

菊苣降尿酸作用的谱效关系研究

朱春胜, 林志健*, 张冰*, 王红坡, 王雪洁, 牛红娟, 王雨, 聂安政

北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 研究菊苣 HPLC 指纹图谱与其降尿酸药效的相关性, 初步揭示菊苣降尿酸药效物质基础。方法 高嘌呤饮食诱导鹌鹑高尿酸血症, 并给予菊苣水提物。采用偏最小二乘 (PLS) 法将菊苣 HPLC 指纹图谱中各共有峰的相对峰面积和降尿酸药效进行数据处理, 研究谱效相关性, 确定菊苣降尿酸作用的药效物质基础。结果 菊苣地上部分具有较好的降尿酸药效, 根据变量投影重要性指标确定了菊苣 HPLC 指纹图谱中各个共有峰对降尿酸作用的贡献度。其中, 绿原酸、菊苣酸及峰 3、6、7、8 所代表的化合物对降尿酸药效的贡献度较大。结论 通过菊苣 HPLC 指纹图谱与其降尿酸药效 PLS 法分析可知, 菊苣降尿酸作用与其所含的多种成分有关。

关键词: 菊苣; 降尿酸; 谱效关系; 偏最小二乘法; 指纹图谱; 绿原酸; 菊苣酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)22-3386-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.017

Spectrum-effect relationships on uric acid lowering effect of *Cichorium intybus*

ZHU Chun-sheng, LIN Zhi-jian, ZHANG Bing, WANG Hong-po, WANG Xue-jie, NIU Hong-juan, WANG Yu, NIE An-zheng

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To study the relationships between HPLC fingerprint of *Cichorium intybus* extract and the uric acid lowering efficacy and to reveal the material basis of *C. intybus*. **Methods** Quail were used in the experiment and high purine diet was used to induce hyperuricemia; In addition, the quail were administered with *C. intybus* water extract. The partial least squares (PLS) method was used to study the spectrum-effect relationships and to find out the material basis of uric acid lowering efficacy. **Results** The aerial part of *C. intybus* has good uric acid lowering effect, and the contribution of various components in *C. intybus* with uric acid lowering effect was determined according to the variable importance in projection value. Among them, chlorogenic acid, chicory acid, and peaks of 3, 6, 7, and 8 have larger contribution degree than others. **Conclusion** The PLS analysis on the spectrum-effect relationships indicates that uric acid lowering effect of *C. intybus* is related to the various components in *C. intybus*.

Key words: *Cichorium intybus* L.; uric acid lowering; spectrum-effect relationships; partial least squares method; fingerprint; chlorogenic acid; chicory acid

中药指纹图谱的研究目的是从中药整体物质基础出发, 通过多维分析检测手段对复杂中药进行测试, 以尽可能全面获取中药化学成分群的特征信息, 并用于中药的质量评价、质量控制和新药研究, 目前其已作为一种切实可行而且被国内外广泛认可的研究方法, 应用于中药的质量控制和评价中^[1-2]。然

而单纯的指纹图谱并不能很好地反映药材的药效信息, 基于此, 中医药界在指纹图谱的基础上提出了新的理论——谱效关系, 该理论首次由李戎等^[3]提出, 旨在找出中药“谱”与“效”之间的科学规律, 为中药质量的控制和药效标准的评价提供可靠的客观依据^[4]。

收稿日期: 2015-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403152); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20130013120001, 20120013130002); 北京中医药大学青年教师专项自主课题 (2013-QNJSZX008); 北京中医药大学科研创新团队 (2011-CXTD-014)

作者简介: 朱春胜 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药防治代谢性疾病的研究。Tel: 15910387220 E-mail: zhuchunsheng6@163.com

***通信作者** 张冰, 医学博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药防治代谢性疾病的基础与临床研究、中药药性理论实质研究及中药不良反应与警戒理论研究。Tel: (010)64286335 E-mail: zhangbing6@263.net
林志健, 医学博士, 讲师, 研究方向为中药防治代谢性疾病的基础与临床研究、中药药性理论实质研究及中药不良反应与警戒理论研究。Tel: (010)64286335 E-mail: linzhijian83@126.com

菊苣为菊科植物毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. 或菊苣 *Cichorium intybus* L. 的干燥地上部分或根, 具有清肝利胆、健胃消食、利尿消肿的作用^[5-6]。本课题组前期研究发现菊苣对高尿酸血症具有很好的治疗作用^[7-8], 但对其发挥药效的物质基础尚未进行系统的研究。中药指纹图谱能较全面地表征化学成分信息, 因此本研究在获得不同产地菊苣的指纹图谱和降尿酸药效信息的基础上, 开展菊苣治疗高尿酸血症的谱效关系研究, 以阐明菊苣降尿酸的药效物质基础, 为菊苣的质量控制及评价体系制定提供支持和依据。

1 材料

1.1 药材

菊苣药材 (10 批), 采收或购买, 具体产地及采收时间见表 1。经北京中医药大学中药学院中药鉴定教研室闫永红教授鉴定为菊科植物菊苣 *Cichorium intybus* L. 的干燥地上部分。

表 1 菊苣药材来源及采收时间

Table 1 Origins and harvesting time of *C. intybus*

编号	产地	采收时间
S1	北京海淀	2014-11
S2	辽宁大连	2013-08
S3	辽宁灯塔	2014-10
S4	黑龙江肇庆	2014-10
S5	新疆墨玉	2013-10
S6	内蒙古	2011-10
S7	河北平山	2012-08
S8	山东寿光	2013-10
S9	新疆昌吉	2014-08
S10	新疆昌吉	2014-10

1.2 药品与试剂

苯溴马隆片 (批号 1211945), 德国赫曼大药厂; 菊苣酸对照品 (批号 111752-200902, 质量分数 $\geq 99.9\%$), 中国食品药品检定研究院; 绿原酸对照品 (批号 MFCD00003862, 质量分数 $\geq 95\%$), Sigma 公司; 尿酸试剂盒, 中生北控生物科技股份有限公司; 甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器

Shimadzu LC-2010AHT 高效液相色谱系统 (日本岛津公司); Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (美国安捷伦科技公司); Sartorius BT 125D 1/10 万分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司); KQ-500DE 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); DFT-100 中药粉碎机 (温岭市大德中药机械有限公司)。

1.4 动物

迪法克鹌鹑 (雄性) 130 只, 体质量 (150 $\pm$ 10) g, 购自北京市德岭鹌鹑养殖场, 批号 U-1-46。

2 方法与结果

2.1 菊苣水提物的制备

取菊苣地上部分 250 g, 粉碎, 浸泡 30 min, 第 1 次加 10 倍量水, 回流提取 1 h, 滤过, 收集滤液; 第 2 次加 8 倍量水, 回流提取 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 定容至 600 mL, 即得菊苣水提物 (0.417 g/mL)。

2.2 不同产地菊苣水提物降尿酸作用比较

雄性迪法克鹌鹑 130 只 (38 日龄), 适应环境 7 d 后, 按体质量和尿酸值随机分为 13 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、阳性对照组 (苯溴马隆片)、10 批菊苣水提物组。对照组自由摄取普通鹌鹑饲料, 其余各组均予酵母料 15 g/kg^[9], 食后补充普通饲料, 自由饮水。阳性对照组 ig 苯溴马龙片溶液 (采用纯净水溶解) 20 mg/kg, 10 批菊苣水提物组分别 ig 菊苣水提物 5 g/kg^[7], 对照组和模型组 ig 等体积纯净水, 给药体积为 12 mL/kg, 各组每天给药 1 次, 连续给药 3 周。取血前禁食不禁水 12 h, 于实验第 21 天颈静脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 按试剂盒方法检测血清中尿酸的量。菊苣降尿酸药效值为模型组尿酸水平与给药组尿酸水平的差值。结果显示, 与对照组比较, 模型组鹌鹑血清中尿酸水平显著升高, 除内蒙古 (S6) 和山东寿光 (S8) 产地外, 其他各产地菊苣水提物均具有显著的降尿酸作用。结果见表 2。

表 2 各组鹌鹑血清尿酸水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Serum uric acid levels of quail from each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	尿酸	降尿酸药效值
对照	200.97 $\pm$ 69.33	—
模型	308.10 $\pm$ 61.96*	—
阳性对照	178.10 $\pm$ 47.30 [#]	—
S1	191.81 $\pm$ 42.30 [#]	116.29
S2	235.20 $\pm$ 95.75 [#]	72.90
S3	234.51 $\pm$ 78.37 [#]	73.59
S4	215.68 $\pm$ 56.66 [#]	92.42
S5	238.62 $\pm$ 80.91 [#]	69.48
S6	270.11 $\pm$ 41.90	37.99
S7	244.64 $\pm$ 55.32 [#]	63.46
S8	278.32 $\pm$ 88.14	29.78
S9	193.44 $\pm$ 70.14 [#]	114.66
S10	188.64 $\pm$ 67.52 [#]	119.46

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

2.3 不同产地菊苣水提物的 HPLC 指纹图谱

2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-甲醇 (B); 梯度洗脱程序: 0~2 min, 23% B; 2~15 min, 23%~33% B; 15~20 min, 33%~40% B; 20~27 min, 40%~42% B; 27~40 min, 42%~60% B; 40~50 min, 60%~70% B; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 取菊苣酸、绿原酸对照品适量, 加入 100% 甲醇 20 mL, 密塞, 超声提取 30 min, 甲醇补充减少的体积, 过 0.45 μm 滤膜, 配制成质量浓度分别为 51.2、39.0 μg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.3.3 供试品溶液的制备 分别量取“2.1”项制备的 10 批菊苣水提物 2 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 备用。

2.3.4 HPLC 指纹图谱峰的归属 分别精密吸取混合对照品溶液及 10 批菊苣供试品溶液进样, 按“2.3.1”项条件测定, 得到 HPLC 图谱, 结果见图 1。10 批菊苣水提物 HPLC 指纹图谱共确定 12 个共有峰, 并指认 2 和 5 号峰分别为绿原酸和菊苣酸, 结果见图 2。

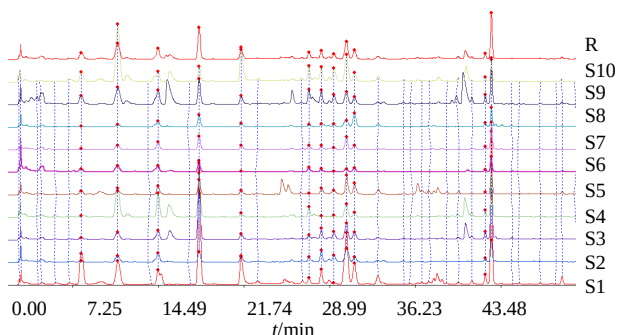


图 1 不同产地菊苣药材 HPLC 特征图谱

Fig. 1 HPLC feature fingerprints of *C. intybus* from different origins

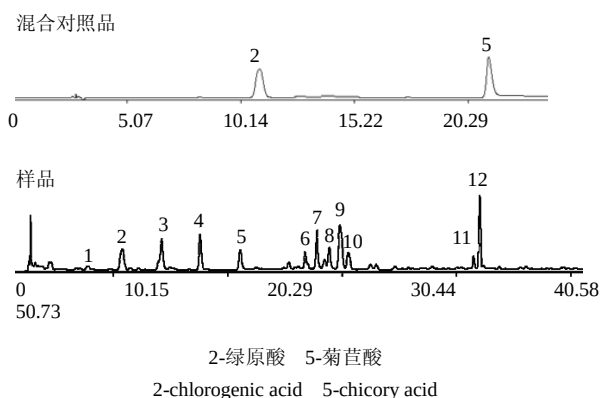


图 2 菊苣药材的特征共有峰

Fig. 2 Common characteristic peaks of *C. intybus*

2.4 菊苣 HPLC 指纹图谱各共有峰相对峰面积与降尿酸药效的偏最小二乘分析 (PLS)

采用 SIMCA-P11.5 对菊苣指纹图谱各共有峰相对峰面积 (以峰 9 为参比峰) 和降尿酸药效进行 PLS。首先将原本多个变量通过线性变换重新组合成新的互相之间无相关性的综合变量, 即从原始变量中导出几个主成分代替原始变量, 使它们尽可能多地保留原始变量的信息, 用方差来衡量它们解释原始变量信息大小的能力。如表 3 所示, 本实验前 3 个主成分可以解释 89.3% 的菊苣降尿酸药效的信息, 解释 80.3% 的菊苣自身化学成分信息, 89.3% Y 变量的变化并拥有 51.9% 的预测能力 (Q^2)。

考察变量投影重要性指标 (variable importance in projection, VIP) 反映的是每一个自变量在解释因变量时作用的重要程度, 当 $VIP > 1$ 则说明该自变量解释因变量的重要性显著^[10]。如表 4 所示, 说明菊苣中的绿原酸及峰 3、6、7、8 所对应的成分对降尿酸药效具有重要影响。菊苣酸的 VIP 为 0.96, 接近 1, 提示菊苣酸对降尿酸药效可能具有一定影响。

表 3 PLS 的因子累积解释方差

Table 3 Factor cumulative variance explained of PLS

主成分	X 变量	累积 X 变量	Y 变量	累积 Y 变量	Q^2 /cum	调整 R^2
1	0.377	0.377	0.635	0.635	0.410	0.410
2	0.334	0.711	0.173	0.808	0.034	0.413
3	0.092	0.803	0.085	0.893	0.156	0.519

3 讨论

PLS 是集多元线性回归、典型相关分析和主成分分析的基本功能为一体, 能够同时实现回归建模、数据结构简化及两组变量间的相关分析的第 2 代多

元回归方法。通过 PLS, 首先将原本多个变量通过线性变换重新组合成新的互相之间无相关性的综合变量, 即从原始变量中导出几个主成分代替原始变量, 使它们尽可能多地保留原始变量的信息, 用方

表4 PLS的变量投影重要性指标

Table 4 Variable importance in projection of PLS

峰号	VIP	峰号	VIP
1	0.70	7	1.37
2	1.25	8	1.13
3	1.14	9	0.67
4	0.64	10	0.82
5	0.96	11	0.69
6	1.48	12	0.61

差来衡量它们解释原始变量信息大小的能力；再考察变量VIP，其反映的是每一个自变量在解释因变量时作用的重要程度，一般情况下VIP>1则说明该自变量解释因变量的重要性显著^[10-11]。与其他数据处理方法相比，PLS具有较明显的优势，因此，本实验采用PLS对谱效数据进行分析。

临床中常用的降尿酸化学药物多集中在2大类：（1）抑制尿酸生成药即黄嘌呤氧化酶抑制剂，这类药包括别嘌呤醇、非布索坦；（2）促进尿酸排泄药，这类药包括丙磺舒、苯溴马龙、苯磺唑酮^[12]。药物流行病学研究发现，以上这些药物虽然作用靶点清晰并且降尿酸作用明确，但存在较严重的不良反应，长期服用常会出现皮疹、发热、骨髓抑制和肝肾损害等，停药后血尿酸水平极易反弹，远期疗效差^[13-16]。菊苣在我国使用拥有较长的历史，副作用小，适合长期使用。维吾尔医学取其清肝利胆之功效在临床中作为抗肝炎制剂的主要原料，以发挥保肝护肝的疗效^[17]，因此采用菊苣来治疗高尿酸血症不但可以达到降尿酸的药效，还能起到保肝护肝功的作用，适用于肝功能不全的高尿酸血症患者。

本实验以高嘌呤饮食诱导鹌鹑高尿酸血症模型为研究对象，比较不同产地及不同采收时间菊苣地上部分提取物的降尿酸作用，结果显示除内蒙古和山东寿光产地外均具有显著的降尿酸药效。同时采用PLS分析了菊苣降尿酸的谱效关系，结果表明指纹图谱中峰2、3、5、6、7和峰8与菊苣降尿酸作用关系密切，其中峰2、5分别为绿原酸、菊苣酸，而峰3、6、7、8化学结构有待于进一步的研究。综上所述，菊苣降尿酸作用是多种成分共同作用的结果，由于仅鉴定出了部分降尿酸作用成分的结构，因此，菊苣降尿酸作用的谱效关系还需进一步的深入研究和完善。

参考文献

- [1] Gong F, Liang Y Z, Xie P S, *et al.* Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1002(1/2): 25-40.
- [2] 庞晶瑶, 王伽伯, 马致洁, 等. 基于化学指纹图谱和生物毒性检测的何首乌质量评控 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3392-3396.
- [3] 李 戎, 闫智勇, 李文军, 等. 创建中药谱效理论学 [J]. 中医教育, 2002, 2(21): 62.
- [4] 何毓敏, 张长城, 袁 丁. 探讨基于谱效关系的中药质量评价的物元分析新方法 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1182-1185.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 庞市宾, 吴发宝, 刘晓燕, 等. 毛菊苣提取物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 418-421.
- [7] 周 俊, 张 冰, 林志健, 等. 中药菊苣根与地上部分提取物降尿酸效果的比较研究 [A] // 中华医学会第十二次全国内分泌学学术会议论文汇编 [C]. 西安: 中华医学会内分泌学会, 2013.
- [8] 朱文静, 张 冰, 刘小青, 等. 大鼠高尿酸血症证候学特征及菊苣的干预研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3636-3639.
- [9] 张 冰, 刘小青, 丁正磊, 等. 鹌鹑高尿酸血症模型发病机理研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(9): 595-598.
- [10] 肖 遂. 基于谱效关系的中药铁苋菜抑菌物质辨识方法研究 [D]. 上海: 中国农业科学院, 2013.
- [11] 徐晶晶. 基于抗氧化谱效关系分析的薄荷药材质量控制和评价方法研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [12] 穆勇昕, 王战建. 痛风降尿酸药物的疗效评价 [J]. 药物与临床, 2014, 11(1): 24-27.
- [13] 吴新荣, 臧路平, 刘志刚. 抗高尿酸血症药物作用靶点研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(11): 1414-1417.
- [14] Lee H Y, Ariyasinghe J T, Thirumoorthy T. Allopurinol hypersensitivity syndrome: a preventable severe cutaneous adverse reaction? [J]. *Singapore Med J*, 2008, 49(5): 388-392.
- [15] Kaufmann P, Török M, Hänni A, *et al.* Mechanisms benzarone and benzbromarone-induced hepatic toxicity [J]. *Hepatology*, 2005, 41(4): 29-35.
- [16] Azevedo V F, Buiar P G, Giovannella L H, *et al.* Allopurinol, Benzbromarone, or a combination in treating patients with gout: Analysis of a series of outpatients [J]. *Int J Rheumatol*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/263720>.
- [17] 李 渊. 维药毛菊苣保肝作用及有效成分含量测定 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2012.