛋白依赖的蛋白激酶(CAMKK2)等。山豆根活性成分靶点与白血病疾病靶点的交集基因共24个,包括IRF1、BCL2、CYPLA1、PIM1等。上述交集基因的PPI网络共包含节点24个、边142条,平均节点度值为6.5,平均介数为0.045。GO分析结果显示,上述交集基因的生物过程涉及缺乏配体的体外凋亡信号通路、凋亡过程的负调控、B细胞增殖的正调控等,分子功能主要包括蛋白质同源化活性、相同蛋白质的结合等,细胞组分主要包括胞外区、线粒体等。KEGG通路富集分析结果显示,上述交集基因主要与T细胞受体信号通路、Janus激酶/信号传导及转录激活因子(JAK/STAT)信号通路、人类嗜T淋巴细胞I型病毒(HTLV-I)感染等通路有关。结论:山豆根中的活性成分可能通过JAK/STAT信号通路、HTLV-I感染等通路作用于PTGS2、PRSS1、CAMKK2等靶点,进而发挥对白血病的治疗作用,呈现多成分、多靶点、多通路的特点。

关键词 山豆根;白血病;网络药理学;靶点;基因;通路

响较大,以致质量存在差异,这可能与地瓜藤药材的产地、采收时间和贮藏条件等因素有关。

综上所述,所建指纹图谱以及聚类分析、PCA分析、OPLS-DA分析可用于地瓜藤药材的鉴别和质量控制。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:153.
[2] 张文平,张晓平,刘娜,等.民族药地板藤的研究进展[J].中国现代中药,2016,18(4):531-534.
[3] 郭良君,谭兴起,郑巍,等.地瓜藤化学成分研究[J].中草药,2011,42(9):1709-1711.
[4] 徐蔚,王培,李尚真,等.地果根茎化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(2):270-272.
[5] 关永霞,杨小生,佟丽华,等.苗药地瓜藤化学成分的研究[J].中草药,2007,38(3):342-344.
[6] 田民义,刘婷婷,洪怡,等.地果化学成分及抗肿瘤活性研究[J].中药材,2018,41(9):2120-2123.
[7] 杨世波,王韦,张润芝,等.地板藤根的抗氧化和抑菌活性研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2013,22(4):

235-238.
[8] 杜银香,胡泽华.地枇杷抑菌物质提取及抑菌活性研究[J].北方园艺,2017,41(14):150-154.
[9] 张文平,张晓平,时瑞梓,等.民族药地板藤止血抗炎及镇痛作用研究[J].时珍国医国药,2017,28(12):2905-2906.
[10] 张文平,张晓平,马大龙,等.民族药地板藤不同萃取部位体外抗病毒实验研究[J].中国现代中药,2018,20(3):288-304.
[11] 汤秀梅,王京昆,刘波,等.民族药地板藤的质量标准研究[J].云南中医中药杂志,2009,30(11):47-48.
[12] 唐丽萍,房秀艳,蒋晖,等.云南习用药材地板藤的质量标准研究[J].云南中医学院学报,2007,30(4):13-16.
[13] 邹纯才,鄢海燕.中药指纹图谱及其数字化[M].合肥:安徽科学技术出版社,2008:99-100.
[14] 金高娃,章飞芳,薛兴亚,等.超高效液相色谱在复杂体系中中药分离分析中的应用[J].世界科学技术,2006,8(3):106-111.
[15] 钮松召,崔颖,卢菲,等.蒙药山川柳的HPLC指纹图谱建立、相似度评价和聚类分析[J].中国药房,2019,30(8):1091-1094.
[16] 郭威,孙蓉,王亮,等.基于指纹图谱和OPLS-DA的越南和国产土茯苓差异性化合物探索[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(14):62-67.

(收稿日期:2019-06-29 修回日期:2019-11-06)

(编辑:陈宏)

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81873571)

* 副教授,硕士。研究方向:抗肿瘤天然药物工程。E-mail:1026443774@qq.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:抗肿瘤天然药物工程。E-mail:714259965@qq.com