

续断“发汗”前后 HPLC 指纹图谱与细胞增殖分化药效的谱效关系研究

杨莹^{1,3}, 康显杰², 杜伟锋^{2*}, 来平凡¹, 葛卫红²

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学 中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 311401

3. 浙江中医药大学附属广兴医院, 浙江 杭州 310007

摘要: 目的 研究续断“发汗”前后水煎液 HPLC 指纹图谱与促进大鼠成骨细胞、人成骨样 MG-63 细胞增殖药效的谱效关系, 寻找续断发汗前后发挥药效的物质基础, 为明确“发汗”对药效的影响提供依据。方法 采用 DAD 检测器建立续断“发汗”前后水煎液的 HPLC 指纹图谱, 采用灰色关联度分析法建立其谱效关系。结果 14 和 4 号峰代表的化学成分与成骨细胞的增殖分化及 MG-63 细胞的增殖都具有较高的关联度, 关联度均在 0.7 以上。与成骨细胞增殖、MG-63 细胞增殖、碱性磷酸酶 (ALP) 活性 3 个药效指标关联度排序比较靠前的特征峰有 14、4、6、16、13、11、5 号峰。结合前期研究推断, 这些峰可能为川续断皂苷 VI、绿原酸、马钱苷、川续断皂苷 IV 同分异构体、川续断皂苷 X、异绿原酸 C、咖啡酸。结论 川续断皂苷 VI、绿原酸、马钱苷、川续断皂苷 IV 同分异构体、川续断皂苷 X、异绿原酸 C、咖啡酸可能是续断“发汗”前后影响细胞增殖分化作用的主要物质基础, 进而影响其药效。

关键词: 发汗; 灰色关联度分析; 谱效关系; 细胞增殖; 细胞分化; 川续断皂苷 VI; 绿原酸; 马钱苷; 川续断皂苷 IV 同分异构体; 川续断皂苷 X; 异绿原酸 C; 咖啡酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)16-3909-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.025

Spectral-effect relationship between HPLC fingerprint and cell proliferation and differentiation of crude and sweated *Dipsaci Radix*YANG Ying^{1,3}, KANG Xian-jie², DU Wei-feng², LAI Ping-fan¹, GE Wei-hong²

1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China

3. Guangxing Hospital Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China

Abstract: **Objective** To study the spectrum-effect relationships of fingerprints of sweated and crude *Dipsaci Radix* on cell proliferation and differentiation, and find out the material basis of efficacy before and after sweating in order to provide the basis for the impact of the efficacy. **Methods** The DAD detector was used to establish HPLC fingerprints of sweated and crude *Dipsaci Radix*, and the relationship between the spectrum and efficiency was established by gray relational analysis. **Results** The chemical composition of peaks 14 and 4 were highly correlated with the proliferation and differentiation of osteoblasts and the proliferation of MG-63 cells. The correlations were all above 0.7. The three pharmacophore indicators associated much with the characteristic peaks 14, 4, 6, 16, 13, 11, and 5. Combined with the previous analysis, these peaks represented respectively asperosaponin VI, chlorogenic acid, loganin, asperosaponin IV isomers, dipsacoside X, chlorogenic acid C, and caffeic acid. **Conclusion** Asperosaponin VI, chlorogenic acid, loganin, asperosaponin IV isomers, dipsacoside X, chlorogenic acid C, and caffeic acid may be the main material basis for the effect of cell proliferation and differentiation, thus affecting its efficacy.

Key words: sweating; gray correlation analysis; spectrum-effect relationship; cell proliferation; cell differentiation; asperosaponin VI; chlorogenic acid; loganin; asperosaponin IV isomers; dipsacoside X; chlorogenic acid C; caffeic acid

收稿日期: 2018-12-13

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81303224); 浙江中医药大学科研基金项目-2018 国家自然科学基金预研项目(2018ZG34); 中华中医药学会青年人才托举工程项目(QNRC2-C12); 浙江省药品监督管理局委托的中药材产地加工项目

作者简介: 杨莹(1993—), 女, 浙江杭州人, 硕士研究生, 从事中药资源开发利用及品质评价研究。E-mail: nazhidongxi@163.com

*通信作者 杜伟锋(1984—), 男, 河北任县人, 副研究员, 从事中药炮制及质量控制研究。Tel: (0571)87195895 E-mail: duweifeng_200158@sohu.com

续断又名接骨、属折，是川续断科多年生草本植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的根^[1]，具有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏的作用。《本草汇言》^[2]载：“续断，补续血脉之药也。大抵所断之血脉非此不续，所伤之筋骨非此不养，所滞之关节非此不利……”。现代药理研究结果显示，续断具有抗菌消炎、增强免疫、防氧化、抗衰老、促骨形成、心肌保护等多重功效，尤其是对跌打损伤、关节疼痛患者具有良好的治疗效果^[3-4]。续断传统的加工采收方法为秋季采挖，除去根头和须根，用微火烘至半干，堆置“发汗”至内部变绿色时，再烘干。相关研究发现，续断经产地加工“发汗”后，其主要化学成分的含量均发生改变，而“发汗”造成的成分改变是否影响其药效尚缺乏有力证据，同时药材有无必要“发汗”尚不明确^[5-10]。

中药谱效关系分析是指将中药化学成分与药效学研究结合起来，采用统计学方法将二者进行关联分析，科学地阐述其化学成分与疗效的关系^[11-13]。中药指纹图谱指通过对中药材或中成药进行适当处理，采用一定的分析方法，得到能够标志该中药材或中成药特征的色谱或光谱的图谱，旨在通过这一技术反映具有复杂成分的中药材及复方制剂内在质量的均一性及稳定性^[14]，但是并没有与中药的药效建立直接的内在联系^[15]，即不能用化学计量学相似度来评判中药质量的好坏。因此，要控制中药药效的质量，就必须建立“谱效”之间的联系。

本实验选取续断的主要功效“续折伤”，采用 DAD 检测器建立 HPLC 指纹图谱，利用灰色关联度分析法研究续断“发汗”前后化学成分与其对人成骨样细胞 MG-63、幼鼠成骨细胞增殖分化的药效结果的关联性，为寻找续断“发汗”前后发挥药效的物质基础提供依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

新生 SD 大鼠，清洁级，浙江中医药大学动物实验中心提供，合格证号 SCXK（沪）2013-0016；人成骨样 MG-63 细胞株，为具有人成骨细胞表型特征的成骨细胞模型，购于中国科学院上海细胞所。传代培养，于 -80 ℃ 冻存。

1.2 仪器

1200 型系列高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；CO₂ 培养箱（Thermo Fisher 公司）；Nikon TS100 型倒置相差显微镜（Nikon 公司）；ELX2800 型酶标

测试仪（美国索林公司）；恒温离心机（凯达科学仪器有限公司）；Nikon 光学显微镜（Nikon 公司）；形态计量分析软件（Silicon Graphic 公司）。

1.3 药材

续断样品采自四川西昌，经浙江中医药大学来平凡教授鉴定为川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根。未发汗样品为续断经采集后于 80 ℃ 条件下烘干而成，发汗样品为续断采集后采用《中国药典》2015 年版方法，经产地“发汗”加工后而成。

1.4 试剂

对照品马钱苷酸（批号 111865-201102，质量分数 93.8%）、绿原酸（批号 110753-201314，质量分数 96.6%）、咖啡酸（批号 110885-200102，质量分数 100.0%）、马钱苷（批号 111640-201005，质量分数 99.2%）、川续断皂苷 VI（批号 111685-201003，质量分数 93.5%），购自中国食品药品检定研究院；异绿原酸 A（批号 14022612，质量分数 98%）、异绿原酸 B（批号 14041411，质量分数 98%）、异绿原酸 C（批号 14041414，质量分数 98%），购自成都曼思特生物技术有限公司。DMEM 培养基（Gibico 公司）；小牛血清（杭州四季青生物公司）；II 型胶原酶（Sigma 公司）；胰蛋白酶（Hyclone 公司）；二甲基噻唑二苯基四氮唑溴盐（Sigma 公司）；对硝基苯磷酸二钠盐（PNPP，德国 Merck 公司）；苯甲酸雌二醇（武汉大华伟业医药化工有限公司）。

2 方法

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 供试品溶液的制备 将适量“发汗”或“未发汗”样品粉末加入 8 倍量的蒸馏水，回流提取，减压浓缩至一定体积。置于 50 mL 量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀，精密吸取 1 mL，置于蒸发皿中蒸干，加甲醇溶解，置于 10 mL 量瓶中并定容，摇匀，即得。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取对照品马钱苷酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、川续断皂苷 VI、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 各 40.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入甲醇至刻度，摇匀，制成 4 mg/mL 的对照品溶液。再精密吸取 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，加入甲醇至刻度，摇匀，即得各对照品质量浓度为 0.40 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）-0.05%

磷酸水溶液(B),柱温 30 ℃,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 212 nm,洗脱程序 0 min, 2% A; 0~5 min, 2%~6% A; 5~18 min, 6%~10% A; 18~40 min, 10%~20% A; 40~70 min, 20%~25% A; 70~80 min, 25%~35% A; 80~90 min, 35%~60% A; 90~110 min, 60%~70% A; 110~120 min, 70% A; 进样量 10 μL。

2.1.4 方法学考察 空白溶剂的 2 h 色谱图中未发现有干扰。考察了精密度、重复性、稳定性,结果相似度均在 0.990 以上,RSD 值均小于 5%。说明该指纹图谱方法的精密度、重复性、稳定性良好。空白溶液、对照品和样品色谱图见图 1。

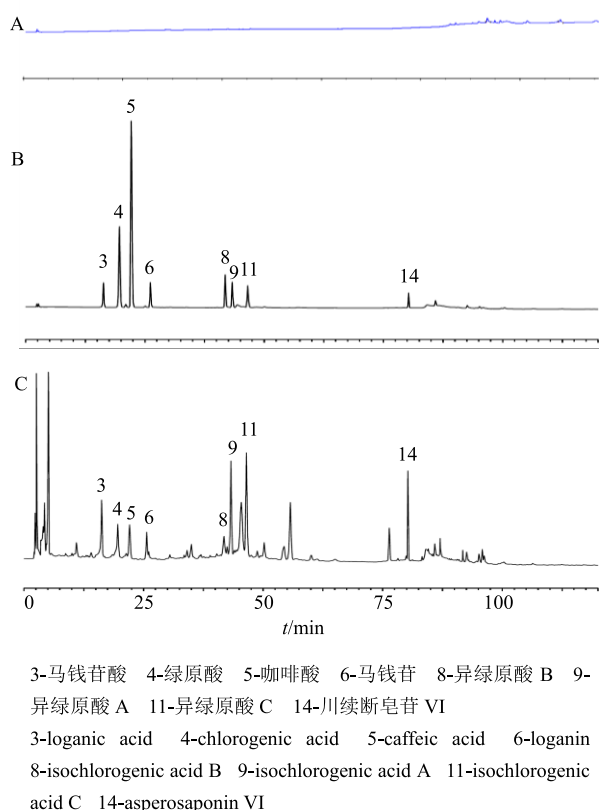


图 1 空白溶剂 (A)、对照品溶液 (B) 和样品 (C, “未发汗”续断低剂量组) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of blank solution (A), reference substance (B) and sample (C, low dose group of crude *Dipsaci Radix*)

2.2 细胞药效实验

2.2.1 药物的制备 取“2.1.1”项下浓缩得到的供试品溶液用蒸馏水定容,配制成质量浓度为 1 g/mL 的药液。用 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,待用。用时“未发汗”组和“发汗”组分别用 DMEM 配成终质量浓度为 50、100、200 mg/mL 的溶液。

2.2.2 续断“发汗”前后对细胞增殖的影响 取新

生 SD 大鼠成骨细胞^[16]和 MG-63 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔培养板中,每板加细胞液 100 μL,培养箱中放置 2 h,分为对照组和续断“发汗”和“未发汗”低、中、高剂量 (50、100、200 mg/mL) 组,每板加药液 100 μL,置 5% CO₂ 培养箱、37 ℃ 下培养。44 h 后取出 96 孔培养板,吸取细胞上清液 100 μL,加入 20 μL 5 g/L 的 MTT 显色剂,置 5% CO₂ 培养箱、37 ℃ 下培养 4 h。48 h 后取出 96 孔培养板,吸弃上清液,用 100 μL DMSO 溶解,振摇,用酶标仪 490 nm 测定吸光度 (A) 值。

2.2.3 续断发汗前后对细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性的影响 大鼠成骨细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔培养板中,每板加细胞液 500 μL,培养箱放置 2 h,分组同“2.2.2”项下,每板加入药液 200 μL,置 5% CO₂ 培养箱、37 ℃ 下培养 72 h。72 h 后取出 24 孔板,用对硝基苯磷酸盐法在酶标仪上 420 nm 处测 A 值,比较药物对大鼠成骨细胞 ALP 活性的影响。

2.3 灰色关联度分析

2.3.1 细胞增殖、分化的药效指标 R 值 为了将药效结果量化,进而能与 HPLC 图谱相结合,分析两者的关系,将大鼠成骨细胞增殖、MG-63 细胞增殖、大鼠成骨细胞 ALP 活性结果^[16]中对照组的药效值定为 100%,各给药组药效值依此量化,得到 R ($R = A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$)。

2.3.2 原数据变换 根据续断“发汗”前后不同剂量组的 HPLC 图谱 16 个共有峰峰面积数据,列出了续断发汗前后不同剂量组的药效 R 值,前者为子序列,后者为母序列。子序列和母序列存在测度不一致的问题,在此采用均值化对原数据进行规格化处理,公式如下。

$$Y_{ik} = X_{ik} / X_k$$

Y_{ik} 为变换后的数据, X_{ik} 为原始数据, X_k 为第 k 列数据的均值

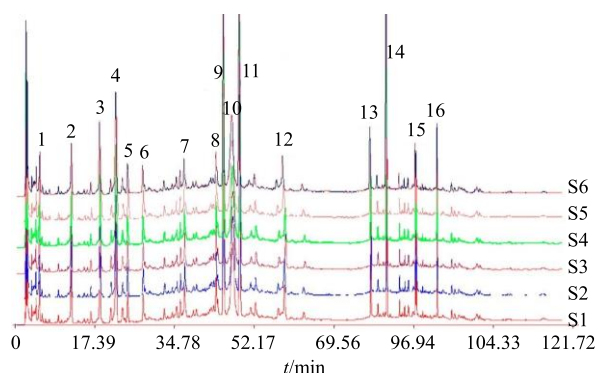
2.3.3 计算关联系数和关联度 计算续断“发汗”前后不同剂量组水煎液 HPLC-DAD 图谱与细胞增殖分化 3 个药效指标之间的关联系数和关联度。

2.3.4 关联度排序 计算续断“发汗”前后水煎液 HPLC-DAD 图谱与细胞增殖分化药效指标之间的关联度排序。

3 结果

3.1 HPLC-DAD 指纹图谱及共有峰

续断“发汗”前后不同剂量组的 HPLC-DAD 图谱中共有峰为 35 个,见图 2,根据峰面积大小筛选出其中 16 个主要共有特征峰,占总峰面积的 95%



3-马钱苷酸 4-绿原酸 5-咖啡酸 6-马钱苷 8-异绿原酸 B 9-异绿原酸 A 11-异绿原酸 C 14-川续断皂苷 VI S1~S3-“未发汗”续断低、中、高剂量组 S4~S6-“发汗”续断低、中、高剂量组
3-loganic acid 4-chlorogenic acid 5-caffeic acid 6-loganin 8-isochlorogenic acid B 9-isochlorogenic acid A 11-isochlorogenic acid C 14-asperosaponin VI S1—S3-low, medium, and high dose groups of crude *Dipsaci Radix* respectively S4—S6-low, medium and high dose groups of sweated *Dipsaci Radix* respectively

图 2 续断发汗前后 HPLC-DAD 指纹图谱

Fig. 2 HPLC-DAD fingerprints of sweated and crude *Dipsaci Radix*

以上。16 个共有峰的峰面积见表 1。

3.2 细胞增殖、分化的药效指标 R 值

为了将药效结果量化,进而能与 HPLC 图谱相结合,分析两者的关系。对于大鼠成骨细胞增殖、MG-63 细胞增殖、成骨细胞 ALP 活性,将对照组的药效值定位 100%,其他的药效值依次量化,见表 2。

3.3 原数据变换

根据“2.3.2”项下原始数据变换方法,得到续断“发汗”前后药效作用的 R 值均值化数据和 HPLC-DAD 图谱 16 个色谱峰面积均值化数据。结果见表 3、4。

3.4 关联系数和关联度

计算续断“发汗”前后不同剂量组水煎液 HPLC-DAD 图谱与细胞增殖分化 3 个药效指标之间的关联系数和关联度,见表 5~7。

3.5 关联度排序

对续断“发汗”前后水煎液 HPLC-DAD 图谱与细胞增殖分化药效指标间的关联度进行排序,见表 8。

表 1 续断“发汗”前后不同剂量组 HPLC-DAD 指纹图谱共有峰面积

Table 1 HPLC-DAD fingerprints common peaks of sweated and crude *Dipsaci Radix* for different doses

峰号	“未发汗”续断			“发汗”续断		
	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹
1	84.96	186.92	336.46	71.31	135.49	284.54
2	84.85	186.67	336.00	72.59	137.92	289.62
3	448.13	985.89	1 774.60	414.58	787.71	1 654.19
4	753.08	1 656.77	2 982.19	420.43	798.81	1 677.51
5	94.94	208.88	375.98	128.01	243.22	510.77
6	91.97	202.34	364.21	39.00	74.11	155.63
7	62.32	137.10	246.78	59.78	113.59	238.54
8	198.60	436.92	786.45	248.93	472.96	993.22
9	718.03	1 579.66	2 843.40	613.64	1 165.92	2 448.43
10	640.07	1 408.14	2 534.66	594.20	1 128.98	2 370.86
11	712.19	1 566.82	2 820.28	769.42	1 461.90	3 070.00
12	124.67	274.27	493.68	157.23	298.74	627.36
13	130.34	286.74	516.13	125.25	237.97	499.73
14	2 656.39	5 844.06	10 519.30	615.81	1 170.05	2 457.10
15	48.98	107.76	193.97	36.98	70.26	147.56
16	73.31	161.29	290.32	70.99	134.87	283.23

表 2 续断“发汗”前后药效作用的 R 值

Table 2 R value of pharmacodynamic effect for sweated and crude *Dipsaci Radix*

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	R 值		
		成骨细胞增殖	MG-63 细胞增殖	ALP 活性
“未发汗”续断	50	152.45	154.96	160.00
	100	172.73	174.58	172.95
	200	188.81	201.69	179.05
“发汗”续断	50	143.12	145.52	152.37
	100	149.42	153.75	168.12
	200	180.65	183.54	173.40

表 3 续断“发汗”前后药效作用的 R 值均值化数据

Table 3 Averaged R of pharmacodynamic effect for sweated and crude *Dipsaci Radix*

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	成骨细胞增殖	MG-63 细胞增殖	ALP 活性
“未发汗”续断	50	0.926 6	0.916 9	0.954 4
	100	1.049 8	1.032 9	1.031 6
	200	1.147 6	1.193 4	1.068 0
“发汗”续断	50	0.869 9	0.861 0	0.908 9
	100	0.908 1	0.909 7	1.002 8
	200	1.098 0	1.085 9	1.034 3

表 4 续断“发汗”前后 HPLC-DAD 图谱 16 个色谱峰面积均值化

Table 4 Average of 16 HPLC-DAD peak area for sweated and crude *Dipsaci Radix*

峰号	“未发汗”续断			“发汗”续断		
	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹
1	0.463 6	1.019 9	1.835 8	0.389 1	0.739 3	1.552 5
2	0.459 6	1.011 2	1.820 1	0.393 2	0.747 1	1.568 8
3	0.443 3	0.975 3	1.755 6	0.410 1	0.779 3	1.636 4
4	0.545 1	1.199 3	2.158 7	0.304 3	0.578 2	1.214 3
5	0.364 7	0.802 4	1.444 4	0.491 8	0.934 4	1.962 2
6	0.595 1	1.309 3	2.356 8	0.252 4	0.479 5	1.007 0
7	0.435 7	0.958 6	1.725 5	0.418 0	0.794 2	1.667 9
8	0.379 8	0.835 7	1.504 2	0.476 1	0.904 6	1.899 7
9	0.459 8	1.011 6	1.820 9	0.393 0	0.746 7	1.568 0
10	0.442 6	0.973 7	1.752 7	0.410 9	0.780 7	1.639 4
11	0.410 9	0.903 9	1.627 0	0.443 9	0.843 4	1.771 0
12	0.378 5	0.832 8	1.499 1	0.477 4	0.907 1	1.905 0
13	0.435 4	0.957 8	1.724 1	0.418 4	0.794 9	1.669 3
14	0.685 1	1.507 3	2.713 2	0.158 8	0.301 8	0.633 7
15	0.485 4	1.067 8	1.922 0	0.366 4	0.696 2	1.462 1
16	0.433 8	0.954 4	1.717 9	0.420 0	0.798 1	1.675 9

表 5 续断“发汗”前后 HPLC-DAD 图谱与大鼠成骨细胞增殖药效指标之间的关联系数和关联度

Table 5 Correlation coefficient and correlation of HPLC-DAD and osteoblast proliferation for sweated and crude *Dipsaci Radix*

峰号	“未发汗”续断关联系数			“发汗”续断关联系数			关联度
	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	
1	0.463 4	1.000 0	0.362 3	0.453 4	0.729 2	0.468 4	0.579 4
2	0.466 7	1.000 0	0.371 6	0.461 1	0.753 9	0.464 5	0.586 3
3	0.480 7	1.000 0	0.415 0	0.495 5	0.874 4	0.449 3	0.619 2
4	0.701 1	0.949 3	0.410 0	0.580 6	0.744 4	1.000 0	0.730 9
5	0.461 2	0.674 7	0.628 9	0.565 8	1.000 0	0.353 6	0.614 0
6	0.743 1	0.804 9	0.383 5	0.569 1	0.673 2	1.000 0	0.695 6
7	0.487 5	1.000 0	0.438 5	0.513 1	0.943 6	0.442 6	0.637 6
8	0.426 7	0.657 5	0.533 8	0.508 8	1.000 0	0.336 2	0.577 2
9	0.466 5	1.000 0	0.371 1	0.460 7	0.752 5	0.464 7	0.585 9
10	0.481 4	1.000 0	0.417 2	0.497 2	0.880 6	0.448 6	0.620 8
11	0.470 8	0.831 7	0.491 8	0.526 2	1.000 0	0.397 5	0.619 7
12	0.425 1	0.651 9	0.535 8	0.508 1	1.000 0	0.334 1	0.575 8
13	0.487 8	1.000 0	0.439 7	0.514 0	0.947 2	0.442 3	0.638 5
14	1.000 0	0.825 8	0.436 2	0.685 6	0.737 3	0.821 3	0.751 0
15	0.489 1	1.000 0	0.348 8	0.454 9	0.676 4	0.539 3	0.584 8
16	0.491 7	1.000 0	0.447 3	0.520 2	0.963 3	0.443 4	0.644 3

表 6 续断“发汗”前后 HPLC-DAD 图谱与 MG-63 细胞增殖药效指标之间的关联系数和关联度

Table 6 Correlation coefficient and correlation of HPLC-DAD and MG-63 cells proliferation for sweated and crude *Dipsaci Radix*

峰号	“未发汗”续断关联系数			“发汗”续断关联系数			关联度
	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	
1	0.431 5	1.000 0	0.346 9	0.421 4	0.679 8	0.424 3	0.550 6
2	0.434 8	1.000 0	0.356 5	0.429 0	0.704 0	0.420 8	0.557 5
3	0.448 8	1.000 0	0.401 6	0.462 7	0.823 0	0.407 2	0.590 6
4	0.715 2	0.941 5	0.422 0	0.587 9	0.750 6	1.000 0	0.736 2
5	0.467 4	0.692 3	0.671 6	0.573 3	1.000 0	0.352 1	0.626 1
6	0.731 1	0.769 8	0.378 5	0.554 9	0.652 8	1.000 0	0.681 2
7	0.473 0	1.000 0	0.443 8	0.497 6	0.898 6	0.418 4	0.621 9
8	0.436 5	0.682 0	0.574 1	0.520 3	1.000 0	0.337 5	0.591 7
9	0.434 6	1.000 0	0.355 9	0.428 6	0.702 7	0.421 0	0.557 1
10	0.449 4	1.000 0	0.403 9	0.464 3	0.829 1	0.406 7	0.592 2
11	0.481 9	0.867 1	0.526 8	0.538 3	1.000 0	0.397 9	0.635 3
12	0.434 8	0.676 0	0.576 2	0.519 6	1.000 0	0.335 4	0.590 3
13	0.474 3	1.000 0	0.446 0	0.499 5	0.902 3	0.419 1	0.623 5
14	1.000 0	0.803 4	0.435 0	0.678 3	0.725 0	0.818 2	0.743 3
15	0.501 6	1.000 0	0.365 3	0.464 8	0.690 9	0.539 1	0.593 6
16	0.480 0	1.000 0	0.455 8	0.507 5	0.918 5	0.422 0	0.630 7

表 7 续断“发汗”前后 HPLC-DAD 图谱与成骨细胞 ALP 活性药效指标之间的关联系数和关联度

Table 7 Correlation coefficient and correlation of HPLC-DAD and osteoblast ALP activity for sweated and crude *Dipsaci Radix*

峰号	“未发汗”续断关联系数			“发汗”续断关联系数			关联度
	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹	200 mg·mL ⁻¹	
1	0.452 3	1.000 0	0.343 5	0.437 8	0.611 1	0.438 6	0.547 2
2	0.455 3	1.000 0	0.351 5	0.444 6	0.627 6	0.435 4	0.552 4
3	0.468 0	1.000 0	0.387 9	0.474 8	0.705 2	0.422 9	0.576 5
4	0.746 9	1.000 0	0.435 8	0.620 1	0.735 2	0.983 0	0.753 5
5	0.505 3	0.768 1	0.633 5	0.604 2	1.000 0	0.382 5	0.648 9
6	0.669 2	0.728 4	0.347 4	0.516 3	0.575 2	1.000 0	0.639 4
7	0.474 1	1.000 0	0.407 3	0.490 1	0.747 6	0.417 5	0.589 4
8	0.527 1	0.844 5	0.611 0	0.613 4	1.000 0	0.409 0	0.667 5
9	0.455 1	1.000 0	0.351 0	0.444 2	0.626 7	0.435 6	0.552 1
10	0.468 6	1.000 0	0.389 7	0.476 3	0.709 0	0.422 4	0.577 7
11	0.544 0	1.000 0	0.535 0	0.595 3	0.939 9	0.448 9	0.677 2
12	0.525 1	0.837 4	0.612 9	0.612 6	1.000 0	0.406 6	0.665 8
13	0.474 4	1.000 0	0.408 3	0.490 9	0.749 8	0.417 2	0.590 1
14	1.000 0	0.841 0	0.442 4	0.694 3	0.716 6	0.892 7	0.764 5
15	0.516 9	1.000 0	0.361 6	0.477 8	0.631 4	0.541 9	0.588 3
16	0.475 6	1.000 0	0.412 5	0.494 2	0.759 2	0.416 1	0.592 9

表 8 续断“发汗”前后 HPLC-DAD 图谱与细胞增殖分化药效指标之间的关联度排序

Table 8 Correlation ranking of HPLC-DAD and cell proliferation and differentiation for sweated and crude *Dipsaci Radix*

关联度 排序	成骨细胞增殖		MG-63 细胞增殖		ALP 活性	
	特征峰号	关联度	特征峰号	关联度	特征峰号	关联度
1	14	0.751 0	14	0.743 3	14	0.764 5
2	4	0.730 9	4	0.736 2	4	0.753 5
3	6	0.695 6	6	0.681 2	11	0.677 2
4	16	0.644 3	11	0.635 3	8	0.667 5
5	13	0.638 5	16	0.630 7	12	0.665 8
6	7	0.637 6	5	0.626 1	5	0.648 9
7	10	0.620 8	13	0.623 5	6	0.639 4
8	11	0.619 7	7	0.621 9	16	0.592 9
9	3	0.619 2	15	0.593 6	13	0.590 1
10	5	0.614 0	10	0.592 2	7	0.589 4
11	2	0.586 3	8	0.591 7	15	0.588 3
12	9	0.585 9	3	0.590 6	10	0.577 7
13	15	0.584 8	12	0.590 3	3	0.576 5
14	1	0.579 4	2	0.557 5	2	0.552 4
15	8	0.577 2	9	0.557 1	9	0.552 1
16	12	0.575 8	1	0.550 6	1	0.547 2

研究结果表明, 14 和 4 号峰的化学成分与 3 个药效指标都具有较高的关联度, 关联度均在 0.7 以上。依据关联度的大小, 确定各成分对大鼠成骨细胞增殖贡献大小顺序为 14 号峰>4 号峰>6 号峰>16 号峰>13 号峰>7 号峰>10 号峰>11 号峰>3 号峰>5 号峰>2 号峰>9 号峰>15 号峰>1 号峰>8 号峰>12 号峰; 各成分对 MG-63 细胞增殖贡献大小顺序为 14 号峰>4 号峰>6 号峰>11 号峰>16 号峰>5 号峰>13 号峰>7 号峰>15 号峰>10 号峰>8 号峰>3 号峰>12 号峰>2 号峰>9 号峰>1 号峰; 各成分对成骨细胞 ALP 活性贡献大小顺序为 14 号峰>4 号峰>11 号峰>8 号峰>12 号峰>5 号峰>6 号峰>16 号峰>13 号峰>7 号峰>15 号峰>10 号峰>3 号峰>2 号峰>9 号峰>1 号峰。这 3 个药效指标关联度排序比较靠前的特征峰有 14、4、6、16、13、11、5 号峰。结合本项目组前期分析推断, 这些峰可能为川续断皂苷 VI、绿原酸、马钱苷、川续断皂苷 IV 同分异构体、川续断皂苷 X、异绿原酸 C、咖啡酸, 这些成分可能是作为续断“发汗”前后发挥细胞增殖分化药效的主要物质基础^[17]。

4 讨论

中药质量控制和评价是制约中药现代化发展的关键科学问题之一, 也一直是中医药研究的难点和热点^[18]。中药为多组分复杂体系, 其疗效的发挥为

多成分、多靶点、多途径协同作用的结果, 单一或几个化学成分的定量检测难以全面评价中药质量优劣^[19]。现有评价中药材质量的方法有指纹图谱、谱效关系、一测多评等^[20]。其中, 中药指纹图谱能够标示中药中的多种化学成分, 其能够表征中药的整体特征性, 然而中药指纹图谱所体现的化学成分与药效指标无直接关联。因此, 近年来研究人员开始将化学指纹图谱与中药药效相关联, 通过谱效关系深入研究与药效相关的指纹峰或成分群, 阐明中药药效物质基础, 以建立能反映中药内在质量的药效指纹图谱^[14-15,21-22]。

课题组前期研究了续断发汗前后主要成分的变化情况以及对人成骨样 MG-63 细胞、幼鼠成骨细胞增殖的影响^[16-17,23]。化学研究表明, 续断“发汗”后, 川续断皂苷 VI 和绿原酸的含量均显著降低, 马钱苷的含量略有降低, 咖啡酸、异绿原酸 C、川续断皂苷 IV 同分异构体、川续断皂苷 X 的含量略升高; 药理研究表明, 续断“发汗”组均较“未发汗”组药理活性降低。本实验对续断“发汗”前后指纹图谱与对细胞增殖分化药效的关联性研究。通过灰色关联度分析法对指纹图谱共有峰封面和药效数据分析, 结果表明 16 个共有峰所代表的化学成分与大鼠成骨细胞、MG-63 细胞增殖分化药效的关联度均大于 0.5, 即续断发挥药效与这 16 个化学成分

均有关联。其中, 14 和 4 号峰所代表的化学成分与药效关联度大于 0.7, 此外 6、16、13、11、5 号峰与 3 个药效指标的关联度排序较靠前。灰色关联度分析法是一种用灰色关联度顺序来描述因素间相关程度的方法, 强调因素间相关程度的顺序。通过这种谱效关系的研究, 发现续断发汗前后主要发挥细胞增殖分化药效的成分主要是川续断皂苷 VI、绿原酸、马钱苷、异绿原酸 C、咖啡酸、川续断皂苷 IV 同分异构体、川续断皂苷 X、续断苷 B 等。结合化学、药理以及谱效关系的结果分析, 川续断皂苷 VI 和绿原酸、马钱苷是影响续断发汗后对成骨细胞增殖活性降低的主要物质基础。本实验为续断“发汗”前后药效物质基础的深入研究提供了依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 汪文来, 鞠大宏, 刘梅洁, 等. 续断有效成分药理学研究进展 [J]. 中国医药导刊, 2015, 17(10): 1059-1060.
- [3] Jung H W, Jung J K, Son K H, *et al.* Inhibitory effects of the root extract of *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng *et al* T. M. Ai on collagen-induced arthritis in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 98-103.
- [4] 陶 益, 季 德, 蔡宝昌, 续断炮制工艺和炮制机制的研究进展 [J]. 中国药房, 2014, 25(39): 3735-3737.
- [5] 杨中林, 刘双跃, 秦民坚. 不同加工方法对续断中 Akebia Saponin D 含量变化的影响 [J]. 中医药信息, 2000, 17(1): 16-17.
- [6] 佟志刚. 续断中总皂苷的含量测定技术 [J]. 健康必读, 2011(3): 308.
- [7] 汪 霞. 发汗与不发汗续断的比较研究 [J]. 浙江中医杂志, 2011, 46(4): 292-293.
- [8] 王 初. 发汗与不发汗续断中水溶性浸出物和川续断皂苷 VI 的比较 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 865-866.
- [9] 金 奇, 来平凡, 杜伟锋, 等. “发汗”对续断质量的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(12): 2636-2638.
- [10] 杜伟锋, 丛晓东, 蔡宝昌. HPLC-ESI/MS 法测定续断“发汗”前后绿原酸和川续断皂苷 VI 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 112-115.
- [11] Wang B L, Hu J P, Sheng L, *et al.* Chemical-pharmacokinetic-pharmacodynamic fingerprints of *Schisandra chinensis* alcoholic extract [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(5): 734-740.
- [12] Xu J J, Lu J Q, Li X S, *et al.* Study on spectrum-effect relationship between fingerprints of essential oil from Shennong Xiangju and the *in vitro* antioxidant activities [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(10): 1823-1830.
- [13] 崔 方, 韩增护, 刘小花, 等. 红芪提高免疫功能活性部位的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 101-105.
- [14] 李云飞, 程翼宇, 范晓辉. 中药多维谱效关系研究思路探讨 [J]. 中国天然药物, 2010, 8(3): 167-170.
- [15] 姜东京, 杜伟锋, 蔡宝昌. 中药谱效关系在中药质量控制方面的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 3811-3814.
- [16] 杨 莹, 杜伟锋, 康显杰, 等. 续断“发汗”前后水煎液及含药血清对人成骨样 MG-63 细胞、幼鼠成骨细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5594-5599.
- [17] 杜伟锋, 贾永强, 姜东京, 等. 基于 HPLC-ESI-MS 法续断发汗前后的成分分析 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3251-3255.
- [18] 肖小河, 王永炎, 刘 义. 从热力学角度审视和研究中医药 [A] // 中华中医药学会. 中医药学术发展大会论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会中华中医药学会糖尿病分会, 2005.
- [19] 曾令军, 林 兵, 宋洪涛, 等. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1425-1432.
- [20] 李婷婷, 王新芳, 马 玲, 等. 谱效关系与一测多评相结合全面提升中药材质量控制标准 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 225-227.
- [21] 万新军. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(10): 52-53.
- [22] 赵海燕, 韩 旭. 中药谱效关系的研究思路与应用进展 [J]. 世界中医药, 2014, 9(4): 537-539.
- [23] Du W F, Li X N, Yang Y, *et al.* Quantitative determination, principal component analysis and discriminant analysis of eight marker compounds in crude and sweated *Dipsaci Radix* by HPLC-DAD [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 2129-2135.