

乌梅炒炭前后化学成分与药效变化及其炒炭止血原理研究

李春帅, 辛洁萍[#], 王海丽, 徐文娟, 宋肖桦, 叶先文, 张海霞, 李 千, 李向日*
北京中医药大学 中药炮制研究中心, 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 102400

摘要: **目的** 通过对乌梅炒炭前后化学成分及药效变化进行研究, 阐明乌梅炒炭的炮制原理。 **方法** 采用液质联用技术鉴定乌梅炒炭前后的化学成分并进行多元统计分析, 以小鼠肠推进和断尾实验比较乌梅炒炭前后药效的变化。 **结果** 乌梅炒炭前后化学成分具有明显差异, 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 将乌梅与乌梅炭化学成分聚为 2 组并标示出 6 个主要差异性成分, 其中柠檬酸-葡萄糖溶液 (acid citrate dextrose, ACD) 具有抗凝作用。药理实验结果表明, 乌梅水煎液和乌梅炭水煎液均具有涩肠作用, 乌梅炒炭后产生了止血作用, 止血作用的活性部位为透析袋内相对分子质量较大的成分。 **结论** 乌梅与乌梅炭均具有涩肠作用, 乌梅炭的止血作用可能与其炒炭后 ACD 等成分含量降低及产生的相对分子质量大的物质有关。

关键词: 乌梅; 乌梅炭; 炒炭止血; 炮制原理; 正交偏最小二乘法-判别分析

中图分类号: R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)24-7714-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.009

Changes in chemical composition and medicinal effect of *Mume Fructus* before and after charcoal frying and its principle of hemostasis

LI Chun-shuai, XIN Jie-ping, WANG Hai-li, XU Wen-juan, SONG Xiao-hua, YE Xian-wen, ZHANG Hai-xia, LI Qian, LI Xiang-ri

Research Center of Chinese Medicine Processing, Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

Abstract: Objective To elucidate the concoction principle of fried charcoal of Wumei (*Mume Fructus*) by investigating the changes of chemical composition and medicinal effect before and after fried charcoal. **Methods** The chemical constituents of *Mume Fructus* before and after charcoal frying were identified by liquid mass spectrometry and analyzed by multivariate statistical analysis, and the changes in the medicinal effects of *Mume Fructus* before and after charcoal frying were studied by intestinal propulsion and tail break experiments in mice. **Results** The results showed significant differences in the chemical composition of *Mume Fructus* before and after charcoal frying, and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) clustered the chemical composition of *Mume Fructus* and Wumeitan (*Mume Fructus Carbonisata*) into two groups and labeled six major differential components. Among them, acid citrate dextrose (ACD) had an anticoagulant effect. The results of pharmacological experiments showed that both the aqueous decoction of *Mume Fructus* and the aqueous decoction of *Mume Fructus Carbonisata* had an astringent effect, and the fried charcoal of *Mume Fructus* produced a haemostatic effect, with the active site of the haemostatic effect being mainly the large molecular weight substances in the dialysis bag. **Conclusion** Both *Mume Fructus* and *Mume Fructus Carbonisata* have astringent effects, and the haemostatic effect of *Mume Fructus Carbonisata* may be related to its reduced content of components such as ACD and the large molecular weight substances produced after frying.

Key words: *Mume Fructus*; *Mume Fructus Carbonisata*; charcoal medicine to stop bleeding; principle of concoction; orthogonal partial least squares discriminant analysis

乌梅始载于《神农本草经》^[1], 是一种常见的药食同源的中药, 《中国药典》2020 年版中规定其为蔷薇科杏属植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实, 具有敛肺、涩肠、生津、

收稿日期: 2022-06-02

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (2019YFC1711500)

作者简介: 李春帅, 女, 硕士研究生, 从事中药炮制与中药品质评价研究。Tel: 13693300317 E-mail: 1107224618@qq.com

*通信作者: 李向日, 女, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制与中药品质评价研究。Tel: 13601326248 E-mail: lixiangri@sina.com

[#]共同第一作者: 辛洁萍, 女, 硕士研究生, 从事中药炮制与中药品质评价研究。Tel: 17812003625 E-mail: xinjieping09@163.com

安蛔的功效，常用于治疗肺虚久咳、久泻久痢、虚热消渴、蛔厥、呕吐、腹痛等症^[2]。现代药理学研究表明，乌梅具有抑菌、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、抑制肾结石等作用^[3-5]。

宋代《证类本草》^[6]中最早提及乌梅炭“烧为末，杵末”。《汤液本草》^[7]中记载乌梅“治一切恶疮肉出，以乌梅烧为末，杵末傅”。乌梅及乌梅炭应用历史悠久，临床应用中，乌梅具有涩肠止泻的功效，乌梅炭新增止血功效。炭药是一类非常具有炮制特色的中药，具有广泛的药理作用，止血作用是其共性。炭药首次记载于战国时期的《五十二病方》“止出血者燔发”^[8]。关于炭药止血理论，学说众多，通常认为中药经炒炭炮制后，化学成分组成及含量发生了改变，从而产生止血作用^[9]。张向阳等^[10]研究发现地榆炭发挥止血作用可能与其鞣质含量相关。钟凌云等^[11]认为炭药止血作用是因为高温炮制后中药中的草酸钙或碳酸钙分解，可溶性钙盐含量升高，从而促进血液中的蛋白质凝固，激活凝血因子，产生凝血效果。随着中药炭药中纳米类成分碳点的研究逐渐兴起，研究发现，碳点存在于多种炭药中并产生止血作用^[12-13]，Cheng 等^[14]发现灯心草经炭烧处理后在其水提物可产生灯芯炭纳米碳点，可抑制血小板的减少和局部出血。

为探究乌梅及乌梅炭化学成分及药理作用的差异，阐明乌梅炒炭止血的科学内涵，本实验首先采用液质联用技术初步鉴定乌梅及乌梅炭水煎液中的化学成分，经偏最小二乘法统计分析可视化展示乌梅及乌梅炭水煎液化学成分的组间差异并明确了 6 个差异成分，然而小分子化合物的变化无法充分阐明乌梅炒炭止血的科学内涵。其次，以小鼠肠推进实验和断尾出血实验分别评价乌梅及乌梅炭的涩肠与止血作用，结果显示乌梅和乌梅炭均有涩肠作用，乌梅炒炭后产生了止血作用，且止血活性部位为乌梅炭透析袋内相对分子质量较大的成分。最后，采用低分辨透射电子显微镜（transmission electron microscope, TEM）、红外光谱等技术对乌梅炭止血活性部位进行初步结构表征，从相对分子质量大的化合物角度为乌梅炒炭止血的原理提供新的视角。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Scientific Q Exactive 型质谱仪，赛默飞世尔科技有限公司；FA1104 型电子天平，上海乐平科学仪器有限公司；HH-S6A 型电热恒温水浴锅，

北京科伟永兴仪器有限公司；SHB-III A 型循环水式多用真空泵，上海振捷试验设备有限公司；Thermo Scientific Nicolet Is10 型傅里叶红外光谱仪、Tecnai G2 20 型 TEM，美国 FEI 公司。

1.2 材料

乙腈（色谱纯，批号 F22M8G206）购自美国 Fisher 公司；甲酸（色谱纯，批号 214911）购自赛默飞世尔科技有限公司；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）；注射用白眉蛇毒凝血酶，购自锦州奥鸿药业有限责任公司；蒙脱石散，购自海南先声药业有限公司；0.9%氯化钠注射液（批号 1709283205）购自石家庄四药有限公司；水合氯醛（批号 20210915）购自上海麦克林生化科技有限公司；墨水、透析袋（截留相对分子质量 1000）购自北京正程生物科技有限公司；注射用白眉蛇毒血凝酶（hemocoagulase for injector, HI）购自北京正程生物科技有限公司。

共收集 6 批乌梅样品（MF1~MF6），经北京中医药大学李向日教授鉴定为蔷薇科杏属植物梅 *P. mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实，乌梅饮片信息见表 1。6 批乌梅样品（MF1~MF6）在 150~180 °C 下清炒 50 min，至乌梅皮肉鼓起，表面焦黑色为止，即得乌梅炭样品（MFC1~MFC6）。乌梅及乌梅炭样品如图 1 所示。

1.3 实验动物

SPF 级 KM 小鼠，5 周龄 60 只，4 周龄 60 只，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，实验动物生产许可证号 SYXK（京）2016-0038，饲养于北京中医药大学实验动物中心，室温 22~25 °C，相对湿度 60%，12 h/12 h 昼夜循环，本实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法与结果

2.1 乌梅水煎液和乌梅炭水煎液的制备

取乌梅饮片 20.0 g，分别以 40 倍量水煎煮 3 次，

表 1 乌梅样品信息

Table 1 Information on *Mume Fructus* samples

编号	产地	生产厂家	批号
MF1	四川	保和堂制药有限公司	20200116
MF2	云南	保和堂制药有限公司	20200830-1
MF3	云南	保和堂制药有限公司	20200830-2
MF4	四川	保和堂制药有限公司	20200830-3
MF5	四川	保和堂制药有限公司	20200830-4
MF6	云南	保和堂制药有限公司	20200830-5

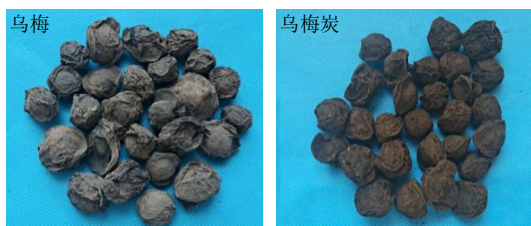


图 1 乌梅及乌梅炭样品

Fig. 1 Samples of *Mume Fructus* and *Mume Fructus Carbonisata*

每次 1 h。每次的煎煮液皆用滤纸滤过，合并煎煮液，浓缩成 1.0 g/mL（按照生药量计算），即得乌梅水煎液。于 4 °C 冰箱，保存备用。

将乌梅炭饮片 20.0 g，同法制成乌梅炭水煎液。于 4 °C 冰箱，保存备用。

将乌梅炭水煎液置于透析袋（截留相对分子量 1000）内透析，每隔一段时间换 1 次水，直至透析袋外溶液无色，收集每次换取的袋外溶液，浓缩至 1.0 g/mL（按照炭药量计算），得到乌梅炭透析袋外溶液（MFC-O）；同时收集透析袋内溶液，浓缩至 1.0 g/mL（按照炭药量计算），得到乌梅炭透析袋内溶液（MFC-I）；MFC-O 和 MFC-I 均放于 4 °C 冰箱中，保存备用。

2.2 液质联用（LC-MS）分析

2.2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色

谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；柱温 30 °C；样品室温度 15 °C；进样量 3 μL；以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相，梯度洗脱：0~6 min，3%~15%甲醇；6~20 min，15%~30%甲醇；20~27 min，30%~95%甲醇；27~28 min，95%~3%甲醇；28~30 min，3%甲醇；体积流量为 0.2 mL/min。

2.2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源（ESI），负离子模式扫描，毛细管温度 350 °C，鞘气和辅助气均为氮气（质量分数 >99%），鞘气流速 35 arb，辅助气流速 10 arb，喷雾电压 3200 V，最大喷射电流 100 A，扫描范围为 m/z 100~1500，数据采集系统为 Xcalibur 4.1。

2.3 成分解析

使用 Xcalibur 4.1 与 MZmine-2.53-Windows 软件对质谱数据进行处理，通过查阅文献^[15-18]和质谱相关网站，根据相关化合物的准分子离子峰、二级碎片离子峰、离子峰丰度比等质谱信息，初步推测化合物结构。

乌梅及乌梅炭水煎液质谱总离子流图见图 2，水煎液中初步鉴别出的化合物汇总表 2。

2.4 乌梅与乌梅炭化学成分正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA）

乌梅和乌梅炭水煎液的质谱数据（Raw 格式）

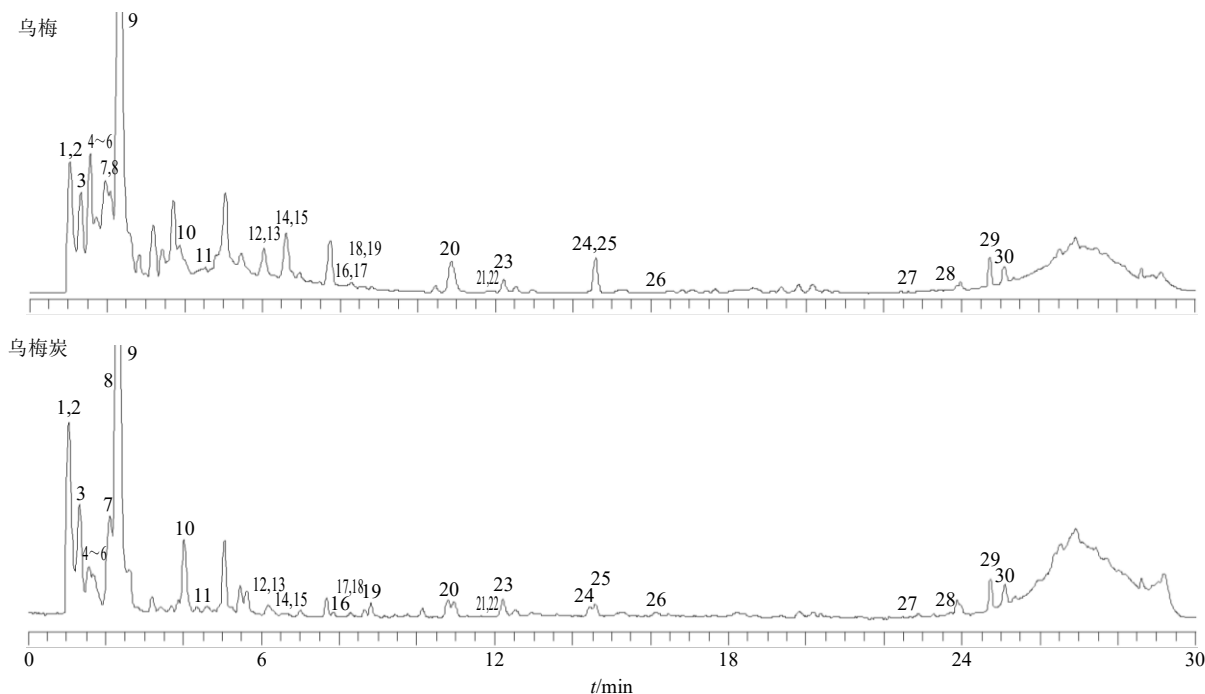


图 2 乌梅及乌梅炭质谱总离子流图

Fig. 2 Total ion flow diagram for mass spectrometry of *Mume Fructus* and *Mume Fructus Carbonisata*

表 2 乌梅及乌梅炭水煎液中鉴别出的化合物

Table 2 Compounds identified in aqueous decoction of *Mume Fructus* and *Mume Fructus Carbonisata*

峰号	化合物	<i>t_R</i> /min	离子	分子式	理论值 (<i>m/z</i>)	实际值 (<i>m/z</i>)	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片 (<i>m/z</i>)	乌梅	乌梅炭	炒炭后含量变化
1	赤藓糖醇	1.16	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₄ H ₁₀ O ₄	103.039 5	103.038 7	-7.76	103.038 7, 57.033 2	+	-	-
2	奎宁酸	1.19	[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.055 6	191.055 3	-1.57	191.055 3, 85.028 1	+	+	↑
3	酒石酸	1.26	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₆	149.008 6	149.008 1	-3.36	87.007 4, 71.012 5, 59.012 5	+	+	↓
4	延胡索酸	1.53	[M-H] ⁻	C ₄ H ₄ O ₄	115.003 1	115.002 4	-6.09	115.002 4, 71.012 5	+	+	↓
5	苹果酸	1.54	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₅	133.013 7	133.013 0	-5.26	115.002 4, 89.023 1, 71.012 5	+	+	↓
6	乌头酸	1.61	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₆ H ₆ O ₆	154.998 0	154.997 7	-1.94	154.997 7, 111.007 5, 83.012 5	+	+	↑
7	柠檬酸-葡萄糖溶液	1.94	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₃	353.072 0	353.071 7	-0.85	353.071 7, 111.007 2, 87.007 1	+	+	↓
8	2-脱氧肌苷	2.21	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	251.078 0	251.077 7	-1.19	251.077 7, 110.023 5, 59.012 4	+	-	-
9	枸橼酸	2.27	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 2	191.018 9	-1.57	129.018 2, 87.007 4, 85.028 2	+	+	↓
10	3-羟基戊二酸	3.98	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₅ H ₈ O ₅	129.018 8	129.017 9	-6.98	129.017 9, 85.028 1	+	+	↑
11	5-羟甲基糠醛	4.48	[M-H] ⁻	C ₆ H ₆ O ₃	125.023 9	125.023 2	-5.60	125.023 2, 81.033 2, 65.002 0	+	+	↑
12	焦酒石酸	6.13	[M-H] ⁻	C ₅ H ₈ O ₄	131.034 4	131.033 9	-3.82	131.033 9, 115.919 4, 87.043 8	+	+	↓
13	咖啡酸	6.17	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 4	179.034 6	1.12	179.034 6, 135.044 0, 74.993 4	+	+	↓
14	龙胆酸	6.49	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	153.018 8	153.018 2	-3.92	153.018 2, 109.028 2, 80.963 7	+	+	↑
15	二羟基苯乙酸	6.71	[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₄	167.034 4	167.034 0	-2.39	167.034 0, 123.043 8, 65.038 3	+	+	↑
16	邻甲氧基苯酚	7.99	[M-H] ⁻	C ₇ H ₈ O ₂	123.044 6	123.044 0	-4.88	123.044 0, 95.048 8	+	+	↓
17	没食子酸	8.16	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	169.013 7	169.013 5	-1.18	125.022 8, 97.028 2, 65.001 9	+	+	↓
18	水杨酸	8.20	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 9	137.023 3	-5.84	137.023 3, 93.033 3, 65.001 9	+	+	↓
19	番石榴酸	8.73	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₇	255.050 5	255.050 9	-1.61	181.049 2, 167.070 6, 149.059 6	+	+	↑
20	4-乙酰氧基苯酚	10.76	[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₃	151.039 5	151.039 0	-3.31	151.039 0, 123.007 3, 109.028 2	+	+	↓
21	香草酸	11.64	[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₄	167.034 4	167.033 4	-5.99	167.033 4, 152.010 5, 123.044 0	+	+	↓
22	苯甲酸	11.92	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₂	121.029 0	121.028 3	-5.78	121.028 3, 93.033 2	+	+	↓
23	莽草酸	12.15	[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₀ O ₅	173.045 0	173.044 3	-4.05	173.044 3, 111.007 5	+	+	↑
24	2-O-阿魏酸-羟基柠檬酸	14.43	[M+FA-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁	429.066 9	429.067 3	0.93	133.013 1, 111.007 3, 87.007 1	+	+	↑
25	苯甲基-β-樱草糖苷	14.69	[M+FA-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	447.150 3	447.150 5	0.45	401.145 7, 269.102 8, 101.023 1	+	+	↓
26	2-丁酰呋喃	16.32	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₈ H ₁₀ O ₂	119.049 7	119.048 9	-6.72	119.048 9, 65.332 5	+	+	↓
27	柚皮素	22.60	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	253.050 1	253.048 8	-5.14	253.048 8, 158.715 5	+	-	-
28	阿魏酸	23.58	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.050 1	193.049 9	-1.04	193.049 9, 161.022 9, 137.023 2	+	+	↑
29	丁香酸	24.54	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	179.034 4	179.034 3	-0.56	179.034 3, 81.335 4	+	+	↓
30	七叶亭	25.33	[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	159.008 2	159.007 3	-5.66	159.007 3, 131.012 5, 102.987 5	+	+	↓

“+”表示存在，“-”表示不存在，“↑”表示含量上升，“↓”表示含量下降

“+” indicates presence, “-” indicates absence, “↑” indicates increasing content, “↓” indicates a decrease in content

通过 QI 软件进行标准化处理, 处理后的数据以 *usp* 格式导入 SIMCA 14.1 软件进行多元统计分析。将乌梅和乌梅炭水煎液 2 组样品进行 OPLS-DA, 结果见图 3, 并绘制 S-plot 散点图以显示 2 组样品的差异性成分, 结果见图 4。

从 OPLS-DA 图 (图 3) 中可以看出, 乌梅和乌梅炭水煎液可明显分为 2 类, 提示乌梅炮制后成分含量或组成发生了较大的变化。S-plot 散点图 (图

4) 表明二者之间存在 6 个显著差异性成分, 分别为苯甲基-β-樱草糖苷 (峰 25)、枸橼酸 (峰 9)、柠檬酸-葡萄糖溶液 (acid citrate dextrose, ACD, 峰 7)、番石榴酸 (峰 19)、3-羟基戊二酸 (峰 10)、2-O-阿魏酸-羟基柠檬酸 (峰 24), 其中 ACD 具有抗凝作用^[19-22], 且经炒炭炮制后含量降低。

2.5 小鼠肠推进实验

5 周龄 KM 小鼠按体质量随机分为对照组、蒙

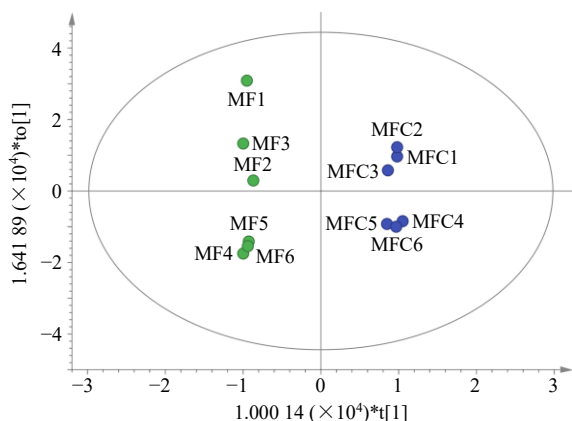
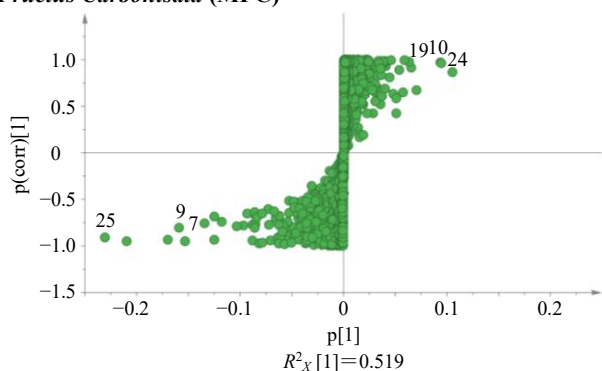


图 3 乌梅 (MF) 与乌梅炭 (MFC) 的 OPLS-DA 图

Fig. 3 OPLS-DA plot of *Mume Fructus* (MF) and *Mume Fructus Carbonisata* (MFC)



图中数字代表峰号, 与表 2 同

the numbers in figure represent the peak numbers, same as table 2

图 4 乌梅与乌梅炭 S-plot 散点图

Fig. 4 S-plot scatter plot for of *Mume Fructus* and *Mume Fructus Carbonisata*

脱石散组、MF 组、MFC 组、MFC-O 组以及 MFC-I 组, 每组 6 只。对照组将生理盐水与 50%墨水 1 : 1 混合, 以 2 g/kg 的剂量给药。蒙脱石散组取 1.75 g 蒙脱石散用生理盐水稀释成 17.5 mg/mL 的溶液, 与 50%墨水 1 : 1 混合, 以 0.5 g/kg 的剂量给药。MF、MFC、MFC-O 和 MFC-I 给药组将“2.1”项下溶液用生理盐水稀释, 得到质量浓度为 700 mg/mL (按原药材的质量计算) 的溶液, 与 50%墨水 1 : 1 混合, 以 2 g/kg 的剂量单次给药。实验前 12 h 禁食, 自由饮水。给药 30 min 后将各组小鼠以颈椎脱臼法处死。立即解剖取出上端自幽门, 下端至回盲部的全部小肠肠管, 用卷尺测量小肠肠道全长及墨汁在肠道内推进长度, 依公式计算墨汁推进率。

墨汁推进率 = 肠管染黑长度 / 小肠肠管总长度

实验结果如表 3 所示。与对照组相比, 蒙脱石散、MFC 组在涩肠作用方面具有显著性差异 ($P < 0.05$), MF 组在涩肠作用方面具有极显著性差异

表 3 小鼠肠推进实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Results of intestinal propulsion experiments in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	全长/cm	推进/cm	推进率/%
对照	50.8 ± 5.6	42.7 ± 5.1	83.9 ± 3.0
蒙脱石散	55.2 ± 7.1	41.8 ± 5.4	75.7 ± 7.1*
MF	55.9 ± 4.1	37.9 ± 6.7	67.8 ± 8.5***
MFC	53.0 ± 4.9	37.5 ± 4.4	70.8 ± 11.0*
MFC-O	57.5 ± 5.3	45.4 ± 8.1	79.1 ± 10.9
MFC-I	53.8 ± 5.8	42.1 ± 3.8	78.4 ± 8.1

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below tables

($P < 0.001$); MFC-I 组和 MFC-O 组无显著性差异, 但均有明显的下降趋势。说明乌梅炭的涩肠作用是透析袋内和透析袋外 2 部分成分共同发挥作用的。

2.6 小鼠断尾止血实验

4 周龄 KM 小鼠按照体质量随机分为对照组、HI 组、MF 组、MFC 组、MFC-O 组以及 MFC-I 组, 每组 7 只, 其中对照组 ig 生理盐水, 给药剂量 0.5 mL/只。HI 组用 10 mL 的生理盐水分次溶解 1 kU HI 粉末, 配制成 0.1 kU/mL 的溶液, 置于锡箔纸包裹的离心管中, 给药剂量 0.2 mL/只。MF、MFC、MFC-O 以及 MFC-I 给药组: 将“2.1”项下溶液用生理盐水稀释, 得到质量浓度为 100 mg/mL (按原药材的质量计算) 的溶液, 给药剂量 0.5 mL/只, 均为单次给药。给药方式为 sc 给药, 给药 2 h 后, 将小鼠用 10%水合氯醛以 0.01 g/g 的剂量 ip 麻醉, 平放于手术台上, 用剪刀于距离小鼠 1 cm 尾尖处剪断, 待血液开始自行溢出时计时, 每 30 s 用滤纸吸附尾尖血滴 1 次, 直至再无血液流出 (即滤纸吸附时无血迹出现)。从断尾血液流出开始到出血时间停止, 此段时间即为出血时间, 记录实验结果。

从小鼠断尾血液开始流出到流血停止流出为出血时间, 6 组小鼠断尾出血时间记录如表 4 所示。与对照组相比, MF 组小鼠断尾出血无显著差异, HI 组和 MFC 组的小鼠断尾出血时间明显缩短 ($P <$

表 4 小鼠断尾实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Results of tail-breaking experiments in mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	出血时间/min	组别	出血时间/min
对照	9.8 ± 2.3	MFC	5.1 ± 1.3**
HI	4.1 ± 0.4**	MFC-O	9.3 ± 1.6
MF	9.1 ± 1.9	MFC-I	5.3 ± 1.5**

0.01), 说明乌梅炒炭后产生了止血作用; 而 MF 组和 MFC-O 组小鼠断尾出血时间无显著性差异, 说明乌梅水煎液和乌梅炭透析袋外溶液并不能起到止血作用; MFC-I 组小鼠断尾出血时间明显缩短 ($P < 0.01$), 说明乌梅炭止血作用的活性部位是透析袋内大分子成分。

2.7 乌梅炭透析袋内成分的结构表征

透析袋是由半透膜制成袋状容器, 样品溶液在透析过程中相对分子质量较大的分子被截留在袋内, 盐和小分子物质不断扩散并从袋中透析出来, 直到袋内外的浓度达到平衡。小鼠断尾出血实验结果显示, 乌梅炭止血作用的活性部位主要为透析袋内相对分子质量较大的成分, 故而对乌梅炭透析袋内成分进行结构表征。

2.7.1 TEM 分析 以去离子水为溶剂, 将制备的 MFC-I 溶液稀释成一定质量浓度, 超声 30 min, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。将获取的 MFC-I 溶液滴于铜网上, 阴干后利用 TEM 分析。由图 5 可以看出, MFC-I 中分布着外形近球形的颗粒, 在水中具有良好的分散度, 粒径小于 5 nm。

2.7.2 红外光谱 (FTIR) 分析 电子分析天平称取溴化钾粉末 100 mg; 将 1 滴 MFC-I 与 100 mg 溴化钾混合, 烘干后碾磨成细粉, 置于模具中压片。尽量避免样片长时间暴露于空气中, 然后迅速放入红

外测试仪的样品架中测定其 FTIR。从图 6 可以看出, 该部分的官能团吸收峰位于 3 425.09、2 969.93、2 925.04、2 854.41、1 734.89、1 617.59、1 410.23、1 086.54、1 049.90、880.93 cm^{-1} 等。通过分析可知, 波数为 3 425.09 cm^{-1} 的吸收峰, 是 -OH 或 -NH 的伸缩振动峰, 与分子间氢键的伸缩振动相关; 波数为 2 925.04、2 854.41 cm^{-1} 的吸收峰与 -CH₃ 和 -CH₂ 的对称和不对称伸缩有关; 波数为 1 734.89 cm^{-1} 由 C=O 的伸缩振动引起; 波数为 1 617.59 cm^{-1} 吸收峰由 C=C 的伸缩振动引起, 波数在 1010~667 cm^{-1} 的为 C-H 的面外弯曲振动引起。同时在 1650~1430 cm^{-1} 区域内只存在 1 617.59 cm^{-1} 1 个吸收峰, 故推测 MFC-I 中的成分不含苯环。综上 MFC-I 的表面活性基团主要以 C=O、-OH 或 -NH 以及 C=C 为主。

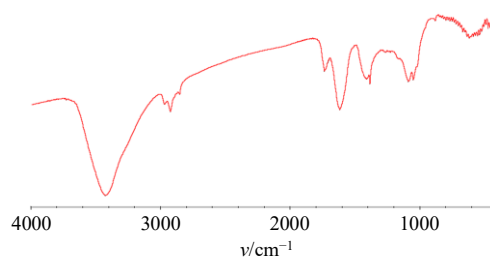


图 6 MFC-I 的 FTIR 图

Fig. 6 Infrared spectrum of MFC-I

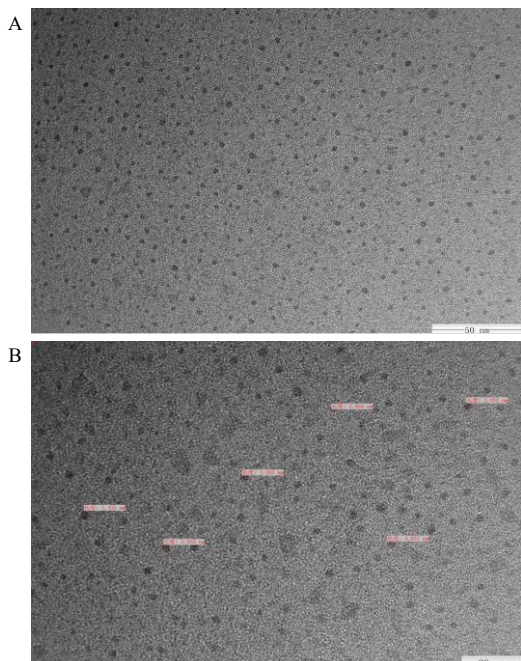


图 5 MFC-I 的低分辨电镜图 ($\times 200\ 000$, A; $\times 300\ 000$, B)
Fig. 5 Low-resolution electron micrograph of MFC-I ($\times 200\ 000$, A; $\times 300\ 000$, B)

3 讨论

乌梅性平, 味酸涩, 具有敛肺、涩肠、生津、安蛔的功效, 炒炭后产生了止血的功效^[23]。通过对乌梅和乌梅炭水煎液中的化学成分进行解析, 可以看出乌梅中多数成分为有机酸类化合物, 符合乌梅味酸涩的特点。对比乌梅与乌梅炭水煎液的化学成分可以发现, 赤藓糖醇、2'-脱氧肌苷、柚皮素等成分在乌梅炭水煎液中并未检测到, 推测可能在炒制的过程中发生了分解和转化。

小鼠肠推进实验表明, 乌梅与乌梅炭均具有涩肠作用。MFC-I 溶液和 MFC-O 溶液与 MFC 组相比无显著差异, 但仍有涩肠作用, 说明乌梅炭的涩肠作用是由透析袋内和透析袋外 2 部分共同组成。液质数据分析乌梅炒炭前后化学成分的变化, 发现乌梅与乌梅炭有机酸化合物基本一致, 推测这些化合物是乌梅与乌梅炭涩肠作用的共同物质基础。

小鼠断尾出血实验表明, 乌梅本身并没有止血作用, 炒炭后产生了止血作用, 乌梅炭止血作用的活性部位主要是乌梅炭透析袋内成分。乌梅炭水煎

液经由透析袋透析, 相对分子质量较大的分子被截留在袋中, 对乌梅炭透析袋内成分进行结构表征, 发现其在 TEM 下为粒径小于 5 nm 的近球形颗粒, 在水中分散度良好。FTIR 显示, 乌梅炭透析袋内成分的表面活性基团主要以 C=O、-OH 或-NH 以及 C=C 为主, 且不含苯环。由此推测乌梅炒炭后可能产生了某些相对分子质量较大的物质, 该物质具有止血作用。此外, 液质数据分析发现, 乌梅中具有抗凝作用的化合物 ACD 在炒炭后含量降低, 从而导致乌梅炭抗凝作用减弱, 这也可能是乌梅炭产生止血作用的原因之一。

以上实验结果说明了乌梅炒炭前后化学成分和药理作用的变化, 对乌梅炭止血作用的有效部位, 即透析袋内的相对分子质量较大的化合物, 进行了初步的结构表征, 为乌梅炒炭止血理论提供新的研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈润东.《神农本草经》[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018: 12.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 81.
- [3] 张华月, 李琦, 付晓伶. 乌梅化学成分及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(S1): 296-300.
- [4] Gong X P, Tang Y, Song Y Y, *et al.* Comprehensive review of phytochemical constituents, pharmacological properties, and clinical applications of *Prunus mume* [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 679378-679378.
- [5] 张小琼, 侯晓军, 杨敏, 等. 乌梅的药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3567-3570.
- [6] 唐慎微.《证类本草》[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 7.
- [7] 王好古.《汤液本草》[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018: 11.
- [8] 张雷. 马王堆汉墓帛书《五十二病方》集注 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2017: 10.
- [9] 赵玉升, 李伟洋, 曹天佑, 等. 中药炭药止血物质基础概述 [J]. 中医药导报, 2021, 27(8): 56-60.
- [10] 张向阳, 魏红, 韩建国. 地榆炭烘法炮制工艺实验研究 [J]. 河北中医, 2014, 36(7): 1065-1067.
- [11] 钟凌云, 龚千锋, 张的风. 中药炒炭的炮制机理 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13(1): 19.
- [12] Wang Y Z, Kong H, Liu X M, *et al.* Novel carbon dots derived from *Cirsii Japonici Herba Carbonisata* and their haemostatic effect [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(9): 1635-1644.
- [13] Zhang M L, Zhao Y, Cheng J J, *et al.* Novel carbon dots derived from *Schizonepetae Herba Carbonisata* and investigation of their haemostatic efficacy [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2017, 46(8): 1-10.
- [14] Cheng J J, Zhang M L, Sun Z W, *et al.* Hemostatic and hepatoprotective bioactivity of *Junci Medulla Carbonisata*-derived carbon dots [J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(4): 431-446.
- [15] 苗志伟, 刘玉平, 孙宝国. SDE-GC-MS 分析乌梅中挥发性成分 [J]. 食品科学, 2011, 32(24): 270-273.
- [16] 李书帆, 刘毅, 江汉美, 等. HS-SPME-GC-MS 法分析乌梅与炮制品中挥发性成分 [J]. 湖北农业科学, 2021, 60(9): 113-116.
- [17] Wang R, Cheng H, Yang Y T, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry combined with chemometric analysis as an approach for the quality evaluation of *Mume Fructus* [J]. *J Sep Sci*, 2022, 45(11): 1884-1893.
- [18] 李书帆, 刘毅, 江汉美, 等. HS-SPME-GC-MS 法分析乌梅与炮制品中挥发性成分 [J]. 湖北农业科学, 2021, 60(9): 113-116.
- [19] 朱利娟, 张卉卉, 纪明慧, 等. 局部枸橼酸抗凝在危重症患儿连续性肾脏替代治疗中的应用进展 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2021, 10(5): 274-277.
- [20] 吴梁晖, 梁晖. 枸橼酸抗凝法在维持性血液透析中的应用进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(11): 1026-1029.
- [21] Wright S, Steinwandel U, Ferrari P. Citrate anticoagulation using ACD solution A during long-term haemodialysis [J]. *Nephrology*, 2011, 16(4): 396-402.
- [22] Ooi E L, Lim T W, Lim N. Comparison of the efficacy and safety of two regional citrate anticoagulation protocols using acid citrate dextrose A or Prismocitrate 10/2, in patients with acute renal failure undergoing continuous venovenous haemodiafiltration [J]. *Crit Care*, 2010, 14(Suppl 1): P515.
- [23] 李景丽, 杨宏乔, 刘静, 等. 乌梅生品及其不同制炭品止血作用的对比研究 [J]. 陕西中医, 2014, 35(12): 1680-1681.

[责任编辑 郑礼胜]