

[制剂工艺]

基于谱效关系筛选大黄炭制前后改善人脐静脉内皮细胞损伤的物质基础

翟 婷¹, 卢利涛¹, 何江伟¹, 郭亚菲², 郭 玫¹, 朱昕宇^{1,3,4,5*}
[1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 3. 甘肃省中医药研究中心, 甘肃 兰州 730000; 4. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 5. 甘肃省道地药材质量标准化技术研究与推广工程实验室, 甘肃 兰州 730000]

摘要: **目的** 筛选大黄炭制前后改善人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的物质基础。**方法** 建立 HPLC 指纹图谱, 正交偏最小二乘法判别分析进行差异性分析。以 LPS 诱导 HUVECs 损伤模型, 检测 NO、MDA 水平及 SOD 活性。灰色关联度分析、偏最小二乘法回归分析考察谱效关系, 筛选活性成分。**结果** 17 批生品、炭制品指纹图谱中分别有 22、20 个共有峰, 相似度均大于 0.8, 主要差异成分有 12 种, 其中没食子酸、5-羟甲基糠醛、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 A 被鉴定出。炭制品改善 HUVECs 损伤的作用强于生品。生品、炭制品指纹图谱中共有峰的关联度均大于 0.5, 峰 3、5、11、12、15、19、23 对其药效有显著影响(VIP 值>1)。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 可为明确大黄及其炭制品止血作用的物质基础提供依据。
关键词: 大黄; 大黄炭; 人脐静脉内皮细胞(HUVECs); 物质基础; HPLC 指纹图谱; 止血作用; 谱效关系
中图分类号: R283 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2025)07-2163-09
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.005

Screening of material basis for *Rhei Radix et Rhizoma* on improving human umbilical vein endothelial cell injury before and after carbonization based on spectrum-effect relationship

ZHAI Ting¹, LU Li-tao¹, HE Jiang-wei¹, GUO Ya-fei², GUO Mei¹, ZHU Xin-yu^{1,3,4,5*}
[1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. Gansu Provincial Research Center for Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. Provincial Key Laboratory for Research on Chemistry and Quality of Traditional Chinese (Tibetan) Medicines in Universities of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 5. Gansu Provincial Laboratory for Quality Standardization Technology Research and Promotion Engineering of Authentic Medicinal Materials, Lanzhou 730000, China]

ABSTRACT: **AIM** To screen the material basis for *Rhei Radix et Rhizoma* on improving human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) injury before and after carbonization. **METHODS** The HPLC fingerprints were established, after which difference analysis was performed by orthogonal partial least squares discriminant analysis. The LPS-induced HUVECs injury model was established, then NO, MDA levels and SOD activity were detected. Gray correlation analysis and partial least squares regression were adopted in the investigation of spectrum-effect relationship, and active constituents were screened. **RESULTS** There were 22 and 20 common peaks in the fingerprints for 17 batches of raw products and carbonized products, respectively, along with the similarities of more than 0.8. Twelve main difference components were observable, among which gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural,

收稿日期: 2024-12-06
基金项目: 国家自然科学基金联合基金重点项目(U21A20412); 甘肃省教育厅高校教师创新基金项目(2024A-091); 甘肃省道地药材质量标准化技术研究与推广工程实验室开放基金项目(ddyc-2022-04); 甘肃中医药大学引进人才科研启动基金(2019YJRC-01)
作者简介: 翟 婷(1999—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药效物质基础及其质量控制。E-mail: 1451639255@qq.com
*通信作者: 朱昕宇(1992—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药化学、分析学研究。E-mail: zhxy19@gszy.edu.cn

catechin, aloe rhodopsin-8-*O*- β -*D*-glucoside, rhubarbic acid-8-*O*- β -*D*-glucoside and sennosides A were identified. The carbonized products demonstrated stronger effect on improving HUVECs injury than the raw product. The correlations of common peaks were more than 0.5 in the fingerprints for raw products and carbonized products, and peaks 3, 5, 11, 12, 15, 19, 23 exhibited significant effects on their efficacy (VIP values>1). **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can provide a basis for clarifying the material basis for hemostatic efficacy of *Rhei Radix et Rhizoma* and its carbonized product.

KEY WORDS: *Rhei Radix et Rhizoma*; *Rhei Radix et Rhizoma* charcoal; human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); material basis; HPLC fingerprints; hemostatic efficacy; spectrum-effect relationship

唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 为我国特有物种,主产于甘肃南部、青海南部、西藏偏东部等地区,为甘肃省地道药材^[1-2],具有泻下攻积、清热泻火等功效,炒炭后可增强其凉血、化瘀、止血作用,用于治疗血热有瘀出血症^[3-4]。血管内皮细胞是血管壁重要组成部分,可调节血管通透性,参与物质转运,维持凝血与抗凝之间的平衡,确保正常的血液流变性^[5-6],当其受到病理性损害时会释放过量一氧化氮(NO),使细胞连接变松、通透性增加,从而引起出血^[7];过量的活性氧自由基(ROS)可引发脂质过氧化反应,进一步导致机体组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性降低,脂质过氧化重要产物丙二醛(MDA)水平升高,从而使血管壁凝血功能发生障碍^[8-9],但大黄及其炭制品是否因保护血管内皮细胞而具有止血作用尚不明确。因此,本实验采用脂多糖(LPS)诱

导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤模型,观察大黄炭制前后对NO、MDA水平及SOD活性的影响,并结合HPLC指纹图谱建立其保护损伤血管内皮细胞作用的谱效关系,旨在筛选质量差异标志物,阐明该药材发挥止血作用的物质基础。

1 材料

1.1 细胞 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)(货号iCell-h110),购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。

1.2 药材 大黄来源于甘肃、青海,经甘肃中医药大学强正泽副教授鉴定为蓼科大黄属植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 的干燥根及根茎,具体见表1。大黄炭是按2020年版《中国药典》规定炒制而成的外焦内棕褐色的炮制品(编号T1~T17)。

表 1 大黄信息

Tab. 1 Information of *Rhei Radix et Rhizoma*

编号	来源	采收时间	编号	来源	采收时间
S1	甘肃省甘南州夏河县	2021 年秋	S10	青海省西宁市湟中区	2021 年秋
S2	甘肃省甘南州卓尼县	2022 年秋	S11	甘肃省卓尼县藏巴哇镇	2023 年秋
S3	青海省西宁市湟中区	2020 年秋	S12	甘肃省合作市麻岗村	2023 年秋
S4	甘肃省甘南州合作市	2021 年秋	S13	甘肃省合作市依毛梁村	2023 年秋
S5	甘肃省甘南州临潭县	2021 年秋	S14	甘肃省甘南州临潭县	2023 年秋
S6	甘肃省甘南州合作市	2022 年秋	S15	甘肃省合作市早子村	2023 年秋
S7	青海省西宁市湟中区	2022 年秋	S16	甘肃省合作市勒秀镇	2023 年秋
S8	甘肃省甘南州临潭县	2022 年秋	S17	甘肃省夏河县博拉乡	2023 年秋
S9	甘肃省甘南州合作市	2020 年秋			

1.3 试剂 没食子酸(批号AF22051007)、5-羟甲基糠醛(批号AFB12704)、儿茶素(批号AF21061302)、芦荟大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号AF21041301)、番泻苷B(批号AZCE1710)、大黄酸-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号AF21051507)、番泻苷A(批号AF22012402)、大黄酚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号AFCC0101)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号AZ24121606)、大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号AZCG1913)、芦荟大黄素(批

号T28D6F8264)、大黄酸(批号AF22022153)、大黄素(批号C18F8Q29652)、大黄酚(批号T24J10F93796)、大黄素甲醚(批号T09M9F55482)、5-羟甲基糠醛(批号AFB12704)对照品均购自成都埃法生物科技有限公司,纯度 $\geq$ 98%。LPS(批号820F036)购自北京索莱宝科技有限公司;MTT购自美国Sigma公司;PBS缓冲液购自上海李记生物科技有限公司;RPMI-1640培养基购自美国HyClone公司;胎牛血清、胰蛋白酶均

购自美国 Gibco 公司；丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。磷酸（色谱纯，批号 20210415）购自天津市大茂化学试剂厂；甲醇（色谱纯，批号 20230218056）购自天津市富宇精细化工有限公司。

1.4 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；DFT-200A 型手提式高速粉碎机（温岭市林大机械有限公司）；KQ-700DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；ME204E 型电子天平 [梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；DHG-9070A 型电热鼓风干燥箱（上海铂温仪器有限公司）；MULTISKAN MK3 型酶标仪（美国 Thermo 公司）；HF90 型 CO₂ 恒温培养箱、HF-1200LC 型生物安全柜、Neofuge 15R 型冷冻离心机 [力新仪器（上海）有限公司]；CKX53 型倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；Cellometer mini 型细胞计数仪（美国 Nexcelom 公司）。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 参照文献 [10] 报道，SinoChromODS-BP 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲醇（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0~8 min，5%~16% A；8~25 min，16%~30% A；25~48 min，30%~60% A；48~57 min，60% A；57~85 min，60%~100% A）；体积流量 1 mL/min；柱温 35℃；检测波长 280 nm；进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 B、大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量，70% 甲醇溶解，摇匀，制成质量浓度分别为 0.065、0.035、0.333、0.07、0.078、0.333、0.144、0.065、0.036、0.152、0.07、0.2、0.055、0.07、0.144 mg/mL 的溶液，即得。

2.1.3 供试品溶液制备 根据前期预实验结果，称取生品及其炭制品（过 4 号筛）各 0.25 g，加入 25 mL 70% 甲醇，在（35±5）℃ 下超声（功率 420 W，频率 40 kHz）处理 30 min，放冷，70% 甲醇补足减失的质量，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得，剩余滤液挥干溶剂成粉末后保存。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 B、大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 0.87%、1.17%、0.96%、1.32%、0.91%、0.75%、2.79%、1.2%、0.96%、1.15%、1.20%、1.33%、0.74%、2.82%、2.67%，表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性试验 精密称取炭制品（T1）0.25 g，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 B、大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量 RSD 分别为 0.51%、0.29%、0.47%、2.08%、2.78%、2.24%、2.25%、0.71%、1.94%、2.52%、0.82%、1.49%、2.69%、2.09%、2.84%，表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 取供试品溶液（T1）适量，于 0、2、4、6、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 B、大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 1.84%、2.90%、2.86%、2.91%、0.95%、2.48%、2.07%、2.94%、1.97%、1.66%、2.27%、1.90%、2.44%、1.79%、2.18%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 耐用性试验 分别在不同体积流量[(1.0±0.2) mL/min]、柱温[(35±5)℃]、色谱柱（SinoChromODS-BP、Agilent TC-C₁₈，4.6 mm×250 mm，5 μm）下进行考察，发现各成分色谱峰峰面积 RSD 为 0.31~2.00%，保留时间 RSD 为 0.04~0.57%，表明该方法耐用性良好。

2.3 图谱生成 取生品及其炭制品各 17 批，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”

项色谱条件下进样测定，将相关数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 年版），采用中位数法，设定时间窗宽度为 0.1 min，以生品（S1）、炭制品（T1）为对照，经多点校正后采用 Mark 峰匹配，生成指纹图谱（图 1~2），计算相似度，结果见表 2。由此可知，各批生品及其炭制品指纹图谱与对照图谱的相似度均大于 0.8，表明两者质量稳定性和一致性理想，制炭过程可控性良好。

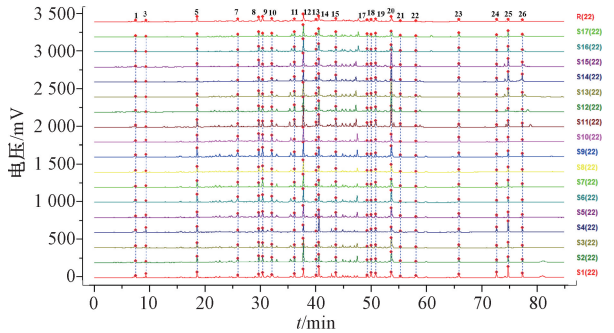


图 1 17 批大黄 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints for 17 batches of *Rhei Radix et Rhizoma*

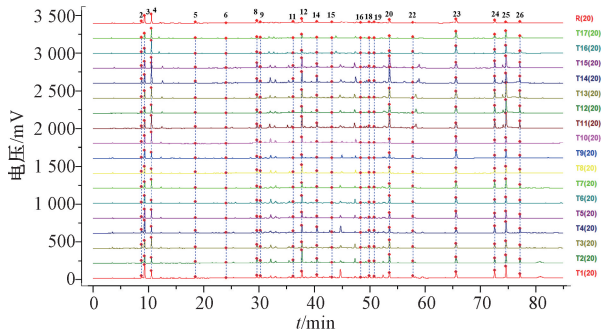


图 2 17 批大黄炭 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints for 17 batches of *Rhei Radix et Rhizoma charcoal*

2.4 共有峰指认与差异性分析

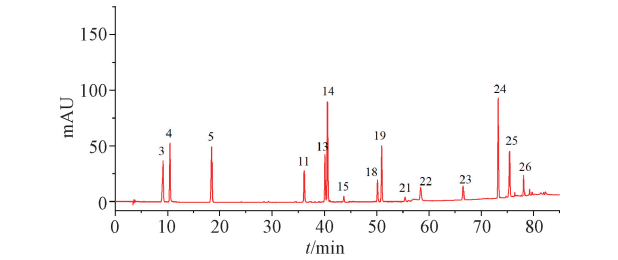
2.4.1 共有峰指认 取“2.1.2”项下对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 3。在生品及其炭制品中分别鉴定出 22、20 个共有峰，两者共有峰 16 个，经对照品比对指认出 3~5、11、13~15、18、19、21~26 号峰，分别为没食子酸、5-羟甲基糠醛、儿茶素、芦荟苷、番泻苷 B、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷、番泻苷 A、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。另外，生品中未发现 4 号峰；炭制品中有 2 批未检测到 13、

表 2 相似度测定结果

Tab. 2 Results for similarity determination

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.941	T1	0.966
S2	0.992	T2	0.953
S3	0.983	T3	0.978
S4	0.875	T4	0.940
S5	0.996	T5	0.988
S6	0.980	T6	0.955
S7	0.977	T7	0.983
S8	0.986	T8	0.976
S9	0.982	T9	0.957
S10	0.941	T10	0.951
S11	0.983	T11	0.981
S12	0.975	T12	0.975
S13	0.983	T13	0.982
S14	0.931	T14	0.951
S15	0.979	T15	0.985
S16	0.984	T16	0.937
S17	0.982	T17	0.963

21 号峰，而其余批次中均存在。



3. 没食子酸 4. 5-羟甲基糠醛 5. 儿茶素 11. 芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷 13. 番泻苷 B 14. 大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷 15. 番泻苷 A 18. 大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷 19. 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷 21. 大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖糖苷 22. 芦荟大黄素 23. 大黄酸 24. 大黄素 25. 大黄酚 26. 大黄素甲醚
3. gallic acid 4. 5-hydroxymethylfurfural 5. catechin 11. aloemodin-8-*O*- β -D-glucoside 13. sennoside B 14. rhein-8-*O*- β -D-glucoside 15. sennoside A 18. chrysophanol-8-*O*- β -D-glucoside 19. emodin-8-*O*- β -D-glucoside 21. physcion-8-*O*- β -D-glucoside 22. aloemodin 23. rhein 24. emodin 25. chrysophanic acid 26, physcion

图 3 对照品 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of reference substances

2.4.2 差异性分析 采用 SIMCA14.0 软件中的正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）建立模型，发现累积解释能力参数 R^2X （cum）为 0.769， R^2Y （cum）为 0.974，预测能力参数 Q^2 （cum）为 0.953>0.5，具有良好的解释、预测能力^[11]。得分图见图 4，可知生品及其炭制品分布在不同区域，

即两者成分存在显著差异。以变量重要性投影 (VIP) 值>1 为标准, 共筛选出 12 个差异标志物, 分别为 4 号峰 (5-羟甲基糠醛)、3 号峰 (没食子酸)、14 号峰 (大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖糖苷)、20 号峰、12 号峰、10 号峰、5 号峰 (儿茶素)、15 号峰 (番泻苷 A)、7 号峰、9 号峰、11 号峰 (芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖糖苷)、19 号峰, 见图 5。

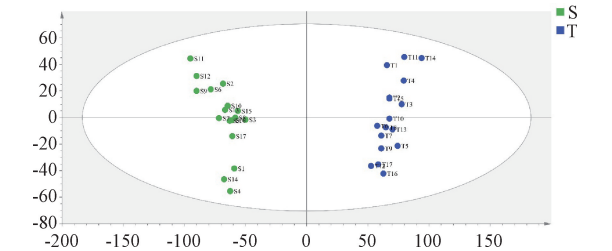


图 4 OPLS-DA 得分图
Fig. 4 Score plot for OPLS-DA

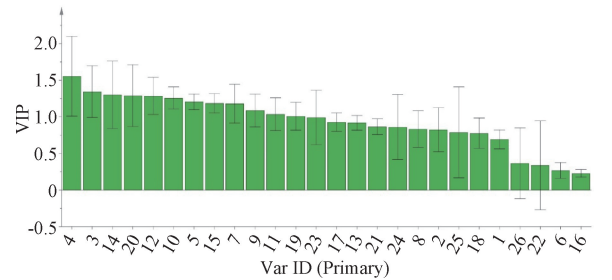


图 5 OPLS-DA VIP 值
Fig. 5 VIP values for OPLS-DA

2.5 HUVECs 细胞损伤保护作用研究

2.5.1 细胞培养 HUVECs 细胞复苏后, 加入配制好的培养基 (RPMI-1640 培养基+10% 胎牛血清+1%青霉素-链霉素溶液) 中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁长满至 90% 后用 0.25% 胰酶消化传代, 取对数生长期者用于实验。

2.5.2 药液制备 取“2.1.3”项下剩余滤液粉末 (S1、T1), 加入培养基及 DMSO, 制成 16.0 μg/mL 母液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.5.3 分组与给药 取对数生长期 HUVECs 细胞, 调整浓度为 (1.5~2.0) ×10⁵/mL, 每孔 100 μL, 接种于 96 孔板中, 作为正常组, 同时设置空白组, 不作任何处理, 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养过夜, 吸去原培养液, 2 组加入 100 μL 完全培养基, 给药组分别加入含 16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/mL 生品及其炭制品 70% 甲醇提取物的完全培养基, 每组 3 个复孔, 培养 24 h, 每孔中加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 在 37 ℃ 下培养

4 h, 弃去上清液, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 待结晶完全溶解后采用酶标仪立即检测 570 nm 波长处吸光度 *A*, 计算细胞存活率, 公式为存活率= [(*A*_{给药组}-*A*_{空白组}) / (*A*_{正常组}-*A*_{空白组})] × 100%。

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 结果见表 3。由此可知, 当提取物质量浓度小于 1.0 μg/mL 时细胞存活率大于 90%, 并且随着其质量浓度增加无明显变化 (*P*>0.05), 故选择 0.25~1.0 μg/mL 进行后续实验。

表 3 各组细胞存活率比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)
Tab. 3 Comparison of cell viabilities among various groups ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

组别	质量浓度/(μg/mL)	细胞存活率/%
空白组	—	0.00±0.003
正常组	—	100.00±0.038 ^{##}
大黄 70% 甲醇提取物组	0.25	99.34±0.060
	0.5	99.03±0.030
	1.0	95.58±0.046
	2.0	85.06±0.037
	4.0	77.47±0.044 ^{**}
	8.0	64.94±0.043 ^{**}
大黄炭 70% 甲醇提取物组	16.0	61.62±0.043 ^{**}
	0.25	99.32±0.024
	0.5	95.50±0.053
	1.0	94.04±0.051
	2.0	92.08±0.053
	4.0	89.68±0.071
	8.0	88.50±0.002
	16.0	81.79±0.031 [*]

注: 与空白组比较, ^{##}*P*<0.01; 与正常组比较, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01。

2.5.4 NO、MDA 水平及 SOD 活性检测 取对数生长期 HUVECs 细胞, 调整浓度为 (1.5~2.0) ×10⁵/mL, 每孔 100 μL, 接种于 96 孔板中, 作为正常组, 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养过夜, 吸去原培养液, 正常组加入 100 μL 专用培养基, 模型组加入含 1 μg/mL 的 LPS 专用培养基 100 μL, 给药组分别加入 1、0.5、0.25 μg/mL 生品及其炭制品 70% 甲醇提取物含 1 μg/mL 脂多糖的专用培养基 100 μL, 每组 3 个复孔, 培养 24 h, 按照试剂盒说明书, 分别采用硝酸还原酶法、硫代巴比妥酸显色法、黄嘌呤氧化酶法检测 NO、MDA 水平及 SOD 活性。

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 结果见表 4。由此可知, 与正常组比较, 模型组 NO、MDA 水平升高 (*P*<0.01), SOD 活性降低 (*P*<0.01), 表明造模成功; 与模型组比较, 给药

组 NO、MDA 水平在 0.25~1.0 μg/mL 范围内不断降低，而 SOD 活性在该范围内不断升高，并且三者均呈剂量相关性，故设定质量浓度为 1.0 μg/mL 进行后续实验。

表 4 各组 NO、MDA 水平及 SOD 活性比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 4 Comparison of NO, MDA levels and SOD activities among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)	MDA/(nmol·mg·prot ⁻¹)	SOD/(U·mg·prot ⁻¹)
正常组	—	19.65±1.16	28.52±1.90	25.64±1.24
模型组	—	54.97±1.56 ^{##}	99.88±1.69 ^{##}	12.52±1.16 ^{##}
大黄组	0.25	52.24±1.37	99.92±3.16	14.28±0.65
	0.5	49.42±0.85 [*]	91.56±2.03 ^{**}	17.98±1.09 ^{**}
	1.0	45.83±1.01 ^{**}	86.60±1.74 ^{**}	19.14±0.72 ^{**}
	0.25	49.00±2.13 [*]	86.75±0.62 ^{**}	19.63±0.72 ^{**}
	0.5	45.67±1.52 ^{**}	82.22±1.12 ^{**}	22.30±2.95 ^{**}
	1.0	38.93±1.85 ^{**}	79.33±1.05 ^{**}	24.76±2.05 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

2.5.5 止血作用研究 按“2.5.2”项下方法制备药液，按照试剂盒说明书，分别检测 NO、MDA 水平及 SOD 活性，结果见表 5~7。由此可知，与正常组比较，模型组 NO、MDA 水平升高 ($P<0.01$)，SOD 活性降低 ($P<0.01$)，表明造模成功；与模型组比较，大部分生品组、炭制品组 NO、MDA 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，SOD 活性升高 ($P<0.01$)。

表 5 各组 NO 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Comparison of NO levels among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	NO/(μmol·L ⁻¹)	组别	NO/(μmol·L ⁻¹)
正常组	23.43±1.50	S17 组	42.24±2.02 ^{**}
模型组	63.42±1.74 ^{##}	T1 组	34.64±2.18 ^{**}
S1 组	46.76±1.90 ^{**}	T2 组	36.36±2.40 ^{**}
S2 组	47.69±2.07 ^{**}	T3 组	33.46±1.41 ^{**}
S3 组	47.35±1.90 ^{**}	T4 组	37.78±1.53 ^{**}
S4 组	52.11±2.01 ^{**}	T5 组	29.98±2.21 ^{**}
S5 组	48.99±1.72 ^{**}	T6 组	36.34±3.44 ^{**}
S6 组	51.33±0.62 ^{**}	T7 组	32.34±2.61 ^{**}
S7 组	48.33±4.65 ^{**}	T8 组	31.11±2.52 ^{**}
S8 组	50.20±2.46 ^{**}	T9 组	36.53±2.80 ^{**}
S9 组	46.89±1.86 ^{**}	T10 组	34.08±3.22 ^{**}
S10 组	50.54±0.75 ^{**}	T11 组	35.44±2.41 ^{**}
S11 组	48.71±2.58 ^{**}	T12 组	39.66±1.91 ^{**}
S12 组	50.95±2.21 ^{**}	T13 组	36.06±1.79 ^{**}
S13 组	55.57±2.07	T14 组	33.91±0.28 ^{**}
S14 组	47.10±1.71 ^{**}	T15 组	38.23±2.38 ^{**}
S15 组	51.78±2.49 ^{**}	T16 组	37.34±2.64 ^{**}
S16 组	53.57±3.06 [*]	T17 组	40.47±1.98 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

2.5.6 差异性分析 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析，发现组间比较，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，再通过 SIMCA14.0 软件进行 OPLS-DA 分析，结果见图 6~8。由此可知，生品及其炭制品分布在不同区域，表明两者对 NO、

2168

表 6 各组 MDA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Comparison of MDA levels among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	MDA/(nmol·mg·prot ⁻¹)	组别	MDA/(nmol·mg·prot ⁻¹)
正常组	29.60±1.86	S17 组	73.69±0.77 ^{**}
模型组	104.75±2.58 ^{##}	T1 组	61.82±0.67 ^{**}
S1 组	76.37±0.87 ^{**}	T2 组	67.13±2.68 ^{**}
S2 组	76.29±2.50 ^{**}	T3 组	55.75±1.45 ^{**}
S3 组	75.75±1.45 ^{**}	T4 组	68.97±0.47 ^{**}
S4 组	75.75±4.45 ^{**}	T5 组	56.88±2.24 ^{**}
S5 组	80.03±1.40 ^{**}	T6 组	68.87±1.60 ^{**}
S6 组	77.39±1.80 ^{**}	T7 组	45.06±1.33 ^{**}
S7 组	78.02±4.15 ^{**}	T8 组	69.86±0.60 ^{**}
S8 组	83.78±2.49 ^{**}	T9 组	58.17±1.29 ^{**}
S9 组	79.52±1.11 ^{**}	T10 组	67.68±1.80 ^{**}
S10 组	81.04±2.86 ^{**}	T11 组	46.25±2.22 ^{**}
S11 组	106.73±5.58	T12 组	69.61±3.38 ^{**}
S12 组	82.81±1.21 ^{**}	T13 组	54.84±2.77 ^{**}
S13 组	77.85±1.38 ^{**}	T14 组	61.71±2.39 ^{**}
S14 组	78.76±1.37 ^{**}	T15 组	71.83±3.82 ^{**}
S15 组	84.87±3.65 ^{**}	T16 组	69.22±2.21 ^{**}
S16 组	106.40±2.96	T17 组	64.13±0.57 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

MDA 水平及 SOD 活性的影响存在一定差异。

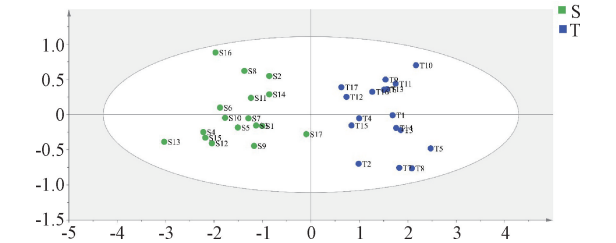


图 6 NO 水平 OPLS-DA 散点图

Fig. 6 OPLS-DA scatter plot for NO levels

2.6 谱效关系研究

2.6.1 灰色关联度分析 分别将生品及其炭制品 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积与 NO、MDA 水平及 SOD 活性导入 SPSSPRO 网站，以 NO、MDA 水平

表 7 各组 SOD 活性比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 7 Comparison of SOD activities among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	SOD/(U·mg·prot ⁻¹)	组别	SOD/(U·mg·prot ⁻¹)
正常组	31.89±1.54	S17 组	32.54±2.72**
模型组	7.93±1.11##	T1 组	37.65±1.98**
S1 组	30.51±0.56**	T2 组	36.67±1.26**
S2 组	29.13±0.85**	T3 组	33.81±0.36**
S3 组	25.31±1.48**	T4 组	39.42±1.06**
S4 组	17.07±0.71**	T5 组	35.29±0.46**
S5 组	24.67±2.03**	T6 组	38.54±1.75**
S6 组	14.37±1.26	T7 组	34.77±2.68**
S7 组	21.87±1.56**	T8 组	42.88±1.27**
S8 组	28.79±3.48**	T9 组	34.63±2.98**
S9 组	21.59±0.90**	T10 组	39.64±2.30**
S10 组	25.28±2.54**	T11 组	37.33±2.36**
S11 组	22.97±2.79**	T12 组	37.72±1.34**
S12 组	26.13±1.28**	T13 组	34.09±1.19**
S13 组	23.79±1.60**	T14 组	38.25±0.52**
S14 组	32.60±2.84**	T15 组	34.87±1.49**
S15 组	16.45±2.05**	T16 组	35.91±0.49**
S16 组	15.70±1.74*	T17 组	38.36±1.26**

注：与正常组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

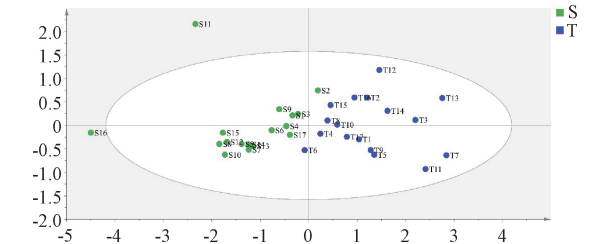


图 7 MDA 水平 OPLS-DA 散点图

Fig. 7 OPLS-DA scatter plot for MDA levels

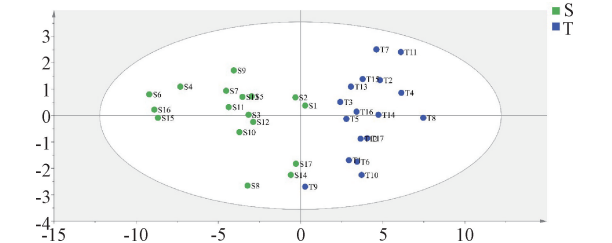


图 8 SOD 活性 OPLS-DA 散点图

Fig. 8 OPLS-DA scatter plot for SOD activities

及 SOD 活性为母序列，HPLC 指纹图谱共有峰峰面积为子序列，采用均值化法对原始数据进行无量纲化处理后作灰色关联度分析，关联度越大，共有峰峰面积与药效的关系越密切^[12]，结果见表 8~10。由此可知，各共有峰峰面积关联度均大于 0.5，表明生品及其炭制品是通过内部成分群来共同发挥止血作用。

表 8 共有峰峰面积与 NO 水平的关联度

Tab. 8 Correlations between peak areas of common peaks and NO levels

共有峰	关联度	关联序	共有峰	关联度	关联序
3	0.588	16	18	0.759	4
5	0.691	14	19	0.739	8
8	0.822	3	20	0.830	1
9	0.718	10	22	0.719	9
11	0.704	12	23	0.707	11
12	0.823	2	24	0.699	13
14	0.751	6	25	0.757	5
15	0.630	15	26	0.750	7

表 9 共有峰峰面积与 MDA 水平的关联度

Tab. 9 Correlations between peak areas of common peaks and MDA levels

共有峰	关联度	关联序	共有峰	关联度	关联序
3	0.602	16	18	0.751	6
5	0.685	14	19	0.728	9
8	0.814	2	20	0.816	1
9	0.708	11	22	0.728	8
11	0.703	13	23	0.726	10
12	0.813	3	24	0.708	12
14	0.734	7	25	0.754	4
15	0.621	15	26	0.753	5

表 10 共有峰峰面积与 SOD 活性的关联度

Tab. 10 Correlations between peak areas of common peaks and SOD activities

共有峰	关联度	关联序	共有峰	关联度	关联序
3	0.713	7	18	0.650	10
5	0.582	15	19	0.602	14
8	0.713	8	20	0.720	6
9	0.605	12	22	0.781	5
11	0.604	13	23	0.852	1
12	0.703	9	24	0.789	4
14	0.642	11	25	0.840	2
15	0.522	16	26	0.793	3

2.6.2 偏最小二乘法回归分析 采用 SIMCA14.0 软件，以生品及其炭制品 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积为自变量 (X)，NO、MDA 水平及 SOD 活性为因变量 (Y)，测定回归系数和 VIP 值^[13]，结果见图 9~14，可知与 NO、MDA 水平及 SOD 活性关联、VIP 值 >1 的色谱峰分别有 11、8、9 个。另外，峰 3、5、11、12、15、19、23 对炭制品止血作用有显著影响。

3 讨论与结论

本实验采用 OLPS-DA 分析，以 VIP 值 >1 为标准，筛选造成大黄及其炭制品成分差异的主要标志物。灰色关联分析能较好地识别与药效作用相关性较高的共有峰，但无法精确区分相关性方向^[14]，

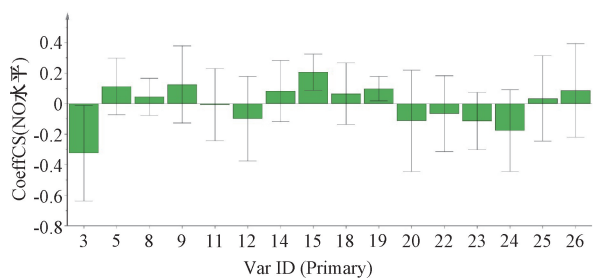


图 9 NO 水平回归系数

Fig. 9 Regression coefficients for NO levels

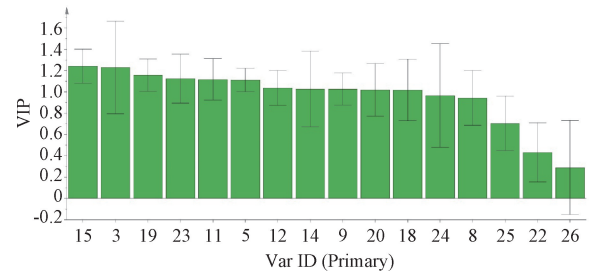


图 10 NO 水平 VIP 值

Fig. 10 VIP values for NO levels

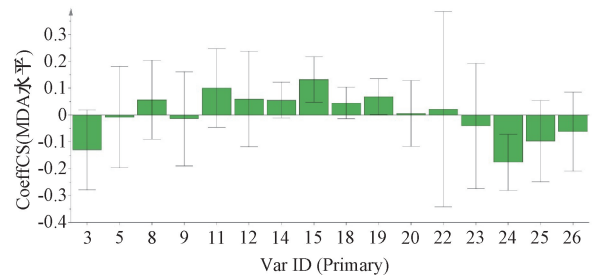


图 11 MDA 水平回归系数

Fig. 11 Regression coefficients for MDA levels

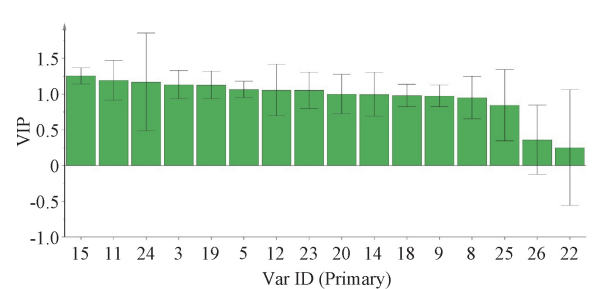


图 12 MDA 水平 VIP 值

Fig. 12 VIP values for MDA levels

结果显示共有峰关联度均大于 0.5，表明这些成分是大黄及其炭制品发挥止血药效的主要物质。偏最小二乘回归分析以 VIP 值>1 为标准，可筛选引起大黄及其炭制品止血功效差异的主要变量。

研究表明，与大黄止血作用相关的成分大多为鞣质类、蒽醌类，也可能与其炒炭后钙、铁、镁含量增加，而钙能促进血液凝固有关^[15-16]。本实验通过谱效关系得到与大黄及其炭制品止血功效相关

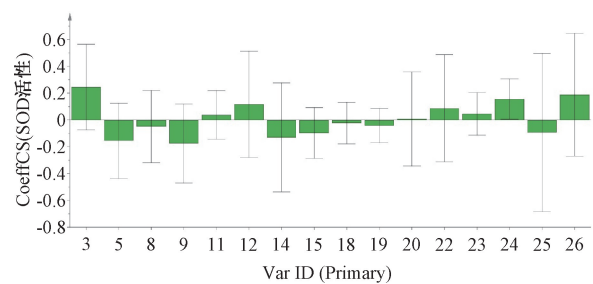


图 13 SOD 活性回归系数

Fig. 13 Regression coefficients for SOD activities

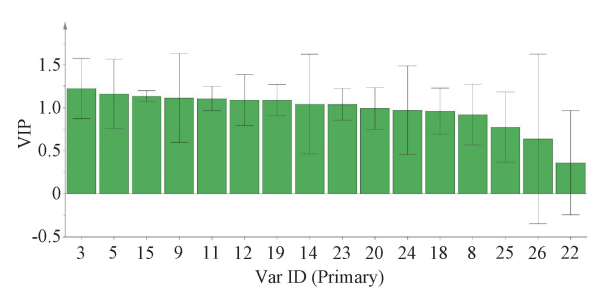


图 14 SOD 活性 VIP 值

Fig. 14 VIP values for SOD activities

性较高、被指认出的成分有没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄酸，其中没食子酸可提升血小板黏附、聚集能力，增加血小板中纤维蛋白原水平而使凝血时间缩短，从而收敛止血^[17]；大黄酸可降低毛细血管通透性，改善血管脆性，促进血小板生成^[18]；儿茶素可减轻血管内皮细胞的氧化应激，从而维护血管内皮细胞的完整性及正常功能^[19]；番泻苷以泻下作用为主，其止血作用有待进一步研究。另外，大黄炒炭后产生 5-羟甲基糠醛，可抑制脂质等过氧化反应，促进血液循环，进而维持细胞结构和功能完整性^[20]。

综上所述，本实验采用谱效关系筛选大黄炭制前后发挥止血作用的药效物质基础，可为阐释该药材“多成分-多靶点-多通路”的药效物质基础和作用机制提供参考依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：24.

[2] 孙洪兵，朱文涛，王红兰，等. 唐古特大黄潜在地理分布及生境特征分析[J]. 中药材，2024，47(1)：57-61.

[3] 罗仁书. 大黄不同炮制方法对其有效成分及临床疗效的影响[J]. 临床合理用药杂志，2013，6(13)：108-109.

[4] 戴作波. 大黄炮制品与炮制方法对其主要化学成分的影响[J]. 临床合理用药杂志，2012，5(25)：23.

[5] Kuang X, Chen S H, Lao J T, *et al.* HDAC9 in the injury of

vascular endothelial cell mediated by P38 MAPK pathway[J].
J Interferon Cytokine Res, 2021, 41(12): 439-449.

[6]

周丽娜,姚卫峰,柳佳,等.侧柏炭不同溶剂提取物对LPS诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J].中国中药杂志,2013,38(22):3933-3938.

[7]

Younis W H, Al-Rawi N H, Mohamed M A, et al. Molecular events on tooth socket healing in diabetic rabbits[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 51(8): 932-936.

[8]

Pan K Y, Shen M P, Ye Z H, et al. Inhibitive effects of anti-oxidative vitamins on mannitol-induced apoptosis of vascular endothelial cells[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7(10): 825-829.

[9]

袁萍,邹学敏,余明东,等.茶多酚对甲醛致人内皮细胞氧化损伤的保护作用[J].南华大学学报(医学版),2010,38(6):746-749.

[10]

杨丽,温雅心,刘洋,等.大黄炭加热过程颜色特征与14种化学成分含量变化关系研究[J].中国中药杂志,2020,45(17):4230-4237.

[11]

赵宏苏,赵茹,乔金为,等.基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究[J].中草药,2022,53(5):1345-1353.

[12]

王志萍,李林杰,王昱涵,等.基于灰色关联度的金母颗粒

抗炎作用的谱效关系研究[J].中药新药与临床药理,2023,34(5):675-683.

[13]

肖瑞瑶,滕攀攀,胡超,等.偏最小二乘回归分析应用于中药谱效关系的研究进展[J].辽宁化工,2020,49(3):303-305.

[14]

金雅晴,祖勉,洪永凯,等.基于网络药理学的香薷治疗流感作用机制研究[J].军事医学,2022,46(9):691-698.

[15]

朱诗塔,雷鹏,李新中,等.掌叶大黄不同炮制品指纹图谱与其止血作用的灰关联系数分析[J].中南药学,2009,7(1):55-58.

[16]

曾亮.大黄及其不同炮制品中6种元素的含量测定[J].广东微量元素科学,2007,14(6):48-49.

[17]

赵晓波.大黄炮制方法对其药理作用影响[J].医学理论与实践,2020,33(8):1246-1247.

[18]

王君.大黄不同炮制品对其药效的影响[J].天津药学,2010,22(1):53-55.

[19]

周慧,雷玉华,张复贵,等.儿茶素基于MEK/ERK信号通路对老年冠心病大鼠内皮功能的作用机制研究[J].疑难病杂志,2021,20(4):353-357.

[20]

赵玲,陈建平,李琳,等.5-羟甲基糠醛抗氧化性及其抗细胞增殖活性的研究[J].现代食品科技,2013,29(11):2638-2642.

白及提取工艺优化及其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性评价

王珊珊¹, 罗益远^{2,3}, 谢叶菲², 蒋新苗², 潘萍^{2,3}, 秦昆明^{1*}, 陈宏降^{2,3*}
(1. 江苏海洋大学药学院, 江苏 连云港 222005; 2. 浙江药科职业大学中药学院, 浙江 宁波 315500; 3. 宁波市中药资源综合开发利用重点实验室, 浙江 宁波 315500)

摘要: **目的** 优化白及提取工艺,并考察其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性。**方法** 在单因素试验基础上,以超声时间、乙醇体积分数、料液比为影响因素,天麻素、原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯、山药素Ⅲ、二氢赤素、3'-O-甲基山药素Ⅲ总提取量为评价指标,Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。测定提取物对 DPPH、ABTS⁺ 自由基的清除作用,以及对酪氨酸酶的抑制活性。**结果** 最佳条件为超声时间 49 min,乙醇体积分数 55%,料液比 1:30,提取次数 2 次,总提取量为 13.18 mg/g。提取物对 DPPH、ABTS⁺ 自由基及酪氨酸酶的 IC₅₀ 分别为 10.12、314.07、1.70 μg/g。**结论** 该方法简便、可靠、稳定,可用于提取抗氧化、酪氨酸酶抑制活性较强的白及。

关键词: 白及;提取工艺;抗氧化活性;酪氨酸酶抑制活性;Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2025)07-2171-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.006

收稿日期: 2024-09-06
基金项目: 浙江省公益基础研究项目 (LTGN23H280004); 浙江省药品监督管理局科技计划项目 (2023014); 浙江省教育厅一般项目 (Y202352650); 宁波市自然科学基金项目 (2021J187, 2023J306)
作者简介: 王珊珊 (1997—),女,研究方向为药物分析。E-mail: 1479804964@qq.com
***通信作者:** 秦昆明 (1985—),男,博士,研究员,硕士生导师,研究方向为中药炮制机理及其质量标准。E-mail: qinkm123@126.com
陈宏降 (1983—),男,博士,教授,研究方向为中药活性成分及其质量控制。Tel: (0574) 88839203, E-mail: chhj1228@163.com