

山楂叶不同提取物对血瘀大鼠全血黏度影响的谱效关系研究

高 婧^{1,2}, 李 响³, 周 芸⁴, 潘海峰^{1*}

1. 承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000

2. 承德市食品药品检验检测中心, 河北 承德 067000

3. 承德市药品不良反应监测中心, 河北 承德 067000

4. 石家庄市第一医院, 河北 石家庄 050000

摘 要: **目的** 研究山楂叶不同提取部位指纹图谱与其降低血瘀大鼠全血黏度的相关性, 为建立指纹图谱与药效关联的中药质量控制模式提供理论依据和数据支持。 **方法** 采用高效液相色谱法建立山楂叶不同提取部位的指纹图谱; 采用 MATLAB 软件的逐步后退分析方法, 计算指纹图谱共有峰 (X) 与全血黏度药效值 (Y) 的多元线性回归方程。 **结果** 指纹图谱共有峰有 32 个, 其中 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{17} 、 X_{19} 、 X_{27} 、 X_{29} 和 Y 具有相关性, 组成功效成分组; X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{19} 、 X_{29} 与 Y 呈负相关, 有可能是活性单体成分, 其中 X_{14} 为牡荆素葡萄糖苷, X_{17} 为牡荆素, X_{19} 为芦丁。 **结论** 利用 MATLAB 统计软件计算得到的多元回归方程具有统计学意义, 为进一步研究山楂叶提取物的活性成分提供理论依据。

关键词: 山楂叶提取物; 指纹图谱; 全血黏度; 谱效关系; 质量控制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)06-1385-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.023

Study on spectrum-effect relationship among effects of different extracts of *Crataegi Folium* on whole blood viscosity in rats

GAO Jing^{1,2}, LI Xiang³, ZHOU Yun⁴, PAN Hai-feng¹

1. Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development of Hebei Province, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

2. Chengde City Food and Drug Inspection and Testing Center, Chengde 067000, China

3. Chengde City Adverse Drug Reaction Monitoring Center, Chengde 067000, China

4. First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To study the correlation between the fingerprints of different extracts of *Crataegi Folium* and reducing the blood viscosity of blood stasis rats, and to provide a theoretical basis and data support for the establishment of the quality control model of traditional Chinese medicine, which is "Fingerprints are associated with efficacy". **Methods** Fingerprints of different extracts of *Crataegi Folium* were established by high performance liquid phase method. The multivariate linear regression equation of common peak X and whole blood viscosity Y was calculated by stepwise regression analysis of MATLAB software. **Results** There were 32 common peaks in the fingerprints, X_9 , X_{10} , X_{11} , X_{13} , X_{14} , X_{15} , X_{17} , X_{19} , X_{27} , and X_{29} related to the whole blood viscosity Y compose functional composition groups. X_{10} , X_{11} , X_{13} , X_{19} , X_{29} negatively correlated with Y , which may be active monomer components, among which X_{14} is vitexin glucoside, X_{17} is Vitexin, and X_{19} is rutin. **Conclusion** The multiple regression equation calculated by MATLAB statistical software in this study has significance in statistics, which can provide a scientific basis for further study of the active components of *Crataegi Folium* extract.

Key words: *Crataegi Folium* extract; fingerprint spectrum; whole blood viscosity; spectrum-effect relationship; quality control

收稿日期: 2017-11-06

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究重点项目 (ZD2015097); 河北省高校省级重点学科建设项目资助 (冀教高 [2013] 4 号); 河北省中医药管理局课题 (2017216); 承德市科学技术研究与发展计划项目 (201606A016); 河北省高等学校科学技术研究项目 (QN2017005)

作者简介: 高 婧 (1984—), 女, 满族, 在读研究生, 主管药师, 研究方向为中药分析。Tel: 18103141008 E-mail: 51913034@qq.com

***通信作者** 潘海峰, 女, 硕士研究生导师。Tel: (0314)2291186 E-mail: phf2301@163.com

随着我国心血管疾病的高发,副作用相对较小的活血化瘀类中药逐渐成为研究热点。山楂叶 *Crataegi Folium* 作为活血化瘀类中药,价格低廉、疗效显著,因此以山楂叶提取物为原料的制剂和成药在临床上广泛应用,如益心酮片^[1]等。目前,对山楂叶提取物的化学成分和药理作用研究较多,但其具体的药效物质基础尚不明确。本课题选取山楂叶 4 种不同极性提取部位,即山楂叶 50%乙醇提取部位(A)、《中国药典》2015 年版收录的山楂叶过大孔树脂后醇提取物(B)、山楂叶醋酸乙酯部位(C)和山楂叶饱和正丁醇部位(D),建立指纹图谱并检测全血黏度的药效学指标,通过 MATLAB 软件,采用逐步后退方法,建立多元线性回归方程,寻找山楂叶提取物发挥药理作用的活性单体和药效物质群。

1 材料

1.1 药品与试剂

山楂叶药材由承德民族师范学院董建新教授鉴定为蔷薇科植物山楂 *Grataegus pinnatifida* Bge. 的干燥叶。

样品 A 由承德御室金丹药业有限公司提供, B 购于山东临沂爱康药业有限公司(批号 AKH15-1), C、D 自制。对照品绿原酸(批号 110753-201415, 质量分数为 96.2%)、牡荆素鼠李糖苷(批号 111668-200602, 质量分数为 100%)、金丝桃苷(批号 111521-201507, 质量分数为 94.3%)、牡荆素(批号 111687-201603, 质量分数为 95.7%)、牡荆素葡萄糖苷(批号 111979-201501, 质量分数分 92.8%)、芦丁(批号 100080-201409, 质量分数为 91.5%)均购于中国食品药品检定研究院,供含量测定用。甲醇、乙腈为色谱纯(Fisher 科技有限公司);实验用水为娃哈哈纯净水;其他试剂为分析纯;乌拉坦(批号 2015 年 4 月 01 日,天津市光复精细化工研究所),盐酸肾上腺素(天津金耀药业有限公司,批号 1505301);阳性对照复方丹参片(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 15121305);

1.2 仪器

Agilent1200 Series 液相色谱仪、Agilent-8453 紫外-分光光度计(安捷伦科技有限公司);AG245 电子分析天平(梅特勒-托利多集团);KQ-700 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);LBY-N6K 全自动清洗血流变仪(北京普利生仪器有限公司)。

1.3 动物

Wistar 大鼠,雄性,体质量 180~220 g,由北

京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2012-0001,饲料购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验期间动物自行采食和饮水。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

2.1.1 样品 C 的制备 取山楂叶药材 50 g,加 6 倍量乙醇浸渍 48 h,渗漉,收集漉液,减压回收乙醇至相对密度为 1.04(60 ℃)的清膏,加等量水稀释后,加 1/6 倍量石油醚(60~90 ℃),振摇,取水层,用 0.7 倍量醋酸乙酯振摇提取,提取液减压回收醋酸乙酯并浓缩至干,即得。

2.1.2 样品 D 的制备 取山楂叶药材 30 g,加 5 倍量 50%乙醇加热回流提取 2 次,合并提取液,减压回收至无醇味,用 3 倍量水饱和的正丁醇振摇 3 次,合并正丁醇提取液,减压回收正丁醇并浓缩至干,即得。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%冰醋酸(B)-四氢呋喃(C),梯度洗脱程序为 0~5 min, 10%~12% A, 90%~88% B; 5~15 min, 12% A, 88% B; 15~30 min, 12% A, 88%~85% B, 0~3% C; 30~50 min, 12% A, 85% B, 3% C; 50~60 min, 12%~20% A, 85%~76% B, 3%~4% C; 60~70 min, 20% A, 76%~73% B, 4%~7% C; 70~80 min, 20%~30% A, 73%~66% B, 7%~4% C; 80~120 min, 30%~80% A, 66%~16% B, 4% C。检测波长 320 nm, 体积流量 0.9 mL/min, 柱温 30 ℃, 供试品溶液和对照品溶液进样量均为 10 μL。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取 A、B、C、D 4 种山楂叶提取物,加入 60%甲醇,超声处理 30 min,分别制成低(A1 为 3.30 mg/mL, B1 为 1.50 mg/mL, C1 为 1.30 mg/mL, D1 为 2.00 mg/mL)、中(A2 为 5.00 mg/mL, B2 为 2.30 mg/mL, C2 为 2.00 mg/mL, D2 为 3.00 mg/mL)、高(A3 为 6.60 mg/mL, B3 为 3.00 mg/mL, C3 为 2.60 mg/mL, D3 为 4.00 mg/mL) 3 种质量浓度的供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸(S1) 10.23 mg、牡荆素葡萄糖苷(S2) 10.59 mg、牡荆素鼠李糖苷(S3) 13.28 mg、牡荆素(S4) 10.01 mg、芦丁(S5) 10.11 mg、金丝桃苷(S6) 10.15 mg,置于同一 100 mL 量瓶中,加 60%甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2.4 样品测定 将对照品溶液和 4 种提取物低、中、高质量浓度共 12 份供试品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。记录对照品溶液、供试品溶液的色谱图及各共有峰的峰面积。采用中药色谱指纹

图谱相似度评价系统(国家药典委员会 2004A), 将供试品溶液 A3、B3、C3、D3 的色谱峰数据以中位数法生成对照指纹图谱, 得到共有峰 32 个, 并含有 6 个已知对照品色谱峰, 见图 1。

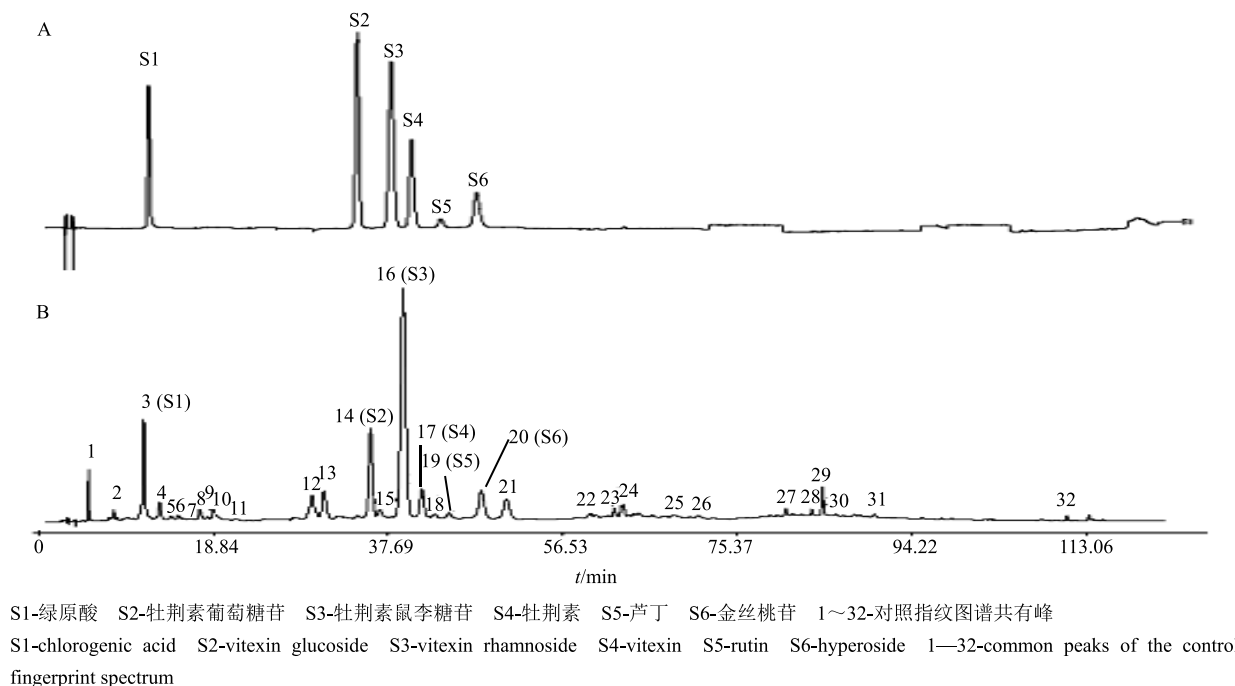


图 1 对照品图谱 (A) 及 4 个提取物的对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 Reference map (A) and control fingerprint spectrum of four extracts (B)

2.3 山楂叶各提取物对血瘀大鼠全血黏度的影响

2.3.1 血瘀模型的制备及给药^[2] 将大鼠分为对照组、模型组、阳性对照组(复方丹参片)、山楂叶提取物低、中、高剂量给药组(共 12 组), 每组 8 只。大鼠正常饲养 1 周后, 次日清晨开始 ig 给药, 每天 1 次, 共给药 7 d。对照组和模型组大鼠给予相应体积的生理盐水, 阳性对照组和给药组大鼠的给药剂量见表 1, ig 体积为 10 mL/kg。给药期间所有大鼠均正常进食和饮水。除对照组外, 末次给药 (ig 第 7 天) 1 h 后, 大鼠颈背部 sc 盐酸肾上腺素 (1 mg/mL) 0.8 mg/kg, 2 h 后放入冰水中 (4 °C) 浸泡 5 min, 取出后擦干, 2 h 后再次 sc 等剂量盐酸肾上腺素。

2.3.2 血样采集及指标的测定 造模次日给药 1 h 后取血, ip 20%乌拉坦麻醉 (0.5 mL/100 g), 用一次性抗凝负压采血管腹主动脉取血 (肝素钠抗凝)。取抗凝血全血用全自动清洗血流变仪测定全血黏度 [低切变率 (20 s⁻¹)、中切变率 (60 s⁻¹)、高切变率 (150 s⁻¹)]。

2.3.3 数据处理方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统

计学分析, 采用单因素方差分析 (ANVOA)。结果见表 1。结果表明大鼠血瘀模型制备成功, 4 种提取物各剂量均可降低血瘀大鼠的全血黏度。

2.4 谱效关系的研究

以指纹图谱中各共有峰的峰面积为 X , 各提取物的不同剂量给药后大鼠全血黏度 (低、中、高切变率平均值) 为 Y (表 2), 利用 MATLAB 软件, 采用逐步后退回归方法, 进行谱效相关分析。计算多元线性回归方程的系数, 得到回归方程为 $Y = 8.686\ 9 + 80.025\ 2\ X_9 - 21.776\ 9\ X_{10} - 39.270\ 3\ X_{11} - 4.683\ 6\ X_{13} + 1.151\ 4\ X_{14} + 40.028\ 3\ X_{15} + 0.247\ 9\ X_{17} - 47.107\ 8\ X_{19} + 16.887\ 3\ X_{27} - 0.958\ 2\ X_{29}$, $r^2 = 0.999\ 6$, $P = 0.047\ 5$, 说明此回归方程中自变量 X 与因变量 Y 均有相关性, 并具有统计学意义。

3 讨论

谱效关系研究是中医药领域内处于学术前沿的中药现代化新思路, 是建立在中药指纹图谱研究的基础之上, 比指纹图谱更加深入的科学研究方向^[3]。谱效关系研究揭示了中药所含的化学成分与药效之

表 1 山楂叶提取物对急性血瘀大鼠全血黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 1 Effect of *Crataegi Folium* extract on whole blood viscosity of acute blood stasis rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	全血黏度/(mPa·s)		
		低切变率 (20 s ⁻¹)	中切变率 (60 s ⁻¹)	高切变率 (150 s ⁻¹)
对照	—	7.505 ± 0.016	5.275 ± 0.018	3.728 ± 0.016
模型	—	11.250 ± 0.053 [#]	7.745 ± 0.040 [#]	5.893 ± 0.020 [#]
复方丹参片	600	8.512 ± 0.090 [*]	6.672 ± 0.026 [*]	4.847 ± 0.021 [*]
A1	33	10.401 ± 0.021 [*]	7.953 ± 0.031 [*]	5.352 ± 0.015 [*]
A2	50	9.786 ± 0.011 [*]	7.365 ± 0.018 [*]	5.043 ± 0.015 [*]
A3	66	8.958 ± 0.019 [*]	6.910 ± 0.012 [*]	4.822 ± 0.015 [*]
B1	15	8.836 ± 0.028 [*]	6.381 ± 0.015 [*]	4.901 ± 0.022 [*]
B2	23	8.205 ± 0.031 [*]	5.796 ± 0.011 [*]	4.632 ± 0.012 [*]
B3	30	7.037 ± 0.039 ^{**}	5.287 ± 0.013 [*]	3.496 ± 0.023 [*]
C1	13	8.838 ± 0.020 [*]	6.808 ± 0.023 [*]	4.843 ± 0.021 [*]
C2	20	7.918 ± 0.022 [*]	6.038 ± 0.012 [*]	4.526 ± 0.019 [*]
C3	26	7.300 ± 0.042 [*]	5.548 ± 0.032 [*]	3.897 ± 0.018 [*]
D1	20	10.090 ± 0.020 [*]	8.545 ± 0.019 [*]	5.740 ± 0.016 [*]
D2	30	9.658 ± 0.023 [*]	8.152 ± 0.020 [*]	5.041 ± 0.014 [*]
D3	40	8.721 ± 0.034 [*]	7.651 ± 0.019 [*]	4.828 ± 0.030 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 2 4 种山楂叶提取物共有峰的峰面积 (X) 及全血黏度值 (Y)

Table 2 Peak area of common peaks of four *Crataegi Folium* extracts (X) and whole blood viscosity (Y)

组别	峰面积										
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
A1	53.49	118.94	589.56	201.82	37.19	23.66	14.13	25.87	15.04	61.00	11.90
A2	81.04	180.21	893.28	305.79	56.35	35.85	21.41	39.19	22.78	92.42	18.04
A3	106.97	237.88	1179.10	403.65	74.38	47.32	28.26	51.73	30.08	121.99	23.83
B1	1.24	28.71	447.54	93.17	49.01	30.47	40.36	87.74	34.23	124.87	51.07
B2	1.90	44.02	686.25	142.86	75.15	46.73	61.89	134.53	52.48	191.47	78.30
B3	2.48	57.42	895.12	186.34	98.02	60.95	80.73	175.47	68.46	249.75	102.13
C1	174.28	42.29	225.89	104.95	65.43	89.52	60.98	131.88	42.74	123.57	80.24
C2	268.13	65.06	347.54	161.47	100.66	137.72	93.82	202.90	65.77	190.11	123.44
C3	348.58	84.58	451.81	209.92	130.86	179.04	121.96	263.77	85.50	247.16	160.47
D1	53.62	109.23	408.45	138.59	75.43	55.26	41.00	36.32	18.24	74.33	12.14
D2	80.43	163.85	612.68	207.88	113.14	82.89	61.50	54.48	27.36	111.49	18.21
D3	107.23	218.47	816.92	277.18	150.85	110.51	82.00	72.63	36.48	148.66	24.28

组别	峰面积										
	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}	X_{17}	X_{18}	X_{19}	X_{20}	X_{21}	X_{22}
A1	75.80	60.13	455.89	61.89	710.60	112.09	44.05	65.44	116.62	97.45	16.51
A2	114.85	91.11	690.76	93.77	1076.60	169.83	66.74	99.16	176.70	147.65	25.02
A3	151.69	120.27	911.81	123.77	1421.30	224.18	88.10	130.88	233.25	194.99	33.03
B1	98.11	44.65	856.31	130.54	3306.30	119.64	94.75	87.15	183.24	100.34	30.40
B2	150.43	68.46	1313.00	200.18	5069.80	183.46	145.29	133.64	280.97	153.85	46.62
B3	196.22	89.29	1712.60	261.10	6612.90	239.30	189.51	174.31	366.49	200.68	60.81
C1	357.83	64.50	106.74	107.51	261.60	309.42	34.23	57.57	384.17	293.32	45.98
C2	550.52	99.24	164.22	165.40	402.48	476.04	52.66	88.57	591.04	451.27	70.74
C3	715.70	129.09	213.49	215.03	523.23	618.87	68.46	115.13	768.37	586.66	91.97
D1	163.29	85.40	746.22	92.05	1623.40	262.38	76.85	115.42	211.94	187.04	47.52
D2	244.93	128.10	1119.30	138.08	2435.20	393.57	115.27	173.14	317.92	280.57	71.28
D3	326.58	170.80	1492.40	184.10	3246.90	524.76	153.69	230.85	423.89	374.09	95.04

续表 2

组别	峰面积										Y
	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇	X ₂₈	X ₂₉	X ₃₀	X ₃₁	X ₃₂	
A1	12.44	14.63	19.41	5.24	46.70	12.76	11.22	5.21	2.07	8.16	7.90
A2	18.85	22.17	29.41	7.95	70.76	19.34	16.99	7.90	3.14	12.37	7.40
A3	24.89	29.27	38.82	10.49	93.41	25.53	22.43	10.42	4.14	16.33	6.90
B1	20.33	29.24	40.00	12.51	12.73	6.47	164.49	3.40	12.19	3.29	6.71
B2	31.17	44.83	61.33	19.18	19.52	9.93	252.23	5.22	18.69	5.04	6.21
B3	40.68	58.48	80.00	25.01	25.46	12.95	329.00	6.81	24.37	6.57	5.27
C1	73.52	32.48	61.86	56.94	59.98	83.53	86.27	39.39	67.50	5.25	6.83
C2	113.10	49.96	95.17	87.60	92.29	128.51	132.71	60.61	103.85	8.08	6.16
C3	147.03	64.95	123.72	113.88	119.97	167.06	172.53	78.79	135.01	10.51	5.58
D1	44.37	24.04	43.59	23.28	113.56	49.37	56.46	47.02	43.50	9.60	8.13
D2	66.55	36.06	65.38	34.93	170.34	74.05	84.70	70.53	65.25	14.40	7.62
D3	88.73	48.09	87.18	46.57	227.12	98.74	112.92	94.04	87.00	19.19	7.07

间的相关性,阐明了中药可能的活性成分以及各成分之间的协同或拮抗作用,可以实现中药内在质量的综合评价和控制,并可指导和加速新药的开发与研究。

谱效关系的分析方法有很多种,本研究采用逐步后退法^[4](又称向后消元法)对山楂叶不同提取物对血瘀大鼠全血黏度影响的谱效关系进行研究,从得到的回归方程可以看出 X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₇、X₁₉、X₂₇、X₂₉和全血黏度值 Y 均有正负相关性,对大鼠全血黏度有不同程度的影响,组成功效成分组。X₁₀、X₁₁、X₁₃、X₁₉、X₂₉与 Y 呈负相关,且有可能是活性成分。其中 X₁₄是牡荆素葡萄糖苷, X₁₇是牡荆素, X₁₉是芦丁,牡荆素葡萄糖苷、牡荆素和芦丁都属于对心血管有药理作用的活性黄酮类成分^[5-7]。本实验仅研究了山楂叶提取物对全血黏度影响的物质基础,其他药效学指标还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 中药注射剂指纹图谱技术要求 (暂行) [S]. 2000.
- [3] 邵 峰, 谷丽菲, 钟丹丹, 等. 山楂体外降三酰甘油主要活性组分谱效关系研究 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 339-344.
- [4] 陈 峰. 医用多元统计分析方法 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2006.
- [5] 庞文悦, 王 莲, 张荣泉. 山楂叶总黄酮生物活性研究近况进展 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(17): 134-136.
- [6] 杨宇杰, 林 静, 王春民, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠高脂血症早期干预的实验研究 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1848-1850.
- [7] Dong L, Fan Y, Shao X, *et al.* Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, doi: 10.1016/j.fct.2011.09.040