

## 赤芍、白芍的 LC-MS 色谱峰与细胞抑制率的谱效关系研究

宋玉超, 马海波, 张 旗, 崔秀荣, 连超杰, 李 强\*, 雷海民

北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

**摘要:** 目的 确定川赤芍、赤芍、白芍抑制脂多糖 (LPS) 诱导大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 过度激活的“药效成分组”。方法 以川赤芍、赤芍、白芍不同提取物 LC-MS 图谱峰面积及其抑制 LPS 诱导的 NR8383 细胞活力增强为基础, 采用偏最小二乘回归法, 对 LC-MS 图谱和抑制细胞增殖的内在联系进行谱效分析。结果 LC-MS 图上的 X<sub>11</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>3</sub> 这 6 个成分组成的“药效成分组”对川赤芍、赤芍、白芍抑制 NR8383 细胞增殖药效的贡献较大。结论 “药效成分组”的研究显示, 同基源的赤芍、白芍在抑制 LPS 诱导的 NR8383 细胞增殖方面具有相同的化学成分 (X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>3</sub>), 但同时也有某些成分 (X<sub>11</sub>、X<sub>6</sub>) 仅能在赤芍中检测到, 这提示不同的化学成分及含量差异可能是造成赤芍、白芍功效不同的物质基础。

**关键词:** 赤芍; 白芍; 药效成分组; 偏最小二乘法; 谱效分析

中图分类号: R285.5; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2012)02-0103-04

## Spectrum-effect relationship between LC-MS fingerprint chromatogram and cell inhibitory rate of *Paeoniae Radix Rubra* and *Paeoniae Radix Alba*

SONG Yu-chao, MA Hai-bo, ZHANG Qi, CUI Xiu-rong, LIAN Chao-jie, LI Qiang, LEI Hai-min

School of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

**Abstract: Objective** To study the “effective components group” of *Paeoniae Radix Rubra*, *Paeoniae Radix Veitchii*, and *Paeoniae Radix Alba* in the inhibiting proliferation of NR8383, which was induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The inherent relationship between LC-MS fingerprint and proliferation inhibition with partial least squares regression were analysed, which were based on LC-MS fingerprint peak areas of all samples and the inhibiting of cell activity increase of NR8383 of *Paeoniae Radix Rubra*, *Paeoniae Radix Veitchii*, and *Paeoniae Radix Alba*. **Results** Effective components group consists of six peaks X<sub>11</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>9</sub>, and X<sub>3</sub> of the fingerprint, which played the most inhabitation of NR8383 proliferation. **Conclusion** “Effective components group” indicates that *Paeoniae Radix Rubra* and *Paeoniae Radix Alba* with the same origin contain the common ingredients (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>9</sub>, and X<sub>3</sub>) in the inhibiting proliferation of NR8383. However, X<sub>11</sub> and X<sub>16</sub> only can be detected in *Paeoniae Radix Rubra*, which can be considered as the different material basis in efficacy between *Paeoniae Radix Rubra* and *Paeoniae Radix Alba*.

**Key words:** *Paeoniae Radix Rubra*; *Paeoniae Radix Alba*; effective components group; partial least square method; spectrum-effect analysis

《中国药典》2010 年版规定赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根, 白芍为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 经去皮水煮后的干燥根<sup>[1-2]</sup>。赤芍、白芍来源相近甚至相同, 但临床上却不可混用, HPLC 指纹图谱研究表明其化学成分存在差异<sup>[3]</sup>。白芍长于补血, 赤芍则重在凉血, 故二者的功效差异主要体现在凉血和补血两个方面。其中赤芍、白芍补血作用的比较研究已另有文章发表<sup>[4-5]</sup>。本实验则从“凉血”功

效入手, 比较研究赤芍、白芍凉血作用的有关谱效分析, 采用偏最小二乘回归法对川赤芍、赤芍、白芍的 LC-MS 图谱及凉血药效结果进行分析研究, 旨在探讨川赤芍、赤芍、白芍抑制脂多糖 (LPS) 诱导 NR8383 细胞早期过度激活的“药效成分组”, 比较三者药效物质基础的异同, 为有区别的制定质量标准, 保证临床与生产用药安全提供参考。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent 公司);

收稿日期: 2011-11-01

作者简介: 宋玉超 (1986—), 女, 硕士研究生。E-mail: yuchaobzy@163.com

\*通讯作者 李 强, 男, 副研究员, 硕士生导师。Tel: (010)84738640 E-mail: lq\_cn@126.com

Waters 2695 HPLC-Waters Q-TOF-MS (Waters 公司); RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); DZ-2BC 型真空干燥箱(天津市泰斯特有限公司); KQ-500E 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

川赤芍、赤芍、白芍均为自购,经北京中医药大学刘春生教授鉴定,川赤芍为毛茛科植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根,赤芍、白芍分别为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 未去皮和经去皮水煮后的干燥根。LPS (Sigma 公司,批号 020M4062); 双抗 (Hyclone 公司,100 mL,批号 J110981) 和胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,100 mL,批号 100419); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 50 mg)、DMSO (500 mL) 均为 Amresco 公司产品。HPLC 级乙腈 (Merck 公司), 其余试剂均为分析纯; 高纯水为自制。

大鼠肺泡巨噬细胞系 (NR8383) 购于中国科学院细胞库,由本研究室传代后使用; F12K 培养基 (Gibco, 500 mL, 批号 979454)。

## 2 方法与结果

### 2.1 不同提取物的制备

为了获得谱效分析所需的异同并存的足够的样本数,先取赤芍药材 200 g,以 8 倍量 70%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩干燥,得“醇提取物”;将药渣晾干后,同样以 8 倍量的水回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩干燥得“醇后水提取物”;再取干燥赤芍药材 200 g,调换溶剂顺序,同上法回流提取,分别得到“水提取物”和“水后醇提取物”。同法得到川赤芍、白芍的“醇提取物”、“醇后水提取物”、“水提取物”、“水后醇提取物”。共计 12 个样本。

### 2.2 LC-MS 指纹图谱的建立

**2.2.1 色谱条件** 在文献[6]的基础上稍作改进。色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为高纯水、B 为乙腈,梯度洗脱: 0~15 min (B 5%~15%), 15~25 min (B 15%~18%), 25~40 min (B 18%~40%), 40~45 min (B 40%~85%); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 230 nm。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 分别精密称取上述各提取物相当于 1.0 g 生药的量,置 10 mL 量瓶中,加入 70%甲醇水溶液 8 mL,浸泡 60 min,60 Hz 超声处理 30 min,取出放至室温,补充溶剂至刻度,

混匀,静置 30 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

**2.2.3 质量飞行时间质谱** 质谱条件<sup>[7]</sup>: ESI 负离子模式检测;碰撞气、鞘气和辅助气为高纯氮,离子喷射电压-4 500 V,毛细管电压 2 600 V;毛细管温度 300 °C;碰撞能量-10 eV;扫描质量范围  $m/z$  100~1 000。采用 lock spray 进行质量数校正。

**2.2.4 自变量的选择** 为平衡自变量和样本数之间的矛盾,保证统计结果的可靠性,综合各提取物 LC-MS 各峰的响应值,首先仅选择在大于 5 (包含 5) 个提取物中均具有一定响应值的峰作为分析对象,经药效实验验证后再讨论是否有必要进行剩余少数峰的分析。为保证矩阵的完整性,对应不出峰的位置用 0 表示,得到谱效分析的自变量,结果见表 1。

### 2.3 药效试验

待 NR8383 细胞生长状态良好时,吹打消化细胞,用培养液调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  个/mL,将该细胞液加入 96 孔板中,200 μL/孔,每组设 6 个复孔。实验设川赤芍、赤芍、白芍各提取物(终质量浓度均为 10 μg/mL)组,孵育 1 h,再加入 LPS (1 μg/mL)。同时设正常细胞空白对照(不用 LPS 刺激)组、LPS 对照(LPS 刺激后加入 PBS)组。

培养 3 h 后,MTT 法检测波长 570 nm 处的吸光度 ( $A_{570}$ ) 值。实验设置调零孔。各组实验均重复进行 3 次。设正常对照组抑制率为 0%,以 LPS 诱导 NR8383 细胞 3 h 抑制率为因变量。结果见表 2。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - \frac{\text{给药组 } A_{570}}{\text{空白对照组 } A_{570}}$$

### 2.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析,多组间差异采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间比较采用 S-N-K 检验分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

### 2.5 谱效相关性分析

本实验的药效数据和指纹图谱数据有不同的度量标准,即量纲不同,所以采用标准差标准化,以消除变量量纲差异。以经过标准化处理的指纹图谱中代表化学成分各峰的峰面积积分为自变量,以标准化处理后的赤芍、白芍对 NR8383 细胞的抑制率作为因变量,利用 METALAB7.4.0 统计软件,运用偏最小二乘回归法进行谱效相关性分析,计算出各自变量对应因变量的回归系数。“功效成分”的 LC-MS 色谱峰见图 1。

表 1 各样本 LC-MS 色谱峰的峰面积

Table 1 Peak areas of each sample measured by LC-MS

自变量	$t_R$ /min	川赤芍提取物				赤芍提取物				白芍提取物			
		醇	醇后水	水	水后醇	醇	醇后水	水	水后醇	醇	醇后水	水	水后醇
X <sub>1</sub>	2.67	95 180	54 988	317 177	53 434	42 059	14 614	93 133	6 905	54 803	23 289	84 664	7 259
X <sub>2</sub>	4.64	1 895	350	309	0	594	0	0	0	15 277	0	17 084	0
X <sub>3</sub>	5.54	0	0	0	0	1 920	0	1 482	0	1 015	379	1 823	0
X <sub>4</sub>	10.65	0	0	0	0	2 296	348	1 494	532	0	0	362	0
X <sub>5</sub>	12.20	0	0	0	0	14 561	1 275	7 101	2 290	0	0	0	0
X <sub>6</sub>	13.61	2 449	787	1 690	646	1 803	872	1 640	842	0	0	0	0
X <sub>7</sub>	14.23	51 033	487	4 854	2 956	31 737	3 071	0	3 835	3 947	358	1 302	677
X <sub>8</sub>	19.16	2 513	479	1 980	921	2 428	599	1 854	595	2 945	1 968	3 271	1 235
X <sub>9</sub>	20.82	246 939	12 405	98 966	19 484	345 557	33 686	274 096	32 122	109 511	29 796	130 822	12 025
X <sub>10</sub>	22.39	231 345	13 773	0	2 821	12 977	1 210	1 335	0	3 281	753	1 113	0
X <sub>11</sub>	24.11	1 241	0	2 402	8 438	1 203	0	0	0	0	0	0	0
X <sub>12</sub>	28.79	3 140	507	2 653	1 025	4 730	1 402	3 842	1 635	2 847	1 291	2 958	806
X <sub>13</sub>	30.35	387 199	814	43 625	54 199	48 328	0	4 097	3 516	0	0	0	0
X <sub>14</sub>	32.05	0	0	690	460	828	0	667	0	0	435	1 041	369
X <sub>15</sub>	33.20	3 010	2088	1 595	1 473	902	2 296	1 197	1 105	1 472	1 391	2 040	1 350
X <sub>16</sub>	35.34	5717	485	535	748	0	599	0	319	1 394	308	0	315
X <sub>17</sub>	40.28	1 602	0	1 664	970	2 471	1 199	2 005	1 393	1 691	1 838	1 668	693
X <sub>18</sub>	41.71	1 700	0	0	801	1 385	0	497	504	1 010	0	520	1 169

表 2 对 NR8383 细胞系的抑制率 (n=3)

Table 2 Inhibitory rate against NR8383 cell (n=3)

组别	A <sub>570</sub>	抑制率/%
空白对照	0.284 2±0.026 3	
LPS 对照	0.439 4±0.019 8	-54.60±6.98
川赤芍醇提取物	0.363 3±0.026 4	-27.82±9.29**
醇后水提取物	0.373 5±0.021 6	-31.42±7.61**
水提取物	0.359 3±0.027 8	-26.43±9.78**
水后醇提取物	0.362 4±0.032 1	-27.52±11.3**
赤芍醇提取物	0.359 3±0.031 9	-26.43±11.21**
醇后水提取物	0.383 2±0.037 2	-34.83±13.08*
水提取物	0.363 6±0.023 8	-27.95±8.39**
水后醇提取物	0.376 3±0.027 3	-32.42±9.60*
白芍醇提取物	0.374 2±0.034 2	-31.68±12.05*
醇后水提取物	0.395 4±0.027 3	-39.13±9.6
水提取物	0.379 7±0.027 0	-33.59±9.50*
水后醇提取物	0.391 6±0.026 8	-37.81±9.43

与 LPS 对照组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs LPS control group

其中回归系数代表各自变量对因变量的贡献大小,以回归系数进行建模,得回归方程  $Y=0.387 6$

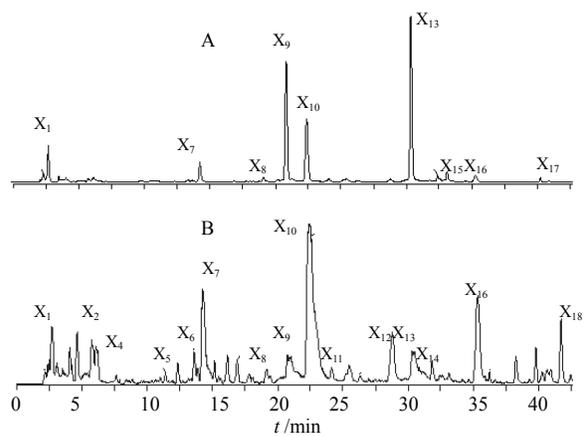


图 1 “功效成分”在 LC (A) 和 MS (B) 图上的位置

Fig. 1 Relative locations of “effective components” in LC (A) and MS (B) chromatograms

$$X_1+0.298 5 X_2+0.225 2 X_3+0.138 0 X_4+0.122 4 X_5+0.447 7 X_6-0.101 5 X_7-0.090 1 X_8+0.263 7 X_9+0.020 2 X_{10}+0.548 8 X_{11}+0.222 8 X_{12}+0.016 3 X_{13}-0.360 5 X_{14}-0.236 1 X_{15}+0.076 4 X_{16}-0.402 1 X_{17}-0.106 8 X_{18}$$

从该方程中可以看出,在此模型中,18 个自变

量对  $Y$  的回归系数有正也有负, 即存在正相关和负相关; 其中  $X_{11}$ 、 $X_6$ 、 $X_1$  (没食子酸)、 $X_2$ 、 $X_9$  (芍药苷)、 $X_3$  这 6 个自变量具有较大的正相关系数, 占正相关系数总和的 75% 以上, 为抑制 NR8383 细胞过度激活的“功效成分组”。见图 1。

各提取物 LC-MS 总离子流图中  $X_{11}$ 、 $X_6$ 、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_9$ 、 $X_3$  这 6 个峰对抑制 NR8383 细胞活化的贡献较大, 即体现了凉血效果较明显。其中  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_9$ 、 $X_3$  4 个峰在川赤芍、赤芍和白芍各提取物中均能检测到, 而  $X_6$ 、 $X_{11}$  仅在川赤芍和赤芍各提取物中检测到。根据药理实验结果显示赤芍和川赤芍各提取物的抑制效果有明显优于白芍各提取物的趋势, 可以推测  $X_6$ 、 $X_{11}$  这两个峰所代表的组分可能是造成这种凉血药效差异的物质基础之一。

### 3 讨论

#### 3.1 实验条件的优化

实验中比较了乙腈-水以及乙腈-0.1%磷酸水的分离效果, 结果发现两种溶剂洗脱系统的分离效果大致相同, 考虑到后续要进行质谱检测, 不能应用无挥发性的酸, 故最终选择乙腈-水作为液相溶剂洗脱系统。在此条件下, 得到了较好的分离效果。由于赤芍中主要的化学成分是单萜及其苷类、酚酮、鞣质等化合物, 这些化合物均有较多的羟基, 容易形成稳定的氧负离子, 所以采用负离子检测方式可以检测到更多的化合物, 总离子流图有较好的信噪比。

#### 3.2 模型的选择及意义

根据温病卫气营血的理论体系, 温病血分证是指温邪深入血分, 引起耗血动血, 瘀热互结所出现的证候<sup>[8]</sup>, 其多发生于多种急性感染性和传染性疾病的危重阶段, 而急性肺损伤是此阶段最易出现的一种并发症。急性肺损伤发病机制复杂, 至今尚未完全阐明。但是, 诸多组织学及病理学研究表明, 早期过度的宿主应答反应和后期免疫细胞的异常凋亡是介导急性肺损伤病理损伤的关键原因<sup>[9-10]</sup>。中医对此则认为热毒深入血分, 迫血妄行是导致进一步血分证其他病变的原始动因, 治疗应首先立足于清热凉血。由此可见, 中医凉血的治法应当与机体的免疫异常密切相关。肺泡巨噬细胞是肺内长期的居留性免疫细胞, 在急性肺损伤的发生、发展及转

归的免疫反应中占有重要地位<sup>[11]</sup>。鉴于此本课题选择大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 细胞炎症损伤模型, 观察赤芍、白芍对 LPS 致 NR8383 细胞活性改变的作用, 并以此体现赤芍凉血作用的一个趋势。

本研究利用偏最小二乘回归法对川赤芍、赤芍、白芍的化学成分与调节 LPS 刺激的 NR8383 细胞过度激活的药效之间的关系进行了谱效分析, 得出了一组“药效相关峰”, 并推测  $X_6$ 、 $X_{11}$  这两个峰所代表的组分可能是造成这种凉血药效差异的物质基础之一。当然, “功效成分组”需最终得到药效验证才具有代表性。本实验的不足之处是未能全部确定“药效相关峰”中的每一个化合物, 不能完全验证此分析方法的正确性。因此, 对“功效成分组”中各峰的指认工作将是本课题后续研究的重点。

致谢: 本课题由北京中医药大学科研创新团队-中药先导化合物发现与开发创新团队项目资助。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 96, 147.
- [2] He X Y, Han L, Huang X S. A new phenolic glucoside from *Paeonia lactiflora* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(2): 84-86.
- [3] 高明, 赵 镭, 赵光树. 白芍和赤芍 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1904-1906.
- [4] 李 强, 周 荣, 杨伟鹏, 等. 赤芍、白芍补血作用比较研究 (I) [J]. *中医药信息*, 2010, 27(6): 11-13.
- [5] 李 强, 周 荣, 杨伟鹏, 等. 赤芍、白芍对环磷酰胺所致的血虚证小鼠补血作用比较研究 [J]. *中医药信息*, 2011, 28(1): 19-21.
- [6] 王云涛, 王莉梅, 金向群. 赤芍的高效液相指纹图谱及液-质联用分析 [J]. *中成药*, 2010, 32(7): 1089-1092.
- [7] 冯 超. 赤芍与白芍的药动学研究及化学成分的液质联用分析 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
- [8] 林培政. 温病学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 21.
- [9] 吕 进, 王希良. 流感病毒感染介导的免疫病理损伤研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(8): 961-967.
- [10] Kitsmura Y, Hashimoto S, Mizuta N, et al. Fas P Fas L-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163( 3Pt1): 762-769.
- [11] 张 伟, 蒋耀光, 李 磊. 肺泡巨噬细胞与急性肺损伤 [J]. *创伤外科杂志*, 2003, 5(5): 389-391.