

两色金鸡菊提取物大剂量给药致小鼠死亡化学成分的研究

王 健¹, 古扎力努尔·艾尔肯², 李琳琳¹, 李新霞², 张 瑞¹, 梁 乐¹, 陶 亮³, 毛新民^{1,4*}

1. 新疆医科大学基础医学院 药理教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054

2. 新疆医科大学 分析测试中心, 新疆 乌鲁木齐 830054

3. 中山大学中山医学院 药理教研室, 广东 广州 510080

4. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

摘要: **目的** 比较两色金鸡菊各种提取物对小鼠的急性毒性作用, 分析对大剂量给药致小鼠死亡贡献最大的成分, 为后期研究提供安全性数据并优化提取工艺。 **方法** 分别测定各提取物对小鼠的最大给药量或最大耐受量 (MTD), 用 Bliss 法测定半数致死量 (LD_{50}), 记录小鼠死亡情况和体质量变化情况; 高效液相色谱 (HPLC) 法测定各提取物指纹图谱, 根据各物质吸收峰, 结合多元线性回归, 分析对大剂量给药致小鼠死亡贡献最大的成分。 **结果** 两色金鸡菊喷雾干燥水提物 (SD)、醋酸乙酯萃取组分 (AR) 最大给药量均为 36 g/kg, 真空干燥水提物 (VD) MTD 为 26 g/kg, 乙醇提取物 (ETE) LD_{50} (95% 可信限) 为 19.565 (17.558~21.734) g/kg, 醋酸乙酯萃取组分 (AC) LD_{50} (95% 可信限) 为 16.414 (13.987~34.725) g/kg; 3,5-二咖啡酰奎宁酸可能是对大剂量给药致小鼠死亡贡献最大的成分。 **结论** ETE 和 AC 大剂量给药会致小鼠死亡, 3,5-二咖啡酰奎宁酸可能是对两色金鸡菊提取物大剂量给药致小鼠死亡贡献最大的成分。

关键词: 两色金鸡菊; 急性毒性; 半数致死量; 最大耐受量; 高效液相指纹图谱; 多元线性回归; 3,5-二咖啡酰奎宁酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)04-0617-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.015

Induction of mice death by toxicity components from large-dose *Coreopsis tinctoria* extract

WANG Jian¹, Gu Zha li nu er·Ai Er ken², LI Lin-lin¹, LI Xin-xia², ZHANG Rui¹, LIANG Le¹, TAO Liang³, MAO Xin-min^{1,4}

1. Department of Pharmacology, Basic Medicine College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

2. Analytical & Testing Center, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

3. Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

4. Affiliated Traditional Chinese Medicine College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract: objective By comparing the acute toxicity of different extracts from *Coreopsis tinctoria* on mice, combined with the HPLC fingerprint and multiple linear regression to analyze the element which plays the most important role in causing the death of mice, and to provide the safety data for improving the extraction technology. **Methods** To measure the maximum dose and maximal tolerance dose (MTD) of all the extracts, to measure the median lethal dose (LD_{50}) by Bliss, and to record the death and weight changes; To measure the fingerprints of the extracts by HPLC, and to determine the element which mostly induced the death of mice by analyzing the absorption peak of the extracts by HPLC fingerprint with multiple linear regression. **Results** The extracts include aqueous extract by spray drying (SD), aqueous extract by vacuum drying (VD) process, ethanol extract (ETE), ethyl acetate extracted component (AC), and the ethyl acetate extracted residuum (AR). Among those extracts, the maximum dose of SD and AR is 36 g/kg, the MTD of the VD is 26 g/kg, the LD_{50} (95% confidence limits) of ETE and AC are 19.565 (17.558—21.734) g/kg and 16.414 (13.987—34.725) g/kg, respectively; Under the high dose situation, 3,5-dicaffeoylquinic acid properly is the component which mostly contributes to the death of mice. **Conclusion** Under the high dose situation, the ETE and AC will lead the death, and 3,5-dicaffeoylquinic acid properly is the component which mostly contributes to the death of mice.

Key words: *Coreopsis tinctoria* Nutt.; acute toxicity; median lethal dose; maximal tolerance dose; HPLC fingerprint; multiple linear regression; 3,5-dicaffeoylquinic acid

收稿日期: 2015-06-24

基金项目: 国家自然科学基金与新疆联合基金重点项目 (U1303223); 新疆创新药物临床前药效学评价技术平台建设 (201233150)

作者简介: 王 健, 硕士研究生, 从事新药研发。Tel: (0991)4362421 E-mail: monashdan@163.com

*通信作者 毛新民, 博士, 教授, 博士生导师, 从事糖尿病病理及新药研究。Tel: (0991)4363822 E-mail: mxm3277@sina.com

两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt. 为菊科 (Compositae) 金鸡菊属 *Coreopsis* L. 一年生草本植物, 原产于美洲, 后分布于世界各地^[1], 在我国主要分布于新疆南疆地区海拔 3 000 m 左右的昆仑山区, 故又称“昆仑雪菊”。当地居民多以两色金鸡菊当茶饮^[2]。研究发现, 两色金鸡菊中含有氨基酸类、多糖类、多酚类、有机酸类、黄酮类、挥发油类等化学成分^[3-9]。现代药理学实验发现其有调节凝血功能、改善血脂、调节血糖、降低血压及抗氧化等活性^[10-11]。目前对两色金鸡菊的研究集中在化学成分提取、分离及药理作用等方面^[2,7,12-14], 通过气相色谱-质谱 (GC-MS) 法从金鸡菊的挥发油中鉴别出 22 种成分, 从黄酮类成分中分离得到黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、查耳酮及异黄酮类化合物。本课题组通过薄层色谱 (TLC) 及高效液相色谱 (HPLC) 法, 指认两色金鸡菊中 8 种成分, 分别为花色苷-3-葡萄糖苷、绿原酸、金鸡菊苷、flavanokanin、黄诺马苷 (flavanomarein)、马里苷、二咖啡酰奎宁酸和奥卡宁^[14-15]。目前未见两色金鸡菊及其提取物的安全性研究报道。

本课题组采用不同工艺对两色金鸡菊进行提取, 得到 5 种提取物, 本研究以 5 种提取物进行小鼠的急性毒性研究, 并结合提取物 HPLC 指纹图谱, 提取各化学成分峰面积, 运用多元线性回归分析, 找出对两色金鸡菊提取物大剂量给药致小鼠死亡贡献最大的成分, 为后期研究提供安全性数据并优化提取工艺。

1 材料

1.1 仪器

AB135-S 分析天平 (Mettler-Toledo 公司); MULTIFUGEX-3R 离心机 (Thermo Fisher 公司); Waters 2690 高效液相色谱仪 (配备 2478 型双波长检测器, 美国 Waters 公司); Milli-Q 超低有机物超纯水机 (Millipore 公司); HGC-12A 氮吹仪 (天津市恒奥科技发展有限公司); MS 3 basic 涡旋混匀仪 (IKA 公司); HH-S4 数显恒温水浴锅 (金坛市医疗仪器厂); 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); PB-10 pH 计 (Sartorius 公司)。

1.2 药品及主要试剂

两色金鸡菊干燥花序, 由乌鲁木齐市三高和药业有限公司提供, 经新疆医科大学药学院胡君萍博士鉴定为两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt. 干燥花序。以水提取, 经喷雾干燥和真空干燥后, 得喷

雾干燥水提物 (spray drying, SD) 和真空干燥水提物 (vacuum drying, VD), 乌鲁木齐市三高和药业有限公司提供; 本课题组专利工艺 (专利号 CN 201210270799) 提取, 冷冻干燥, 得自制乙醇提取物 (ethanol extract, ETE); 以乙醇提取, 浓缩, 醋酸乙酯萃取, 浓缩后喷雾干燥得自制醋酸乙酯萃取组分 (ethyl acetate extracted component, AC), 萃余液喷雾干燥得自制醋酸乙酯萃余组分 (ethyl acetate extracted residuum, AR)。

羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 上海源叶生物科技有限公司); 乙腈、甲醇 (色谱纯, Fisher 公司); 甲酸 (色谱纯, 天津市富宇精细化工有限公司)。

1.3 动物

昆明小鼠, 体质量 (18±2) g, 雌雄各半, 购自新疆疾病预防控制中心实验动物科, 许可证号 SCXK (新) 2011-0003。小鼠进入 SPF 实验室, 分笼、常规饲养, 自由摄食和饮水, 温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h/12 h 明暗交替, 适应性喂养 5 d 后进行急性毒性试验。

2 方法

2.1 急性毒性试验

2.1.1 SD、AR 的最大给药量测定 预试验结果显示, SD 和 AR 组小鼠未出现死亡, 故测定最大给药量。取 34 只小鼠, 雌雄各半, 分成 3 组: 对照组 10 只, SD 和 AR 36 g/kg 剂量组各 12 只。小鼠禁食不禁水 12 h 后, ig 给药 1 次, 给药体积 40 mL/kg (药物质量浓度为 0.9 g/mL), 对照组给予等体积的蒸馏水。观察小鼠给药后进食饮水, 精神状态等, 记录给药前及给药后 7、10、14 d 的小鼠体质量。

2.1.2 VD 最大耐受量 (MTD) 测定 预试验结果显示小鼠出现死亡, 但提取物质量浓度已是最大值, 无法再加大剂量, 且死亡率不足 10% 无法计算半数致死量 (LD₅₀), 故进行 MTD 实验。取 60 只小鼠, 雌雄各半, 按体质量随机分成 5 组: VD 36.00、30.00、26.00、22.12、18.80 g/kg ($r=0.85$) 剂量组 (与 SD 共用对照组)。给药方式及指标观察同“2.1.1”项。

2.1.3 ETE LD₅₀ 测定 预试验显示 ETE 组小鼠出现死亡且数量满足计算 LD₅₀ 条件。取 96 只小鼠, 雌雄各半, 按体质量随机分成 8 组: ETE 36.00、30.00、26.00、22.12、18.80、15.96、13.56、11.56 g/kg ($r=0.85$) 剂量组 (与 SD 共用对照组)。给药方式及指标观察同“2.1.1”项。

2.1.4 AC LD₅₀ 测定 预试验显示 AC 组小鼠出现

死亡且数量满足计算 LD_{50} 条件。取 60 只小鼠，雌雄各半，按体质量随机分成 6 组：对照组，AC 15.96、13.56、11.56、9.84、8.36 g/kg ($r=0.85$) 剂量组。AC 给药方式及指标观察同“2.1.1”项，对照组 ig 同样体积的 0.5% CMC-Na 溶液。

2.2 各提取物 HPLC 指纹图谱分析

供试品溶液配制：分别取 5 种两色金鸡菊提取物各 0.5 g 置 25 mL 量瓶中，加 60%乙醇溶液适量，密塞，超声 30 min，冷却，60%乙醇定容至刻度，摇匀。10 000 r/min 离心 15 min，取上清液 1 mL 于 10 mL 量瓶中，60%乙醇定容至刻度，摇匀，0.22 μ m 微孔滤膜滤过，续滤液为供试品溶液。

色谱条件：Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 35 $^{\circ}$ C；进样量 10 μ L；流动相为 0.5%甲酸溶液 [A, pH 值为 (2.55 $\pm$ 0.05)]-乙腈 (B)，0~60 min，95%~80% A，梯度程序洗脱。

2.3 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 软件包对数据进行处理。体质量数据先进行正态性检验，符合正态分布，组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析。以提取物中各种化学成分峰面积或各成分实际给药量为自变量 (x)，以 15.96 mg/kg 给药剂量时各组动物的死亡率为因变量 (y)，进行多元线性回归 (逐步法)。

3 结果

3.1 急性毒性试验结果

3.1.1 SD 和 AR 最大给药量 给药后无小鼠死亡。给药 8 h 后小鼠活动、精神状态均恢复正常。各时间点体质量与对照组比较差异不显著。结果表明：未见毒性反应，SD 和 AR 小鼠单次 ig 最大给药量为 36 g/kg。

3.1.2 VD MTD 结果 给药后 8 h，36.00、30.00 g/kg

组各有 1 只小鼠死亡，26.00 g/kg 为未出现死亡的最高剂量。除 36.00、30.00 g/kg 组外，其他组给药 12 h 后小鼠活动、精神状态均恢复正常。各时间点体质量与对照组比较差异不显著。结果表明，VD 小鼠单次 ig 给药 MTD 为 26.00 g/kg，按出粉率折算成生药量为 76.5 g/kg，相当于人常用量 (5 g/60 kg) 的 918 倍。

3.1.3 ETE 急性毒性试验结果 ig 给药后不同时间的累计死亡数见图 1，其中 11.56 g/kg 组无死亡。其余剂量组小鼠给予 ETE 后 30 min 出现死亡，所有小鼠死亡都发生在给药后 4 h 内。由表 1 计算得回归方程： $y(\text{Probit})=-4.1048+7.0499\lg D$ ； $LD_{50}=19.565$ g/kg，Feiller 校正的 95%可信限为 17.550~21.734 g/kg； $LD_5=11.433$ g/kg； $LD_{95}=33.482$ g/kg，按出粉率将 LD_0 11.56 g/kg 折算成生药量为 23.12 g/kg，相当于人常用量 5 g/60 kg 的 277.44 倍。ETE 36.00、30.00、26.00、22.12 g/kg 组剩余小鼠不足 6 只，不满足统计要求，故不进行计算；18.80、15.96、13.56 g/kg 剂量组满足统计要求，给药后 7、10、14 d，ETE 18.80、15.96、13.56 g/kg 组与对照组比较体质量减小且差异显著 ($P<0.05$)，结果见表 2。

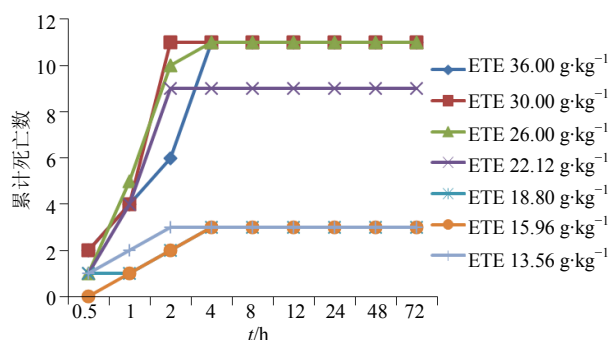


图 1 ETE 各剂量组小鼠时间-累计死亡曲线

Fig 1 Time-cumulative death curves of mice after administration of ETE

表 1 ETE 急性毒性试验结果

Table 1 Acute toxicity of ETE

剂量/(g·kg ⁻¹)	lgD	动物数/只	死亡数/只	死亡率/%	实验机率单位	回归机率单位
36.00	1.556 3	12	11	92.00	6.383 2	6.866 9
30.60	1.485 7	12	11	92.00	6.383 2	6.369 3
26.00	1.415 0	12	11	92.00	6.383 2	5.870 6
22.12	1.344 8	12	9	75.00	5.674 2	5.375 7
18.80	1.274 2	12	3	25.00	4.325 8	4.877 8
15.96	1.203 0	12	3	25.00	4.325 8	4.376 4
13.56	1.132 3	12	3	25.00	4.325 8	3.877 5
11.56	1.063 0	12	0	0.00	—	3.388 9

表 2 ETE 4 个剂量组小鼠质量变化情况

Table 2 Body weight changes of mice in each group after administration of ETE

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g			
		给药前	给药后 7 d	给药后 10 d	给药后 14 d
对照	—	22.90±0.98	29.91±2.00	32.09±2.10	34.02±1.97
ETE	18.80	22.80±1.54	27.53±2.33*	29.54±2.26*	31.29±2.58*
	15.96	23.00±1.21	27.66±2.11*	29.71±2.09*	31.50±2.21*
	13.56	23.02±1.22	27.86±1.96*	29.66±2.23*	31.72±2.35*
	11.56	22.93±1.49	28.21±2.18	30.55±2.38	32.28±2.63

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

3.1.4 AC 急性毒性试验结果 ig 给药后不同时间的累计死亡数见图 2, 其中 8.36 g/kg 组无死亡。其余各剂量组小鼠给予 AC 后 4 h 出现死亡, 所有小鼠死亡都发生在给药后 8 h 内。由表 3 计算得回归方程 $y(\text{Probit}) = -3.283 + 6.816 \lg D$; $LD_{50} = 16.414$ g/kg, Feiller 校正的 95%可信限为 13.987~34.725 g/kg; $LD_5 = 9.416$ g/kg; $LD_{95} = 28.611$ g/kg。按出粉率将 LD_0 8.36 g/kg 折算成生药量为 83.6 g/kg, 相当于人常用量 5 g/60 kg 的 1 003.2 倍。各组同时间体质量均不同程度小于对照组, 但差异不显著, 结果见表 4。

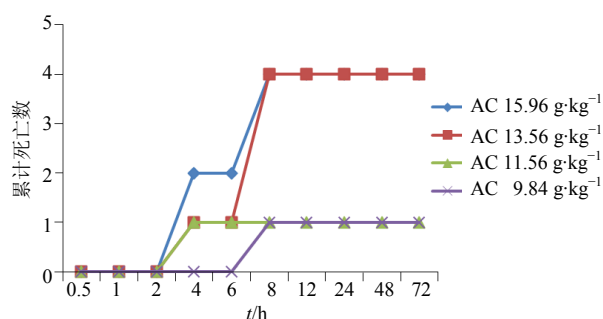


图 2 AC 各剂量组小鼠时间-累计死亡曲线

Fig. 2 Time-cumulative death curves of mice after administration of AC

表 3 AC 急性毒性试验结果

Table 3 Acute toxicity of AC

剂量/(g·kg ⁻¹)	lgD	动物数/只	死亡数/只	死亡率/%	实验机率单位	回归机率单位
15.96	1.204 10	10	4	40.00	4.747 1	4.924 4
13.56	1.133 50	10	4	40.00	4.747 1	4.443 3
11.56	1.063 00	10	1	10.00	3.718 3	3.962 2
9.84	0.993 00	10	1	10.00	3.718 3	3.485 4
8.36	0.922 21	10	0	0.00	—	3.002 9

表 4 AC 各组小鼠体质量变化情况

Table 4 Body weight changes of mice in each group after administration of AC

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g			
		给药前	给药后 7 d	给药后 10 d	给药后 14 d
对照	—	22.98±1.06	29.91±1.93	32.08±1.96	34.04±2.03
AC	15.96	22.85±1.51	28.18±2.36	30.39±2.83	31.96±3.03
	13.56	22.96±1.38	28.71±2.93	30.60±2.86	32.23±3.00
	11.56	22.93±1.22	29.27±2.74	31.53±3.20	33.51±3.67
	9.84	22.97±1.08	29.18±2.68	31.45±2.78	33.26±3.10
	8.36	22.93±1.26	28.84±3.38	31.21±3.08	33.51±3.06

3.2 指纹图谱及化学成分指认

各提取物 HPLC 指纹图谱见图 3, 各提取物主要色谱峰峰面积及相应化合物见表 5, 利用前期课题组建立的以绿原酸为参比的一测多评的方法^[16],

计算出各提取物中绿原酸、黄诺马苷、马里苷和 3,5-二咖啡酰奎宁酸的量见表 6, 按各提取物均能配制的最高质量浓度换算的剂量 15.96 mg/kg 给予小鼠时, 绿原酸、黄诺马苷、马里苷和 3,5-二咖啡酰奎

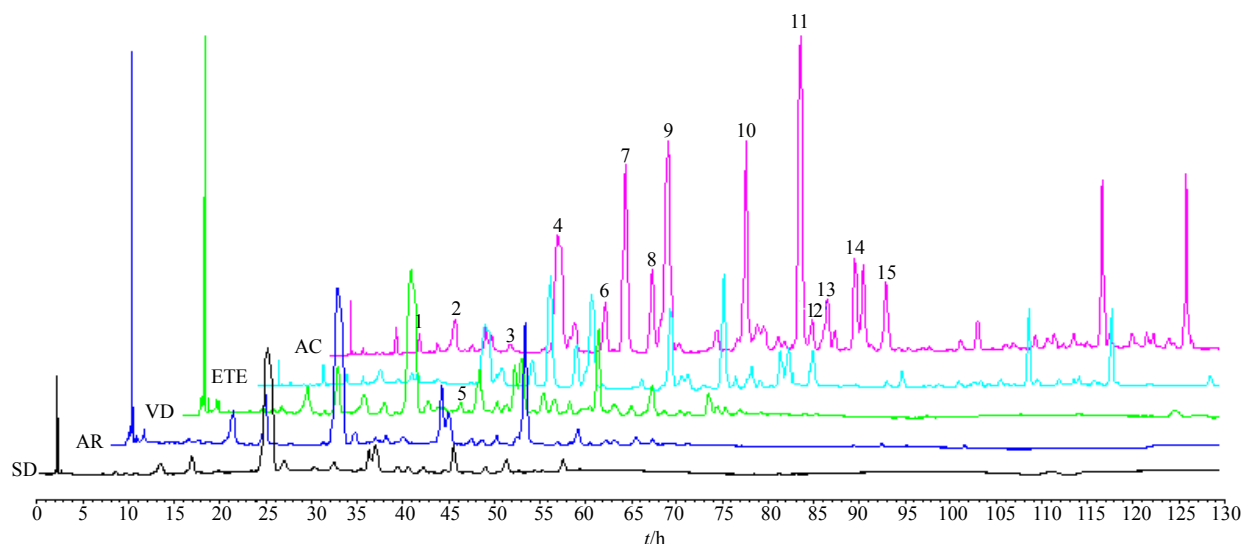


图 3 各提取物 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of each extract from *C. tinctoria*

表 5 各提取物具体化学成分及对应峰面积

Table 5 Chemical constituents in each extract from *C. tinctoria* and their corresponding peak areas

编号	成分	各提取物具体成分峰面积				
		SD	AR	VD	ETE	AC
1	3,4',5,6,7-五羟基黄酮烷-O-葡萄糖苷	1 934 373	2 630 579	5 507 709	6 264 067	2 387 139
2	绿原酸	2 304 447	3 000 558	6 788 571	11 579 991	1 146 939
3	3,3',5,5',7-五羟基黄酮烷-O-葡萄糖苷	0	0	5 571 648	828 118	523 931
4	黄诺马苷	30 833 231	19 233 164	37 850 155	22 206 555	15 202 542
5	flavancorepsin	0	0	1 453 000	0	0
6	flavanokanin	1 938 119	593 939	8 703 694	9 058 393	3 301 262
7	3,4',5,6,7-五羟基黄酮烷	0	0	1 300 175	2 979 181	11 261 127
8	槲皮万寿菊素-7-O-葡萄糖苷	2 250 996	3 303 534	5 517 696	5 360 207	5 779 488
9	3',5,5',7'-四羟基黄酮烷-O-葡萄糖苷	4 159 027	2 627 502	9 316 220	12 352 784	15 863 563
10	马里苷	3 587 539	8 334 587	10 620 693	22 405 617	32 781 155
11	3,5-二咖啡酰奎宁酸	1 658 039	1 218 093	3 911 125	10 290 387	13 839 789
12	奥卡宁橙酮	940 040	0	1 404 812	2 979 191	1 178 637
13	波斯菊苷	162 050	445 181	487 962	1 686 043	3 474 748
14	奥卡宁	1 602 814	501 439	4 192 857	10 226 638	4 197 823
15	3',5,5',7'-四羟基黄酮烷	159 250	386 924	0	5 625 664	3 729 221

表 6 各提取物中绿原酸、黄诺马苷、马里苷和 3,5-二咖啡酰奎宁酸的量

Table 6 Levels of chlorogenic acid, flavanomarein, marein, and 3,5-dicaffeoylquinic acid in each extract from *C. tinctoria*

提取物	绿原酸/(mg·g ⁻¹)	黄诺马苷/(mg·g ⁻¹)	马里苷/(mg·g ⁻¹)	3,5-二咖啡酰奎宁酸/(mg·g ⁻¹)
SD	3.07	29.52	17.52	1.79
AR	4.00	18.41	40.71	1.31
VD	9.05	36.24	51.87	4.22
ETE	15.44	17.65	96.43	10.73
AC	1.53	14.55	160.10	14.93

宁酸的实际给药量见表 7。

3.3 统计学结果

模型 1: 以提取物中各种化学成分峰面积为 x , 以各提取物均能配制的最高质量浓度 15.96 mg/kg 给药时各组动物的死亡率为 y , 进行多元线性回归。结果提示 3,5-二咖啡酰奎宁酸 (峰 11) 可能是对大剂量给药致小鼠死亡贡献最大成分, 差异显著 ($P <$

0.05), 结果见表 8、9。模型 2: 以 15.96 mg/kg 给予小鼠各提取物时, 绿原酸、黄诺马苷、马里苷和 3,5-二咖啡酰奎宁酸的实际给药量为 x , 以 15.96 mg/kg 给药时各组动物的死亡率为 y , 进行多元线性回归。结果也提示 3,5-二咖啡酰奎宁酸可能是对大剂量给药致小鼠死亡贡献最大成分, 差异显著 ($P <$

表 7 按 15.96 mg/kg 剂量给药时各提取物中绿原酸、黄诺马苷、马里苷和 3,5-二咖啡酰奎宁酸的实际给药量
Table 7 Actual dosages of chlorogenic acid, flavanomain, marlein, and 3,5-dicaffeoylquinic acid in each extract from *C. tinctoria* by administration of 15.96 mg/kg

提取物	绿原酸/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	黄诺马苷/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	马里苷/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	3,5-二咖啡酰奎宁酸/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
SD	49.00	471.14	279.62	28.57
AR	63.84	293.82	649.73	20.91
VD	144.44	578.39	827.85	67.35
ETE	246.42	281.69	1 539.02	171.25
AC	24.42	232.22	2 555.20	238.28

表 8 模型 1 预测变量系数
Table 8 Predictor variable coefficients of Model 1

模型 1	非标准化系数		标准系数	t	P 值
	B	标准误差			
常量	-0.071 025 499	0.029 150 809		-2.436 484 634	0.092 790 909
峰 11	$3.251\ 01 \times 10^{-8}$	$3.661\ 27 \times 10^{-9}$	0.981 501 44	8.879 436 564	0.003 011 841

表 9 模型 1 排除变量系数
Table 9 Excluded variable coefficients of Model 1

模型 1	t	P 值	偏相关	共线性统计量 (容差)
1	-2.059 957 599	0.175 583 223	-0.824 416 777	0.952 986 695
2	-1.162 075 808	0.365 129 976	-0.634 870 024	0.973 399 698
3	-3.686 407 045	0.066 346 253	-0.933 653 747	0.990 230 461
4	-2.809 084 832	0.106 806 231	-0.893 193 769	0.695 634 040
5	-3.023 905 292	0.094 168 184	-0.905 831 816	0.948 685 586
6	-3.823 296 469	0.062 105 738	-0.937 894 262	0.875 870 244
7	0.672 229 884	0.570 693 903	0.429 306 097	0.186 033 709
8	-2.066 981 850	0.174 685 821	-0.825 314 179	0.407 855 598
9	-3.256 113 459	0.082 776 748	-0.917 223 252	0.077 898 011
10	-0.669 763 550	0.571 979 988	-0.428 020 012	0.520 852 933
12	-1.115 558 478	0.380 672 433	-0.619 327 567	0.674 841 113
13	1.380 225 926	0.301 545 131	0.698 454 869	0.085 358 625
14	-1.043 309 414	0.406 337 376	-0.593 662 624	0.578 097 339
15	0.131 958 685	0.907 094 685	0.092 905 315	0.268 899 253

表 10 模型 2 预测变量系数
Table 10 Predictor variable coefficients of Model 2

模型 2	非标准化系数		标准系数	t	P 值
	B	标准误差			
常量	-0.071 112 387	0.028 528 672		-2.492 663 77	0.088 276 162
3,5-二咖啡酰奎宁酸	0.030 490 053	0.003 358 563	0.982 281 834	9.078 302 63	0.002 823 608

表 11 模型 2 排除变量系数
Table 11 Excluded variable coefficients of Model 2

模型 2	<i>t</i>	<i>P</i> 值	偏相关	共线性统计量 (容差)
绿原酸	-0.882 258 341	0.470 702 347	-0.529 297 653	0.980 103 664
黄诺马昔	-2.539 682 740	0.126 321 979	-0.873 678 021	0.645 693 783
马里昔	0.424 304 607	0.712 626 926	0.287 373 074	0.056 330 724

4 讨论

由于未见两色金鸡菊受试提取物在人群中使用, 故没有其提取物的临床用量参考值, 本研究通过提取工艺的出粉率将各提取物用量折算成对应的生药量, 将其与人用生药量做比较, 即以成人每日 5 g (人用生药量) 为临床参考用量, 参照《中药新制剂开发与应用》指导原则^[17]: “按体质量计算受试制剂的小鼠 MTD 相当于临床人用剂量的 100 倍以上, 则认为较安全, 可供临床安全应用”。本实验的受试提取物 VD、ETE、AC 的小鼠 MTD 分别为 26、11.56、8.36 g/kg, 折算所得生药量分别为 76.5、23.12、83.6 g/kg, 分别是临床人用生药量的 918、277.44、1 003.2 倍, 均大于临床人用剂量的 100 倍, 认为较安全; 但提取物 VD、ETE、AC 在超过 MTD 给药时出现小鼠死亡, 故通过本研究寻找到导致小鼠死亡或对小鼠死亡贡献最大的成分, 为后期对提取物进行分离和纯化得到高效低毒的提取物提供指导; 后续本课题组还将对提取物口服生物利用度进行研究, 确定提取物中各成分的吸收情况, 以进一步阐明各提取物的安全性。

本实验首先通过提取物中各物质的峰面积与给药时各组动物的死亡率进行多元逐步线性回归, 筛选目标化合物, 再通过各提取物中绿原酸、黄诺马昔、马里昔和 3,5-二咖啡酰奎宁酸的实际给药量与给药时各组动物的死亡率进行多元逐步线性回归, 进一步验证了 3,5-二咖啡酰奎宁酸可能是对大剂量给药致小鼠死亡贡献最大的成分。由于中药提取物化学成分组成十分复杂, 将其中每一个化学成分通过以对照品为参比建立分析方法定量分析的难度很大, 本实验利用课题组前期建立的一测多评的方法, 是一种解决途径; 两色金鸡菊提取物中除了绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎宁酸等有机酸类物质, 大多数为查耳酮类物质和其与葡萄糖形成的葡萄糖苷, 例如 3',5,5',7'-四羟基黄烷酮-*O*-葡萄糖苷和 3',5,5',7'-四羟基黄烷酮, 3,3',5,5',7-五羟基黄烷酮-*O*-葡萄糖苷和 3,4',5,6,7-五羟基黄烷酮, 在使用紫外检测器检测时, 由于苷上链接的葡萄糖是不产生响应信号的,

响应信号均是苷元部分产生的, 可利用苷与苷元的响应信号强度和摩尔质量之间的关系, 在有其中 1 种对照品的情况下同时定量测定苷与苷元的水平, 这可能成为另一种可行的解决途径。

通过本实验发现两色金鸡菊 ETE 中可能存在抑制小鼠体质量增加的物质; ETE 组动物在给药后 0.5 h 开始出现死亡, 毒性反应发生快, 提示致动物死亡的成分可能是较容易吸收的物质。通过多元逐步线性回归, 发现 3,5-二咖啡酰奎宁酸可能是对大剂量给药致小鼠死亡贡献最大的成分, 3,5-二咖啡酰奎宁酸有 5 种同分异构体, 查阅相关文献, 未见对 3,5-二咖啡酰奎宁酸毒性及不良反应的报道, 本结论是建立在数学模型推导的基础上, 还需进一步的实验研究进行确认。

天然产物大多化学成分复杂, 分离纯化单体工作较为冗长, 即使得到单体, 由于混合物中物质间的相互作用, 单体恐无法发挥与混合物相同的效果, 理想状态是得到各个单体后按照天然产物中的比例进行配比, 测定其效果, 但实际操作困难较大, 基于 HPLC 指纹图谱利用多元线性回归的数学模型, 可以建立药效 (毒性) 与物质基础的数学模型, 为天然产物中有效成分或毒性成分的确立提供思路, 并筛选出对其药效 (毒性) 贡献最大的成分, 为大复方的配伍和优化提供理论依据; 同时仍需不断寻找更优、更能反映实际情况的数学模型, 使药效 (毒性)、数学模型、物质基础三者更好的统一。

参考文献

- [1] Smith S M, Deng Z N. Pollen-mediated gene flow from *Coreopsis tinctoria* to *Coreopsis leavenworthii*: inheritance of morphological markers and determination of gene flow rates as affected by separation distances [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2012, 137(3): 173-179.
- [2] 刘伟新, 邓继华, 徐 鸿. 一种金鸡菊花的生药学研究 [J]. *中国民族医药杂志*, 2009, 15(1): 24-25.
- [3] 木合布力·阿布力孜, 张 兰, 张 敏. 昆仑雪菊中氨基酸的含量分析 [J]. *医药导报*, 2011, 30(4): 431-432.
- [4] 张彦丽, 阿布都热合曼·合力力, 阿依吐仑·斯马义. 苯酚-硫酸法测定维吾尔药昆仑雪菊多糖含量的研究 [J].

- 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2205-2207.
- [5] Abdureyim A, Abliz M, Sultan A, *et al.* Phenolic compounds from the flowers of *Coreopsis tinctoria* [J]. *Chem Nat Compd*, 2013, 48(6): 1085-1086.
- [6] 钱宗耀, 周晓龙, 刘河疆, 等. 气相色谱-质谱联用技术分析两色金鸡菊中的脂肪酸 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(7): 293-294.
- [7] 赵 军, 孙玉华, 徐 芳, 等. 昆仑雪菊黄酮类成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(1): 50-52.
- [8] 张彦丽, 韩艳春, 阿依吐仑·斯马义. GC-MS 对昆仑雪菊挥发油成分的研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(11): 1299-1300.
- [9] 木合布力·阿布力孜, 张 燕, 景兆均, 等. 新疆昆仑雪菊化学成分的初步定性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(6): 628-630.
- [10] 明 婷, 庞市宾, 哈木拉提, 等. 金鸡菊提取物对微循环及抗凝血作用的实验研究 [J]. 农垦医学, 2012, 34(1): 17-19.
- [11] 潘 英, 李 宁, 倪 慧, 等. 金鸡菊属植物化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 512-518.
- [12] 李冬明. 昆仑雪菊的药学研究进展 [J]. 浙江中医志, 2012, 47(10): 776-777.
- [13] 郑大成, 阿布力孜木合布力, 吐鲁洪阿依努尔. 昆仑雪菊水溶性黄酮的制备及初步鉴定 [J]. 亚太传统医药, 2010, 6(10): 18-20.
- [14] 古扎丽努尔·艾尔肯. 两色金鸡菊药材质量标准建立及黄酮提取物质量分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2013.
- [15] 张 瑞, 李新霞, 毛新民, 等. HPLC 法测定两色金鸡菊提取物中 flavanomorein 和 marein 的含量 [J]. 安徽农业科学 2015, 43(6): 3-74.
- [16] 张 瑞. 两色金鸡菊黄酮提取物工艺及化学成分分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015.
- [17] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.