

酸枣仁黄酮部位不同配伍的解郁安神作用及谱-效相关性分析

宋 伟, 唐生安, 曹冰雁, 符敬伟, 乔 卫*

天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

摘 要:目的 建立酸枣仁黄酮部位不同配伍的 HPLC 指纹图谱, 研究其与解郁安神功效的谱效关系。方法 采用 Spearman 分析、灰色关联度分析、多元回归分析方法将 HPLC 指纹图谱中各组分特征峰的峰面积与小鼠行为学指标数据相关联。

结果 酸枣仁黄酮部位 HPLC 指纹图谱中与药效有较强相关性的成分有 5 个, 分别为维采宁-II、牡荆素葡萄糖苷、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素。**结论** 通过谱-效相关性分析, 推测出酸枣仁黄酮部位发挥抗抑郁、镇静催眠作用的有效成分, 为酸枣仁有效成分筛选及质量控制方法的建立提供了依据。

关键词: 酸枣仁; 黄酮; 谱效关系; 维采宁-II; 牡荆素葡萄糖苷; 斯皮诺素; 6'''-阿魏酰斯皮诺素; 6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1123-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.021

Depression-resolving and spirit-tranquilizing effects of different compatibility of flavonoids in *Ziziphi Spinosae Semen* and spectrum-efficient correlation analysis

SONG Wei, TANG Sheng-an, CAO Bing-yan, FU Jing-wei, QIAO Wei

Tianjin Municipal Key Laboratory of Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics; School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of different compatibility of flavonoids in *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) so as to establish spectrum-efficient correlation between HPLC fingerprints and the effects of depression-resolving and spirit-tranquilizing. **Methods** Spearman analysis, grey relational analysis, and multiple regression analysis were used to correlate the peak area of the characteristic peaks of each component in the HPLC fingerprint with the behavior indexes of depressive and insomnia mice. **Results** There were five chemical compositions strongly related with efficacy of flavonoids in ZSS, including vicenin-II, glucosylvitexin, spinosin, 6'''-feruloylspinosin, and 6'''-p-hydroxybenzoylspinosin. **Conclusion** The effective components of flavonoids in ZSS with depression-resolving and spirit-tranquilizing effects can be inferred by spectrum-efficient correlation analysis, which can provide the basis for the screening and quality control of effective components of ZSS.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; flavonoids; spectrum-efficient correlation; vicenin-II; glucosylvitexin; spinosin; 6'''-feruloylspinosin; 6'''-p-hydroxybenzoylspinosin

酸枣仁 *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) 为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 干燥成熟的种子。具有养心安神、敛汗生津、补肝之功效, 用于虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴等症^[1]。近年来的药理研究表明, 酸枣仁中的黄酮类成分是其发挥抗抑郁、镇静催眠活性的主要物质基础之一^[2-4]。然而, 有关酸枣仁黄酮部位与其他部位配伍发挥药效的有效成分研究相对较少。本研究以酸枣仁黄酮部位为研究对象, 研

究酸枣仁黄酮部位不同配伍指纹图谱及其解郁安神作用, 采用 Spearman 分析、灰色关联度分析、多元回归分析等方法对数据结果进行分析, 建立酸枣仁黄酮部位不同配伍与解郁安神作用的谱效关系, 从而筛选出发挥作用的有效成分。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); AUX120 R204 十万分之一分析天平 (日本岛

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173530); 天津市自然科学基金重点项目 (17JCZDJC33200)

作者简介: 宋 伟 (1992—), 女, 硕士, 研究方向为中药药理与药效物质基础。Tel: 13602160667 E-mail: evolsong@163.com

*通信作者 乔 卫 Tel: 13072023961 E-mail: qiaowei@tmu.edu.cn

津公司); KQ-500B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); GloMax-Multi 酶标仪 (Promega 公司); Centrifuge 5810R 离心机 (Eppendorf 公司)。

1.2 药品及试剂

酸枣仁购自安徽亳州市怡怡堂精品药材店, 经天津医科大学药学院周晔教授鉴定为酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 干燥成熟的种子。本实验室经提取分离得到酸枣仁总生物碱、总黄酮、总皂苷提取物 (分别含总生物碱 65.23%、总黄酮 80.50%、总皂苷 66.17%); 酸枣仁浸膏 (自制, 折合生药量为 12.0 g/kg); 盐酸文拉法辛缓释胶囊 (成都康弘药业集团股份有限公司); 解郁安神颗粒 (通化利民药业有限责任公司); 对照品 6"-阿魏酰斯皮诺素 (成都普思生物科技有限公司, 批号 PS13013103)、斯皮诺素 (成都普思生物科技有限公司, 批号 PS12010701), 质量分数均 > 98%; 石油醚、乙醇、正丁醇、盐酸、氢氧化钠均为分析纯 (天津基准化学试剂有限公司); 小鼠 γ -氨基丁酸 (GABA) 酶联免疫分析试剂盒、小鼠谷氨酸 (Glu) 酶联免疫分析试剂盒、小鼠脑源性神经营养因子 (BDNF) 酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司)。

1.3 实验动物

健康雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 体质量 (18~20) g, 购于中国医学科学院医学实验动物研究所, 合格证号 SCXK 津 2005-0001。

2 方法与结果

2.1 酸枣仁黄酮部位不同配伍对抑郁失眠小鼠行为学的影响

2.1.1 分组及给药 健康雄性 ICR 小鼠 130 只, 随机分为 13 组, 即对照组、模型组、文拉法辛组、解郁安神颗粒组、酸枣仁浸膏组、酸枣仁单一部位给药组 (3 组)、酸枣仁黄酮部位不同配伍组 (5 组), 每组 10 只, 具体分组及给药方案见表 1 (其中酸枣仁总黄酮组相当于酸枣仁 10.0 g/kg, 酸枣仁总生物碱组相当于酸枣仁 1.6 g/kg, 酸枣仁总皂苷组相当于酸枣仁 11.6 g/kg, 酸枣仁总生物碱-总黄酮组相当于酸枣仁 11.6 g/kg, 酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量组相当于酸枣仁 13.2 g/kg, 酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量组相当于酸枣仁 23.2 g/kg)。采用 21 d 慢性不可预知温和刺激结合平台睡眠剥夺法构建小鼠抑郁失眠模型, 采用的刺激方式包括潮湿饲养 12 h、无垫料饲养 12 h、冷水游泳 6 min、倾斜 12 h、昼

表 1 动物分组及给药方案

Table 1 Animal grouping and dosage regimen

组别	剂量
对照	—
模型	蒸馏水 0.01 mg·kg ⁻¹
文拉法辛	9.38 mg·kg ⁻¹
解郁安神颗粒	650 mg·kg ⁻¹
酸枣仁浸膏	2 640 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总黄酮	160 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总生物碱	14 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总皂苷	110 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	总黄酮 24 mg·kg ⁻¹ +总皂苷 110 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	总黄酮 31 mg·kg ⁻¹ +总皂苷 200 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总生物碱-总黄酮 (1:14)	总生物碱 11.7 mg·kg ⁻¹ +总黄酮 163.8 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总生物碱-总黄酮 (1:12)	总生物碱 14.0 mg·kg ⁻¹ +总黄酮 160.8 mg·kg ⁻¹
酸枣仁总生物碱-总黄酮 (1:8)	总生物碱 19.0 mg·kg ⁻¹ +总黄酮 152.0 mg·kg ⁻¹

夜颠倒、夹尾 1 min、热水游泳 6 min、睡眠剥夺 12 h、禁食 12 h、禁水 12 h, 共 10 种刺激, 每天随机给予 2 种刺激, 连续刺激 21 d。并于每日 8:00~9:00 时 ig 给药 1 次, 给药体积 0.01 mL/g, 连续给药 21 d。

2.1.2 指标检测及结果

(1) 体质量 分别记录小鼠在实验开始前及造模过程中的体质量, 即第 1、10、21 天的体质量, 计算出各组小鼠体质量增长情况。实验第 1 天各组小鼠体质量无显著性差异, 实验第 21 天模型组小鼠体质量增长与对照组小鼠比较差异显著 ($P<0.01$)。酸枣仁总黄酮不同配伍组小鼠体质量增长与模型组比较差异显著 ($P<0.05$ 、0.01), 具体结果见表 2。

(2) 强迫游泳实验 (FST) [5] 将小鼠单独放入一直径 18 cm, 高 30 cm 的圆柱形烧杯中。缸中水深 10 cm 以上, 水温 (25±2)℃。实验进行 6 min。记录后 4 min 内小鼠的不动时间, 用小鼠的漂浮不动时间作为判断抑郁严重程度的指标。结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠游泳不动时间明显增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组小鼠游泳不动时间均减少 ($P<0.01$), 结果见表 3。

(3) 悬尾实验 (TST) [6] 将小鼠尾部 1~2 cm 处的部分贴在一水平木棍上, 使动物成倒挂状态,

表 2 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on body weight of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体质量/g			
	第 1 天	第 10 天	第 21 天	体质量增量
对照	23.07±0.78	27.89±2.31	33.97±1.33	10.78±0.63
模型	23.30±0.98	27.13±0.91	25.29±2.38	3.25±1.97 ^{##}
文拉法辛	24.50±2.02	27.70±3.61	30.05±3.82	6.19±2.37 ^{**}
解郁安神颗粒	22.74±0.74	26.10±1.21	24.88±3.04	3.41±1.74
酸枣仁浸膏	24.01±0.76	25.78±1.13	28.52±2.11	6.37±1.55 ^{**}
酸枣仁总黄酮	19.79±1.73	27.10±2.18	25.19±4.43	12.01±4.24 ^{**}
酸枣仁总生物碱	21.88±2.69	27.98±3.90	31.80±3.91	11.81±4.33 ^{**}
酸枣仁总皂苷	22.80±1.14	28.86±3.61	33.69±3.98	6.37±2.51 ^{**}
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	19.54±3.67	25.23±1.73	25.69±2.77	4.92±1.79 [*]
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	23.24±0.83	26.47±1.01	28.64±2.45	5.39±2.78 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)	23.57±1.70	28.96±2.60	33.73±2.71	10.16±1.79 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:12)	24.29±2.39	28.71±3.26	32.09±3.17	7.80±3.00 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)	23.11±0.69	26.65±1.60	27.52±5.81	6.82±5.94 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 3 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠游泳不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on forced swimming test of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	FST 累计不动时间/s
对照	24.43± 6.85
模型	91.90± 5.60 ^{##}
文拉法辛	65.00± 8.95 ^{**}
解郁安神颗粒	71.70±13.11 [*]
酸枣仁浸膏	57.22± 7.84 ^{**}
酸枣仁总黄酮	36.33± 7.46 ^{**}
酸枣仁总生物碱	51.14± 7.20 ^{**}
酸枣仁总皂苷	46.83± 8.36 ^{**}
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	60.13±11.12 ^{**}
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	70.11±10.67 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)	30.63± 8.03 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:12)	49.07± 6.11 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)	40.56± 9.72 ^{**}

其头部离台面约 20 cm, 悬挂 2 侧用板隔开动物视线。实验进行 6 min, 以小鼠头部向下, 四肢自然下垂作为悬尾不动的标准。观察并记录后 4 min 内小鼠的不动时间为悬尾不动时间。实验结果显示, 与模型组比较, 各给药组小鼠悬尾不动时间缩短 ($P < 0.05$ 、0.01), 结果见表 4。

(4) ip 阈下剂量戊巴比妥钠实验^[7] 给小鼠 ip 阈

表 4 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠悬尾不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on tail suspension test of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TST 累计不动时间/s
对照	89.11±13.42
模型	122.89± 9.33 ^{##}
文拉法辛	110.00±12.78 [*]
解郁安神颗粒	102.60±10.13 [*]
酸枣仁浸膏	91.00±13.26 ^{**}
酸枣仁总黄酮	81.50±11.84 ^{**}
酸枣仁总生物碱	82.00± 5.16 ^{**}
酸枣仁总皂苷	65.40±13.32 ^{**}
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	93.60±10.11 ^{**}
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	102.80± 8.17 [*]
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)	81.53± 8.46 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:12)	67.46±11.64 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)	59.33±14.44 ^{**}

下剂量戊巴比妥钠, 剂量为 30 mg/kg, 记录各组小鼠出现睡眠的只数。以翻正反射消失 1 min 以上记为睡眠。结果显示, 与模型组相比, 各给药组小鼠的睡眠只数百分比均明显升高, 其中, 酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)组、总生物碱-总黄酮(1:12)组小鼠睡眠只数百分比接近对照组水平, 结果见表 5。

表 5 酸枣仁总黄酮不同配伍对阈下剂量戊巴比妥实验的影响 ($n = 10$)Table 5 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on subthreshold dose of pentobarbital sodium on sleep of mice ($n = 10$)

组别	睡眠只数	睡眠比/%
对照	7	70
模型	4	40
文拉法辛	6	60
解郁安神颗粒	7	70
酸枣仁浸膏	8	80
酸枣仁总黄酮	7	70
酸枣仁总生物碱	6	60
酸枣仁总皂苷	6	60
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	5	50
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	6	60
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)	7	70
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:12)	7	70
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)	6	60

(5) ip 阈上剂量戊巴比妥钠实验^[7] 给小鼠 ip 阈上剂量戊巴比妥钠, 剂量为 40 mg/kg。ip 后开始计时, 记录睡眠潜伏期及睡眠时间。以翻正反射消失时记为睡眠起始时间, 翻正反射恢复时记为睡眠结束时间。ip 给药后到睡眠起始这段时间为睡眠潜伏期, 潜伏期超过 15 min, 按 15 min 记录。睡眠时间超过 60 min, 按 60 min 记录。实验结果显示, 与模型组比较, 除酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)组外, 各给药组小鼠的睡眠潜伏期均明显缩短, 且差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组相比, 各给药组小鼠睡眠时间均明显延长 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 6。

2.2 酸枣仁总黄酮不同配伍对抑郁失眠小鼠脑内神经递质水平的影响

各组小鼠于末次给药 30 min 后, 给予 1 min 悬尾刺激。刺激后立即断头处死, 取小鼠全脑放入 EP 管中, 加 1 mL PBS 研磨均匀, 低温离心后取上清液待测。用 Elisa 法检测小鼠脑内 GABA、Glu、BDNF 含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作。根据标准曲线计算小鼠脑内 GABA、Glu、BDNF 的量。

2.2.1 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠脑内 Glu 量的影响 Glu 含量标准曲线为 $Y = 0.1519X - 0.2146$ ($R^2 = 0.9966$), 求得各组小鼠脑内 Glu 的量(表 7), 实验结果表明, 与模型组比较, 各给药组小鼠的 Glu 水平均降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中酸枣仁总生物

表 6 酸枣仁总黄酮不同配伍对阈上剂量戊巴比妥实验的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 6 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on suprathreshold dose of pentobarbital sodium on sleep of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	睡眠潜伏期/min	睡眠时间/min
对照	4.00 ± 1.07	45.63 ± 9.83
模型	$12.75 \pm 2.66^{##}$	$19.75 \pm 1.49^{##}$
文拉法辛	$5.63 \pm 0.92^{**}$	$38.13 \pm 4.25^{**}$
解郁安神颗粒	$5.13 \pm 1.13^{**}$	$40.25 \pm 6.36^{***}$
酸枣仁浸膏	$6.40 \pm 0.84^{**}$	$37.00 \pm 6.82^{**}$
酸枣仁总黄酮	$6.78 \pm 2.39^{**}$	$39.40 \pm 2.25^{**}$
酸枣仁总生物碱	$5.50 \pm 2.37^{**}$	$29.90 \pm 1.06^{**}$
酸枣仁总皂苷	$5.20 \pm 0.92^{**}$	$49.75 \pm 4.85^{**}$
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	$8.75 \pm 1.28^*$	$34.25 \pm 1.91^{**}$
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	$8.20 \pm 0.92^*$	$29.75 \pm 4.85^{**}$
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)	$9.13 \pm 1.96^*$	$32.38 \pm 2.44^{**}$
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:12)	$10.88 \pm 1.55^*$	$27.75 \pm 1.58^*$
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)	11.38 ± 2.26	$25.12 \pm 1.64^*$

表 7 酸枣仁黄酮不同配伍对小鼠脑内 Glu 量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 7 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on content of Glu in brain of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	Glu/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	49.24 ± 6.93
模型	$62.39 \pm 6.74^{##}$
文拉法辛	$53.89 \pm 7.61^{**}$
解郁安神颗粒	$54.66 \pm 6.56^{**}$
酸枣仁浸膏	$50.19 \pm 8.26^{**}$
酸枣仁总黄酮	$47.25 \pm 4.17^{**}$
酸枣仁总生物碱	$53.54 \pm 5.81^{**}$
酸枣仁总皂苷	$52.81 \pm 5.44^{**}$
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	$53.02 \pm 6.15^{**}$
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	$57.17 \pm 5.75^*$
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)	$48.37 \pm 6.05^{**}$
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:12)	$49.34 \pm 3.42^{**}$
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)	$48.76 \pm 6.34^{**}$

碱-总黄酮各配伍组小鼠脑内 Glu 含量普遍较低,提示其对抑制小鼠 Glu 系统过度激活效果良好。

2.2.2 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠脑内 GABA 量的影响 小鼠脑内 GABA 量标准曲线为 $Y=0.1502X-0.1903$ ($R^2=0.9989$), 结果表明(表 8), 各给药组小鼠脑内 GABA 水平均高于模型组, 其中酸枣仁总生物碱-总黄酮各配伍组及酸枣仁单一部位组与模型组比较差异显著 ($P<0.01$), 总生物碱-总黄酮各配伍组的 GABA 含量水平较高。

Glu 和 GABA 在脑的正常活动中协同发挥作用, 酸枣仁总生物碱-总黄酮各配伍组小鼠脑内 Glu、GABA 量均较接近对照组, 提示酸枣仁总生物碱-总黄酮配伍对维持小鼠内 2 种神经递质量的平衡效果均较为明显。

表 8 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠脑内 GABA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 8 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on content of GABA in brain of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	GABA/(ng·mL ⁻¹)
对照	15.02±1.24
模型	8.40±2.46 ^{##}
文拉法辛	8.95±2.20
解郁安神颗粒	8.83±1.03
酸枣仁浸膏	13.98±2.43 ^{**}
酸枣仁总黄酮	13.64±2.46 ^{**}
酸枣仁总生物碱	12.66±2.91 ^{**}
酸枣仁总皂苷	11.57±1.91 [*]
酸枣仁总黄酮+总皂苷低剂量	11.60±1.92 [*]
酸枣仁总黄酮+总皂苷高剂量	12.01±3.28 [*]
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:14)	11.64±2.61 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:12)	13.07±1.23 ^{**}
酸枣仁总生物碱-总黄酮(1:8)	13.82±2.82 ^{**}

2.2.3 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠脑内 BDNF 量的影响 小鼠脑内 BDNF 量的标准曲线为 $Y=0.0013X+0.049$ ($R^2=0.9969$)。由表 9 可知, 模型组小鼠由于应激刺激所产生的抑郁症状导致其脑内 BDNF 水平低下, 而给药组小鼠脑内 BDNF 水平明显高于模型组 ($P<0.01$), 表明药物对提高小鼠脑内 BDNF 水平并改善小鼠抑郁程度有明显效果。其中, 酸枣仁总生物碱-总黄酮各配伍组小鼠脑内 BDNF 水平与对照组接近, 效果较为明显。

表 9 酸枣仁总黄酮不同配伍对小鼠脑内 BDNF 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 9 Effects of different compatibility of flavonoids in ZSS on concentrations of BDNF in brain of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

编号	组别	BDNF/(ng·mL ⁻¹)
1	对照	24.69±2.91
2	模型	15.23±2.23 ^{##}
3	文拉法辛	22.64±1.98 ^{**}
4	解郁安神颗粒	22.24±1.88 ^{**}
5	酸枣仁浸膏	24.63±1.49 ^{**}
6	酸枣仁黄酮	27.40±1.55 ^{**}
7	酸枣仁生物碱	26.79±2.44 ^{**}
8	酸枣仁皂苷	28.57±2.97 ^{**}
9	酸枣仁黄酮+皂苷低剂量	23.00±2.47 ^{**}
10	酸枣仁黄酮+皂苷高剂量	21.52±2.04 ^{**}
11	酸枣仁生物碱-黄酮(1:14)	23.43±1.35 ^{**}
12	酸枣仁生物碱-黄酮(1:12)	24.62±2.11 ^{**}
13	酸枣仁生物碱-黄酮(1:8)	24.65±2.12 ^{**}

2.3 酸枣仁总黄酮不同配伍样品指纹图谱

2.3.1 液相色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%醋酸水溶液, 梯度洗脱: 运行时间 60 min; 0 min, 10%乙腈; 10~60 min, 20%~24%乙腈。体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL; 检测波长 280 nm^[8]。

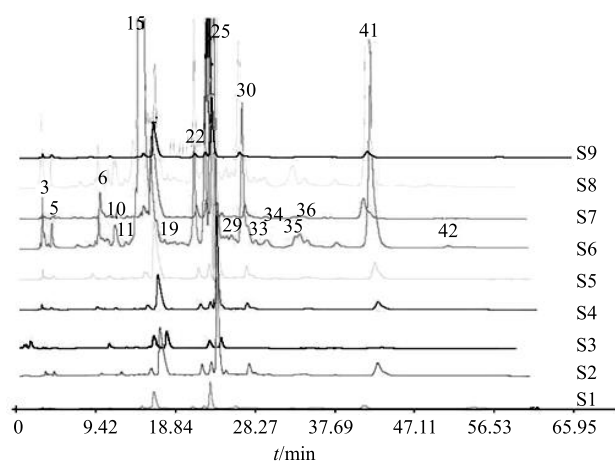
2.3.2 不同配比样品溶液的制备 分别准确称取一定量的酸枣仁总皂苷、总生物碱、总黄酮及酸枣仁浸膏, 按照小鼠各给药组剂量, 加甲醇配制成相应质量浓度的样品溶液, 用 0.45 μm 微孔有机滤膜滤过, 备用。

2.3.3 HPLC 分析 分别取样品溶液 20 μL, 注入 HPLC 仪, 按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 如图 1 所示。

通过对酸枣仁总黄酮不同配伍样品进行 HPLC 分析, 应用《中药色谱指纹图谱相似度评价》软件 (2004 年 A 版) 进行计算, 得到主要色谱峰及其积分面积, 见表 10, 共检测出 42 个色谱峰。在本实验室前期研究基础上, 指认 10、22、25、30、41 号峰分别为黄酮部位中的成分维采宁Ⅱ、牡荆素葡萄糖苷、斯皮诺素、6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素^[8]。

2.4 谱效相关性研究

2.4.1 Spearman 分析^[9] 将酸枣仁总黄酮不同配伍



S1-酸枣仁黄酮 S2-酸枣仁生物碱 S3-酸枣仁皂苷 S4-酸枣仁生物碱-黄酮 (1:14) S5-酸枣仁生物碱-黄酮 (1:12) S6-酸枣仁生物碱-黄酮 (1:8) S7-酸枣仁黄酮-皂苷低剂量组 S8-酸枣仁黄酮-皂苷高剂量组 S9-酸枣仁浸膏组, 表 10 同

S1-flavonoids in ZSS S2-alkaloids in ZSS S3-saponins in ZSS S4-alk-fla (1:14) S5-alk-fla (1:12) S6-alk-fla(1:8) S7-fla-sap (low dose) S8-fla-sap (high dose) S9-extract of ZSS, same as table 10

图 1 酸枣仁黄酮不同配伍 HPLC 指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprints of different compatibility of flavonoids in ZSS

组 HPLC 相关峰峰面积及药理数据进行相关性分析 ($P < 0.05$), 计算 Spearman 相关系数 (γ), $|\gamma| \geq 0.8$ 表示高度相关, $0.5 \leq |\gamma| < 0.8$ 表示中度相关, $0.3 \leq |\gamma| < 0.5$ 表示低度相关, $|\gamma| < 0.3$ 表示不相关。本实验按照 5 个及以上参数具有相关性为标准, 确定 3、6、10、11、19、22、25、35、36、41 号峰与药效作用相关。其中, 10、22、41 号峰分别为酸枣仁黄酮部位中的成分维采宁 II、牡荆素葡萄糖苷和 6'''-阿魏酰斯皮诺素。

2.4.2 灰色关联度分析^[10]

(1) 指定参考数据列

参考数据列记为 X_0 , 第 1 个时刻记为 $X_0(1)$, 第 2 个时刻记为 $X_0(2)$, 第 k 个时刻记为 $X_0(k)$ 。参考序列 X_0 可表示为 $X_0 = [X_0(1), X_0(2), X_0(k)]$ 。分析中被比较的列记为 X_1, X_2, X_n , 类似序列为 $X_1 = [X_1(1), X_1(2), X_1(k)], \dots, X_n = [X_n(1), X_n(2), X_n(k)]$ 。

(2) 变量的归一化

分析系统中可能存在不同量纲的数据, 为了便

表 10 酸枣仁黄酮部位不同配伍主要色谱峰及其积分面积

Table 10 Main peaks and its peak area of different compatibility of flavonoids in ZSS

峰号	t/min	积分面积								
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
1	3.18	—	—	30 752	962 807	4 893 340	690 147	367 216	208 967	4 069 270
2	3.44	297 376	—	37 854	290 019	1 632 689	263 855	153 774	57 818	1 222 463
3	3.77	354 879	—	25 741	241 448	749 450	654 781	91 063	35 763	521 589
4	4.19	700 394	147 921	183 036	657 532	3 852 688	551 568	673 113	93 458	388 995
5	4.93	184 191	—	—	93 875	363 443	378 728	51 298	140 039	3 120 221
6	9.71	610 119	—	180 288	1 127 752	4 760 360	4 138 157	401 867	177 999	2 235 872
7	10.37	184 793	1 832 249	—	302 962	1 253 750	1 161 999	175 321	42 849	1 405 935
8	10.89	—	984 854	—	317 737	1 769 853	558 121	509 334	211 326	112 782
9	11.52	23 273	168 984	51 983	100 541	6 113 606	386 150	102 944	12 911	200 409
10	12.04	743 670	180 073	—	265 149	400 572	141 326	316 720	12 482	333 416
11	12.28	—	107 985	—	140 326	1 013 192	1 783 638	2 426 087	168 478	545 464
12	13.23	123 477	359 261	—	221 271	658 471	591 890	224 102	324 884	643 234
13	14.21	—	423 784	—	511 811	457 812	131 997	200 558	611 165	23 429
14	14.37	324 524	123 486	—	101 209	400 572	458 012	2 241 032	330 295	154 782
15	14.80	16 998 653	4 073 588	—	13 902 609	129 978 897	22 943 591	11 761 251	5 148 040	16 510 662
16	15.56	491 566	145 222	—	1 242 268	10 025 008	3 109 280	137 105	23 597	3 174 332
17	15.70	1 305 239	439 540	107 318	1 457 549	106 288 931	13 228 650	1 343 026	330 295	974 414
18	16.66	178 277	129 425	32 169	462 115	530 090	485 162	216 720	354 187	533 336
19	17.35	1 676 337	214 266	2 912 399	7 825 740	16 411 420	7 756 736	204 562	115 251	22 588

续表 1

峰号	t/min	积分面积								
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
20	17.79	452 545	4 760 676	—	1 593 741	6 817 919	147 063	399 968	201 382	41 526
21	19.59	6 443 674	101 727	—	169 596	616 513	766 421	258 660	126 056	118 122
22	20.70	2 607 705	—	29 734	3 302 471	21 368 003	3 422 464	1 250 259	533 441	1 269 151
23	21.67	—	543 355	—	242 504	309 078	172 947	163 029	75 407	858 456
24	22.85	3 169 027	2 323 318	—	3 773 306	24 791 323	4 571 740	1 450 022	640 344	9 998 342
25	23.54	63 788 002	2 538 459	280 194	73 619 751	41 887 367	87 981 726	13 610 799	5 813 788	45 764 960
26	24.49	1 175 910	—	—	433 552	362 562	1 495 466	331 818	39 489	176 169
27	25.01	302 726	139 845	—	126 248	626 859	515 008	478 022	108 265	49 361
28	25.42	390 700	—	—	536 328	337 235	9 965 165	1 738 886	168 138	82 884
29	25.87	249 881	113 389	—	206 900	14 711 233	5 156 208	793 575	676 281	49 361
30	26.43	3 487 474	—	83 946	4 076 891	4 264 388	4 220 366	427 119	301 641	565 603
31	27.24	417 998	—	—	6 662 280	337 234	270 327	478 022	304 358	82 884
32	27.63	3 414 745	135 037	—	1 164 667	11 511 485	868 400	189 397	178 138	90 595
33	27.94	—	117 295	—	536 092	226 437	472 234	144 754	148 547	18 559
34	29.58	522 442	—	—	205 202	2 815 580	685 383	355 284	247 856	133 149
35	32.74	422 622	—	—	—	410 409	599 212	750 263	207 827	153 791
36	33.57	700 665	—	—	—	3 573 197	1 062 955	408 144	154 798	512 245
37	33.88	428 680	—	—	—	5 457 130	5 311 103	207 716	111 957	443 584
38	34.42	456 723	76 102	—	607 025	3 637 456	110 395	187 992	154 694	147 009
39	38.38	259 903	—	—	8 899 530	2 463 318	444 019	246 672	166 779	466 063
40	41.34	1 156 655	563 892	—	1 539 852	6 599 850	2 066 899	151 634	154 694	30 998
41	42.07	6 264 224	380 616	—	7 185 749	64 159 431	8 779 124	244 083	1 376 838	6 205 138
42	50.41	115 847	—	—	280 837	1 301 276	209 587	121 701	855 938	160 455

于比较, 保证结果得可靠性, 在进行灰关联度分析时一般采用归一化法对数据进行无量纲化处理。

$$Xi(k)=Xi(k)/Xi[\text{SUM}(1\sim k)]$$

(3) 关联度系数计算

$X_0(i)$ 与 $X_0(k)$ 的关联系数:

$$\xi_i(k)=(\Delta\min+\rho*\Delta\max)/(\Delta i(k)+\rho*\max)$$

$$\Delta i(k)=|Xi(k)-X_0(k)|$$

$$\Delta\min=\min|X_0(1)\sim X_n(k)|, \Delta\max=\max|X_0(1)\sim X_n(k)|$$

ρ 为分辨系数, $\rho\leq 0.5463$ 时分辨力最好, 通常取 $\rho=0.5$

(4) 关联度计算

$$\gamma_i=\frac{1}{N}\sum_{n=1}^k\xi_i(k)$$

将酸枣仁黄酮不同配伍高效液相谱图定峰 1~42 号与小鼠体重质量变化、游泳不动时间、悬尾不动时间、睡眠时间、Glu 水平、GABA 水平和 BDNF

水平等药效学指标进行灰色关联度分析, 结果见表 11。确定 10、15、22、25、30、41、33 号峰与药效学指标相关度较高。其中 10、22、25、30、41 号峰分别为维采宁II、牡荆素葡萄糖苷、斯皮诺素、6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素。

2.4.3 多元回归分析^[11] 将不同配伍 HPLC 共有峰面积及药理数据输入 SPSS 16.0 软件, 采用强迫引入法处理进行多元回归分析相关分析, 建立回归方程。在多元回归分析中, 共引入了 8 个和药效相关的色谱峰, 即 5、10、15、29、33、34、42 号峰, 其中 10 号峰是维采宁-II, 其他色谱峰还有待进一步指认。

所得方程:

$$Y_{\text{小鼠体重质量变化}}=3.6-0.414 X_5+1.008 X_{10}-0.074 X_{15}+0.537 X_{25}-0.515 X_{29}-0.505 X_{33}-0.035 X_{34}+0.062 X_{42}$$

$$Y_{\text{游泳不动时间}}=11.425+0.024 X_5+0.312 X_{10}-$$

表 11 灰色关联度排序
Table 11 Analysis of grey relational degree

关联度排名	峰号						
	体质量变化	游泳不动时间	悬尾不动时间	睡眠时间	Glu 水平	GABA 水平	BDNF 水平
1	10	25	25	10	10	10	10
2	25	41	10	30	15	30	30
3	30	3	30	25	30	25	15
4	33	8	33	15	13	15	25
5	15	7	41	11	25	13	13
6	8	30	27	41	22	22	22
7	22	10	15	3	33	33	33

$0.502 X_{15} + 0.576 X_{25} + 0.318 X_{29} + 0.272 X_{33} - 0.110 X_{34} + 0.324 X_{42}$

$Y_{\text{悬尾不动时间}} = 12.851 - 0.228 X_5 - 0.05 X_{10} - 0.312 X_{15} + 0.566 X_{25} + 0.939 X_{29} + 0.044 X_{33} - 0.095 X_{34} - 0.311 X_{42}$

$Y_{\text{睡眠时间}} = 16.347 + 0.140 X_5 - 0.065 X_{10} - 0.388 X_{15} + 0.665 X_{25} + 0.116 X_{29} + 0.105 X_{33} + 0.370 X_{34} + 0.783 X_{42}$

$Y_{\text{Glu 水平}} = 59.714 - 0.167 X_5 - 0.349 X_{10} + 0.151 X_{15} - 0.764 X_{25} - 0.048 X_{29} - 0.105 X_{33} + 0.112 X_{34} + 0.358 X_{42}$

$Y_{\text{GABA 水平}} = 59.714 + 0.337 X_5 + 0.253 X_{10} - 0.653 X_{15} + 0.586 X_{25} + 0.250 X_{29} - 0.083 X_{33} - 0.083 X_{34} + 0.442 X_{42}$

$Y_{\text{BDNF 水平}} = 2.827 - 0.188 X_5 + 0.918 X_{10} - 0.284 X_{15} + 0.188 X_{25} - 0.703 X_{29} - 0.258 X_{33} - 0.370 X_{34} + 0.755 X_{42}$ 。

3 讨论

中药成分复杂多样,其有效成分量的高低与药效不一定存在直接关系,单独通过指纹图谱不足以说明中药与药效之间的关系。因此需要借助中药指纹图谱与药效学指标建立内在的关系或数学模型^[12],明确中药材中发挥作用的有效成分。

抑郁症的发病机制尚不明确,目前研究多集中于神经递质及其受体,包括 Glu、GABA、5-羟色胺、去甲肾上腺素等,其中 GABA 的代谢异常会导致失眠和焦虑等相关症状,而 Glu 的急剧增加会导致自杀行为的产生^[13]。BDNF 是神经元再生和突触形态重塑、神经元发育和分化的调节分子。现已发现许多急性或慢性的应激刺激都可使海马组织中脑源性神经营养因子的表达减少。本研究采用酶联免疫分

析法测定小鼠脑内 Glu、GABA、BDNF 量考察酸枣仁总黄酮不同配伍对抑郁失眠小鼠脑内神经递质水平的影响。通过测定小鼠体质量增长、悬尾不动时间、强迫游泳不动时间考察酸枣仁总黄酮不同配伍对抑郁失眠小鼠抗抑郁作用的影响,通过阈上/阈下剂量戊巴比妥钠协同实验考察对抑郁失眠小鼠镇静催眠作用的影响。

谱效关系研究中数据处理方法较多,且各具优势和不足。目前中药谱效关系研究主要采用相关分析法。该法将药效指标作为 1 个变量,同时将中药指纹图谱中的色谱峰面积作为多个变量,考察指纹图谱各色谱峰的面积与药效指标之间的关联性,但该法忽略了中药作用的整体性,无法解释各个色谱峰对药效的协同作用。本实验中数据经正态性检验为非正态分布,因此采用 Spearman 简单相关进行研究。灰色关联度分析通过对各影响因子的分析,得到各因素之间的相关数值关系,若 2 因素变化趋势一致,同步变化程度高,则认为二者关联大,反之,二者关联度较小。与其他数据处理方法相比,灰色关联度分析对数据的要求较低。但该法无法建立相应的数学模型。多元回归分析是研究 1 个或多个自变量与 1 个自变量之间是否存在线性或非线性关系的 1 种统计学方法。回归方程可以描述主要色谱峰与药理作用之间的关系。但是回归分析也存在局限性,无法分析未选择的色谱峰与药理作用的关系。综合上述分析方法的利弊,本研究结合 Spearman 分析、灰色关联度分析、多元回归分析等多种方法分析酸枣仁总黄酮不同配伍组指纹图谱与解郁安神作用的关系,以保证分析结果的准确性。

已有文献报道^[14],黄酮类化合物是酸枣仁功效表现的主要部位之一。但酸枣仁黄酮与其他部位协

同能否发挥解郁安神作用及其药效成分尚未见文献报道。因此本研究将酸枣仁总黄酮作为主要研究对象,建立了酸枣仁总黄酮 HPLC 指纹图谱,确定了 10 个共有峰^[8]。在前期实验基础上,建立酸枣仁黄酮与不同部位配伍的指纹图谱,探究是否有黄酮部位指纹图谱中未出现的新峰,峰面积、峰型等是否发生改变,以 42 个色谱峰有无以及峰面积变化与药效相关性进行探究,指出与药效有关的色谱峰,区别于单纯考察指纹图谱中各色谱峰的相似度然后进行“谱-效”相关性研究的研究模式。本研究建立了酸枣仁总黄酮、总生物碱、总皂苷 3 种部位相互配伍 HPLC 指纹图谱与药理学指标的谱-效相关分析,将药效相关峰峰面积与小鼠体质量变化、游泳不动时间、悬尾不动时间、睡眠时间、Glu 量、GABA 量、BDNF 量等指标进行相关计算,并通过 3 种谱-效相关性分析方法,最终确认了维采宁-II、牡荆素葡萄糖苷、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素等黄酮成分是酸枣仁发挥解郁安神作用的有效成分。本研究为酸枣仁药效物质确认提供了一定的理论依据,为酸枣仁有效组分生产工艺优化、建立质量评价方法和阐释配伍合理性提供了参考依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 袁昌鲁, 王中博, 焦莹, 等. 酸枣仁中黄酮类镇静催眠有效成分的研究 [J]. 中药通报, 1987, 12(9): 36-38.
- [3] 赵启铎, 舒乐新, 王颖, 等. 酸枣仁总黄酮抗抑郁作用的实验研究 [J]. 天津中医药, 2011, 28(4): 335-337.
- [4] 任燕萍. 酸枣仁有效成分的提取及其药理作用研究 [J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 89-91.
- [5] Porsolt R D, Anton G, Blavet N, *et al.* Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments [J]. *Eur J Pharmacol*, 1978, 47(4): 379-391.
- [6] Steru L, Chermat R, Thierry B, *et al.* The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology*, 1985, 85(3): 367-370.
- [7] 陈奇. 中国药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [8] 杨旭, 冉瑞雪, 宋伟, 等. 酸枣仁黄酮 HPLC 指纹图谱建立及 2 种成分测定 [J]. 中成药, 2017, 39(5): 989-992.
- [9] 王开军, 黄添强. 基于趋势秩的 Spearman 相关方法 [J]. 福建师大学报: 自然科学版, 2010, 26(1): 38-41.
- [10] 田兵, 冉雪琴, 薛红, 等. 贵州 42 种野生牧草营养价值灰色关联度分析 [J]. 草业学报, 2014, 23(1): 92-103.
- [11] 白秀琴, 李瑞阁. 多元回归分析方法应用实证分析与比较 [J]. 河南科学, 2010, 28(9): 1083-1088.
- [12] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2410-2413.
- [13] 佟晴, 袁永胜, 徐勤荣, 等. 帕金森病伴发抑郁患者血浆谷氨酸和 γ -氨基丁酸水平的改变及其临床意义 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2015, 41(4): 224-228.
- [14] 吴玉兰, 许惠琴, 陈洗. 酸枣仁不同炮制品及炒酸枣仁中总黄酮与总皂苷的镇静催眠作用比较 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 868-869.