

[药材资源]

基于谱效相关法探究酒炙丹参增强抗凝血活性的物质基础

周 巧¹, 张智慧¹, 张学兰^{1,2*}, 王 悦¹, 甄 臻¹, 奚亚亚¹
(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 通过谱效相关法探究酒炙丹参增强抗凝血活性的物质基础。**方法** 采用 HPLC 法建立丹参生品与酒炙品指纹图谱, 并进行相似度评价。测定不同批丹参生品与酒炙品的体外抗凝血效价, 包括活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 和纤维蛋白原 (FIB) 含量。以丹参生品与酒炙品的 HPLC 图谱的峰面积及其抗凝血效价为基础, 采用偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 法对 HPLC 图谱和抗凝血效价进行相关性分析。**结果** 10 批生丹参饮片 HPLC 指纹图谱相似度为 0.991~0.999, 10 批酒丹参饮片与对照图谱的相似度为 0.982~0.999。丹参酒炙后抗凝血活性显著增强。PLS-DA 法分析得出, 指纹图谱中 7 (丹酚酸 B)、6 (紫草酸)、5 (迷迭香酸)、15 (VIP 均大于 1) 号峰是导致丹参酒炙后抗凝血活性增强的主要成分。**结论** 该方法能较精准地找到丹参酒炙增强抗凝血活性的主要贡献成分。

关键词: 丹参; 酒炙; 指纹图谱; 抗凝血活性; 谱效相关; PLS-DA

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2021)04-0954-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.023

Spectrum-effect correlation-based study on anticoagulant activity enhancement induced by ingredients of wine-processed *Salvia miltiorrhiza*

ZHOU Qiao¹, ZHANG Zhi-hui¹, ZHANG Xue-lan^{1,2*}, WANG Yue¹, ZHEN Zhen¹, XI Ya-ya¹
(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Provincial University Traditional Chinese Medicine Quality Control and Construction of Whole Industry Chain Collaborative Innovation Center, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the spectrum-effect correlation between anticoagulant activity enhancement and ingredients of wine-processed *Salvia miltiorrhiza* Bge.. **METHODS** Crude and wine-processed products of *S. miltiorrhiza* were subjected to fingerprints determination and similarity evaluation by HPLC method, and assessment of *in vitro* anticoagulant potency, including APTT, PT, TT and FIB. Based on the peak area and anticoagulant potency of the HPLC profiles of *S. miltiorrhiza*, PLS-DA method was performed to analyze the correlation of the HPLC profile and anticoagulant potency. **RESULTS** In contrast to the 10 batches of raw *S. miltiorrhiza* sharing 0.991–0.999 similarity in HPLC fingerprints, 10 batches wine-processed products displayed 0.982–0.999 similarity, indicating a significantly enhanced anticoagulant activity. PLS-DA analysis revealed the main components, the peaks 7 (salvianolic acid B), 6 (shikonic acid), 5 (rosmarinic acid), 15 (VIP values greater than 1) in the fingerprints conferring enhanced anticoagulant activity. **CONCLUSION** The spectrum-effect correlation-based study can more accurately reveal the main components of wine-processed *S. miltiorrhiza* contributing enhanced anticoagulant activity.

收稿日期: 2020-04-24

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2018YFC1707002); 国家自然科学基金项目 (81973486); 山东省重点研发计划项目 (2017GSF19113); 山东省中医药科技发展计划项目 (2019-0955)

作者简介: 周 巧 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药饮片制备技术与质量评价。Tel: 15964557112, E-mail: z452710682@163.com

* 通信作者: 张学兰 (1963—), 女, 硕士, 教授, 研究方向为中药炮制原理与饮片质量控制。Tel: (0531) 89628081, E-mail: zhang8832440@sina.com

KEY WORDS: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; wine processing; fingerprints; anticoagulant effect; spectral-effect correlation; PLS-DA

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效^[1], 是临床上治疗心脑血管疾病的大宗常用中药。丹参中的有效成分主要包括水溶性和脂溶性两大类, 前者主要有丹酚酸 B、紫草酸、迷迭香酸、原儿茶醛、丹参素等, 具有抑制血管细胞动脉硬化、促血管生成、抑制血小板聚集等作用; 后者主要有丹参酮 II A、隐丹参酮、丹参酮 I 等, 具有抗凝血、抗血栓、抗氧化等作用^[2-4]。2020 年版《中国药典》收载丹参和酒丹参 2 种饮片规格。据古籍记载, 金、明代以来酒炙成为丹参主要的炮制方法之一, 且《景岳全书》中提出“酒洗去土, 晾干, 切, 破血生新”; 《本草辨义》中“酒炒用, 畏咸水忌醋。渍酒服, 能疗足痹”说明古人已认识到酒丹参较强的活血化瘀、止痛作用, 现代认为酒炙丹参可缓和其寒凉之性, 增强活血祛瘀、调经止痛之功^[5]。

中药指纹图谱具有整体、宏观和模糊的特点, 能最大程度地反映中药中所含成分的种类和含量, 但无法确定这些成分是否为发挥临床作用的药效物质, 将化学指纹图谱与生物活性评价相结合, 构建谱效关系, 可初步探索中药的药效物质^[6]。PLS-DA 是一种融合了多因变量对多自变量的回归建模以及主成分分析在内的多元数据分析方法, 尤其适用于自变量间存在多重相关性以及样本数量少于自变量数量的数据分析^[7]。

研究表明, 丹参酒炙后酚酸类和丹参酮类成分发生明显的质变和量变^[8-10]。丹参生品具有抑制血小板聚集、抗凝血作用, 且酒炙后药效增强^[11]。目前, 关于丹参的指纹图谱已用于丹参及相关制剂的品质评价^[12]。然而, 丹参酒炙增效的物质基础及炮制机理尚未阐明, 缺乏具有个性特点的丹参与酒丹参饮片质量评价标准。本研究采用 HPLC 法建立丹参生品与酒炙品指纹图谱, 结合体外抗凝血药效指标数据, 采用 PLS-DA 法, 将指纹图谱所代表的化学信息与药效数据所代表的生物效应信息相关联, 探讨丹参酒炙增强抗凝血活性的主要贡献成分。本研究旨在为揭示丹参炮制机理及建立丹参与酒丹参饮片质量评价标准提供科学依据。

1 材料

日立 L-2000 Elite 高效液相色谱仪、L-2455 二

极管阵列检测器 (日本日立公司); FA1604N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); LDZ4-0.8 离心机 (北京医用离心机厂); KQ-250E 医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); MK-30 炒药机 (江阴市祝塘明科机械厂); XL1000E 全自动凝血分析仪 (北京众驰伟业科技发展有限公司)。

丹参酮 II A、丹酚酸 B、迷迭香酸草酸、丹参素钠对照品 (上海源叶生物科技有限公司); 隐丹参酮、丹参酮 I、5-羟甲基糠醛对照品对照品 (中国食品药品检定研究院), 以上对照品纯度均大于 98.0%。纤维蛋白原 (FIB) 试剂盒、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 测定试剂盒、凝血酶原时间 (PT) 测定试剂盒、凝血酶时间 (TT) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

10 批生丹参饮片经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎的切制品, 产地分别为河北 (S1)、山西 (S2)、四川 (S3)、河南 (S4)、河北 (S5)、陕西 (S6)、安徽 (S7)、山东 1 (S8)、湖北 (S9)、山东 2 (S10)。

新西兰白兔 24 只, 体质量 2.2~2.5 kg, 购自山东鲁抗医药股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 20080002。

2 方法与结果

2.1 酒丹参制备 取 10 批生丹参饮片各 100 g, 加稀黄酒 20 mL (黄酒: 水 = 1:1), 拌匀, 闷润 2 h, 置炒药机内, 30 r/min 炒制 20 min, 取出晾凉, 筛去碎屑, 混匀, 塑料袋密封, 即得, 编号 A1~A10。

2.2 HPLC 指纹图谱建立

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取对照品丹参酮 II A、丹酚酸 B、隐丹参酮、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮 I、丹参素钠适量, 加甲醇制成每 1 mL 含丹参酮 II A、丹酚酸 B 各 130 μ g, 隐丹参酮、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮 I、丹参素钠、5-羟甲基糠醛各 30 μ g 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取生丹参、酒丹参粉末 (过 3 号筛) 各 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加 80% 甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声 (250 W、40 Hz) 处理 40 min, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.05% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 90.0%~77.0% B; 15~25 min, 77.0%~75.0% B; 25~42 min, 75.0%~58.0% B; 42~73 min, 58.0%~27.0% B; 73~82 min, 27.0%~18.0% B; 82~85 min, 18.0%~15.0% B; 85~90 min, 15.0% B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 270 nm。

2.2.4 精密度试验 取同一批生丹参, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.3”项条件下连续进样 6 次, 测定并记录主要色谱峰的保留时间和峰面积。结果, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取同一批生丹参, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 室温下自然放置 24 h 后于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.2.3”项条件下进样测定, 测定并记录主要色谱峰的保留时间和峰面积。结果, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批生丹参 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.3”项条件下进样测定, 记录主要色谱峰的保留时间和峰面积。结果, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 图谱生成 精密吸取对照品、供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 在“2.2.3”项条件下分析, 指纹图谱见图 1~2。

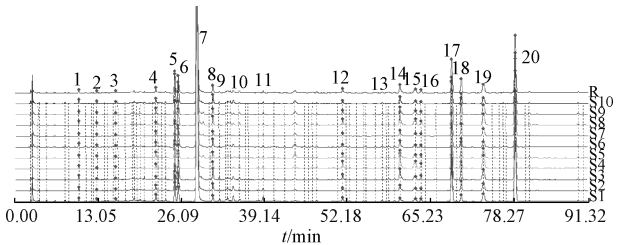


图 1 10 批生丹参 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of raw *S. miltiorrhiza*

结果表明, 生丹参及酒丹参 HPLC 指纹图谱存在显著差异。丹参酒炙后, 色谱峰 1 (丹参素钠)、3 (原儿茶醛)、8、9、10、16 的峰面积显著增加, 而色谱峰 4 (咖啡酸)、7 (丹酚酸 B)、13、15、19、20 (丹参酮 II A) 明显降低; 色谱峰 a、b (5-羟甲基糠醛) 在生品中未检出, 可能为酒炙后的

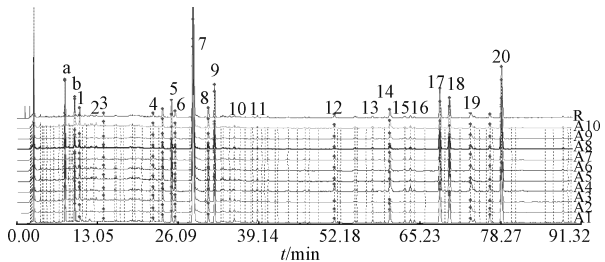


图 2 10 批酒丹参 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of wine-processed *S. miltiorrhiza*

新增峰。

2.2.8 相似度分析 将各批生丹参、酒丹参指纹图谱峰面积数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版”, 计算各批样品指纹图谱的相似度。结果, 10 批生丹参饮片与对照图谱的相似度为 0.991~0.999, 10 批酒丹参饮片与对照图谱的相似度为 0.982~0.999。

2.3 体外抗凝血活性测定

2.3.1 供试品溶液制备 取生丹参、酒丹参粉末 (过 3 号筛), 分别加 12 倍量 80% 甲醇超声提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至浸膏。取适量, 加入 1% 二甲基亚砜超声溶解, 制成质量浓度相当于 0.1 g/mL 生药的溶液, 即得。

2.3.2 APTT、PT、TT、FIB 测定

取健康新西兰白兔, 随机分为空白对照组、生丹参组、酒丹参组, 每组 8 只, 适应性喂养 7 d, 实验前禁食 8 h, 耳缘静脉取血, 以 3.8% 枸橼酸钠 (血与抗凝剂体积比为 9:1) 抗凝, 收集于离心管中, 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 即得待测血浆。按各试剂盒的要求进行凝血指标 (PT、APTT、TT、FIB) 的测定, 采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行统计处理, 实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。结果见表 1。

与空白对照组比较, 生丹参和酒丹参均可延长 PT、APTT、TT ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 缩短 FIB ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明生丹参与酒丹参均有抗凝血活性; 与生丹参比较, 酒丹参能延长 PT、APTT、TT ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 缩短 FIB ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明丹参酒炙后抗凝血活性显著增强。

2.4 相关性分析 利用 SIMCA-P14.1 软件中的偏最小二乘回归分析 (PLS-DA), 比较生丹参及酒丹参在同一质量浓度 (0.1 mg/mL) 下抗凝血活性与 HPLC 色谱峰的相关性。以生丹参、酒丹参的

表 1 生丹参、酒丹参对 PT、APTT、TT、FIB 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 1 Effects of crude and wine-processed *S. miltiorrhiza* on PT, APTT, TT and FIB ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/(L·g ⁻¹)
空白对照组	10. 26±0. 61	40. 35±0. 72	13. 92±0. 68	11. 90±0. 74
S1 组	19. 37±0. 52 **	63. 52±2. 24 *	33. 78±1. 44 **	7. 33±0. 30 *
S2 组	21. 39±0. 81 **	66. 35±0. 79 **	35. 56±0. 99 **	7. 49±0. 49 *
S3 组	21. 44±1. 74 **	66. 52±0. 88 **	33. 50±1. 55 **	7. 32±0. 48 *
S4 组	18. 34±1. 15 *	63. 59±1. 85 *	30. 58±0. 68 *	7. 80±0. 17 *
S5 组	19. 64±1. 10 *	66. 15±1. 09 **	32. 94±0. 73 *	7. 55±0. 23 *
S6 组	20. 42±1. 07 **	64. 87±0. 76 *	32. 36±0. 56 *	7. 41±0. 68 *
S7 组	21. 89±0. 99 **	65. 79±1. 45 **	32. 65±1. 46 *	7. 39±0. 34 *
S8 组	18. 39±1. 09 *	63. 88±1. 63 *	30. 54±1. 34 *	7. 63±0. 15 *
S9 组	18. 10±1. 01 *	67. 27±1. 32 **	31. 76±160 *	7. 51±0. 25 *
S10 组	18. 27±1. 54 *	65. 87±0. 518 **	32. 48±0. 92 *	7. 56±0. 41 *
A1 组	26. 68±0. 88 ** #	68. 68±1. 03 ** #	39. 08±0. 66 ** #	4. 59±0. 47 ** #
A2 组	25. 84±1. 06 ** #	69. 11±0. 69 ** #	39. 66±0. 29 ** #	4. 78±1. 05 ** #
A3 组	26. 56±1. 68 ** #	67. 70±1. 24 ** #	38. 69±1. 52 ** #	4. 65±0. 31 ** #
A4 组	26. 34±0. 56 ** #	71. 37±0. 99 ** #	39. 49±0. 48 ** #	4. 59±0. 78 ** #
A5 组	26. 53±0. 95 ** #	68. 33±1. 84 ** #	39. 06±1. 13 ** #	4. 47±0. 43 ** #
A6 组	24. 91±0. 87 ** #	70. 62±0. 73 ** #	39. 35±0. 53 ** #	4. 73±0. 29 ** #
A7 组	25. 97±1. 00 ** #	70. 31±1. 95 ** #	40. 75±1. 27 ** #	4. 59±0. 60 ** #
A8 组	27. 13±1. 33 ** #	70. 41±0. 97 ** #	40. 54±1. 53 ** #	4. 72±0. 64 ** #
A9 组	25. 17±0. 94 ** #	69. 82±1. 17 ** #	40. 75±1. 96 ** #	4. 60±1. 15 ** #
A10 组	25. 42±1. 08 ** #	71. 14±1. 30 ** #	39. 98±0. 20 ** #	4. 63±0. 40 ** #

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与相应的丹参生品组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

共有峰面积为自变量, 抗凝血指标 APTT、PT、TT、FIB 为因变量, 进行共有色谱峰与活性指标之间的相关性分析。变量对抗凝血活性的影响可由

VIP 值的大小来衡量, 20 个共有峰分别与 APTT、PT、TT、FIB 指标相关的 VIP 见图 3。

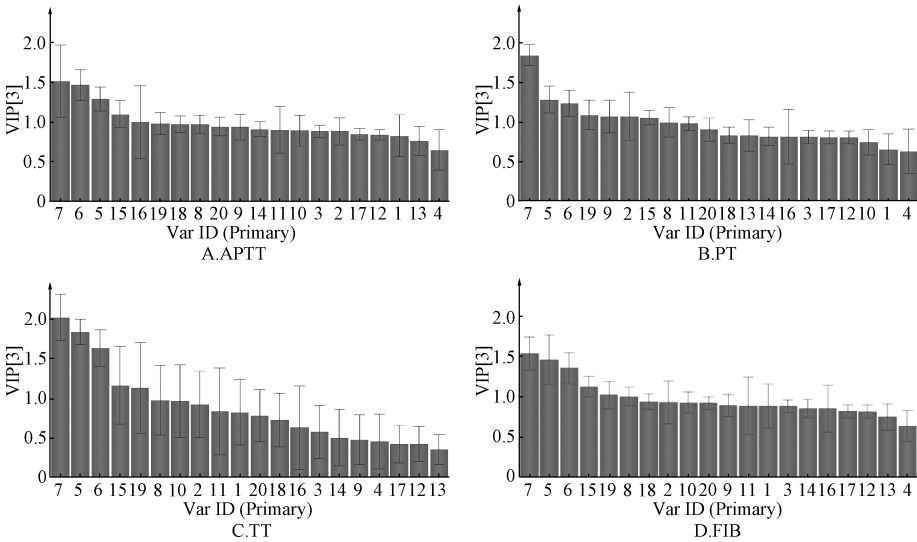


图 3 生丹参、酒丹参谱效相关 PLS-DA 模型的 VIP 图

Fig. 3 VIP diagrams of spectrum-effect related PLS-DA models for crude and wine-processed *S. miltiorrhiza*

VIP 越大, 即变量离 X 轴越远, 表明该色谱峰对于丹参与酒丹参的分类贡献越大, 即为最能导致生丹参、酒丹参药效相区分的差异成分。由图 3 可

知, 峰 7 (丹酚酸 B)、6 (紫草酸)、5 (迷迭香酸)、15 的 VIP 值均大于 1, 表明上述色谱峰对生丹参、酒丹参抗凝血活性差异的贡献较大, 也是导

致两者作用不同的主要成分。

3 讨论

凝血过程主要分为内源性和外源性 2 种凝血途径，大致可分为凝血酶原激活物的形成、凝血酶的形成及纤维蛋白的形成 3 个阶段。APTT 是反应内源性凝血途径的指标；PT 可反映外源性凝血途径的有关因子的水平；TT 主要反映纤维蛋白原转变为纤维蛋白的时间；FIB 即为凝血因子 I，通过对纤溶系统的影响反映凝血效果^[13]。

本实验采用 HPLC 法建立了生丹参及酒丹参指纹图谱，选取 APTT、PT、TT、FIB 4 个指标测定了丹参及酒丹参的体外抗凝血活性，与生品比较，酒丹参的抗凝血作用显著增强。用 PLS-DA 法对丹参及酒丹参的共有峰与抗凝血药效进行谱效相关分析，建立丹参生品及酒制品的共有峰与抗凝血活性药效的相关性模型，发现导致丹参及酒丹参在抗凝血活性方面差异的主要成分包括丹酚酸 B、紫草酸、迷迭香酸及 1 种未知成分，此未知成分的结构及在活血化瘀方面的活性还需进一步验证。该方法能够较精准的找到导致中药炮制前后药理活性发生变化的物质基础，以期为传统医药理论提供佐证，为丹参及酒炙丹参的质量控制与谱效关系研究提供思路。

课题组前期研究发现，丹参经酒炙后丹酚酸 B、紫草酸、迷迭香酸含量均降低，丹酚酸 B 转化为丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 C，迷迭香酸转化为丹参素、咖啡酸、阿魏酸^[14]。据报道，迷迭香酸在体内的代谢产物为香豆酸、丹参素等成分；丹酚酸 B 在体内降解为丹参素、咖啡酸及紫草酸^[15-16]，推测丹参酒炙过程中受温度的影响促使丹酚酸 B、紫草酸、迷迭香酸转化为更易被人体吸收、活性更强的化合物，从而增强了其抗凝血药效，有待深入研究。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部

[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020.

[2] Lee H J, Seo M, Lee E J. Salvianolic acid B inhibits atherogenesis of vascular cells through induction of Nrf2-dependent heme oxygenase-1[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(26): 3095-3106.

[3] 杨龙飞, 赵瀚年, 丁晓彦, 等. 丹参水溶性成分促斑马鱼血管生成及心脏保护活性的谱-效关系研究[J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2899-2907.

[4] Su C Y, Ming Q L, Rahman K, et al. *Salvia miltiorrhiza*: traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Medicines*, 2015, 13(3): 163-182.

[5] 李慧芬, 张学兰. 丹参炮制历史沿革研究[J]. *中华中医药学刊*, 2006, 24(11): 2058-2059.

[6] 曾令军, 林 兵, 宋洪涛. 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.

[7] 吕邵娃, 董书羽, 郭玉岩, 等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(15): 226-230.

[8] 吴 鹏, 李慧芬, 张学兰, 等. HPLC-TOF/MS 分析丹参酒炙前后化学成分的变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(11): 6-9.

[9] 石勇强, 王 玉. 丹参酒制方法与其水溶性有效成分含量的关系[J]. *黑龙江医药*, 2010, 23(5): 706-708.

[10] 李慧芬, 宋梦晗, 崔伟亮, 等. 一测多评法测定丹参酒炙前后 4 种丹参酮类成分的含量[J]. *山东中医杂志*, 2018, 37(5): 416-419; 428.

[11] 奚亚亚, 郑文华, 曲丛丛, 等. 基于形性与生物活性结合的酒炙丹参炮制程度研究[J]. *中药材*, 2019, 42(11): 2538-2541.

[12] 张晓灿, 罗丹丹, 陶爱恩, 等. 基于指纹图谱和化学计量学的丹参及紫丹参质量评价研究[J]. *中药材*, 2017, 40(5): 1062-1065.

[13] 张英杰, 王会君, 侯荣伟, 等. 凝血四项的临床应用[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(4): 450-452.

[14] 崔伟亮, 李慧芬, 张学兰, 等. UPLC-QE/MS 法分析丹参酒炙前后 5 种质变化合物[J]. *中成药*, 2019, 41(4): 844-849.

[15] 郭少波, 徐露露, 蒋丽娟, 等. 迷迭香酸的大鼠体内代谢产物及代谢途径分析[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(21): 4704-4712.

[16] 侯梦妮, 顾 霄, 谢 珍, 等. 丹酚酸 B 在大鼠体内的代谢产物及代谢途径研究[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(21): 2673-2682.