

基于 UPLC-Q-Exactive Plus-Orbitrap MS 的丹参提取物成分表征及其抗血栓作用谱效相关药效物质基础解析

刘悦^{1,2}, 丁晓彦³, 王娜⁴, 高燕¹, 杨龙飞¹, 吕婧¹, 韩利文⁵, 傅春升^{6*}, 赵瀚年^{1*}

1. 山东中医药大学 药物研究院, 黄河流域特色中药生态保护和高质量发展协同创新中心 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院 药学部, 山东 济南 250014

3. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

4. 山东现代学院, 山东 济南 250104

5. 山东第一医科大学(山东省医学科学院), 药学院(药物研究所), 山东 济南 250024

6. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 研究不同产地丹参 *Salvia miltiorrhiza* 提取物化学成分与其抗血栓作用的谱效关系, 分析丹参提取物的抗血栓活性成分。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)法建立丹参提取物的指纹图谱; 结合层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA)探讨不同产地丹参的成分差异; 以斑马鱼为模式生物测定不同产地丹参提取物的抗血栓活性; 利用偏最小二乘回归(partial least squares regression, PLSR)分析进行谱-效相关研究, 筛选出药效贡献较大成分。**结果** 通过聚类分析, 60批丹参样品聚为2类; OPLS-DA筛选出2组间的15个差异共有峰; PLSR分析提示在标定的39个共有峰中, 与丹参抗血栓活性最相关的化合物可能为峰1(二糖)、峰31(新隐丹参酮)、峰26(丹参醛)、峰34(隐丹参酮)、峰39(二氢隐丹参酮)、峰8(迷迭香酸)、峰18(4-甲基丹酚酸酯B或异构体)和峰17(丹酚酸B)。**结论** 借助中药谱效学初步阐释了丹参抗血栓作用的药效物质基础, 为丹参谱-效相关质量评价体系的建立提供科学依据, 为丹参临床治疗血栓性疾病提供数据支持。

关键词: 丹参; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS; 斑马鱼; 抗血栓; 偏最小二乘回归分析; 新隐丹参酮; 丹参醛; 隐丹参酮; 二氢隐丹参酮; 迷迭香酸; 4-甲基丹酚酸酯B; 丹酚酸B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)05-1609-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.019

Component characterization of *Salvia miltiorrhiza* extracts based on UPLC-Q-Exactive Plus-Orbitrap MS and analysis of pharmacodynamic material basis related to spectral effect of its antithrombotic activity

LIU Yue^{1,2}, DING Xiaoyan³, WANG Na⁴, GAO Yan¹, YANG Longfei¹, LYU Jing¹, HAN Liwen⁵, FU Chunsheng⁶, ZHAO Bonian¹

1. Collaborative Innovation Center for Ecological Protection and High Quality Development of Characteristic Traditional Chinese Medicine in Yellow River Basin, Institute of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

3. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

4. Shandong Xiandai University, Jinan 250104, China

5. School of Pharmaceutical Sciences (Institute of Materia Medica), Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250024, China

6. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 山东省重点研发计划子课题(2021CXGC010511-01-005); 山东省自然科学基金联合基金项目(ZR2021LZY021)

作者简介: 刘悦, 女, 主管药师, 研究方向为中药质量综合评价及中药临床药学。Tel: 15053169801 E-mail: liuyue05050@163.com

*通信作者: 赵瀚年, 男, 研究员, 博士生导师。Tel: (0531)89628615 E-mail: bonianzh@163.com

傅春升, 男, 主任药师, 从事中药新制剂、新工艺研究。E-mail: yfuchunsheng@163.com

Abstract: Objective To study the spectral effect between chemical components of *Salvia miltiorrhiza* extracts from different origins and their antithrombotic activity, and analyze the antithrombotic active components of *S. miltiorrhiza* extracts. **Methods** The fingerprints of *S. miltiorrhiza* extracts were established by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS; The ingredient differences of *S. miltiorrhiza* from different origins were investigated through hierarchical cluster analysis (HCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA); Zebrafish was used as a model to determine the antithrombotic activity of *S. miltiorrhiza* extracts from different origins; Partial least squares-discriminant (PLSR) analysis was applied to analyze the spectrum-effect correlation, so as to screen out the ingredients with greater contribution to efficacy. **Results** It was found that 60 batches of samples were clustered into two categories by cluster analysis; A total of 15 differential common peaks were screened by OPLS-DA between the two groups; PLSR analysis suggested that among the 39 identified common peaks, the compounds most relevant to the antithrombotic activity of *S. miltiorrhiza* might be peak 1 (disaccharide), peak 31 (neocryptotanshinone), peak 26 (tanshialdehyde), peak 34 (cryptotanshinone), peak 39 (dihydro-cryptotanshinone), peak 8 (rosmarinic acid), peak 18 (4-methyl salvianolate B or isomer) and peak 17 (salvianolic acid B). **Conclusion** This study preliminarily explains the pharmacodynamic material basis of antithrombotic effect of *S. miltiorrhiza* by means of the spectrum-efficacy of traditional Chinese medicine, which provides scientific basis for the establishment of spectrum-effect related quality evaluation system, and provides data support on the clinical treatment of thrombotic diseases with *S. miltiorrhiza*. **Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bge.; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS; zebrafish; antithrombotic activity; partial least squares regression analysis; neocryptotanshinone; tanshialdehyde; cryptotanshinone; dihydro-cryptotanshinone; rosmarinic acid; 4-methyl salvianolate B; salvianolic acid B

血栓是引起缺血性疾病的主要原因,中医认为,血栓的形成与患者气血运行不畅、气滞血瘀有关,因此,中医临床常用活血化瘀类中药治疗血栓性疾病^[1-2],代表药味有丹参、三七、川芎、桃仁、红花、赤芍等。该类药物不仅可以抑制血小板活化和炎症反应,还可以改善纤溶系统、凝血系统等,通过多种途径共同发挥抗血栓作用^[3]。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根或根茎,为中医活血化瘀的要药,主要成分包括脂溶性的丹参酮 I、丹参酮 II_A、水溶性的丹酚酸类与多酚酸类等,具有抗血小板聚集、抑制黏附因子表达、抗氧化、抗癌等作用^[4]。关于丹参抗血小板聚集作用的研究早在 1982 年就有报道,不少临床资料也证实丹参制剂对血栓性疾病有较好的疗效^[5-7]。故本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)建立丹参指纹图谱,采用花生四烯酸诱导的斑马鱼血栓模型,对不同产地丹参的抗血栓作用进行考察,并运用数理统计方法将指纹图谱化学信息与药效学信息进行相关性研究,以期表征丹参的抗血栓效应组分,为丹参抗血栓作用谱-效关系研究奠定基础,为丹参临床治疗血栓性疾病提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Hypersil GOLD 液相色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)、UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS(美国赛默飞世尔科技公司); SB4200DTS 型超

声波双频清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); BP211D 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司); KDM 型可调控温电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司); FDY1002-UV-P 型低有机物型超纯水机(青岛富勒姆科技有限公司); DL-SC05 型微型涡旋混悬仪(北京东陵昌盛生物科技有限公司); IX83+DP8 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 6 孔板(美国 Corning 公司); KQ-300DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ZSA0745 型连续变倍体式显微镜(重庆光电仪器有限公司); Research plus 移液枪(德国 Eppendorf 公司); HPG-280BX 型恒温光照培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 斑马鱼养殖系统(五层单排,上海海圣生物实验设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

乙腈(批号 219087)、甲酸(批号 193497)购自赛默飞世尔(上海)仪器有限公司; 对照品隐丹参酮(批号 110852-201807)、丹参酮 I(批号 110867-201607)、丹参酮 II_A(批号 110766-202022)、丹参素(批号 110855-201915)、丹酚酸 B(批号 111562-201716)、咖啡酸(批号 110885-201703)由中国食品药品检定研究院提供,质量分数均>98%; 对照品丹酚酸 A(批号 Z23D10X106625)、原儿茶醛(批号 TO1013FB14)、迷迭香酸(批号 Y16A9K67403)和紫草酸(批号 Y04J10H75487)由上海源叶生物科技有限公司提供,质量分数均>98%; 二氢丹参酮 I

对照品(批号 PRF7033101, 质量分数>98%)购自成都普思生物科技股份有限公司; 牛蒡子苷对照品(批号 PRF7033101, 质量分数>98%)购自成都普瑞法科技开发有限公司; 花生四烯酸(arachidonic acid, AA, 批号 D1827021)购自上海 Aladdin 公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 39075)购自上海 Sangon 生物科技公司; 玲联茴香胺(批号 MKCC7501)、阿司匹林(批号 MKCD0957)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 4%多聚甲醛(批号 B35F001200)购自武汉 Servicebio 公司。

1.3 动物

成年 AB 系斑马鱼(山东第一医科大学药学院提供)培养于专业的养殖系统, 保持恒温(28.0±0.5)℃, 14 h/10 h 光/暗循环。每天分别于 9:00 和 16:00 时投喂丰年虾。需要用卵时, 把成年雄雌斑马鱼按 2:1 的比例放在交配缸中分隔板的两边; 次日早晨抽去隔板, 斑马鱼受光照刺激自然交配产卵。在产卵后 30 min 内收集胚胎。收集的胚胎移入装有养鱼水(5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl₂、0.16 mmol/L MgSO₄)的培养皿中, 28.5℃培养 72 h, 备用。

1.4 药材

不同产地 60 批丹参饮片(表 1)购自安徽亳州中药材交易中心, 经山东省中医药研究院丁晓彦副研究员鉴定, 均为丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。粉碎过 40 目筛, 备用。

2 方法

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 Thermo Hypersil GOLD 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 90%~85% B; 5~10 min, 85%~80% B; 10~23 min, 80%~75% B; 23~26 min, 75%~40% B; 26~36 min, 40% B; 36~40 min, 40%~5% B; 40~41 min, 5%~90% B。体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30℃; 检测波长 285 nm; 进样量 6 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(electric spray ion source, ESI), 正、负离子检测模式; 扫描范围 *m/z* 100~1 500; 鞘气体积流量 1 132.67 L/h; 辅助气体积流量 283.17 L/h; 毛细管温度 350℃; 辅助气温度 320℃; 喷雾电压为+3.50 kV(正离子模式)和-3.00 kV(负离子模式); 扫描模式为 FullMs/dd-*Ms*², FullMs 分辨率 70 000, dd-*Ms*²分辨率 17 500。

表 1 丹参样品信息

Table 1 Information of *S. miltiorrhiza* samples

编号	批号	来源	编号	批号	来源
AH-0	201206	安徽	SD-0	201001	山东
AH-1	200801	安徽	SD-1	191101	山东
AH-2	200101	安徽	SD-2	190701	山东
AH-3	200401	安徽	SD-3	190301	山东
AH-4	200701	安徽	SD-4	180801	山东
AH-5	190301	安徽	SD-5	190401	山东
AH-6	191201	安徽	SD-6	200703	山东
AH-7	200702	安徽	SD-7	201201	山东
AH-8	191101	安徽	SD-8	201101	山东
AH-9	200501	安徽	SD-9	200101	山东
HB-0	201001	河北	SX-0	191001	山西
HB-1	201101	河北	SX-1	200501	山西
HB-2	200801	河北	SX-2	191201	山西
HB-3	210201	河北	SX-3	201201	山西
HB-4	201201	河北	SX-4	190601	山西
HB-5	210401	河北	SX-5	200701	山西
HB-6	210302	河北	SX-6	201001	山西
HB-7	210701	河北	SX-7	200101	山西
HB-8	210501	河北	SX-8	190301	山西
HB-9	201202	河北	SX-9	200401	山西
JS-0	190601	江苏	SC-0	201201	四川
JS-1	201201	江苏	SC-1	201001	四川
JS-2	200102	江苏	SC-2	210601	四川
JS-3	190401	江苏	SC-3	210301	四川
JS-4	200801	江苏	SC-4	200601	四川
JS-5	200301	江苏	SC-5	210401	四川
JS-6	200101	江苏	SC-6	210201	四川
JS-7	201001	江苏	SC-7	201101	四川
JS-8	200801a	江苏	SC-8	200801	四川
JS-9	200901	江苏	SC-9	210701	四川

2.1.3 对照品溶液和内标溶液的制备 精密称定原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、咖啡酸、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、二氢丹参酮 I 对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 1.200、1.730、1.450、1.260、1.150、0.950、0.020 4、0.108、0.100、1.200 mg/mL 的对照品溶液。精密称定丹参素钠对照品适量, 加 50%甲醇制成质量浓度为 422.5 μg/mL 的对照品溶液。精密称定牛蒡子苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 51.5 μg/mL 的内标溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备

(1) 冻干粉 I 的制备: 精密称定丹参粉末 3 g, 置圆底烧瓶中, 加 95%乙醇 120 mL, 回流提取 1 h, 放至室温, 称定质量, 补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 mL, 制成冻干粉 I, 余滤液另器留存, 残渣晾干备用。

(2) 冻干粉 II 的制备: 取“2.1.4 (1)”项下的

残渣, 置圆底烧瓶中, 加 50%乙醇 90 mL, 回流提取 1.5 h, 放至室温, 称定质量, 补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 7.5 mL, 制成冻干粉 II, 余滤液另器留存, 残渣晾干备用。

(3) 冻干粉 III 的制备: 取“2.1.4 (2)”项下的残渣, 置圆底烧瓶中, 加水 120 mL, 回流提取 0.5 h, 放至室温, 称定质量, 补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 mL, 制成冻干粉 III, 余滤液另器留存。

(4) UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 检测用供试品溶液的制备: 冻干粉 I 用甲醇转移至 100 mL 量瓶中, 定容、混匀得溶液 a; 冻干粉 II 以 50%甲醇为溶剂, 同法操作得溶液 b; 冻干粉 III 以水为溶剂, 同法操作得溶液 c; 取 a、b、c 3 种溶液等体积混合均匀后, 与内标溶液等体积混匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

(5) 药效实验用样品溶液的制备: 分别取“2.1.4 (1) (2) (3)”项下的余滤液 30、22.5、30 mL 合并冻干; 用 5 mL DMSO 将冻干粉转移至 EP 管中, 加养鱼水 20 mL, 超声处理 3 min, 配成 30 mg/mL 的母液, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用; 药效试验前用养鱼水稀释为所需质量浓度。

2.1.5 方法学考察

(1) 精密度考察: 取丹参样品 (批号 200601), 按照“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”“2.1.2”项下分析条件, 连续进样 6 次, 采集图谱并处理, 计算各共有峰与内标峰的相对峰面积及相对保留时间 RSD 值。

(2) 重复性考察: 取同一批丹参样品, 按照“2.1.4”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按照“2.1.1”“2.1.2”项下分析条件, 分别测定, 采集图谱并处理, 计算各共有峰与内标峰的相对峰面积及相对保留时间 RSD 值。

(3) 稳定性考察: 取同一批丹参样品, 按照“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”“2.1.2”项下分析条件, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 采集图谱并处理, 计算各共有峰与内标峰的相对峰面积及相对保留时间 RSD 值。

2.1.6 指纹图谱的建立 取 60 批丹参样品, 按照“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”“2.1.2”项下分析条件进样检测, 记录色谱图。选取峰纯度较高、分离较好的色谱峰为共有峰。根据国内外专业数据库 Pubchem Compound 以及丹参化学成分、质谱研究相关文献, 收集丹参中各种化学成分信息,

导入 Xcalibur 软件, 根据相对分子质量误差 $<1 \times 10^{-5}$, 并结合二级质谱碎片信息、保留时间、对照品的信息以及相关文献数据, 对共有峰进行定性、相对定量分析。

2.2 丹参抗血栓药效学研究

2.2.1 AA 对斑马鱼心脏红细胞染色面积的影响 选用受精后 72 h (72 h post fertilization, 72 hpf) 的 AB 系斑马鱼, 脱膜后在荧光显微镜下筛选发育正常的幼鱼于 6 孔板中, 设置对照组 (0.1% DMSO)、模型组 (AA 质量浓度分别为 20、24、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每组 1 孔, 每孔 15 条斑马鱼, 给药后放入 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中继续培养 1 h^[8]造成血栓, 之后用玲联茴香胺染液避光染色 15 min, 移除染色液, 用养鱼水清洗 2 次, 4%多聚甲醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。每组随机选取 8 条斑马鱼在荧光显微镜下采集图像, 利用 Image Pro Plus 6.0 软件测量斑马鱼心脏红细胞染色面积, GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析, 各组结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以确定最佳建模浓度。

2.2.2 不同质量浓度丹参提取物对斑马鱼尾静脉血栓的影响 取 72 hpf AB 系斑马鱼于培养皿中, 在显微镜下挑选发育正常的斑马鱼于 6 孔板中, 每孔 15 条。设置对照组 (0.1% DMSO)、模型组 (0.1% DMSO 培养 6 h 后加入 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AA)、阳性对照组 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林培养 6 h 后加入 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AA) 和丹参给药组 (分别给予 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹参提取物预处理 6 h 后加入 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AA), 置 28 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中培养 1 h, 之后用玲联茴香胺染液避光染色 15 min, 移除染色液, 用养鱼水清洗 2 次, 4%多聚甲醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。每组随机选取 8 条斑马鱼拍摄心脏和尾部位, 利用 Image Pro Plus 6.0 软件测量心脏红细胞染色面积, GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。

2.2.3 60 批不同产地丹参提取物抗血栓药效学研究 设置空白对照组、模型组、阳性对照组和 60 批丹参提取物组 (质量浓度均为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 各组均按“2.2.2”项下方法处理。

2.3 多元统计分析

将不同产地丹参提取物指纹图谱数据导入 SIMCA 14.1 软件中进行层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA)。

2.4 谱效关系研究

采用在线数据分析平台 SPSSPRO, 以不同产地丹参提取物共有峰相对峰面积为自变量 (X), 斑马鱼心脏相对红细胞染色面积为因变量 (Y), 进行偏最小二乘回归 (partial least squares regression, PLSR) 分析。

3 结果

3.1 方法学考察

在重复性、精密度、稳定性考察中, 以牛蒡子苷为参照峰, 各共有峰的相对峰面积值 RSD 为 0.16%~4.99%, 相对保留时间 RSD 为 0.02%~2.45%, 说明该法重复性良好, 仪器的精密度良好, 样品在 24 h 内稳定性良好, 可用于建立丹参提取物的指纹图谱。

3.2 指纹图谱解析

3.2.1 指纹图谱检测结果 丹参提取物总离子流图见图 1, 根据总离子流图中的保留时间, 把一级质谱提供的准分子离子峰及二级质谱提供的碎片离子信息与对照品及文献数据^[9-19]对比, 共识别 39 个化合物, 见表 2。以牛蒡子苷为内标峰 (峰 40), 计算 39 个共有峰的相对峰面积值。

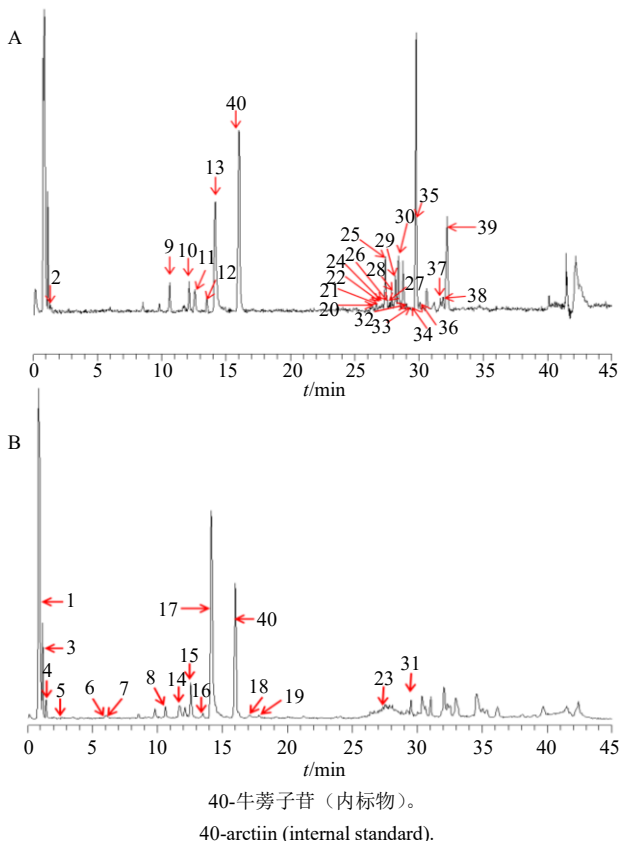


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下丹参提取物总离子流图
Fig. 1 Total ion flow chromatograms of *S. miltiorrhiza* extracts in positive (A) and negative (B) modes

3.2.2 HCA 结果 将 39 个共有峰的相对峰面积值作为变量, 导入 SIMCA 14.1 数据分析软件, 采用 HCA, 60 批丹样品聚为 2 类 (距离=100, 除去异常点), 山西、河北、安徽、江苏产地的聚为一类, 山东、四川的聚为一类 (图 2)。

3.2.3 OPLS-DA 结果 为分析引起不同产地丹参样品差异的色谱峰, 对安徽、江苏、河北、山东、山西和四川 6 个产地的丹参样品进行 OPLS-DA。OPLS-DA 模型可以使样本之间的差异最大化, 以确定样本之间的差异成分^[17]。由图 3-A 可见, 剔除异常值后安徽、河北、江苏和山西产地的丹参 (A 组) 分布在图的右侧, 山东、四川产地 (B 组) 的丹参分布在左侧, 表明 A 组和 B 组产地的丹参化学成分存在一定的差异, 与聚类分析结果相一致。变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 较大的成分即 VIP 值 > 1 的变量, 通常与样本分类更相关。所有成分的 VIP 值见图 3-B, VIP 值大于 1 的变量有 15 个, 分别为峰 9 (15,16-二氢丹参二醇 B)、峰 18 (4-甲基丹酚酸酯 B 或异构体)、峰 8 (迷迭香酸)、峰 15 (丹酚酸 B 同分异构体)、峰 17 (丹酚酸 B)、峰 14 (丹酚酸 A 异构体)、峰 16 (丹酚酸 A)、峰 4 (丹参素)、峰 3 (咖啡酸)、峰 2 (L-苯丙氨酸)、峰 7 (saprionide)、峰 6 (丹酚酸 F)、峰 38 (丹参酮 II_A)、峰 13 (丹参酚醌 I 及其同分异构体) 和峰 5 (原儿茶醛), 它们是区分 A 组和 B 组最为相关的变量, 可初步推测为引起 2 组丹参样品差异的物质。

3.3 丹参提取物抗血栓药效学研究

3.3.1 AA 对斑马鱼心脏红细胞染色面积的影响 由图 4 可知, 与对照组比较, 不同质量浓度的 AA 处理后斑马鱼心脏红细胞染色面积均显著减小 ($P < 0.001$), 故本实验选取 24 $\mu\text{g/mL}$ AA 作为建模条件。
3.3.2 不同质量浓度丹参提取物对斑马鱼尾静脉血栓的影响 由图 5 可知, AA 可导致斑马鱼尾部血栓形成, 表现为与对照组比较, AA 处理后心脏红细胞染色面积显著减小 ($P < 0.001$); 阳性对照药阿司匹林干预后, 心脏红细胞染色面积显著增大 ($P < 0.001$), 尾部静脉血栓明显改善, 表明阿司匹林对于 AA 诱导的血栓具有改善作用; 丹参提取物 (50、100、150 $\mu\text{g/mL}$) 组心脏红细胞染色面积与模型组相比均显著增大 ($P < 0.05$), 且 150 $\mu\text{g/mL}$ 丹参提取物对尾静脉血栓的改善作用最佳, 故选择 150 $\mu\text{g/mL}$ 丹参提取物进行后续的抗血栓作用实验。

表2 丹参提取物指纹图谱共有峰解析结果

Table 2 Results of common peak analysis in fingerprint of *S. miltiorrhiza* extracts

峰号	化合物	分子式	t_R /min	相对分子质量 (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS	离子模式
				理论值	实测值			
1	二糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.86	341.107 8	341.108 1	0.88	179.054 8	[M-H] ⁻
2	L-苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	1.35	166.086 3	166.085 6	-4.21	120.080 7	[M+H] ⁺
3	咖啡酸*	C ₉ H ₈ O ₄	1.42	179.033 9	179.033 4	-2.79	135.043 5, 107.048 6	[M-H] ⁻
4	丹参素*	C ₉ H ₁₀ O ₅	1.49	197.044 4	197.044 0	-2.03	179.033 4, 135.043 4	[M-H] ⁻
5	原儿茶醛*	C ₇ H ₆ O ₃	2.50	137.023 3	137.022 9	-2.92	109.027 9, 93.033 1	[M-H] ⁻
6	丹酚酸 F	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	5.92	313.070 7	313.071 0	0.96	269.081 5, 159.043 7, 109.027 9	[M-H] ⁻
7	sapronide	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	5.96	269.083 0	269.081 4	-5.95	254.057 3	[M-H] ⁻
8	迷迭香酸*	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	11.22	359.076 1	359.076 4	0.84	197.044 1, 179.0336, 161.022 8	[M-H] ⁻
9	15,16-二氢丹参二醇 B	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	11.69	315.122 7	315.120 7	-6.35	297.110 4	[M+H] ⁺
10	丹酚酸 G	C ₁₈ H ₁₂ O ₇	12.40	341.065 6	341.064 2	-4.10	323.053 8, 295.059 1, 277.048 8, 249.053 6	[M+H] ⁺
11	紫草酸*	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	12.52	539.118 4	539.115 9	-4.64	341.065 4, 269.081 8, 181.049 6	[M-H] ⁺
12	紫草酸异构体	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	13.89	539.118 8	539.118 3	-0.93	323.054 9, 269.080 8, 181.048 7	[M-H] ⁺
13	丹参酚醌 I 及其同分异构体	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	13.93	313.143 4	313.140 7	-8.62	295.059 1, 285.074 8, 267.064 4	[M+H] ⁺
14	丹酚酸 A 异构体	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	14.24	493.112 9	493.112 5	-0.81	313.069 3, 295.060 5, 179.034 0, 135.043 7	[M-H] ⁻
15	丹酚酸 B 同分异构体	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	14.69	717.145 0	717.142 8	-3.07	519.092 6, 339.049 7, 321.039 6	[M-H] ⁻
16	丹酚酸 A*	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	14.75	493.112 9	493.113 2	0.61	313.071 0, 295.060 1, 135.043 4	[M-H] ⁻
17	丹酚酸 B*	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	15.95	717.145 0	717.144 8	-0.28	586.440 7, 519.092 5, 446.524 6, 339.0504, 321.039 6	[M-H] ⁻
18	4-甲基丹酚酸酯 B 或异构体	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₆	17.52	731.160 7	731.161 1	0.55	533.109 1, 335.056 0	[M-H] ⁻
19	紫草酸单甲酯	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₂	17.56	551.118 4	551.119 2	1.45	353.066 1, 339.049 0, 321.039 6	[M-H] ⁻
20	亚甲基丹参醌/异二氢丹参酮	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	26.69	279.101 6	279.101 6	0.00	233.096 0, 190.077 5, 169.064 4	[M+H] ⁺
21	3-羟基亚甲基丹参醌	C ₁₈ H ₁₄ O ₄	27.17	295.096 5	295.095 7	-2.71	277.085 5	[M+H] ⁺
22	丹参酮 II _B	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	27.35	311.127 8	311.127 0	-2.57	293.116 4, 275.105 5	[M+H] ⁺
23	1S-hydroxy-anhydride of 16R cryptotanshinone	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	27.50	327.122 7	327.123 0	0.92	283.133 5, 239.143 2	[M-H] ⁻
24	二氢丹参酮酸甲酯	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	27.72	341.138 1	341.138 2	0.29	295.133 1	[M+H] ⁺
25	tanshinol B	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	27.82	297.112 1	297.112 0	-0.34	279.101 6	[M+H] ⁺
26	丹参醛	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	27.84	309.112 1	309.111 2	-2.91	281.116 4, 263.106 5, 235.110 5	[M+H] ⁺
27	异隐丹参酮 II 或其异构体	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	28.04	297.148 5	297.148 1	-1.35	237.090 6, 223.111 7	[M+H] ⁺
28	2,3-去氢丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	28.07	293.117 2	293.117 1	-0.34	275.106 8, 247.111 7	[M+H] ⁺
29	二氢丹参酮 I*	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	28.33	279.101 6	279.099 2	-8.60	261.088 9, 233.094 1, 205.099 5	[M+H] ⁺
30	泽兰黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	28.35	317.211 0	317.210 8	-0.63	299.200 1	[M+H] ⁺
31	新隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	28.38	313.143 4	313.142 8	-1.92	269.153 0, 213.090 9	[M-H] ⁻
32	丹参新醌乙	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	28.71	281.117 2	281.116 3	-3.20	263.105 8	[M+H] ⁺
33	丹参酸甲酯	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	28.75	339.122 7	339.120 6	-6.19	279.099 9, 261.089 4	[M+H] ⁺
34	隐丹参酮*	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	29.67	297.148 5	297.148 8	1.01	279.138 4, 268.110 0, 251.143 1	[M+H] ⁺
35	丹参酮 I*	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	29.78	277.085 9	277.086 1	0.72	249.091 0, 221.096 2	[M+H] ⁺
36	柳杉酚	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	30.00	301.216 2	301.215 3	-2.99	241.158 4	[M+H] ⁺
37	异丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	32.04	295.132 9	295.132 0	-3.05	277.121 6	[M+H] ⁺
38	丹参酮 II _A *	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	32.26	295.132 9	295.133 1	0.68	277.122 5, 249.127 4	[M+H] ⁺
39	二氢隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	32.82	299.164 2	299.164 3	0.33	281.154 2, 253.158 3	[M+H] ⁺

*通过与对照品比对辨识。

* identified by comparison with standards.

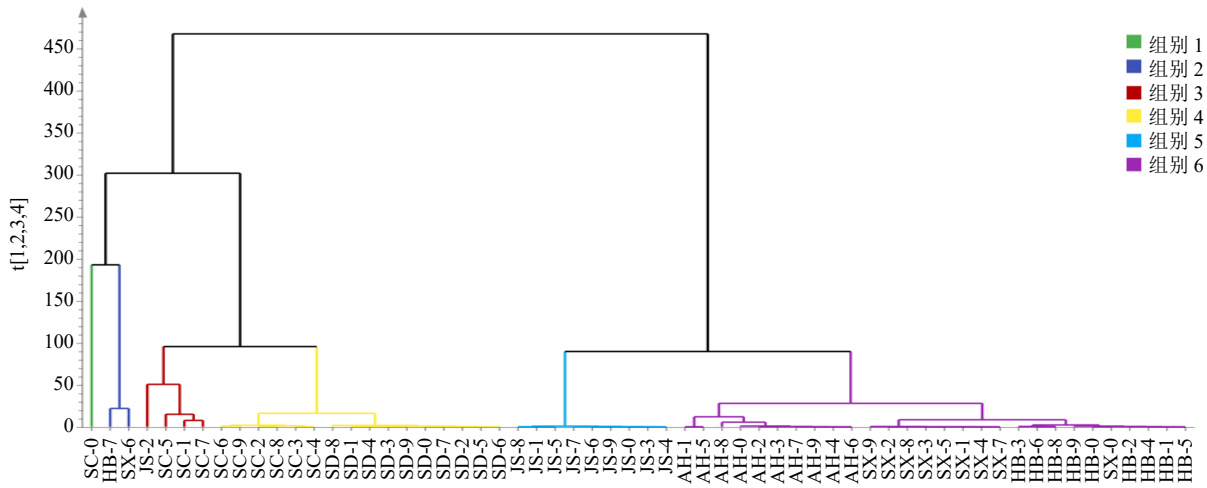
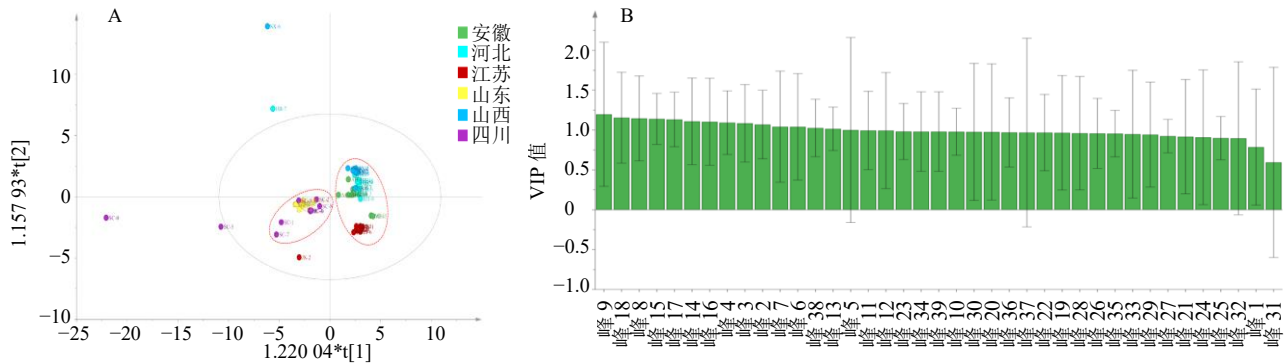


图 2 60 批丹参样品的 HCA 结果图

Fig. 2 HCA result graph of 60 batches of *S. miltiorrhiza* samples

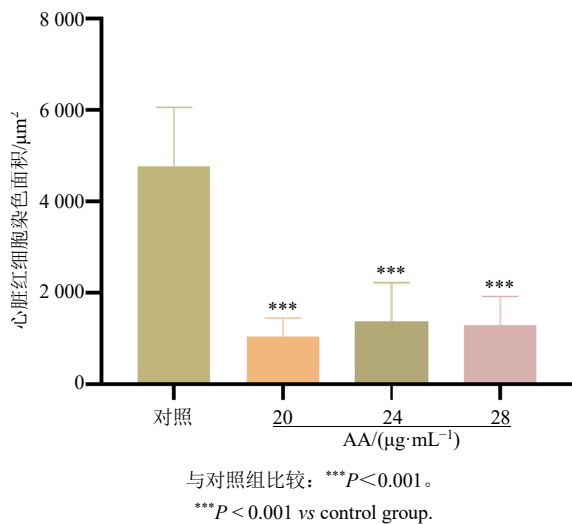


A-得分散点图; B-VIP 值。

A-score scatter plot; B-VIP value.

图 3 丹参样品 OPLS-DA 模型图

Fig. 3 OPLS-DA of *S. miltiorrhiza* samples



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 4 AA 对斑马鱼心脏红细胞染色面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of AA on staining area of red blood cells of zebrafish hearts ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3.3 60 批丹参提取物的抗血栓药效学研究 如表 3 所示,与对照组比较,模型组斑马鱼心脏红细胞染色面积明显减小 ($P < 0.001$),表明建模成功;与模型组比较,阿司匹林组和 60 批丹参提取物组斑马鱼心脏红细胞染色面积显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),均表现出不同程度的抑制斑马鱼尾静脉血栓形成的作用。丹参提取物由于产地及批次不同,抑制斑马鱼尾静脉血栓形成的作用不同,各产地 10 批丹参平均相对红细胞染色面积排序为山东 > 江苏 > 山西 > 安徽 > 河北 > 四川 (图 6),相对红细胞染色面积越大表明抗尾静脉血栓形成的能力越强。OPLS-DA 发现山东四川产地的丹参化学成分差异较小,但药效学研究发现 2 产地丹参抗血栓作用存在显著性差异 ($P < 0.001$),由此可见 OPLS-DA 仅能分析不同产地丹参样品的成分信息,若要评价丹参的抗血栓效果,须将成分信息与药效指标相结合。

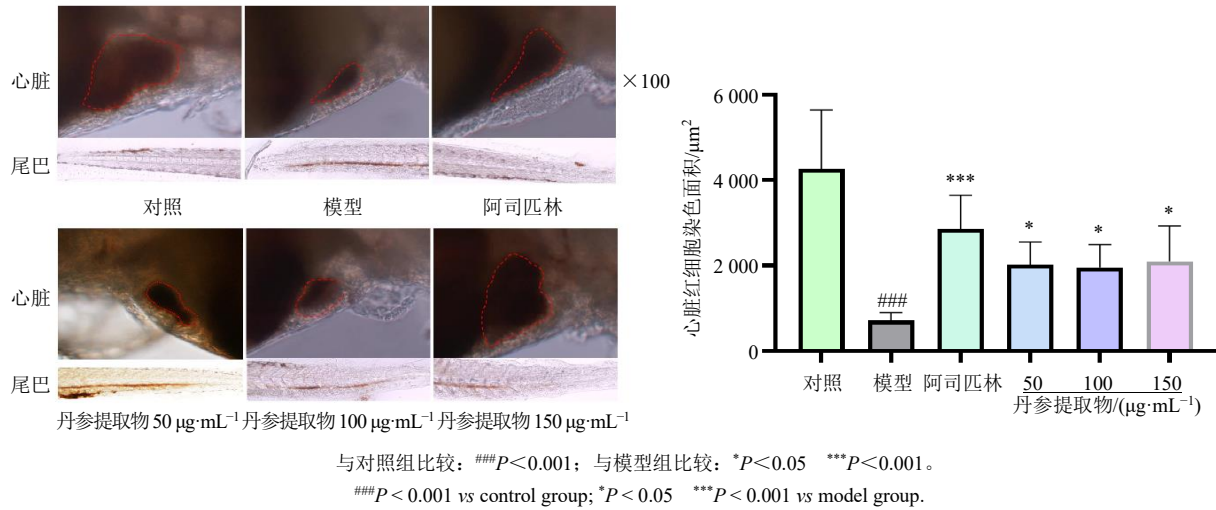


图5 不同质量浓度丹参提取物对斑马鱼心脏红细胞染色面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effects of different concentrations of *S. miltiorrhiza* extracts on staining area of red blood cells of zebrafish hearts ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表3 60批丹参提取物的抗血栓作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Antithrombotic activity of 60 batches of *S. miltiorrhiza* extracts ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	药材编号	心脏红细胞染色面积/ μm^2	相对心脏红细胞染色面积	组别	药材编号	心脏红细胞染色面积/ μm^2	相对心脏红细胞染色面积
对照	—	4 338.88 \pm 87.34	1.000 0	丹参提取物	JS-9	3 014.57 \pm 201.61***	0.694 8
模型	—	717.10 \pm 39.96###	0.165 3	SD-0	3 549.07 \pm 187.12***	0.818 0	
阿司匹林	—	3 306.85 \pm 172.30***	0.762 1	SD-1	3 828.32 \pm 314.54***	0.882 3	
丹参提取物	AH-0	2 710.79 \pm 119.92***	0.624 8	SD-2	3 639.63 \pm 177.87***	0.838 8	
	AH-1	2 940.07 \pm 179.98***	0.677 6	SD-3	3 256.00 \pm 129.43***	0.750 4	
	AH-2	2 784.14 \pm 212.85***	0.641 7	SD-4	3 392.38 \pm 195.74***	0.781 9	
	AH-3	3 339.16 \pm 158.65***	0.769 6	SD-5	3 727.68 \pm 170.17***	0.859 1	
	AH-4	2 828.29 \pm 172.20***	0.651 8	SD-6	3 106.85 \pm 190.25***	0.716 0	
	AH-5	2 775.94 \pm 145.75***	0.639 8	SD-7	3 517.59 \pm 212.81***	0.810 7	
	AH-6	3 009.59 \pm 381.51***	0.693 6	SD-8	3 420.88 \pm 185.40***	0.788 4	
	AH-7	2 969.93 \pm 293.77***	0.684 5	SD-9	3 517.62 \pm 96.50***	0.810 7	
	AH-8	3 106.43 \pm 175.71***	0.716 0	SX-0	3 047.15 \pm 245.61***	0.702 3	
	AH-9	3 038.36 \pm 121.45***	0.700 3	SX-1	2 851.14 \pm 204.25***	0.657 1	
	HB-0	1 377.56 \pm 92.51*	0.317 5	SX-2	3 645.60 \pm 249.24***	0.840 2	
	HB-1	1 642.74 \pm 125.77*	0.378 6	SX-3	3 070.68 \pm 207.62***	0.707 7	
	HB-2	1 968.66 \pm 166.84***	0.453 7	SX-4	3 128.37 \pm 265.48***	0.721 0	
	HB-3	2 452.30 \pm 42.80***	0.565 2	SX-5	2 997.77 \pm 163.36***	0.690 9	
	HB-4	1 746.36 \pm 73.57**	0.402 5	SX-6	3 298.86 \pm 180.13***	0.760 3	
	HB-5	1 627.55 \pm 71.58*	0.375 1	SX-7	2 646.34 \pm 131.61***	0.609 9	
	HB-6	1 660.55 \pm 146.28*	0.382 7	SX-8	2 968.64 \pm 208.73***	0.684 2	
	HB-7	2 796.96 \pm 166.09***	0.644 6	SX-9	3 330.19 \pm 137.65***	0.767 5	
	HB-8	1 703.48 \pm 102.88**	0.392 6	SC-0	1 791.65 \pm 103.90**	0.412 9	
	HB-9	2 265.96 \pm 69.39***	0.522 2	SC-1	1 889.98 \pm 97.99***	0.435 6	
	JS-0	3 288.80 \pm 211.57***	0.758 0	SC-2	1 646.60 \pm 48.18*	0.379 5	
	JS-1	3 314.98 \pm 219.50***	0.764 0	SC-3	1 930.13 \pm 104.80***	0.444 8	
	JS-2	3 191.34 \pm 217.94***	0.735 5	SC-4	1 868.08 \pm 38.43***	0.430 5	
	JS-3	2 685.77 \pm 260.61***	0.619 0	SC-5	1 691.94 \pm 62.10**	0.389 9	
	JS-4	2 712.32 \pm 251.85***	0.625 1	SC-6	1 971.07 \pm 140.27***	0.454 3	
	JS-5	3 501.32 \pm 200.67***	0.807 0	SC-7	1 750.99 \pm 62.31**	0.403 6	
	JS-6	3 291.41 \pm 178.45***	0.758 6	SC-8	1 653.62 \pm 56.56*	0.381 1	
	JS-7	3 538.82 \pm 422.36***	0.815 6	SC-9	1 865.83 \pm 91.92***	0.430 0	
	JS-8	3 285.78 \pm 273.40***	0.757 3				

与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.
$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

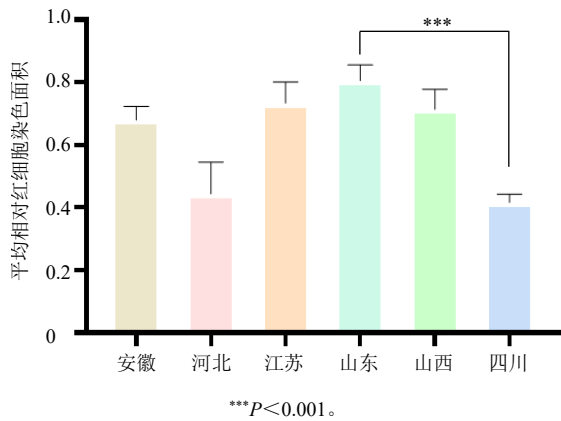


图6 不同产地丹参对斑马鱼心脏相对红细胞染色面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effects of *S. miltiorrhiza* from different origins on relative staining area of red blood cell of zebrafish hearts ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4 PLSR 分析结果

中药指纹图谱与药效的谱效关系需要通过一定的数据处理才能实现，故选择适合的数据处理方法至关重要。PLSR 集相关分析、主成分分析、多元回归分析优势于一体，具有无须剔除样本、预测精度高、计算量小等特点，已逐渐成为中药谱效关系构建的主要数据处理方法^[20-22]。本研究利用 SPSSPRO

在线数据分析软件，把丹参指纹图谱共有峰的相对峰面积作为自变量，斑马鱼相对心脏红细胞染色面积作为因变量，进行 PLSR 分析。根据 PLSR 原理，VIP 值越大表示其对因变量的解释能力越强。由分析结果可知，当主成分个数为 $t[5]$ 时，累计的 X 方差为 100%，代表对自变量信息的提取；累计的 Y 方差为 60.2%，代表对因变量信息的提取；39 个共有峰中有 18 个峰与抗血栓活性呈正相关，18 个峰中 $VIP > 1$ 的成分有 8 个，分别为峰 1（二糖）、峰 31（新隐丹参酮）、峰 26（丹参醛）、峰 34（隐丹参酮）、峰 39（二氢隐丹参酮）、峰 8（迷迭香酸）、峰 18（4-甲基丹酚酸酯 B 或异构体）和峰 17（丹酚酸 B），计算得到的模型系数和 VIP 值，见图 7。据此推测与丹参抗血栓活性最相关的化合物可能为二糖、新隐丹参酮、丹参醛、隐丹参酮、二氢隐丹参酮、迷迭香酸、4-甲基丹酚酸酯 B 或异构体和丹酚酸 B。先前的研究也报道了相关化合物的抗血栓作用，与本研究结论相一致。唐惠兰^[23]通过分子对接技术筛选出了丹参中可能具有抗血栓效应的活性成分，包括丹酚酸 B、迷迭香酸、紫草酸等，并发现它们可能都是通过多靶点发挥抗血栓效应；李丹丹等^[24]研究发现西洋参、丹参组方中有 16 个活性成分作用于血小板活化通路，包括隐丹参酮、新隐丹参酮等。

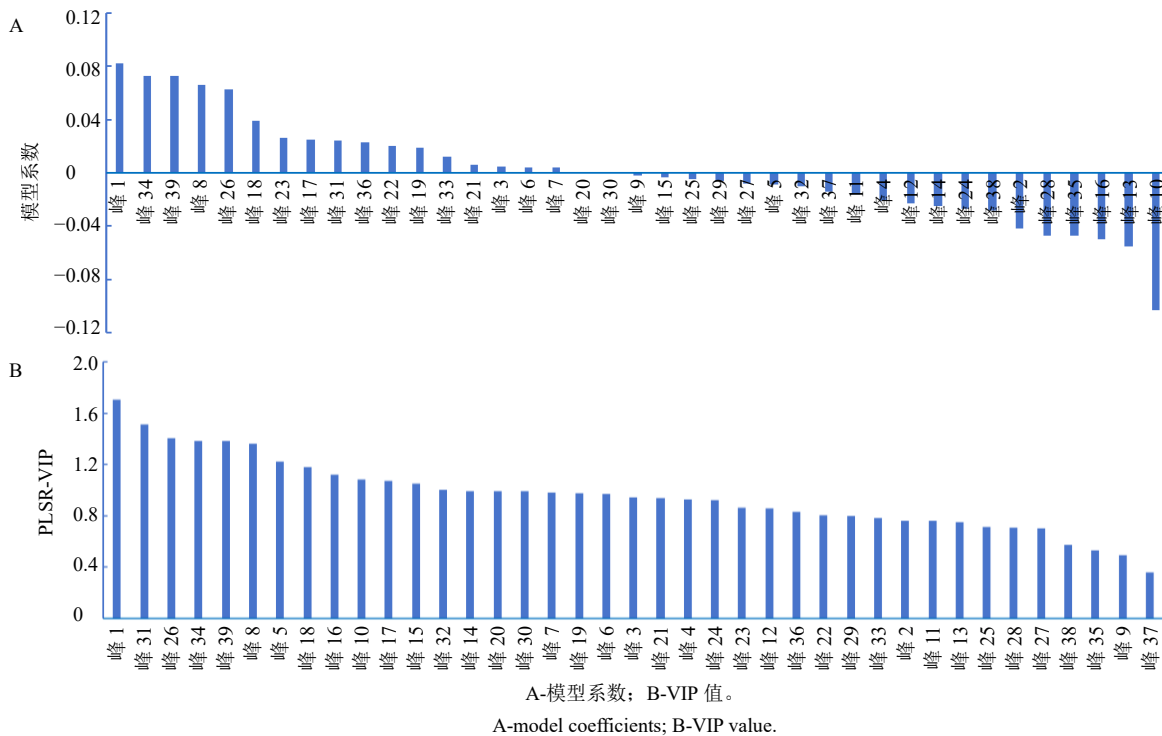


图7 PLSR 分析结果

Fig. 7 Results of PLSR analysis

4 讨论

4.1 斑马鱼血栓模型的特色优势

斑马鱼作为一种体外发育、胚胎透明的新型模式生物,具有给药方便、实验周期短、用药量少、可实现高通量筛选等优点,现已广泛应用于人类疾病模型的构建及中药活性成分的研究^[25-27]等领域。人类与血栓形成相关的基因在斑马鱼中均存在,斑马鱼的血栓形成及凝血机制与人类相似^[28-29],可以模拟人类血栓形成的过程,这为斑马鱼血栓模型的构建奠定了基础。史永平^[30]利用AA构建的斑马鱼血栓模型,发现了栀子中的3个抗血栓关键化合物,其中包括以前未报道的新化合物。樊娇娇^[31]选用盐酸肾上腺素构建的斑马鱼在体血栓模型,操作简便,结果准确,有利于中药抗血栓活性成分的筛选与研究。本课题利用AA作为诱导剂构建的斑马鱼血栓模型,实验周期短,操作简便,检测指标客观可靠。

4.2 中药谱效学在丹参质量评价中的应用

丹参临床应用广泛,是常用的大宗药材。四川是丹参的道地产区,但山东的丹参产量最大,占全国丹参产量的50%以上^[32]。此外河南、陕西、湖北、河北、安徽、山西、江苏、云南和贵州等地也在栽培,由于各产地的地理、气候、环境等因素,不同产地的丹参质量差异大^[33],临床疗效不稳定,如何科学地评价丹参药材的质量一直是一个难题。2002年李戎等^[34]首次提出了中药谱效学,该理论能较好地体现中医药整体观的理念^[35],已经广泛应用于中药质量控制和评价的研究中。中药谱效学中的指纹图谱与药效需要通过一定的数据处理才能构建真正意义上的谱效关系,目前常用的数据处理方法有相关分析、灰色关联度分析、多元回归分析、PLSR法、典型相关分析等^[36]。王雅莉^[37]采用典型相关分析将药效数据与丹参-红花药对液相图谱进行谱效相关分析,可快速、有效地筛选出丹参-红花药对中主要的活血成分,并利用斑马鱼血栓模型验证了药对中的抗血栓活性成分及谱效筛选的可行性。彭丽颖等^[38]采用PLSR法将丹参醇提物指纹图谱与抗氧化活性进行谱效相关分析,发现丹参中13个共有成分对总抗氧化能力均有影响,符合中药多通路、多靶点的特点。

本研究为了更加全面地了解不同产地丹参样品的成分以及抗血栓疗效的差异,采用谱效学相关研究思路,结合HPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS技术的优势,借助OPLS-DA,寻找不同产地丹参样品的差

异化学成分;为了进一步探讨丹参指纹图谱与抗血栓作用之间的关系,将丹参指纹图谱与抗血栓药效指标相关联,采用PLSR分析,较大程度地反映了各成分对药效的贡献作用。接下来将整合谱效相关研究与分子对接技术,旨在进一步缩小物质基础范围,从构效关系层面揭示活性成分可能发挥药效的作用机制,对整合研究获得的药效物质进行抗血栓活性验证,进一步挖掘丹参抗血栓活性的质量标志物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang L, Li Z, Ye X R, *et al.* Mechanisms of thrombosis and research progress on targeted antithrombotic drugs [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(10): 2282-2302.
- [2] 崔柳君, 伊树振, 徐敏, 等. ICU患者下肢深静脉血栓形成的中医治疗研究进展 [J]. *中国中医急症*, 2021, 30(7): 1308-1310.
- [3] 周芝兰, 孙可一, 季笑云, 等. 活血化瘀类中药及复方抗血栓的作用机制研究进展 [J]. *中药与临床*, 2022, 13(3): 108-112.
- [4] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(2): 609-618.
- [5] 蒋丹. 丹参注射液治疗冠心病心绞痛疗效及对血小板聚集率的影响 [J]. *中国中医急症*, 2003, 12(2): 105-106.
- [6] 秦青通, 王肖铭. 复方丹参注射液对急性心肌梗死溶栓治疗再灌注损伤防治作用的研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2003, 10(4): 242-244.
- [7] 苏津自, 詹建福. 舌下含服复方丹参滴丸对健康人和动脉粥样硬化患者动脉弹性功能的即刻影响 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2008, 3(10): 590-592.
- [8] Zhu X Y, Liu H C, Guo S Y, *et al.* A zebrafish thrombosis model for assessing antithrombotic drugs [J]. *Zebrafish*, 2016, 13(4): 335-344.
- [9] 罗厚蔚, 吴葆金, 吴美玉, 等. 丹参新醌丁的分离与结构测定 [J]. *药学学报*, 1985, 20(7): 542-544.
- [10] 刘劫, 杨黄浩, 黎先春, 等. 高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱分析丹参中的丹参酮类化合物 [J]. *质谱学报*, 2008, 29(5): 261-267.
- [11] Yang S T, Wu X, Rui W, *et al.* UPLC/Q-TOF-MS analysis for identification of hydrophilic phenolics and lipophilic diterpenoids from *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Acta Chromatogr*, 2015, 27(4): 711-728.
- [12] Shen Y, Hou J J, Deng W, *et al.* Comparative analysis of ultrafine granular powder and decoction pieces of *Salvia miltiorrhiza* by UPLC-UV-MSn combined with statistical analysis [J]. *Planta Med*, 2017, 83(6): 557-564.

- [13] He W N, Li Y, Qin Y J, *et al.* New cryptotanshinone derivatives with anti-influenza A virus activities obtained via biotransformation by *Mucor rouxii* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(16): 6365-6374.
- [14] Zhang G X, Zhang Y Y, Zhang X X, *et al.* Different network pharmacology mechanisms of Danshen-based Fangjis in the treatment of stable angina [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(6): 952-960.
- [15] 颜晓静, 郑博文, 张毅达, 等. UPLC-Q-TOF/MS 分析孟河医派特色猪心丹参炮制前后化学成分的变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 109-116.
- [16] 张立国, 胡甜甜, 张芳芳, 等. 丹参和紫丹参脂溶性成分的 UPLC 及 LC-MS/MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1208-1215.
- [17] Wang F, Chen L, Chen H P, *et al.* Analysis of flavonoid metabolites in *Citrus* peels (*Citrus reticulata* "dahongpao") using UPLC-ESI-MS/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(15): 2680.
- [18] 陈嘉慧, 张雅心, 刘孟华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的丹参水提液全成分分析 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(1): 1-9.
- [19] 屠燕, 孙连娜, 董志颖, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术分析不同产地丹参药材化学成分的差异 [J]. 中药材, 2021, 44(6): 1337-1342.
- [20] 潘杰, 刘德胜, 颜贵明. 数据分析应用于中药谱效关系中的研究进展 [J]. 中医药学报, 2018, 46(4): 119-122.
- [21] 郝鹏升, 范嘉育, 耿淑琴, 等. 数据分析技术在中药抗氧化谱效关系研究中的应用进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 877-884.
- [22] 吴启端. 谱效研究结合偏小二乘法在石菖蒲挥发油有效成分筛选中的应用 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(4): 497-501.
- [23] 唐惠兰. 基于分子对接技术与斑马鱼血栓模型筛选丹参中的抗血栓活性成分 [D]. 重庆: 重庆理工大学, 2022.
- [24] 李丹丹, 黄焯, 张淼, 等. 基于网络药理学的西洋参、丹参组方抗血栓活性成分及作用机制研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(9): 1290-1296.
- [25] 吴峰, 王国坤, 安丽娜, 等. 丹参多酚酸盐对斑马鱼胚胎血管新生的影响及分子机制初步研究 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(36): 7005-7007.
- [26] 李艳, 刘晓金, 王平, 等. 丹红注射液对斑马鱼促血管作用的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2270-2273.
- [27] 宋玉琴, 鲁梓旭, 余婕, 等. 基于斑马鱼模型及分子对接技术研究丹参促进血管生成的关键活性成分 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3394-3401.
- [28] Jagadeeswaran P. Zebrafish: A tool to study hemostasis and thrombosis [J]. *Curr Opin Hematol*, 2005, 12(2): 149-152.
- [29] Weyand A C, Shavit J A. Zebrafish as a model system for the study of hemostasis and thrombosis [J]. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(5): 418-422.
- [30] 史永平. 基于“组学判别-灰色关联-生物活性”策略研究中药梔子的质量标志物 [D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [31] 樊娇娇. 斑马鱼血栓模型的建立及在中药活性筛选中的应用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [32] 王志芬, 刘喜民. 山东省丹参药材产业现状与发展策略 [J]. 山东农业科学, 2012, 44(8): 131-132.
- [33] 邓爱平, 郭兰萍, 詹志来, 等. 丹参本草考证 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4274-4279.
- [34] 李戎, 闫智勇, 李文军, 等. 创建中药谱效关系学 [J]. 中医教育, 2002, 21(2): 62.
- [35] Zhu C S, Lin Z J, Xiao M L, *et al.* The spectrum-effect relationship-a rational approach to screening effective compounds, reflecting the internal quality of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(3): 177-184.
- [36] 张强, 杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 680-683.
- [37] 王雅莉. 丹参-红花药对活性成分的筛选及其斑马鱼代谢研究 [J]. 重庆: 重庆大学, 2019.
- [38] 彭丽颖, 梁悦, 施君君, 等. 丹参 HPLC 指纹图谱及总抗氧化活性谱效关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3): 110-115.

[责任编辑 李亚楠]