

以药效成分群-活性-功效关联作用筛选当归质量标志物

刘妍如¹, 唐志书^{1*}, 宋忠兴¹, 刘峰², 段金廛^{3*}, 陈琳¹, 史鑫波¹, 杨宁娟¹, 江大海¹

1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省中药产业研究院, 陕西 咸阳 712083
2. 陕西国际商贸学院, 陕西步长制药有限公司, 陕西 咸阳 712046
3. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要:目的 基于质量标志物(quality markers, Q-Marker)概念, 通过构建当归的药效成分群-生物活性关联网络, 确定影响当归药材质量的 Q-Marker, 建立当归药材的整体质控方法。方法 以当归药材表征成分结合主成分分析结果, 对 15 批次不同产地当归药材差异显著的活性成分进行筛选, 将初步选定的差异成分作为当归质控的药效成分群。基于关联规则, 建立体外、体内活性成分筛选评价模型, 通过挖掘组分间关系, 以此确定当归药材的 Q-Marker, 并建立了 Q-Marker 同时定量的测定方法。结果 经 UPLC-TOF/MS 技术及药动学参数预测, 找到当归中 11 个具有潜在药效活性的药效成分群。经药效成分群-生物活性关联网络分析, 将阿魏酸、Z-藁本内酯和欧当归内酯 A 作为当归质控的 Q-Marker, 其方法学结果显示, 3 种化合物线性关系良好, $r > 0.990$, 精密度、重复性和稳定性良好, 平均加样回收率范围为 99.18%~100.25%。结论 基于药效成分群-生物活性关联概念, 采用多元统计结合液质联用分析技术的当归药材 Q-Marker 辨析方法, 可以初步明确与当归药效紧密联系的化学成分来源, 为当归的整体质量控制提供相关数据。

关键词: 当归; 质量标志物; 药效成分群; 活性; 功效; 阿魏酸; Z-藁本内酯; 欧当归内酯 A; 关联网络; UPLC-TOF/MS
中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)09-2626-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.014

Q-Marker screening method for *Angelicae Sinensis Radix* depending on effective components-bioactivity-efficacy network integration analysis

LIU Yan-ru¹, TANG Zhi-shu¹, SONG Zhong-xing¹, LIU Feng², DUAN Jin-ao³, CHEN Lin¹, SHI Xin-bo¹, YANG Ning-juan¹, JIANG Da-hai¹

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Resources of Qin Medicine, Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine Industry, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
2. Shaanxi International Business College, Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xianyang 712046, China
3. Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu Province, Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medical Formula Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective According to quality markers (Q-Marker) theory, to establish a whole set of quality control methods for Danggui (*Angelica Sinensis Radix*, ASR) on the basis of effective components-bioactivity-efficacy network correlation analysis and determine Q-marker affecting the quality of ASR. **Methods** Combined ASR components characterization with principal component analysis (PCA), the differential active components among 15 various habitats materials were directly evaluated, regarding the initially-selected components as the bio-efficacy components for quality control of ASR. Based on correlation analysis principle, the screening and evaluation models of active ingredients *in vitro* and *in vivo* were established by digging inter-relationship of

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 国家重大科技专项“重大新药创制”项目(2019ZX09301-133); 陕西省科技厅重点产业创新链(群)项目(2020ZDLSF05-08); 陕西省“特支计划”青年拔尖人才项目(陕组通字【2018】33号)

作者简介: 刘妍如(1985—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制研究。Tel: (029)38182201 Email: yanzi_2203@aliyun.com

***通信作者:** 唐志书(1972—), 教授, 硕士生导师, 主要从事中药制剂制备技术的研究。Tel: (029)38185060 Email: tzs6565@163.com

段金廛(1956—), 教授, 博士生导师, 中国自然资源学会中药及天然药物资源专业委员会主任委员, 国家“973”计划首席科学家。Tel/Fax: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

components to determine the Q-marker of ASR. Meanwhile, the simultaneous determination methodology for the Q-Marker was established. **Results** With UPLC-TOF/MS technique and pharmacokinetic parameter prediction, 11 bio-efficacy components with potential drug effect activity were found. After being analyzed by the bio-efficacy components-bioactivity network integration analysis, ferulic acid, Z-ligustilide, and levistilide A were chosen as the Q-Marker for quality control of ASR. By using the established quantification method, the linearity coefficients of three Q-Marker were over 0.99. With a highly precision, repeatability and stability results, the average recoveries of three Q-Marker in the samples were ranged from 99.18% to 100.25%. **Conclusion** Based on the concept of bio-efficacy components-bioactivity network correlation, UPLC-TOF/MS was used to discriminate the Q-Marker of ASR, in order to preliminarily identify the source of chemical constituents closely related to the efficacy of ASR, which can provide relevant statistics for the overall quality control of ASR.

Key words: *Angelicae Sinensis Radix*; quality marker; bio-efficacy components; activity; efficacy; ferulic acid; Z-ligustilide; levistilide A; associated network; UPLC-TOF/MS

中药材是生产中药饮片和中成药的基本原料,其质量是保证中药饮片和中成药质量的关键和基础。因此,中药材质量的规范化是保证中药材质量的重要措施和重要前提。国务院于 2016 年发布了《关于促进医药产业健康发展的指导意见》,明确提出完善中药质量标准体系,提高中药质量标准的科学性和合理性。同年,刘昌孝院士^[1]率先提出中药质量标志物(Q-Marker)的核心概念和理论,为提升我国中药产品质量和质量控制水平研究指明了方向^[2-3]。基于中药整体质量控制的研究要求,本课题组认为,中药的整体质量不是单一成分药效的简单加合,而是存在着成分间多层次、多环节、多维度的非线性/线性协同作用。因此,要建立中药整体质量评价体系,首先要对影响中药质量的药效成分群-生物活性的互作因素及其功效相关的生物效应进行关联性分析,挖掘其内在的规律,对于找到关系药材整体质量的 Q-Marker 有重要涵义。这也是对于中药材、中成药整体质量提升与开发研究关键科学问题的初步认知。

当归为伞形科二年生草本植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,其药用记载始见于《神农本草经》,距今已有 2000 多年历史。当归具有浓郁的香气,味甘、辛、微苦,具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效。临床主要用于治疗血虚萎黄、眩晕心悸、虚寒腹痛、风湿痹痛、跌扑损伤、肠燥便秘等症^[4]。作为典型的生境主导型道地药材,产地生态环境是影响当归品质的主要因素,其道地主产区为甘肃南部,如岷县、宕昌等地区。其他产地如云南、四川、湖北等地也有少量分布。由于受到当归价格上涨等因素的影响,当归的种植规模在非传统产区有迅速扩张趋势。然而,由于药材生态环境的适宜性差异导致了各产区当归药材的质量参

差不齐,也给当归质量控制带来很大困难^[5-6]。目前对当归质量的控制主要参考《中国药典》2020 年版,其中仅以阿魏酸作为单指标成分来评价当归质量,而川芎、藁本的指标性控制成分也是阿魏酸,因此单一成分并不能科学、全面、准确反映药材的内在质量^[7-8]。针对目前当归质量参差不齐导致临床疗效不稳定的问题,本研究采用高分辨液质联用技术结合中药成分数据库对当归提取物的化学成分进行表征,以药动学参数(absorption-distribution-metabolism-excretion/toxicity, ADME/T)建议筛选标准对匹配化合物进行药效成分群筛选;选择当归的主要体外抗氧化指标和体内抗血虚、抗血瘀功效指标,通过建立体外和体内生物活性和主要成分的关联,找到与当归生物活性相关系数较高的成分,并将这些成分作为当归质控的 Q-Marker。最后建立当归 Q-Marker 含量测定方法学,以此完成以成分映射药效的当归质量标志物的研究方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity H-CLASS 型超高效液相色谱(UPLC, 美国沃特世科技有限公司)串联 Triple TOF™ 5600+ 质谱仪(美国爱博才思公司),液相配置:二元超高压溶剂系统、FTN 自动进样管理器、PDA 检测器和 Empower3 色谱工作站;Agilent 1290 Infinity II 型超高效液相色谱(UHPLC, 美国 Agilent 公司)串联 AB Sciex 4500 Qtrap 三重四级杆线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司),液相配置:G7120A 四元梯度泵、G7129B 自动进样器、G7116A 柱温箱;Sartorius CPA225D 型十万分之一电子分析天平,德国赛多利斯科学仪器有限公司;KQ-300DE 型数控超声波清洗器,江苏昆山市超声仪器有限公司;DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅,上海科恒实业发展

有限公司; GeneVac miVac 低温离心浓缩仪, 英国 GeneVac 公司; Thermo1510 型全波长酶标仪、Thermo Micro17R 微量低温冷冻离心机, 美国赛默飞世尔科技有限公司; FT-200 动物跑步机, 成都泰盟软件有限公司。

1.2 试剂

对照品阿魏酸, 批号 110773-201614, 质量分数 99.0%, 中国食品药品检定研究院; 对照品 Z-蒿本内酯, 批号 wkq16052404, 质量分数 $\geq 98\%$, 四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品欧当归内酯 A, 批号 MUST-18032812, 质量分数 99.90%(HPLC), 成都曼思特生物科技有限公司; GSH-PX 试剂盒、羟自由基试剂盒, 南京建成生物工程研究所; DPPH 试剂, 批号 W27F10E81251, 上海源叶生物科技有限公司; 总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 快速法), 上海碧云天生物技术有限公司; 肝素钠一次性使用真空采血管, 江苏宇力医疗器械有限公司; 盐酸肾

上腺素注射液, 远大医药 (中国) 有限公司, 批号 181201; 甲酸 (FlukaTM), 色谱纯, 美国霍尼韦尔公司; 乙腈, 色谱纯, 德国默克公司; 其他试剂均为分析纯。实验用水为屈臣氏蒸馏水。

1.3 药材

本研究所用各批次当归药材购于甘肃省, 经陕西中医药大学刘世军教授鉴定为伞形科植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。当归对照药材, 批号 120927-200613, 购于中国药品生物制品检定研究院。15 批当归药材及对照药材信息见表 1。

1.4 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 6~8 周龄, 体质量为 (200 $\pm$ 20) g, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK (川) 2015-030。环境温度 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (50 $\pm$ 10) %, 12 h 光/暗循环 (光照时间 8:00~20:00), 自由进食饮水。在实验开始前每天给予连续 5 min 的抚摸适应, 1 周后大鼠随机

表 1 15 批当归信息

Table 1 Collection information for 15 batches of ASR

编号	批次	产地
S1	120927-200613	对照药材
S2	20190124	甘肃省漳县统货 (漳县统货)
S3	20190124	甘肃省岷县蒲麻镇仓家沟村 (岷县蒲麻镇)
S4	20190124	甘肃省岷县茶埠镇沟江村 (岷县茶埠镇)
S5	20190124	甘肃省岷县申都乡沙地村张家堡 (岷县申都乡)
S6	20190129	甘肃省漳县大草滩镇石咀沟村黄崖沟社 (漳县大草滩)
S7	20190129	甘肃省漳县金钟镇金钟村梅家沟社 (漳县金钟镇)
S8	20190129	甘肃省漳县四族镇韩家村社韩家山社 (漳县四族镇)
S9	20190129	甘肃省定西市渭源县田家河乡就集村牛家庄社 (渭源田家河)
S10	20190129	甘肃省定西市渭源县祁家庙镇乔家沟村营丰社 (渭源祁家庙)
S11	20190129	甘肃省定西市渭源县五竹镇路麻滩村街道社 (渭源五竹镇)
S12	20190130	甘肃省宕昌县理川镇拉路村 (宕昌理川镇)
S13	20190130	甘肃省宕昌县阿坞镇阿坞村 (宕昌阿坞镇)
S14	20190130	甘肃省宕昌县哈达铺镇上罗村 (宕昌哈达铺镇)
S15	20190130	甘肃省若尔盖县巴西乡 3170 m (若尔盖县)

分组, 每组 6 只。所有动物实验遵循陕西中医药大学实验动物伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 UPLC/Q-TOF-MS/MS 成分表征及指纹图谱测定

2.1.1 色谱条件优化 流动相分别比较了乙腈-水

和甲醇-水 2 个溶剂系统, 结果表明, 用乙腈-水二元梯度洗脱系统比用甲醇-水梯度洗脱基线平, 且耗时短。分析时间仅用 30 min, 样品 1 h 谱图显示, 30 min 后无特征峰出现。

以相邻 2 峰的分辨率之和 ($\sum R_s$)、色谱分离系数 (r^*)、色谱信息量 (Φ) 和分层色谱响应值 (hierarchical chromatographic response function,

HCRF) 对指纹图谱的分离峰个数 (N)、分离度和分析时间性能进行评价, 色谱分离质量评价计算公式见式 1~3^[9]。

$$r^* = \prod_{i=0}^{n-1} (R_{i,i+1} / \bar{R}) \quad (1)$$

$R_{i,i+1}$ 为相邻两峰之间的分辨率, n 为峰的总个数, $\bar{R}$ 为 n 个峰的相邻两峰分辨率的平均值

$$\Phi = \sum_{i=0}^n [\lg(2A_i) + 0.5 \lg(2R_i) + 0.25 \lg(2n_i)] \quad (2)$$

A_i 为色谱峰面积, R_i 为相邻两峰间分离度, n_i 为理论塔板数

$$\text{HCRF} = 1\,000\,000\,n + 10\,000\,R_{\min} + t_{\max} - t_{\min} \quad (3)$$

$R_{\min}$ 为最小分离度, $t_{\max} - t_{\min}$ 为最大与最小保留时间之差

为了获得最佳的参数设置, 选择柱温 (25~35 °C)、体积流量 (0.2~0.5 mL/min)、缓冲液浓度 (0.1%~0.2% 甲酸水溶液、0.05%~0.2% 乙酸水溶液)、水相初始比例 (95%~99%), 色谱柱类型 [柱 1 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱 2 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱 3 (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm)] 作为优化参数, 结果见表 2。

优化结果显示, 缓冲系统为 0.1% 甲酸水溶液, 柱温为 30 °C 时, 水相初始比例为 98%, 体积流量为 0.3 mL/min 时, 各峰分离度均 > 1.5, 理论塔板数参数优化结果较好, 以各色谱峰计算均 > 8000, 因此将此作为固定条件进行样品测定。

表 2 色谱条件优化结果

Table 2 Optimization results of chromatographic conditions

优化条件		N	$\sum R_s$	r^*	Φ	HCRF/(×10 ⁸)
缓冲系统	0.1% 甲酸水溶液	121	64.38	0.029 0	1 287.70	1.21
	0.2% 甲酸水溶液	110	34.83	5.22×10^{-3}	663.95	1.10
	0.05% 乙酸水溶液	93	86.35	5.65×10^{-6}	1 131.45	0.93
	0.1% 乙酸水溶液	97	67.39	2.70×10^{-4}	946.70	0.97
	0.2% 乙酸水溶液	89	44.22	2.69×10^{-3}	743.56	0.89
柱温/°C	25	80	51.36	1.30×10^{-3}	971.32	0.80
	30	90	61.06	0.192 0	960.81	0.90
	35	84	62.36	3.83×10^{-4}	934.22	0.84
体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.2	77	69.62	4.15×10^{-3}	1 118.80	0.77
	0.3	88	70.90	0.071 9	1 001.71	0.88
	0.4	87	46.80	0.067 1	949.47	0.87
	0.5	83	53.69	0.065 4	859.57	0.83
水相初始比例	95%	95	27.32	0.172 0	849.64	0.86
	98%	114	57.98	0.248 0	997.30	0.90
	99%	85	49.26	0.075 3	953.81	0.82
色谱柱类型	柱 1	118	96.89	0.025 8	1 683.92	1.18
	柱 2	102	31.66	0.021 2	1 323.43	1.02
	柱 3	84	28.10	7.00×10^{-3}	1 205.39	0.84

2.1.2 测定波长选择 检测波长经过对光电二级阵列管检测器检测三维图谱分析, 根据当归药材中主要成分的特征波长, 从波长 210~400 nm 选取代表各单味药材的重点波长 323 nm, 进行指纹图谱评价。

2.1.3 测定条件

(1) 质谱条件: 离子源为电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式下, 采用信息依赖采集 (IDA)、动态背景扣除 (DBS) 和高灵敏度模式采集数据。母离子

(TOF-MS) 扫描范围 m/z 50~1200, 对超过 100 cps 的 8 个最强峰进行 MS² 采集数据, 子离子 (MS/MS) 扫描范围为 m/z 50~1200。源喷射电压 (ion spray voltage floating) 为 5500 V, 裂解电压 (declustering potential, DP) 为 40 V, 碰撞能量 (collision energy, CE) 为 10 eV, 雾化气 (ion source gas 1, GS1) 和辅助气 (ion source gas 2, GS2) 为氮气, 皆为 344.738 kPa (50 psi), 气帘气 (curtain gas, CUR) 241.316 kPa (35 psi), 雾化温度 (temperature, TEM) 550 °C。

(2) 色谱条件: 采用 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱程序为 0~1 min, 2% 乙腈; 1~18 min, 2%~100% 乙腈; 18~20 min, 100% 乙腈; 20~23 min, 100%~2% 乙腈; 23~25 min, 2% 乙腈; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量 2 μL; 柱温 30 °C。

2.1.4 供试品溶液的制备 参照《中国药典》2020 年版一部当归含量测定项下供试品溶液的制备方法, 称取当归粉末(过三号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密加入 20 mL 70% 甲醇, 称定质量, 85 °C 水浴回流 30 min, 静置放冷, 称定质量, 加入溶剂补足减少的质量, 摇晃均匀后静置, 取上清液滤过, 精密量取续滤液 1 mL, 至 10 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 取续滤液, 即为供试品溶液, 备用。

2.1.5 对照品溶液的制备 参照《中国药典》2015 年版一部当归含量测定项下对照品溶液的制备方法, 取阿魏酸对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 70% 甲醇制成含阿魏酸 12 μg/mL 的对照品溶液, 即得。

2.1.6 谱峰筛选 将 UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析检测得到的图谱数据导入 PeakView 2.2 软件对化合物进行鉴定(图 1-A)。通过对各样品正离子模式下 UPLC/Q-TOF-MS/MS 总离子流图比较、分析及筛选得到 18 个共有特征峰, 其峰面积之和占总峰面积的 90% 以上(图 1-B)。具有一定的代表性。根据 PeakView 2.2 软件、Masterview 的中药成分数据库并结合一级质谱准分子离子峰、二级质谱碎片信息以及文献对 18 个化合物进行鉴定。根据 PeakView 2.2 软件分析其元素组成, 并结合一级、二级质谱碎片信息以及文献, 对当归指纹图谱中的共有峰进行鉴定, 大致推断出 18 个化合物的可能结构信息(表 3)。

2.2 药效成分群筛选

本标准采用 AB Sciex master view 中药成分数据库(TCM Library 1.0)作为从指纹图谱共有峰中筛选药效成分群的匹配库, 参考 TCMSP 数据库参数及 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) 计算结果, 对匹配化合物进行药动学参数预测筛选^[19-20]。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30% 或类药性(drug-like, DL)≥0.18(TCMSP 数据库), 氢键给体<5, 氢键受体<10, 油水分配系数

(MlogP)<4.15 (Swiss ADME 预测) 为关键筛选指标进行化合物筛选, 得到 11 个化合物^[21-22]。结果见表 4。

2.3 体外抗氧化活性

2.3.1 样品溶液的制备 称取当归粉末(过三号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密加入 20 mL 70% 甲醇, 称定质量, 85 °C 水浴回流 30 min, 静置放冷, 称定质量, 加入溶剂补足减少的质量, 摇晃均匀后静置, 取上清液滤过, 取续滤液备用。

2.3.2 ABTS^{·+}自由基抑制率测定 参照总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 快速法)检测方法, 分别制备 70% 甲醇当归样本反应溶液(样本+ABTS 试剂)和 70% 甲醇阴性对照溶液(70% 甲醇+ABTS 试剂)。按照说明分别配制工作液和反应液, 加样在避光条件下进行, 加样后 27 °C 孵育 6 min, 使用酶标仪分别测定 734 nm 处吸光度(A)值。每份样品平行测定 3 次, 取平均值, 按公式 4 计算 ABTS^{·+}自由基抑制率。结果显示, 各批次样品 ABTS^{·+}自由基抑制率范围在 81.42%~89.71%, 大小分别为 S14>S7>S4>S8>S3>S10>S12>S2>S15>S9>S5>S11>S6>S13>S1(图 2)。

$$\text{ABTS}^{\cdot+}\text{自由基抑制率}=(A_0-A_i)/A_0 \quad (4)$$

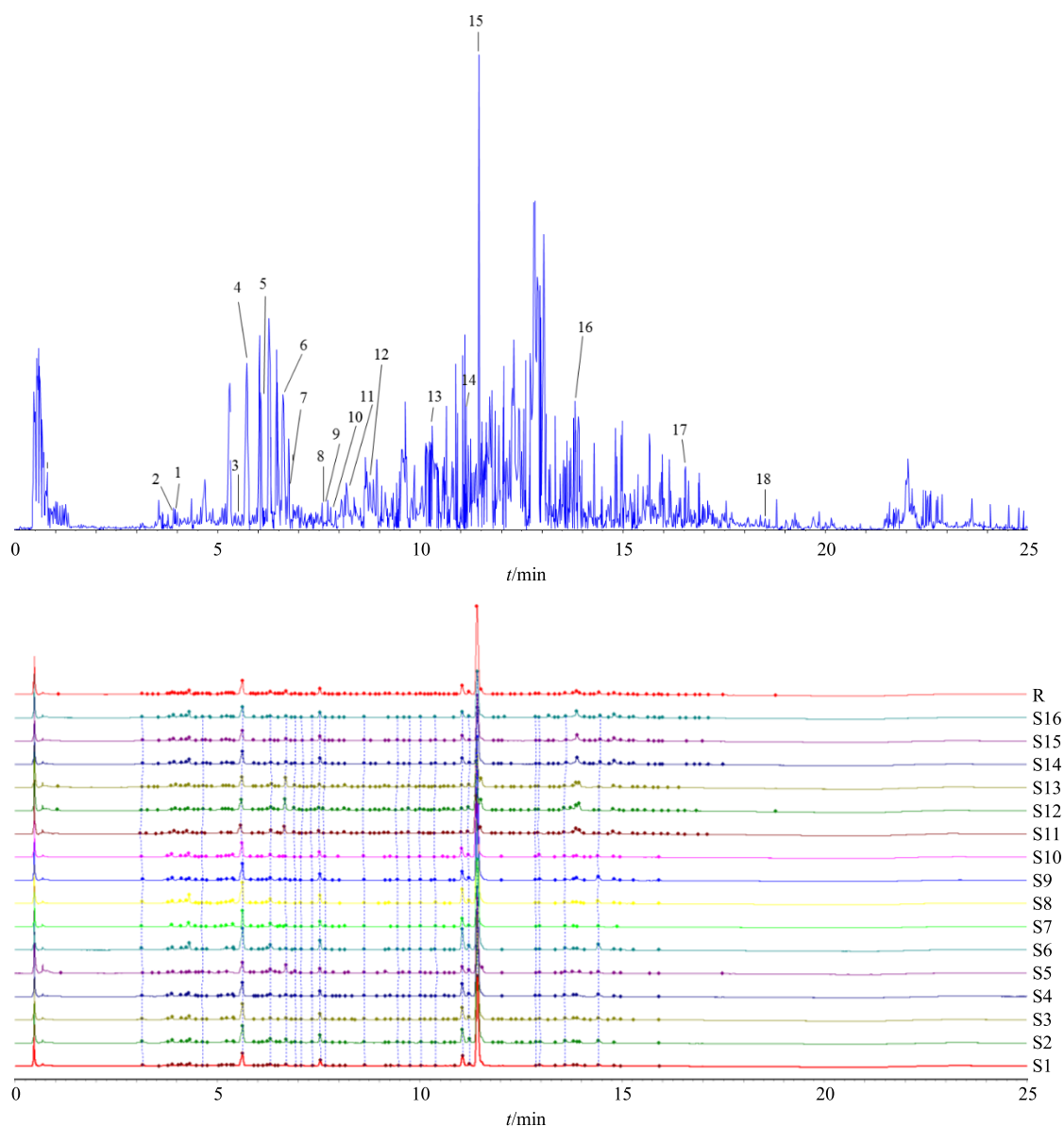
A₀ 为阴性对照溶液的 A 值, A_i 为当归样本反应溶液的 A 值

2.3.3 DPPH[·]自由基抑制率测定 向 0.2 mmol/L 的 DPPH[·] 甲醇溶液加入等体积当归样本溶液(空白对照以 70% 甲醇溶液代替), 加样后混匀, 室温下避光静置 30 min, 用酶标仪测定 517 nm 处的 A 值。每份样品平行测定 3 次, 取平均值, 按公式 5 计算 DPPH[·] 自由基抑制率。结果显示, 各批次样品 DPPH[·] 自由基抑制率范围在 42.89%~73.86%, 大小分别为 S14>S13>S2>S9>S5>S3>S1>S4>S7>S6>S8>S11>S15>S12>S10(图 2)。

$$\text{DPPH}^{\cdot}\text{自由基抑制率}=(A_s-A_b)/A_c \quad (5)$$

A_s 为 150 μL 的 DPPH[·] 溶液+150 μL 的当归样品 A 值, A_b 为 150 μL 的当归样品+150 μL 的 70% 甲醇溶液 A 值, A_c 为 150 μL 的 70% 甲醇溶液+150 μL 的 DPPH[·] 溶液 A 值

2.3.4 羟基自由基(·OH)抑制率检测方法 将制备得到的当归样品溶液, 使用低温离心浓缩仪挥干, 蒸馏水溶解, 备用。将·OH 试剂盒中的试剂按照说明书方法分别配制测试溶液。经最佳取样浓度摸索后, 优化结果在 20%~55% 时的稀释倍数为最佳稀释倍数, 按 1:7 稀释样品为最佳取样浓度, 将各批次当归样品按照 1:7 稀释后按操作表进行测试(稀



1-绿原酸 2-伞形花内酯 3-东莨菪内酯 4-阿魏酸 5-对香豆酸 6-洋川芎内酯 I 7-滨蒿内酯 8-香豆素 9-肉桂酸 10-补骨脂素 11-佛手柑内酯 12-异茴芹内酯 13-洋川芎内酯 A 14-蛇床子素 15-Z-藜本内酯 16-欧当归内酯 17-亚油酸 18-亚油酸甲酯
1-chlorogenic acid 2-umbelliferone 3-scopoletin 4-ferulic acid 5-*p*-coumaric acid 6-senkyunolide I 7-scoparone 8-coumarin 9-cinnamic acid 10-psoralen 11-bergapten 12-isopimpinellin 13-N-butyl-4,5-dihydrophthalide 14-osthole 15-Z-ligustilide 16-levistilide A 17-linoleic acid 18-methyl linoleate

图 1 当归药材 UPLC/Q-TOF-MS 离子流 IDA 提取谱图 (A) 及 15 批 (S1~S15) 不同产地当归药材 UPLC 指纹图谱 (B)
Fig. 1 UPLC/Q-TOF-MS ion flow IDA extraction spectrum of ASR (A) and UPLC fingerprint chromatograms for 15 batches (S1—S15) of ASR from different habitats (B)

释倍数为 8)。按照实验操作表进行实验,用酶标仪测定 550 nm 处的 A 值。每份样品平行测定 3 次,取平均值,按公式 6 计算 $\cdot\text{OH}$ 抑制率。结果显示,各批次样品 $\cdot\text{OH}$ 抑制率范围在 61.36%~28.25%,大小分别为 $S6>S4>S3>S5>S1>S2>S14>S7>S8>S9>S12>S11>S15>S13>S10$ (图 2)。

$$\cdot\text{OH}\text{抑制率}=(A_{\text{对照}}-A_{\text{样本}})/A_{\text{对照}} \quad (6)$$

2.4 体内抗氧化研究

2.4.1 当归水提物制备^[23] 分别取各批次当归药材 (S1~S15) 2 kg,加 10 倍量蒸馏水浸泡 4 h,然后以加热回流方式提取 2 次,每次 2 h,滤过。药渣再以 8 倍量水进行加热回流提取 2 h,滤过。合并水提液,真空减压浓缩干燥后得到当归水提物样品。

2.4.2 当归水提物对血虚 (疲劳) 大鼠作用研究

表 3 15 批当归药材共有峰鉴定
Table 3 Common components among 15 batches of ASR

编号	化合物名称	t_R/min	RSD/%	分子式	相对分子质量	MS/MS (正离子模式)		参考文献
						母离子	特征子离子	
1	绿原酸	4.41±0.01	0.29	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	355.1	163.0, 135.0, 117.0	10
2	伞形花内酯	4.37±0.02	0.56	C ₉ H ₆ O ₃	162.031 7	163.0	135.0, 117.0, 103.0	11
3	东莨菪内酯	5.61±0.02	0.31	C ₁₀ H ₈ O ₄	192.042 3	193.0	178.0, 150.0, 133.0, 122.0	11
4	阿魏酸	5.68±0.01	0.23	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.057 9	195.0	177.0, 145.0, 117.0	11-13
5	对香豆酸	6.20±0.02	0.30	C ₉ H ₈ O ₃	164.047 3	165.0	137.1, 109.1, 105.0	14
6	洋川芎内酯 I	6.76±0.01	0.11	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224.104 9	225.1	207.1, 189.1, 119.1, 105.1	11-13,15
7	滨蒿内酯	6.81±0.05	0.69	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	206.057 9	207.1	161.1, 119.1, 105.1	11
8	香豆素	7.58±0.01	0.13	C ₉ H ₆ O ₂	146.036 8	147.0	129.0, 101.0	13
9	肉桂酸	7.60±0.01	0.10	C ₉ H ₈ O ₂	148.052 4	149.0	131.0, 121.0, 103.0	16
10	补骨脂素	7.96±0.01	0.15	C ₁₁ H ₆ O ₃	186.031 7	187.0	131.0, 115.0	13
11	佛手柑内酯	8.25±0.01	0.13	C ₁₂ H ₈ O ₄	216.042 3	217.0	202.0, 174.0	13
12	异茴芹内酯	8.86±0.01	0.13	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	246.052 8	246.0	232.0, 217.0	13
13	洋川芎内酯 A	10.44±0.01	0.13	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192.115 0	193.1	175.1, 147.1, 137.1, 105.1	17
14	蛇床子素	11.15±0.02	0.14	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244.109 9	245.1	227.1	13
15	Z-藁本内酯	11.47±0.02	0.13	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	190.099 4	191.0	143.1, 130.1	11-13,18
16	欧当归内酯 A	13.97±0.01	0.10	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	380.198 8	381.2	335.1, 191.1, 173.1	11-13,15
17	亚油酸	16.59±0.01	0.08	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240 2	281.2	263.2, 245.2	12
18	亚油酸甲酯	18.50±0.02	0.10	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294.255 9	295.2	263.2, 245.2, 175.1	12

表 4 当归化学成分筛选结果
Table 4 Bio-efficacy components selection results

谱峰编号	CAS	化合物名称	OB/%	DL	数据来源 (ID)
4	537-98-4	阿魏酸 (ferulic acid)	39.56	0.06	TCMSP (MOL000360)
5	4501-31-9	对香豆酸 (<i>p</i> -coumaric acid)	45.98	0.04	TCMSP (MOL000397)
6	94596-28-8	洋川芎内酯 I (senkyunolide I)	46.80	0.08	TCMSP (MOL002143)
7	120-08-1	滨蒿内酯 (scoparone)	74.75	0.09	TCMSP (MOL001999)
10	66-97-7	补骨脂素 (psoralen)	33.06	0.10	TCMSP (MOL001950)
11	484-20-8	佛手柑内酯 (bergapten)	42.21	0.13	TCMSP (MOL001945)
14	484-12-8	蛇床子素 (osthole)	38.75	0.13	TCMSP (MOL000614)
15	551-08-6	Z-藁本内酯 (Z-ligustilide)	53.72	0.07	TCMSP (MOL002122)
16	88182-33-6	欧当归内酯 A (levistilide A)	2.15	0.82	TCMSP (MOL002102)
17	60-33-3	亚油酸 (linoleic acid)	45.01	0.15	TCMSP (MOL000432)
18	112-63-0	亚油酸甲酯 (methyl linoleate)	41.93	0.17	TCMSP (MOL001641)

(1) 模型制备^[24]: 采用力竭跑步加负重游泳交替方法建立复合式疲劳大鼠模型。大鼠适应 1 周后, 随机分为对照组、模型组和给药组, 每组 6 只。参考前期研究, 给药组于造模前 1 周开始给予当归水提物连续 ig 至实验结束, 给药剂量为 5 g/(kg·d), 模型组和对照组给予等体积生理盐水^[23]。

负重游泳模型: 将模型组和给药组大鼠置于底×高 (0.5 m²×1.3 m) 的圆形亚克力水缸中进行适应性游泳, 适应期为 1 周, 每次 20 min, 水温 (25±2) °C。适应期后, 按照每只大鼠体质量的 5% 计算游泳负重量, 制备装有负重量钢球的负重物并束于大鼠尾根部, 以大鼠沉入水底 3 s 即视作力竭。

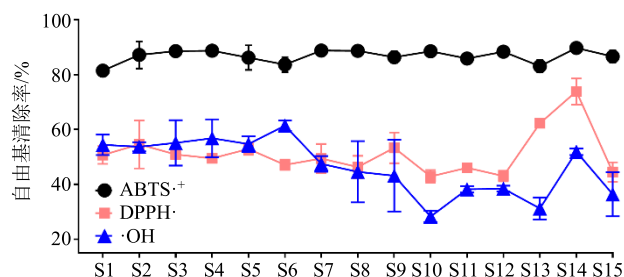


图 2 15 批当归药材提取物体外抗氧化活性比较

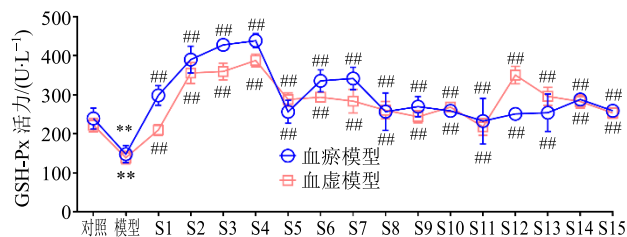
Fig. 2 Comparison of *in vitro* anti-oxidant activities for 15 batches of ASR extract

疲劳式跑步模型：将模型组和给药组大鼠置于动物跑步机（六通道，通道末端加电刺激）进行适应性跑步训练，适应期为 2 d，跑速为 10 m/min，每次 20 min，跑台坡度为 0°。适应期后按坡度 0°、10°、30°，跑速 15、20、25 m/min 程序，每 15 分钟逐步升级的方式进行 45 min 的疲劳式跑步，每天 2 次。跑步同时中以通道末端电刺激鼠尾部，以使大鼠保持持续性运动。

(2) 指标检测：治疗结束后，大鼠眼眶采血 0.5 mL，制备血清，检测各组谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 统计学软件处理数据，计量资料采用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA)， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果显示，与对照组比较，模型组大鼠血清 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比，各给药组大鼠血清 GSH-Px 活性均显著升高 ($P < 0.01$)。除 S1、S9、S11、S15 批次药物与对照组相比无显著差异外，其他批次药物给药后血清 GSH-Px 活性均高于对照组 (图 3)。

2.4.3 当归水提取物对急性血瘀大鼠作用研究



与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 3 15 批当归药材提取物抗血虚及抗血瘀作用比较

Fig. 3 Comparison of *in vivo* anti-bloody deficiency and *in vivo* anti-bloody stasis effects for 15 batches of ASR extract

(1) 模型制备^[25-26]：参考前期研究，给药组于造模前 1 周给予当归水提取物，ig 剂量为 5 g/(kg·d)，模型组和对照组给予等体积蒸馏水，共 2 周^[23]。给药结束后，模型组和各给药组大鼠分别 sc 盐酸肾上腺素 0.8 mL/kg，2 h 后将大鼠浸入 0~2 °C 冰水内游泳 5 min，第 1 次给予盐酸肾上腺素后 3 h，再次注射同等剂量的盐酸肾上腺素。对照组注射同等剂量的生理盐水，不进行冰水游泳。处置后，禁食不禁水。治疗结束后，大鼠眼眶采血 0.5 mL，制备血清，检测各组 GSH-Px 活性。

(2) 指标检测：结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 统计学软件处理数据，计量资料采用单因素方差分析 (ANOVA)， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果显示，与对照组比较，模型组大鼠血清 GSH-Px 值显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比，各批次给药组大鼠血清 GSH-Px 活性均显著升高。除 1~4、6、7 批次给药后血清 GSH-Px 活性高于对照组外 ($P < 0.05$ 、0.01)，其他批次与对照组相比无显著差异 (图 3)。

2.5 当归 Q-Marker 筛选

将采集到的 15 批次当归水提取物的 UPLC-TOF-MS/MS 成分鉴定数据、体外抗氧化活性、体内抗氧化活性数据导入 Simca-p14.1 软件进行特征峰评估以及偏最小二乘回归分析 (partial least squares regression, PLS) 计算。经标准化、对数转换及标度化预处理数据后，建立多元统计模型。选取前 2 个主成分拟合 PLS 模型。为了找到造成各组差异的成分信息，根据生成的 PLS 结果，绘制各成分关系的载荷图，提取组间差别较大的化合物信息进行鉴定 (图 4-A)。

同时，以变量投影重要性指标 VIP (variable importance in projection) 描述各化合物在系统分析的重要性，选定 VIP 大于 1 的化合物作为潜在的 Q-Marker。结果得到具有较大载荷的化合物有 3 个，分别为欧当归内酯 A (VIP: 2.752)，Z-藁本内酯 (VIP: 1.710) 和阿魏酸 (VIP: 1.663) (图 4-B)。进一步将各化合物与体外抗氧化活性、抗血虚疲劳 GSH-Px 活性、抗血瘀 GSH-Px 活性进行 PLS 关联性分析，其中阿魏酸、对香豆酸、蛇床子素、欧当归内酯 A、Z-藁本内酯和亚油酸甲酯与体内外生物活性均呈正相关，且相关系数均大于 0.6，说明上述化合物水平的高低对于当归的生物活性和疗效有重要影响 (表 5)。

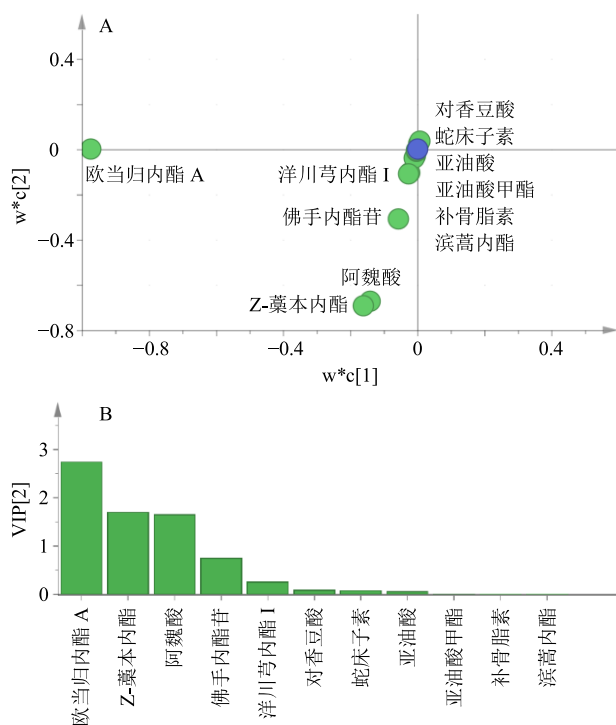


图 4 15 批当归药材成分差异 PLS 载荷图 (A) 和 VIP 得分图 (B)

Fig. 4 PLS analysis with loading plot (A) and VIP bar chart (B) among different batches of ASR

表 5 当归药效成分群与体外、体内生物活性 PLS 关联分析

Table 5 Correlation matrix among bio-efficacy components, anti-oxidant activities, anti-bloody deficiency activities, and anti-bloody stasis activities

编号	成分	自由基清除率		·OH 抑制能力	GSH-PX 活力	
		ABTS· ⁺	DPPH·		抗血瘀	抗血虚 (抗疲劳)
4	阿魏酸	0.932 252	0.931 122	0.917 102	0.885 668	0.891 943
5	对香豆酸	0.672 990	0.669 642	0.641 980	0.669 149	0.629 120
6	洋川芎内酯 I	0.411 998	0.400 324	0.362 240	0.398 402	0.360 696
7	滨蒿内酯	0.257 649	0.234 257	0.216 020	0.250 427	0.206 434
10	补骨脂素	-0.908 400	-0.882 460	-0.962 160	-0.912 970	-0.911 610
11	佛手内酯苷	-0.818 920	-0.811 370	-0.808 710	-0.770 010	-0.780 710
14	蛇床子素	0.626 962	0.609 030	0.711 230	0.620 978	0.666 001
15	Z-藁本内酯	0.936 587	0.932 766	0.964 786	0.911 845	0.941 551
16	欧当归内酯 A	0.653 140	0.700 294	0.643 397	0.587 500	0.649 001
17	亚油酸	0.257 503	0.298 527	0.188 650	0.244 603	0.232 839
18	亚油酸甲酯	0.808 347	0.840 457	0.767 596	0.758 904	0.764 905

表 6 阿魏酸、Z-藁本内酯、欧当归内酯 A 多反应检测参数

Table 6 MRM parameters for ferulic acid, Z-ligustilide and levistilide A

化合物	t_R/min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	DP/V	CE/eV	CXP/V
阿魏酸	5.66	195.0	177.0	70	13	5
Z-藁本内酯	11.47	191.0	115.0	70	56	12
欧当归内酯 A	13.90	381.2	191.1	71	22	9

因此, 根据《中国药典》2020 年版收载的药材质控标准, 结合上述成分筛选结果, 将欧当归内酯 A、Z-藁本内酯和阿魏酸这 3 种化合物初步选定作为当归药材质控的 Q-Marker。

2.6 当归 Q-Marker 测定方法学验证

2.6.1 供试品溶液的制备 见“2.1.4”项下方法。

2.6.2 混合对照品储备溶液的制备 取阿魏酸、欧当归内酯 A 和 Z-藁本内酯对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 70% 甲醇制成质量浓度分别为 2.5、0.1、1.5 $\mu g/mL$ 的混合对照品储备溶液, 即得。

2.6.3 测定条件

(1) 定量质谱条件: 定量质谱分析于采用 ESI 正离子模式进行扫描, 检测模式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)。离子化参数为离子喷雾电压, 正离子模式 5500 V; TEM 550 $^{\circ}C$, GS1 和 GS2 为氮气, 皆为 344.738 kPa (50 psi), CUR 241.316 kPa (35 psi)。化合物离子对优化采集参数: DP、CE 和碰撞池出口电压 (cell exit potential, CXP) 等信息, 如表 6 所示。

(2) 液相条件: 按“2.1.3 (2)”液相色谱条件进行测定。

2.6.4 线性关系考察、检出限和定量限 精密吸取 3 种 Q-Marker 混合对照品储备溶液,按照优化的分析条件进行测定,按“2.1.3 (2)”色谱条件进样,以峰面积为纵坐标 (Y),进样溶液质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准工作曲线。得 3 种化合物线性范围为 0.176~36.000 $\mu\text{g/mL}$,且 X 和 Y 线性关系良好。

表 7 当归 3 个 Q-Marker 的线性方程、线性范围、 r 、检出限和定量限

Table 7 Linearity, regressions coefficients, limits of quantification, limits of detection of three Q-Marker

化合物	线性方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
阿魏酸	$Y=152\,307\,X+83.023$	0.9911	0.8~8.0	0.21	0.73
Z-藁本内酯	$Y=7\times 10^6\,X+36\,657$	0.9962	3.6~36.0	0.63	1.28
欧当归内酯 A	$Y=3\times 10^7\,X-17\,213$	0.9994	0.176~1.760	0.08	0.15

2.6.5 专属性试验 按“2.1.3 (2)”色谱条件,分别精密吸取空白对照溶液、混合对照品溶液、供试品溶液及空白对照样品溶液进样分析,结果见图 5。结果表明 3 种活性成分之间互不干扰,理论塔板数以 3 种成分色谱峰计算均大于 8000,符合定量要求,说明各成分专属性良好。

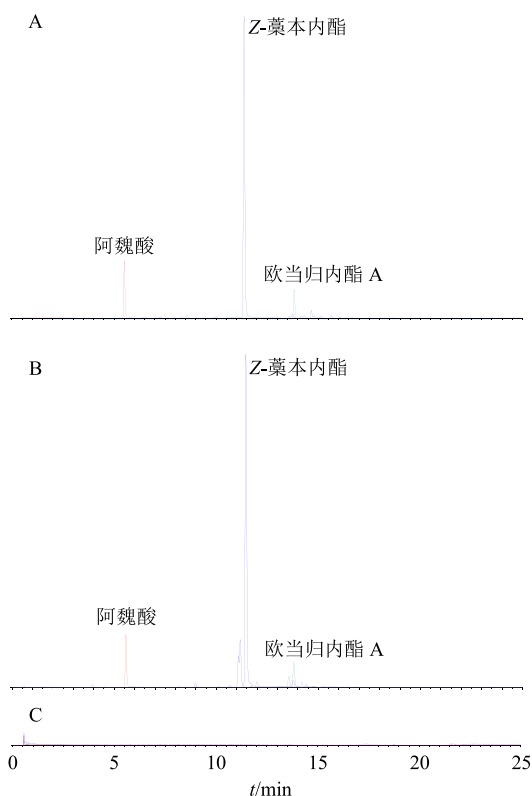


图 5 混合对照品 (A)、当归供试品 (B) 及阴性对照样品 (C) 溶液的 UPLC-MS/MS 提取离子流图

Fig. 5 UPLC-MS/MS extract ion profiles of mix reference substances (A), ASR sample (B) and negative control (C) for ferulic acid, Z-ligustilide and levistilide A

以阴性样品为检测对象,添加不同质量浓度的混合对照品溶液,按照信噪比 (S/N) >3 计算检出限,按照 $S/N>10$ 计算定量限。本方法检出限在 0.08~0.63 $\mu\text{g/mL}$,定量限在 0.15~1.28 $\mu\text{g/mL}$ 。3 种 Q-Marker 的线性方程、相关系数、方法检出限及定量限见表 7。

2.6.6 精密度试验 取混合对照品溶液,按“2.1.3 (2)”项下色谱条件连续测定 6 次,记录峰面积。结果显示 3 个成分的保留时间 RSD 在 0.01%~0.07%,峰面积 RSD 在 0.78%~1.44%,结果表明仪器精密度良好。

2.6.7 重复性试验 取同一批供试品,按“2.1.4”方法制备 6 份供试品溶液,精密吸取各供试品溶液,按“2.1.3 (2)”色谱条件进样测定,记录峰面积并计算质量分数。结果显示 3 个成分的保留时间 RSD 在 0.07%~0.15%,峰面积 RSD 在 0.19%~1.05%,结果表明该方法重复性良好。

2.6.8 稳定性试验 取“2.6.7”项下供试品溶液适量,分别于室温放置 0、3、6、12、18、24、36、48 h,按“2.1.3 (2)”色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示 3 个成分保留时间 RSD 在 0.86%~1.49%,峰面积 RSD 在 1.16%~1.49%,结果表明供试品溶液在室温放置 48 h 内基本稳定。

2.6.9 加样回收率试验 精密称取同一批已知含量的当归粉末 0.2 g,平行称取 6 份,按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液,以药材中各成分与对照品含量 1:1 比例加入已知质量浓度的混合对照品溶液,按“2.1.3 (2)”色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。阿魏酸、Z-藁本内酯和欧当归内酯 A 的平均加样回收率分别为 100.25%、99.18%、100.15%,RSD 分别为 0.32%、0.87%、1.23%。

2.6.10 各批样品测定 取 15 批当归药材样品,分别制备 3 份供试品溶液,精密吸取对照品溶液 2 μL ,供试品溶液 2 μL ,注入液相色谱仪,测定,记录峰面积,按外标法计算各批样品中各成分的含量,结果见表 8。

表 8 15 批当归药材中 Z-藁本内酯、阿魏酸和欧当归内酯含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 8 Ferulic acid, Z-ligustilide and levistolide A contents for 15 batches of ASR ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	藁本内酯	阿魏酸	欧当归内酯 A
S1	19.114±0.038	0.789±0.050	0.373±0.009
S2	19.302±0.111	0.683±0.080	0.271±0.009
S3	18.303±0.069	0.651±0.013	0.330±0.001
S4	21.529±0.079	0.999±0.018	0.316±0.007
S5	17.728±0.095	0.713±0.011	0.188±0.004
S6	23.089±0.137	0.996±0.014	0.247±0.002
S7	25.127±0.126	0.984±0.019	0.217±0.002
S8	19.290±0.021	0.823±0.011	0.159±0.001
S9	18.972±0.039	0.570±0.010	0.256±0.005
S10	21.322±0.056	0.736±0.001	0.180±0.002
S11	17.864±0.062	0.471±0.080	0.093±0.001
S12	21.464±0.112	0.836±0.060	0.204±0.004
S13	23.243±0.054	1.060±0.016	0.231±0.001
S14	21.998±0.013	0.934±0.039	0.211±0.003
S15	19.894±0.083	0.721±0.007	0.163±0.002

3 讨论

当归具有补血活血的重要功效,其药效与当归富含的酚酸类、香豆素类和多糖类成分有关。当归的活血功效主要表现在改善机体心血管能力如提高造血能力、抗血小板聚集、抗炎、抗氧化等方面;而其补血作用主要为能够缓解过度伤津耗液导致的心血不足,以提高机体抗氧化、抗疲劳能力^[27]。因此,本研究将当过的体内外抗氧化活性作为评价当归功效高低的主要指标,建立体外和体内抗氧化评价模型,通过构建当归-体外/体内抗氧化活性-药效成分群的相关网络,对关键化合物进行评价,找出与质量、活性相关性最大的化合物,从而确定当归质控的 Q-Marker。

本研究结果不但可以从药材源头实现对当归药材进行整体质量控制,完成当归药材的优选;同时,通过对当归的药效基础的初步探索和研究,也可以明确与当归药效紧密的化学成分来源,为当归药材质量的稳定和有效控制提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药,

2016, 47(9): 1443-1457.

- [2] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-marker): 提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4517-4518.
- [3] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [4] 严辉, 段金彪, 尚尔鑫, 等. 当归不同部位入药功效取向差异的化学物质基础与药性关联性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3208-3212.
- [5] 严辉, 段金彪, 宋秉生, 等. 我国当归药材生产现状与分析 [J]. 中国现代中药, 2009, 11(4): 12-17.
- [6] 严辉, 张小波, 朱寿东, 等. 当归药材生产区划研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(17): 3139-3147.
- [7] 严辉, 段金彪, 钱大玮, 等. 我国不同产地当归药材质量的分析与评价 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1988-1992.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- [9] Ji Y B, Xu Q S, Hu Y Z, et al. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066(1/2): 97-104.
- [10] Zhou G S, Yang N Y, Tang Y P, et al. Chemical constituents from the aerial parts of *Angelica sinensis* and their bioactivities [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(4): 295-298.
- [11] 李丽丽. 基于植物的化学分类研究当归属植物的活性成分 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [12] Ma J P, Guo Z B, Jin L, et al. Phytochemical progress made in investigations of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(4): 241-249.
- [13] 闫忠红. 当归属药用植物的本草学、亲缘关系、化学成分及药理作用相关性研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2003.
- [14] 张玉华. 当归和喜树 CMCs 体系对香豆素的生物转化初步研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [15] Tsuchida T, Kobayashi M, Kaneko K, et al. Studies on the constituents of Umbelliferae plants. XVI. Isolation and structures of three new ligustilide derivatives from *Angelica acutiloba* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(11): 4460-4464.
- [16] Zhang H, Zhou D D, Yang F Q, et al. Modulation of electroosmotic flow in capillary electrophoresis by plant polyphenol-inspired gallic acid/polyethyleneimine coatings: Analysis of small molecules [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1124: 7-16.
- [17] Tang Y, Zhu M, Yu S, et al. Identification and comparative quantification of bio-active phthalides in essential oils from Si-Wu-Tang, Fo-Shou-San, *Radix*

- Angelica* and *Rhizoma Chuanxiong* [J]. *Molecules*, 2010, 15(1): 341-351.
- [18] 林茂, 朱朝德, 孙庆民, 等. 当归化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1979, 14(9): 529-534.
- [19] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [20] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [21] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1/2/3): 3-26.
- [22] Lipinski C A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2004, 1(4): 337-341.
- [23] 李伟霞, 唐于平, 郭建明, 等. 当归-川芎药对及其组成药味对 3 种血虚模型补血作用的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1808-1814.
- [24] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2177-2183.
- [25] 李伟霞, 王晓艳, 唐进法, 等. 基于 PLS-DA 和多指标综合指数法研究当归-川芎药对对急性血瘀大鼠血清中血管活性物质和黏附分子的影响 [J]. 药学学报, 2019, 54(11): 1909-1917.
- [26] Shi X Q, Tang Y P, Zhu H X, *et al.* Pharmacokinetic comparison of seven major bio-active components in normal and blood deficiency rats after oral administration of Danggui Buxue decoction by UPLC-TQ/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(1): 169-177.
- [27] Jin Y, Qu C, Tang Y P, *et al.* Herb pairs containing *Angelicae Sinensis Radix* (Danggui): A review of bio-active constituents and compatibility effects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 181(1): 158-171.

[责任编辑 郑礼胜]