

基于灰色关联分析的当归补血汤“补血” 功效的药效物质基础研究

高树华¹, 王文官², 才太吉¹, 王晨¹, 高燕^{1*}

(1. 山东中医药大学药物研究院 山东省数字中药重点实验室, 国家中医药管理局高水平重点学科-中药药剂学黄河流域特色中药生态保护和高质量发展协同创新中心, 济南 250355; 2. 烟台中亚至宝药业有限公司, 山东 烟台 264001)

摘要 目的: 通过谱-效相关分析, 针对当归补血汤的“补血”功效, 阐明其药效物质基础。方法: 运用液质联用(LC-QE/MS)技术对当归补血汤进行化学成分定性分析; 建立当归补血汤超高效液相(UPLC)指纹图谱, 对30批次自制当归补血汤的共有峰进行定量分析; 建立苯腈诱导的斑马鱼贫血模型, 应用谱-效相关分析模式, 将30批次当归补血汤的药效数据与指纹图谱数据关联分析, 筛选其药效物质基础。结果: 当归补血汤原型成分定性分析共鉴定出90个化合物; 成功建立当归补血汤 UPLC 指纹图谱及斑马鱼贫血模型, 30批次当归补血汤的药效数据与指纹图谱数据关联分析得到当归补血汤的药效物质有4-胍基丁酸(黄芪)、异亮氨酸(酒当归)、月桂酸(酒当归)、阿魏酸(酒当归、黄芪)、6-甲氧基-2H-色烯-2-酮(酒当归、黄芪)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(酒当归、黄芪)、未知峰8。结论: 本研究通过当归补血汤的原型化学成分定性定量分析并结合谱-效相关研究方法, 筛选了当归补血汤的药效物质基础, 为该经典名方制剂的临床使用和大品种二次开发提供了科学支撑。

关键词: 当归补血汤; 液质联用; 指纹图谱; 贫血模型; 药效物质基础

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2026)01-0069-14

doi:10.19778/j.chp.2026.01.010

Pharmacological material basis of the “blood-tonic” effect of Danggui Buxue Decoction based on grey relational analysis

GAO Shuhua¹, WANG Wenguan², CAI Taiji¹, WANG Chen¹, GAO Yan^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Institute of Pharmaceutical Research, High Level Traditional Chinese Medicine Key Disciplines of the State Administration of Traditional Chinese Medicine; Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center for Ecological Protection and High Quality Development of Characteristic Traditional Chinese Medicine in the Yellow River Basin, Jinan 250355, China; 2. Yantai Zhongya Zhibao Pharmaceutical Co., Ltd., Yantai 264001, China)

Abstract Objective: To elucidate the pharmacological material basis of Danggui Buxue Decoction for its “blood-tonifying” effect through spectrum-effect relationship analysis. **Methods:** The chemical constituents of Danggui Buxue Decoction were qualitatively analyzed using liquid chromatography-quadrupole-orbitrap mass spectrometry

* 基金项目: 山东省重点研发计划项目(2021CXGC010511); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程(2023TSGC0271); 山东中医药大学高等教育发展发展规划研究课题(GJYJZ202210)

第一作者简介: 高树华, 硕士在读; 研究方向: 中药药效物质基础挖掘。Tel: 19861403072; E-mail: 2022111500@sducm.edu.cn

** 通信作者简介: 高燕, 副教授; 研究方向: 中药药效物质基础挖掘。Tel: 18615212592; E-mail: gaoyanings@163.com

(LC-QE/MS). An ultra-performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Danggui Buxue Decoction was established, and the common peaks of 30 batches of self-made Danggui Buxue Decoction were quantitatively analyzed. A zebrafish anemia model induced by phenylhydrazine was established, and the spectrum-effect relationship analysis method was applied to correlate the pharmacological data of 30 batches of Danggui Buxue Decoction with the fingerprint data to screen for its pharmacological material basis. **Results:** A total of 90 prototype components were identified in the qualitative analysis of Danggui Buxue Decoction. The UPLC fingerprint of Danggui Buxue Decoction and the zebrafish anemia model were successfully established. The spectrum-effect relationship analysis of the pharmacological data and fingerprint data of 30 batches of Danggui Buxue Decoction revealed that the pharmacological materials of Danggui Buxue Decoction included 4-guanidinobutanoic acid (from Astragalus), isoleucine (from wine-prepared Angelica), lauric acid (from wine-prepare Angelica), ferulic acid (from both wine-prepared Angelica and Astragalus), 6-methoxy-2*H*-chromen-2-one (from both wine-prepared Angelica and Astragalus), sophoraisoflavone glucoside (from both wine-prepared Angelica and Astragalus), and an unknown peak 8. **Conclusion:** This study screened the pharmacological material basis of Danggui Buxue Decoction through qualitative and quantitative analysis of its prototype chemical constituents combined with spectrum-effect relationship analysis, providing scientific support for the clinical application and secondary development of this classic prescription. **Key words:** Danggui-Buxue Decoction; LC/MS; fingerprint; anemic model; pharmacological basis

当归补血汤为古代经典名方之一,始载于金元李东垣的《内外伤辨惑论》,由黄芪、当归 2 味中药组成,具有“补气养血”之功效,临床常用于医治血虚阳浮的发热、阳浮外越、劳倦内伤、妇人月经不调及疮疡久不愈合^[1-2]。随着现代医学的不断发展,对于中药复方制剂的药效物质基础和作用机制的研究日益受到关注,因此深入探究当归补血汤的药效物质基础,不仅有助于阐明其发挥补血功效的内在机制,还可为该经典名方制剂的临床使用和常用中药制剂二次开发提供科学支撑。

近年来,随着分析技术的不断进步,液质联用、超高效液相色谱等技术在中药化学成分分析中得到了广泛应用。这些技术能够对中药复方中的化学成分进行高效、准确的定性和定量分析,为深入研究中药复方的药效物质基础提供了有力的技术支持。同时,斑马鱼作为一种新兴的实验动物模型,因其具有繁殖能力强、发育速度快、胚胎透明、基因与人类高度同源等优点,在中药药效评价和作用机制研究中逐渐崭露头角。众多研究表明^[3-5],当归补血汤在治疗和改善各类贫血方面效果显著,涵盖肾性贫血、缺铁性贫血、妊娠贫血以及溶血性贫血等多种由不同病因导致的贫血病症。因此本研究以当归补血汤为研究对象,通过建立斑马鱼贫血模型,直观地观察当归补血汤对贫血症状的改善作用,并将大批次的当归补血汤药效数据与指纹图谱数据关联分析,采用先进的谱效相关分析技术,进一步筛选出当归补血汤中

的药效物质基础,以期为当归补血汤的现代化研究和临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

万分之一电子天平(型号:XS105 型, METTLER TOLEDO);电子天平(型号:FA1004N,上海精密科学仪器有限公司);高速冷冻离心机(型号:ALZ20F023,贝克曼库尔特(美国)股份有限公司);三频数控超声波清洗器(型号:KQ-200VDV,昆山市超声仪器有限公司);岛津超高效液相色谱仪(型号:LC-40DX3,岛津企业管理(中国)有限公司);高分辨质谱仪(型号:Vanquish-OrbitrapEx, Thermo Fisher Scientific 公司)旋转蒸发仪(型号:R-300,步琦实验室设备贸易(上海)有限公司);冷冻干燥仪(型号:L-200,步琦实验室设备贸易(上海)有限公司)。

1.2 试剂

色谱级甲酸(批号:F809712,上海麦克林生化科技股份有限公司);色谱级乙腈(批号:A998-4, Thermo Fisher Scientific 公司);色谱级甲醇(批号:A452-4, Thermo Fisher Scientific 公司);阿魏酸(批号:PU0772-0050,成都普思生物科技股份有限公司);毛蕊异黄酮(批号:PS0524-0020,成都普思生物科技股份有限公司);毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号:PS0409-0020,成都普思生物科技股份有限公司);芒柄花素(批号:PU0125-0025,成都普思生物科技股

份有限公司);洋川芎内酯 I (批号:PS2169-0020,成都普思生物科技股份有限公司)。

1.3 药材

共收集黄芪饮片 6 批,酒当归饮片 30 批,制备 30 批当归补血汤(T1-T30),信息如表 1~3 所示。

表 1 黄芪药材信息

Tab. 1 The medicinal material information of *Astragalus membranaceus*

编号	黄芪		
	产地	公司	批号
S1	内蒙古包头	安徽张仲景中医药科技有限公司	2401044
S2	甘肃	康美药业股份有限公司	240100871
S3	甘肃	普宁市泽群中药饮片有限公司	240101
S4	甘肃定西	安徽桐花堂中药饮片科技有限公司	20240202
S5	甘肃	洪雅县瓦屋山药业有限公司	240401
S6	甘肃	山东百味堂中药饮片有限公司	230709

表 2 酒当归药材信息

Tab. 2 The medicinal material information of wine-prepared *angelica*

编号	酒当归		
	产地	公司	批号
S1	青海	安国万宗堂中药材有限公司	2022010568
S2	甘肃	安国万宗堂中药材有限公司	2022010578
S3	甘肃	安国万宗堂中药材有限公司	2022141698
S4	甘肃岷县	安徽盛海堂中药饮片有限公司	2022041755
S5	甘肃岷县	安徽盛海堂中药饮片有限公司	2021111765
S6	甘肃岷县	安徽盛海堂中药饮片有限公司	2021121635
S7	甘肃岷县	山东博康中药饮片有限公司	21081002
S8	青海	安国市聚药堂药业有限公司	220705
S9	吉林	安国市聚药堂药业有限公司	220806
S10	青海	济南七星大药房有限公司	2201009
S11	甘肃	河北胡氏宇博药业有限公司	C394221101
S12	甘肃	济南七星大药房有限公司	20230101
S13	甘肃	四川和顺康药业有限公司	230424
S14	甘肃	滋百岁(河北)药业有限公司	2307001
S15	甘肃	安国市聚药堂药业有限公司	2312002

1.4 动物

48 hpf 标记红细胞的 Tg(*gata1a*;DsRed)转基因斑马鱼,购买自国家斑马鱼资源中心。斑马鱼饲养于 28 ℃ 的养鱼用水中(水质:每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐,电导率为 450~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$;pH 为 6.5~8.5;硬度为 100~300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCO_3 ,饲养管理符合国际 AAALAC 认证要求。

表 3 组合信息表

Tab. 3 Composite information sheet

批次	黄芪	酒当归	批次	黄芪	酒当归
T1	H1	J1	T16	H1	J15
T2	H1	J2	T17	H1	J14
T3	H2	J3	T18	H2	J10
T4	H2	J4	T19	H2	J12
T5	H3	J5	T20	H3	J11
T6	H3	J6	T21	H3	J10
T7	H4	J7	T22	H4	J9
T8	H4	J8	T23	H4	J6
T9	H5	J9	T24	H5	J7
T10	H5	J10	T25	H5	J6
T11	H6	J11	T26	H6	J5
T12	H6	J12	T27	H6	J4
T13	H2	J13	T28	H2	J7
T14	H4	J14	T29	H4	J2
T15	H6	J15	T30	H6	J1

2 方法与结果

2.1 当归补血汤样品的制备

参考李东垣《内外伤辨惑论》中处方“黄芪一两,当归二钱(酒洗)。上件咀,都作一服。水二盏,煎至一盏,去渣,温服,空心食前”折算成现代对应剂量[参考古代经典名方关键信息表(25 首方剂)],即“黄芪 41.30 g,酒当归 8.26 g,加水 600 mL,煎至 300 mL,日服三次”,分别煎煮三份药液,滤过后合并,抽入浓缩器减压浓缩(温度 50~80 ℃)至 200 mL,冷冻干燥,冻干粉得率如表 4 所示。

2.2 当归补血汤化学成分定性研究

2.2.1 检测条件

液相条件: Thermo Fisher Scientific UPLC; Hypersil GOLD aQ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm);流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱:0~15 min,4%~5% A;15~35 min,5%~8% A;35~48 min,8%~10% A;48~53 min,10%~12% A;53~68 min,12%~14% A;68~88 min,14%~20% A;88~93 min,20%~24% A;93~95 min,24%~27% A;95~105 min,27% A;体积流量为 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长为 260 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 2 μL 。

质谱条件:采用 HESI 源,正负离子全扫描模式,毛细管温度 350 ℃,加热器温度 350 ℃,鞘气压力 45 arb,辅助气体压力 10 arb,喷雾电压 3.00 kV,质谱采集范围 80~1 200 m/z ^[6-7]。

表4 当归补血汤提取物冻干粉得率

Tab. 4 The yield of lyophilized powder from Danggui-Buxue

Decoction					
编号	冻干粉得量 (g)	得粉率 (%)	编号	冻干粉得量 (g)	得粉率 (%)
T1	54.52	36.67	T16	47.66	32.06
T2	45.45	30.57	T17	48.07	32.33
T3	52.22	35.12	T18	55.99	37.66
T4	51.46	34.61	T19	53.34	35.88
T5	50.79	34.16	T20	51.51	34.64
T6	44.17	29.71	T21	51.45	34.61
T7	49.12	33.04	T22	48.16	32.39
T8	36.83	24.77	T23	48.50	32.62
T9	50.21	33.77	T24	55.29	37.19
T10	52.74	35.47	T25	55.73	37.48
T11	40.60	27.31	T26	43.76	29.43
T12	42.45	28.55	T27	44.45	29.89
T13	43.99	29.59	T28	54.04	36.35
T14	47.47	31.93	T29	45.98	30.93
T15	72.79	48.96	T30	45.23	30.42

2.2.2 供试品溶液制备

根据前期所得 T10 批冻干粉得率,取干粉适量,精密称定(相当于 1.00 g 处方饮片量)置于圆底烧

瓶中,加入 20% 甲醇溶液 5 mL,称重,回流提取 30 min后放冷,补重,滤过,取续滤液离心 10 min (10 000 r · min⁻¹),取 0.9 mL 上清液加入 0.1 mL 葛根素内标溶液后过 0.22 μm 微孔滤膜配置成供试品(饮片量浓度为 180 mg · mL⁻¹)。

2.2.3 当归补血汤化学成分鉴定

根据国内外专业数据库 Pubchem Compound 以及当归补血汤化学成分、质谱研究相关文献,收集当归补血汤中各非挥发性化学成分信息,导入 Xcalibur 软件,根据相对分子质量,并结合二级质谱碎片信息、保留时间、对照品的信息以及上述相关文献,对化合物进行定性分析^[8,9]。

2.2.4 化学成分表征结果

当归补血汤原型成分的 LC-QE/MS 的总离子流图见图 1。最终鉴定了当归补血汤原型成分 90 个化合物,包含 15 个氨基酸类,19 个黄酮类,1 个皂苷类,2 个苯丙素类,9 个有机酸类,6 个核苷类,1 个微量元素,4 个糖类,2 个酚酸类,2 个香豆素类,1 个甾体,2 个酯类,3 个内酯类及 23 个其他类成分,其中 33 个成分来源于酒当归,33 个成分来源于黄芪,24 个成分来源于黄芪和酒当归两者(见表 5)。

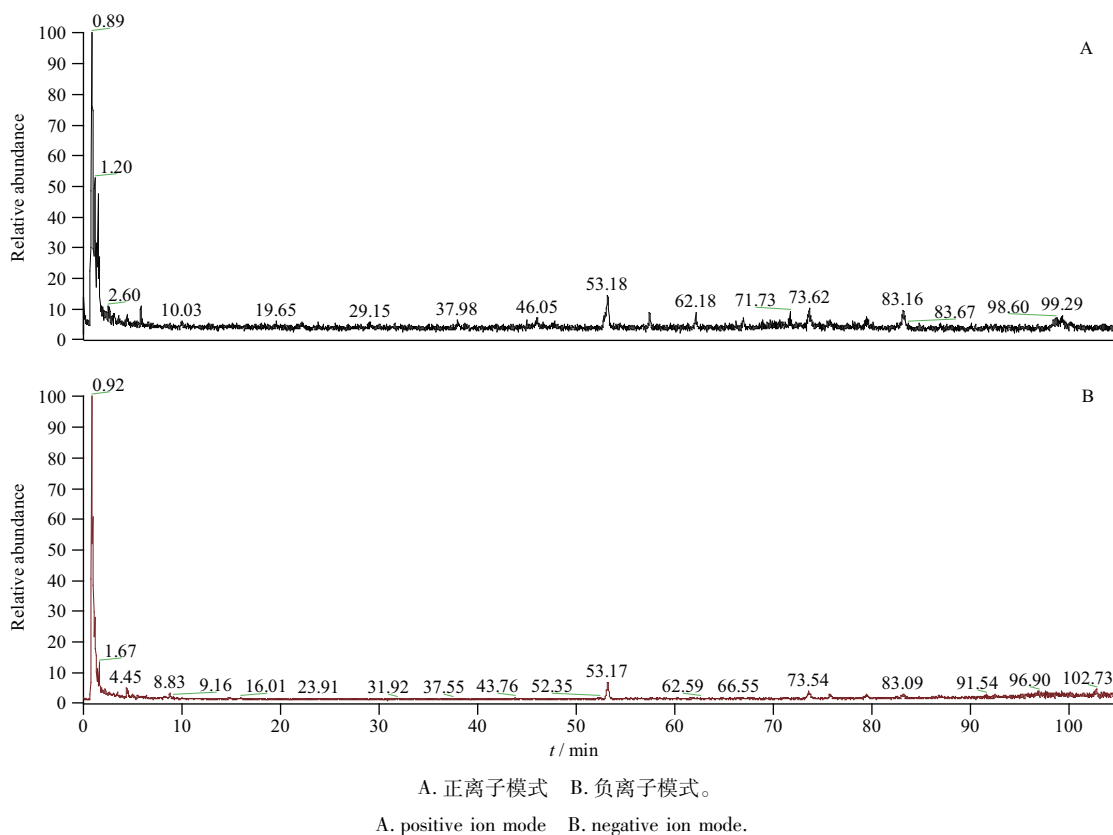


图1 当归补血汤 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS of Danggui-Buxue Decoction

表5 当归补血汤化学成分表征结果

Tab. 5 The result of the chemical composition of traditional decoction

编号	名称	分子式	t_R / min	质荷比 理论值	质荷比 实测值	误差 (ppm)	二级碎片	离子 类型	来源
1	亚精胺	C ₇ H ₁₉ N ₃	0.82	146.165 2	146.165 6	4.1	112.112 4,84.081,72.081	[M+H] ⁺	酒当归
2	DL-精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	3.17	175.119	175.118 9	3.43	158.092 5,130.097 7,116.070 8,70.067 3,60.058 8	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
3	葡糖酸	C ₆ H ₁₂ O ₇	0.98	195.051	195.051 1	-0.51	129.019 4,75.008 8,59.014	[M-H] ⁻	酒当归、黄芪
4	苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	0.96	133.014 2	133.014 2	0	115.003 7	[M-H] ⁻	酒当归、黄芪
5	脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	0.97	116.070 6	116.070 9	3.45	70.065 3	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
6	2-吡咯烷乙酸	C ₆ H ₁₁ NO ₂	1.18	130.086 3	130.085 2	-6.92	84.081	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
7	D-赤藓糖	C ₅ H ₈ O ₅	1.43	147.029 9	147.029 3	-9.52	87.008 8	[M-H] ⁻	酒当归、黄芪
8	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	1.02	191.019 7	191.018 2	-9.42	111.008 8,87.008 8,85.065 9	[M-H] ⁻	酒当归、黄芪
9	谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	2.6	148.060 4	148.059 5	6.75	130.049 5	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
10	烟酸	C ₆ H ₅ NO ₂	1.22	124.039 3	124.039 6	4.03	80.049 7	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
11	缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	5.88	118.086 3	118.085 4	-9.91	59.930 5	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
12	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	7.16	343.123 5	343.126 1	3.67	127.098 3	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
13	腺嘌呤	C ₅ H ₅ N ₅	1.52	136.061 8	136.062 1	-9.29	119.049 3	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
14	5-尿苷-磷酸	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	1.19	323.028 6	323.028 7	3.64	211.001 4	[M-H] ⁻	酒当归、黄芪
15	腺苷 2',3'-环状磷酸三乙铵盐	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	1.2	330.059 8	330.060 6	3.54	136.062 1	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
16	尿嘧啶	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	1.3	113.034 6	113.034 9	-8.07	96.008 2,70.029	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
17	L-谷胱甘肽	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P	1.29	344.040 2	344.040 3	4.24	150.042 2,133.015 7	[M-H] ⁻	酒当归、黄芪
18	肉桂酸乙酯	C ₉ H ₈ O ₃	1.45	165.054 6	165.055 1	-8.87	119.049 4	[M+H] ⁺	酒当归
19	月桂酸	C ₇ H ₈ O ₇	20.37	203.019 7	203.017 7	3.84	141.092 6	[M-H] ⁻	酒当归
20	L-酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	1.47	182.081 2	182.081 7	3.78	165.055,136.076	[M+H] ⁺	酒当归
21	鸟嘌呤核苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	1.64	282.084 4	282.084 6	-7.31	150.042 2,133.015 7	[M-H] ⁻	酒当归
22	N-(1-脱氧-D-果糖-1-基)-L-苯丙氨酸	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	2.5	328.139 1	328.14	4.54	310.129 3,292.118 5,264.123 7,132.080 7	[M+H] ⁺	酒当归
23	维生素 B	C ₉ H ₁₇ NO ₅	3.09	220.117 9	220.117 8	1.38	202.107 9,184.097 4,142.086 5,124.076,98.023 9,90.055 2	[M+H] ⁺	酒当归、黄芪
			3.12	218.103 4	218.103 5	3.64	146.082 3,88.040 4,71.013 9	[M-H] ⁻	
24	琥珀酸腺苷	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₈	4.52	384.115	384.115 8	3.01	206.067 6,234.062 8,252.073 3	[M+H] ⁺	酒当归
25	苯丙氨酸	C ₉ H ₉ NO ₂	2.58	166.086 3	166.086 6	-9.52	120.081 1,103.054 5	[M+H] ⁺	酒当归
26	1-β-D-吡喃葡萄糖基-L-色氨酸	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₇	5.82	367.145	367.141 4	4.11	349.139 3,332.113,229.097 7,188.071	[M+H] ⁺	酒当归
27	3-甲酰基咪唑[1H]-咪唑-3-甲醛	C ₉ H ₇ NO	27.71	146.06	146.060 4	-9.75	118.065 5	[M+H] ⁺	酒当归
28	L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	5.89	205.097 2	205.096 3	0.52	188.071 1,170.060 8,159.092 4,132.081 2	[M+H] ⁺	酒当归
29	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	5.87	353.087 8	353.087 9	-8.97	191.056 3,179.035 2,173.046,161.024 6,135.045 3	[M-H] ⁻	酒当归
30	D-奎尼酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	2.22	191.056 1	191.056 2	-9.23	111.008 8	[M-H] ⁻	酒当归
31	异亮氨酸-亮氨酸	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	10.07	345.186	345.182 8	3.03	132.102 1,86.096 7,69.069 9	[M+H] ⁺	酒当归
32	3-(1,3-苯并二氧醇-5-基)丙烷-1,2-二醇	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	1.08	195.066 3	195.065 1	7.88	96.969 4	[M-H] ⁻	酒当归
33	1,2,3,4-四氢骆驼酮-3-羧酸	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	11.97	231.112 8	231.113 4	0.56	214.086 8,188.071 1,168.081 1,158.096 9	[M+H] ⁺	酒当归
34	邻苯二甲酸	C ₈ H ₆ O ₄	8.19	165.019 3	165.017 8	9.72	121.029 5,77.039 6	[M-H] ⁻	酒当归
35	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	13.08	179.035	179.035 1	0.81	135.045 2	[M-H] ⁻	酒当归
36	淫羊藿次苷 F2	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	17.8	401.145 3	401.147 8	0.6	269.104 1,193.051 6,161.046 9	[M-H] ⁻	酒当归
37	愈创木酚	C ₇ H ₈ O ₂	8.85	123.045 2	123.045 8	0.82	79.055 3	[M-H] ⁻	酒当归
38	4-甲氧苯基-3-O-苄基-β-D-吡喃半乳糖苷	C ₈ H ₈ O ₄	8.83	167.035	167.035	-9.82	123.045 2,79.055 1	[M-H] ⁻	酒当归
39	3-O-阿魏酰奎尼酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	31.81	367.103 5	367.103 4	1.04	193.050 6,173.045 5,134.037,93.034 5	[M-H] ⁻	酒当归

续表5(Tab. 5 continued)

编号	名称	分子式	t_R / min	质荷比 理论值	质荷比 实测值	误差 (ppm)	二级碎片	离子 类型	来源
40	辛二酸	C ₈ H ₁₄ O ₄	27.72	173.081 9	173.083	9.6	129.092 2,111.081 6	[M - H] ⁻	酒当归、黄芪
41	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	31.9	193.050 6	193.050 6	-8.95	178.027 3,149.060 6,134.037 4	[M - H] ⁻	酒当归、黄芪
42	6-甲氧基-2H-色烯-2-酮	C ₁₀ H ₈ O ₃	13.91	177.054 6	177.055 1	1.04	149.060 2,145.028 7,117.033 9	[M + H] ⁺	酒当归、黄芪
43	木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	61.98	447.093 3	447.097 6	3.59	285.077,96.969 7	[M - H] ⁻	酒当归
44	异阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	32.77	193.050 6	193.050 6	-8.92	178.027 2,149.060 8,134.037 3	[M - H] ⁻	酒当归、黄芪
45	异秦皮啶	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	36.17	223.060 1	223.060 7	6.53	190.026 2,134.940 6	[M + H] ⁺	酒当归
46	愈创木酰甘油	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	1.87	213.076 8	213.074 9	3.95	169.062,141.668	[M - H] ⁻	酒当归
47	N-乙酰色氨酸	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	31.3	245.093 1	245.093 2	3.76	203.082 7,159.092 5,142.066 2,116.035 2, 98.024 8,74.024 7	[M - H] ⁻	酒当归、黄芪
48	刀豆氨酸	C ₅ H ₁₂ N ₄ O ₃	3.62	177.098 2	177.097 1	-9.58	160.072 1,118.050 2,102.055 1	[M + H] ⁺	黄芪
49	L-天冬酰胺	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	0.87	133.060 8	133.061 1	4.16	116.034 6,87.055 5	[M + H] ⁺	黄芪
50	4-胍基丁酸	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	6.09	146.092 4	146.091 3	-3.84	114.972 1,69.033 6	[M + H] ⁺	黄芪
51	DL-苏氨酸	C ₄ H ₉ NO ₃	2.68	120.065 5	120.065 8	8.05	74.060 2	[M + H] ⁺	黄芪
52	组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	1.72	156.076 8	156.075 6	4.1	110.071 7	[M + H] ⁺	黄芪
53	邻苯二甲酸酐	C ₈ H ₄ O ₃	8.21	149.023 3	149.024 5	3.78	121.029,93.033 8,65.039	[M + H] ⁺	黄芪
54	腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	1.59	268.104	268.102 1	-9.5	136.062 2	[M + H] ⁺	黄芪
55	鸟苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	1.65	284.098 9	284.097 4	-9.89	152.057 1,135.030 2	[M + H] ⁺	黄芪
56	肌苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	1.66	267.073 4	267.076	0	135.031 3	[M - H] ⁻	黄芪
57	黄原酸	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	2.24	283.068 4	283.065 9	3.72	151.026 2	[M - H] ⁻	黄芪
58	焦儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	2.59	153.019 3	153.019 3	2.91	109.029 3	[M - H] ⁻	黄芪
59	刺芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	73.65	269.080 8	269.081 5	3.48	254.058,237.054 4,213.091 8	[M + H] ⁺	酒当归、黄芪
60	毛蕊异黄酮苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	53.18	447.128 6	447.129 5	2.44	285.076 7,270.053 3,253.048 9	[M + H] ⁺	黄芪
61	芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	73.57	431.133 7	431.134 6	4.09	269.086 6,254.059 1	[M + H] ⁺	黄芪
62	毛蕊异黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	83.13	285.075 8	285.076 3	9.39	270.053 2,253.050 2,225.054 2,137.023 4	[M + H] ⁺	酒当归、黄芪
63	黄芪甲苷IV	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	104.2	807.450 1	807.453 1	3.04	627.384 1	[M + Na] ⁺	黄芪
64	D-阿拉伯糖	C ₅ H ₁₀ O ₅	8.42	149.045 5	149.044 7	0.6	59.013 9	[M - H] ⁻	黄芪
65	异鼠李素-3-O-新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	17.59	625.176 3	625.177 8	-3.56	301.071 5	[M + H] ⁺	黄芪
66	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	4.14	167.035	167.035	1.08	152.011 4,108.021 5	[M - H] ⁻	黄芪
67	3,5-二羟基-2-(4-羟基 苯基)-7-[3,4,5-三羟 基-6-(羟甲基)氧杂戊 环-2-基]氧基-2,3-二氢 苯并吡	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	24.72	449.108 9	449.108 9	0.46	287.0562,259.0612,125.024 4	[M - H] ⁻	黄芪
68	红车轴草素-7-O-β-D- 吡喃葡萄糖苷或同分异 构体	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	66.54	461.108 9	461.109	0	299.056 4	[M - H] ⁻	黄芪
69	根皮苷	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	37.78	435.129 7	435.129 9	3.4	273.077 1,167.035 6	[M - H] ⁻	黄芪
70	4-羟基肉桂酸或反式-4- 羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	23.1	163.040 1	163.040 1	-9.95	119.050 3	[M - H] ⁻	黄芪
71	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	35.67	147.044 1	147.044 4	3.53	119.976 3,91.054 2	[M + H] ⁺	黄芪
72	毛蕊花糖苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	78.38	623.198 1	623.192 1	-8.42	161.045 7	[M - H] ⁻	黄芪
73	大豆苷元	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	74.65	255.065 2	255.065 8	9.93	199.076 6,137.023 7	[M + H] ⁺	黄芪
74	黄芪异黄酮苷,7,2'-二 羟基-3',4'-二甲氧基异 黄酮或同分异构体	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	79.43	463.159 8	463.155 2	3.65	301.107 9,269.081 1,167.070 7	[M + H] ⁺	黄芪
75	黄芪紫檀烷苷或黄芪 异紫檀烷苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	86.87	463.161	463.164 8	5.26	301.108 2,286.084 9,271.059 7,135.054 2, 121.029 5	[M - H] ⁻	黄芪
			86.9	465.175 5	465.176 6	4.02	123.044 4	[M + H] ⁺	
76	丙二酰异黄酮苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	95.88	551.175 9	551.177 7	-9.2	231.066 5,167.070 9	[M + H] ⁺	黄芪
77	6"-O-乙酰基-芒柄花苷	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	96.78	473.144 2	473.145 3	-4.68	269.081 7,254.057 5	[M + H] ⁺	黄芪
78	垂崖豆藤异黄酮醌	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	3.02	315.087 4	315.084 4	2.99	109.029 5	[M - H] ⁻	黄芪

续表5(Tab. 5 continued)

编号	名称	分子式	t_R / min	质荷比 理论值	质荷比 实测值	误差 (ppm)	二级碎片	离子 类型	来源
79	木犀草素 7-甲基醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	79.4	299.056 1	299.054 5	-3.32	284.069 1	[M-H] ⁻	黄芪
80	红车轴草素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	37.05	301.070 7	301.071 5	5.81	286.047 9,269.045 2,241.050 1,213.055 6	[M+H] ⁺	黄芪
81	黄芪紫檀烷	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	98.78	301.107 1	301.106 5	-7.17	191.070 9,167.070 7,147.044 3,134.036 4	[M+H] ⁺	黄芪
82	诺龙	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	97.7	275.200 6	275.202 1	3.35	145.101 4,105.070 1,81.07	[M+H] ⁺	黄芪
83	洋川芎内酯 D	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	57.26	223.096 5	223.097	1.07	205.086 8,177.091 5,149.060 2	[M+H] ⁺	酒当归
84	洋川芎内酯 G 或 K	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	78.89	209.117 2	209.117 8	-7.3	191.630 5,163.111 9,145.101 4	[M+H] ⁺	酒当归
85	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	52.39	187.097 6	187.097 6	-9.31	169.087 1,125.097 3,123.081 8	[M-H] ⁻	酒当归
86	水杨酸	C ₇ H ₆ O ₃	23.99	137.024 4	137.024 4	2.9	93.034 6	[M-H] ⁻	酒当归
87	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	103.9	279.159 1	279.156 7	-7.85	233.154 3,205.159 7,191.107 2	[M+H] ⁺	酒当归
88	4-羟基-3-丁基苯酞	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	41.73	207.101 6	207.105 6	3.17	189.091 6,179.107 4,171.081 5,165.091 5,117.070 1	[M+H] ⁺	酒当归
89	(E)-藜本内酯或 (Z)-藜本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	104.9	191.106 7	191.105 9	4.1	173.096 6,163.112 3,155.086 1,145.101 7,117.07	[M+H] ⁺	酒当归
90	正丁亚基邻苯二甲 酰胺	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	90.45	189.091	189.091 4	3.43	171.080 9,153.070 4,143.085 9,115.054 8	[M+H] ⁺	酒当归

2.3 当归补血汤化学成分定量研究

2.3.1 检测条件

岛津 UPLC LC-40DX3; Hypersil GOLD aQ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0 ~ 15 min, 4% ~ 5% A; 15 ~ 35 min, 5% ~ 8% A; 35 ~ 48 min, 8% ~ 10% A; 48 ~ 53 min, 10% ~ 12% A; 53 ~ 68 min, 12% ~ 14% A; 68 ~ 88 min, 14% ~ 20% A; 88 ~ 93 min, 20% ~ 24% A; 93 ~ 95 min, 24% ~ 27% A; 95 ~ 105 min, 27% A; 体积流量为 0.3 mL · min⁻¹; 检测波长为 260 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 2 μL。

2.3.2 混合标准品及内标溶液的制备

分别取芒柄花素、洋川芎内酯 I、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸 5.0 mg, 精密称定各加 50% 甲醇溶液制成标准品储备液。将上述标准品储存液等比例混合为混合对照品溶液。

精密称定葛根素标准品 2.3 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 50% 甲醇溶液定容制成内标溶液 (质量浓度为: 0.230 mg · mL⁻¹)。

2.3.3 供试品溶液制备

根据前期所得 30 批冻干粉得率, 精密称取冻干粉适量 (相当于 1.00 g 处方饮片量) 置于圆底烧瓶中, 加入 20% 甲醇溶液 5 mL, 称重, 回流提取 30 min 后放冷, 补重, 滤过, 取续滤液离心 10 min (10 000 r · min⁻¹), 取 0.9 mL 上清液加入 0.1 mL 葛根素内标溶液后过 0.22 μm 微孔滤膜配置成供试品 (饮片量浓度为 180 mg · mL⁻¹)。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 线性关系考察 精密称取 T3 批次冻干粉置于 5 mL 容量瓶中, 按照“2.3.3”项下的方法制备样品并进行检测, 以样品浓度为横坐标 X, 待测成分与内标峰面积比值为纵坐标 Y, 进行线性回归分析, 结果见表 6。结果显示 13 个共有峰的 R² 均大于 0.99, 说明共有峰在 22.50 ~ 269.97 mg · mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好。

表 6 当归补血汤样品各共有峰线性关系考察结果
Tab. 6 The results of peak linear relationship between Danggui-Buxue Decoction samples

编号	线性回归方程	R ²	相对峰面积值(RA)
1	Y=0.000 3x+0.001 2	0.998 9	0.006 3~0.075 4
2	Y=0.000 3x+0.001 9	0.999 3	0.085 2~0.007 8
3	Y=0.000 2x+0.001 0	0.999 1	0.045 5~0.004 1
4	Y=0.000 3x-0.000 6	0.997 5	0.090 7~0.008 2
5	Y=0.001 4x+0.004 8	0.999 3	0.375 3~0.031 5
6	Y=0.002 7x-0.006 5	0.999 2	0.724 5~0.047 3
7	Y=0.004 9x+0.023 2	0.999 2	1.328 3~0.118 9
8	Y=0.000 6x+0.004 7	0.999 4	0.016 0~0.159 8
9	Y=0.002 4x+0.002 3	0.999 6	0.638 2~0.051 1
10	Y=0.003 2x+0.018 4	0.998 2	0.868 4~0.074 7
11	Y=0.000 2x+0.000 8	0.999 1	0.005 3~0.060 9
12	Y=0.003 0x+0.007 2	0.999 9	0.821 8~0.072 7
13	Y=0.000 8x-0.008 1	0.992 8	0.207 0~0.013 0

2.3.4.2 重复性考察 平行称取 T3 批次冻干粉 6 份, 精密称定, 按照“2.3.3”项下的方法分别制备

样品并进行检测,计算各共有峰的相对保留时间、相对峰面积 RSD。结果显示 13 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积 RSD 均不大于 0.11%、2.91% 范围内, RSD 均在 3% 以内,表明方法重复性良好。

2.3.4.3 稳定性考察 精密称取 T3 批次冻干粉,按照“2.3.3”项下的方法制备样品并分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行检测,计算各共有峰的相对保留时间、相对峰面积 RSD。结果显示 13 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积 RSD 分别不大于 0.22%、1.72% 范围内, RSD 均在 3% 以内,表明在室温下 24 h 内样品稳定性良好。

2.3.4.4 精密度考察 精密称取 T3 批次冻干粉,按照“2.3.3”项下的方法制备样品并平行测定 6 次,计算各共有峰的相对保留时间、相对峰面积 RSD。结果显示 13 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积 RSD 比值分别均不大于 0.15%、2.72%

范围内, RSD 均在 3% 以内,表明仪器精密度良好。

2.3.5 当归补血汤指纹图谱检测及共有峰的归属

本研究通过超高效液相色谱(UPLC)建立了当归补血汤的指纹图谱,验证了方法的线性、重复性、稳定性和精密度,并对 30 批次自制样品(T1-T30)中的 13 个共有峰进行了定量分析。由于检测结果中存在未知成分,为尽可能多的测定共有成分含量,本研究采用内标法(葛根素)计算共有峰的相对峰面积,测定 30 批次当归补血汤共有峰相对峰面积,结果如表 7 所示,为后续灰色关联分析提供了数据支持^[10-13]。

根据 30 批指纹图谱检测结果,确定了 13 个响应值较高、出峰相对稳定的峰作为共有峰,经由标准品比对,确定 5、6、7、12、13 号色谱峰分别为阿魏酸、洋川芎内酯 I、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素(见图 2)。

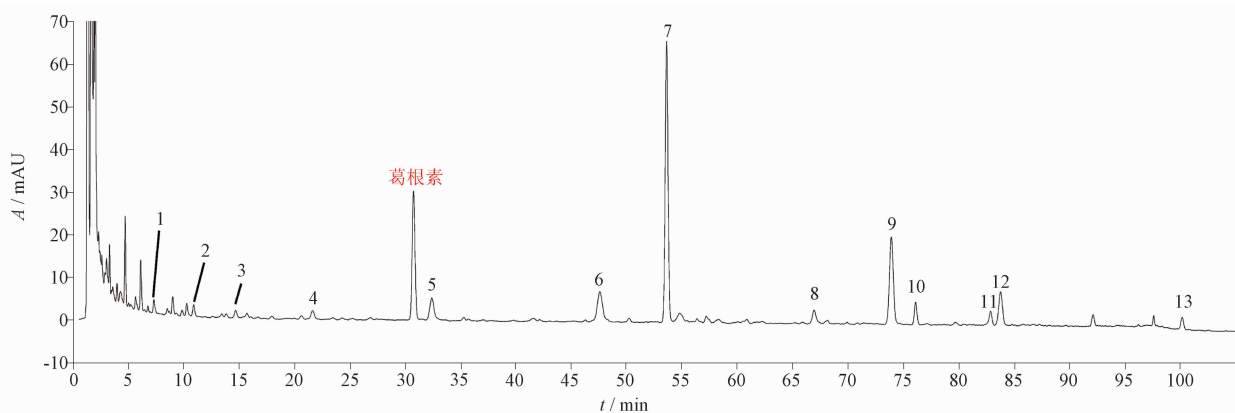
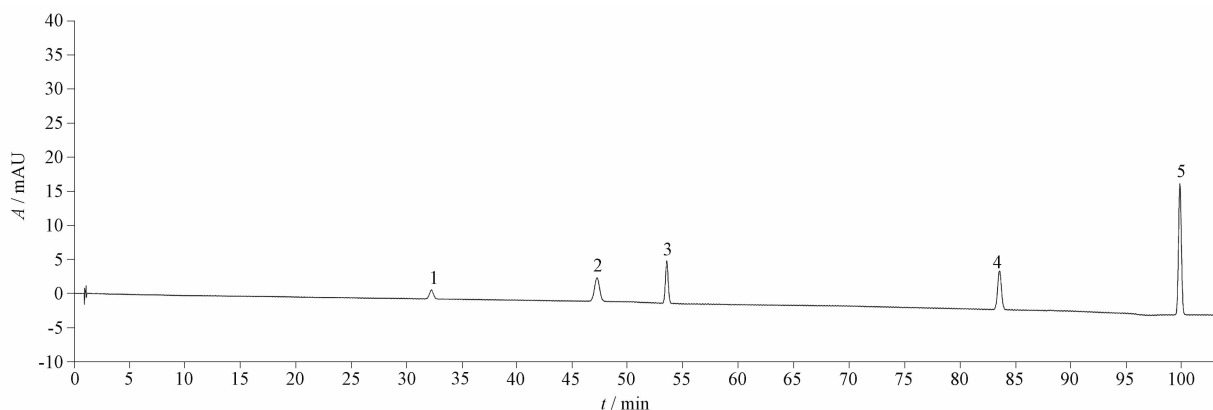


图 2 当归补血汤供试品溶液 UPLC 色谱图

Fig. 2 UPLC Chromatogram of test article of Danggui-Buxue Decoction



1. 阿魏酸 2. 洋川芎内酯 I 3. 毛蕊异黄酮 4. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 C 5. 芒柄花素。
1. Ferulic acid 2. Senkyunolide I 3. Calycosin 4. Sophoraisoflavone glucoside C 5. Formononetin.

图 3 混合标准品溶液 UPLC 色谱图

Fig. 3 UPLC Chromatogram of the mixed standard

表7 当归补血汤指纹图谱共有峰相对峰面积

Tab. 7 Relative peak area of the common peak in the fingerprint map of Danggui-Buxue Decoction

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
T1	0.074 9	0.084 5	0.037 8	0.107 4	0.306 9	0.599 7	1.828 1	0.138 2	1.135 4	0.143 6	0.096 5	0.550 5	0.199 8
T2	0.063 8	0.061 9	0.034 9	0.089 5	0.240 9	0.431 7	1.402 9	0.094 1	0.800 7	0.131 2	0.078 2	0.251 9	0.064 2
T3	0.066 8	0.077 5	0.042 4	0.077 3	0.354 4	0.672 3	1.260 4	0.164 8	0.621 1	0.829 8	0.058 3	0.808 7	0.247 3
T4	0.077 8	0.090 1	0.048 3	0.106 4	0.279 5	0.205	2.200 1	0.145 2	1.009 3	0.314 4	0.118 8	0.532 4	0.138 8
T5	0.077 1	0.076 3	0.040 9	0.094 3	0.292 5	0.294 5	1.639 2	0.142	0.74	0.480 7	0.076 9	0.380 3	0.125 3
T6	0.055 3	0.066 9	0.045 2	0.090 6	0.206 3	0.189 9	1.916 3	0.155 6	0.908 2	0.307	0.113 1	0.546 9	0.158 1
T7	0.065 4	0.075 7	0.047 9	0.096	0.201 4	0.217	1.788	0.122 6	0.715 6	0.135 2	0.099 8	0.460 2	0.080 7
T8	0.051 8	0.060 6	0.036 4	0.074 6	0.218 3	0.242	1.434 3	0.091 6	0.603 8	0.165 3	0.067 2	0.367 3	0.070 5
T9	0.067 6	0.076 7	0.031 6	0.100 8	0.294 7	0.509 9	2.156 9	0.151 2	1.106 3	0.183 5	0.133 9	0.725	0.316
T10	0.070 2	0.070 4	0.040 3	0.102	0.275 7	0.477 1	2.296 4	0.166 3	1.167 1	0.311 6	0.121 1	0.520 7	0.183
T11	0.089 4	0.099	0.038	0.11	0.187	0.490 9	0.747 6	0.050 8	0.310 5	0.056 1	0.048 3	0.733 3	0.198 2
T12	0.078 2	0.096 7	0.035 2	0.128 2	0.295 4	0.391 4	0.840 7	0.078 3	0.332 5	0.147 1	0.047 5	0.698 9	0.124
T13	0.068 7	0.118 6	0.067 5	0.133	0.382 6	0.469 7	1.593 4	0.130 8	0.718 6	0.405	0.096 8	0.622 6	0.235 6
T14	0.071	0.094 8	0.022 7	0.086 7	0.149 1	0.090 1	1.934 7	0.124 9	0.731 6	0.344 1	0.109 9	0.528 3	0.072 5
T15	0.098 9	0.112 9	0.056 5	0.113 7	0.374 9	0.528 2	0.822 8	0.095 9	0.340 5	0.272 8	0.049 9	1.806 1	0.501 4
T16	0.075 2	0.054	0.035 8	0.088 8	0.202	0.383 3	2.105	0.155 1	1.214 9	0.18	0.119 8	0.496 3	0.220 6
T17	0.074	0.057 2	0.042 5	0.084 8	0.196 9	0.407 5	2.108 1	0.165 7	1.218 7	0.181 3	0.125 3	0.487 4	0.196 1
T18	0.070 8	0.083 4	0.055 7	0.074 8	0.358 2	0.698	1.284 1	0.103 3	0.630 7	0.826 3	0.064	0.934 4	0.312
T19	0.076 7	0.08	0.040 5	0.049 1	0.275	0.213	2.697 7	0.182 4	1.132	0.198 2	0.140 9	0.429 3	0.138 6
T20	0.073 6	0.083 8	0.036 1	0.090 5	0.195 8	0.156 2	2.430 8	0.166 9	1.127 8	0.205 7	0.141 6	0.611 3	0.202 7
T21	0.081 2	0.086 1	0.036 3	0.092 3	0.223 6	0.138 2	2.429 3	0.161 2	1.108 6	0.209 6	0.132 1	0.538 4	0.144 3
T22	0.070 5	0.080 3	0.056	0.09	0.257 9	0.265	2.026 1	0.116 2	0.861 4	0.160 7	0.107 4	0.440 8	0.128 3
T23	0.090 4	0.097 1	0.073 8	0.142 1	0.377 7	0.344 6	2.364 4	0.120 7	1.008	0.185	0.111 9	0.653 8	1.454 8
T24	0.095 1	0.091 9	0.056 9	0.115	0.356 2	0.552 5	2.556 3	0.149 9	1.266 4	0.157 9	0.121 4	0.456 7	1.311 7
T25	0.104 9	0.086 1	0.073 1	0.151 6	0.357 3	0.705 9	2.980 9	0.174 5	1.473 9	0.175 7	0.129 5	0.498 6	1.542 4
T26	0.100 3	0.109 5	0.056 7	0.095 8	0.143 9	0.470 1	0.926 1	0.071 1	0.423 1	0.027	0.051	1.152 3	1.396 1
T27	0.082	0.092 4	0.029 2	0.127 2	0.276 2	0.294 1	0.968 5	0.071	0.446 7	0.030 4	0.051 5	1.052 4	1.302
T28	0.076	0.098	0.050 9	0.072	0.328 4	0.542 5	2.643	0.165 7	1.127 1	0.196 4	0.141 5	0.606 7	1.258 2
T29	0.068 3	0.091 4	0.043 6	0.081 2	0.129 5	0.157 4	2.132 9	0.099 2	0.868 5	0.164 5	0.105 3	0.598 5	1.319 1
T30	0.083 2	0.098 8	0.044	0.116 1	0.246 6	0.343 6	0.957 9	0.060 8	0.421 5	0.027 9	0.051 5	0.989 1	1.530 3

2.4 药效指标检测

2.4.1 当归补血汤药液的配置

根据前期所得冻干粉得率,精密称取冻干粉适量(相当于0.20 g处方饮片量),溶于50 mL纯水中,制备浓度为4 mg·mL⁻¹的当归补血汤样品母液,分别记作T1-T30,置于4℃保存备用,样品溶液即用即配。

2.4.2 斑马鱼胚胎的收集

实验前一晚,将标记红细胞的Tg(gata1a;DsRed)转基因斑马鱼按雌雄1:1或1:2的比例置于产卵缸,用隔板将雌、雄斑马鱼分隔。于次日光照前移除隔板,此时计时为0 hpf(Hours post fertilization,受精后

时间)。在移除隔板后2 h(2 hpf)收集胚胎,亚甲基蓝处理后置于28℃恒温恒湿培养箱中孵育。

2.4.3 耐受性(MTC)考察

用1 mg·mL⁻¹的链酶蛋白酶E脱模处理发育至48 hpf的斑马鱼受精卵,显微镜下筛选发育正常的斑马鱼幼鱼。将发育正常的幼鱼放置于24孔板中,放置密度为8条/孔,设置复孔。设置不同质量浓度的当归补血汤给药组(浓度分别为生药量4 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 μg·mL⁻¹),同时设置空白对照组。在28℃的恒温恒湿培养箱中孵育斑马鱼幼鱼,每隔24 h更换一次新鲜药液或DMSO,于给药48 h后记录斑马鱼的死亡情况。结果见图4,当归

补血汤给药浓度低于 $750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼未出现死亡情况,给药质量浓度高于 $750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼死亡率随质量浓度的增加而升高。因此,斑马鱼对当归补血汤的最大耐受剂量为 $750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

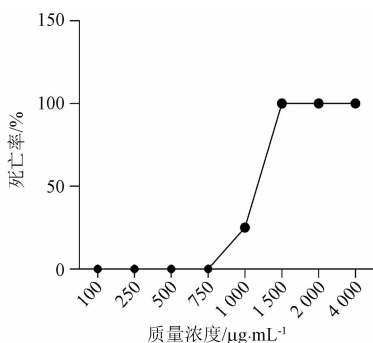


图4 给药后 24 h 斑马鱼对当归补血汤的耐受性考察结果
Fig. 4 Results of tolerance evaluation in zebrafish 24 hours after administration of Danggui Buxue Decoction

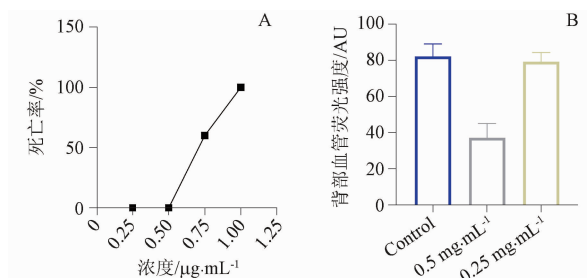
2.4.4 贫血模型造模剂量考察

参考文献方法^[14-16]建立斑马鱼贫血模型。选取正常发育至 48 hpf 的斑马鱼放置于 12 孔板中,放置密度为 8 条/孔,设置复孔。设置空白组 (0.2% DMSO) 及不同浓度的苯肼模型组 (1 、 0.5 、 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),加入相应试药确保孔板终体积为 2 mL ,置于 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中孵育 24 h,采用 Olympus IX83 倒置荧光显微镜进行斑马鱼背部血管进行图像采集,使用 Image J 软件对各组斑马鱼样本进行背部血管荧光强度统计。

贫血模型造模剂量考察结果见图 5~6。如图 5-A 所示,苯肼处理 24 h 后,当造模浓度为 0.75 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼出现死亡情况,且死亡率较高,当造模浓度小于 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼未出现死亡情况,因此继续考察 0.5 、 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的苯肼对斑马鱼的背部血管荧光强度影响情况,结果如图 5-B 所示。结果显示,与对照组相比,苯肼 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组的背部血管荧光强度具有显著性差异 ($P < 0.05$),苯肼 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组的背部血管荧光强度无显著性差异 ($P > 0.05$),因此,斑马鱼贫血模型的最佳造模剂量为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苯肼处理 24 h。

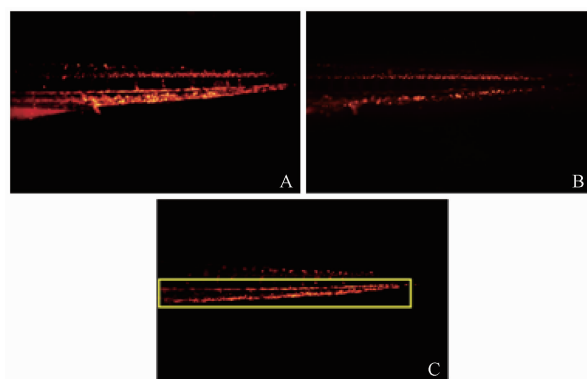
2.4.5 最佳给药剂量考察

选取正常发育至 48 hpf 的斑马鱼放置于 12 孔板中,放置密度为 8 条/孔,设置复孔。设置正常组、模型组(苯肼 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、阳性对照组(益血生胶囊 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和当归补血汤样品溶液低



A. 苯肼处理 24 h 后各组斑马鱼死亡率折线图
B. 各组斑马鱼背部血管荧光强度柱状图。
A. Line graph of mortality rate of zebrafish in each group after 24 hours of phenylhydrazine treatment B. Bar graph of fluorescence intensity of dorsal blood vessels in each group of zebrafish.

图5 贫血模型造模剂量考察结果图($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 5 Graph of dose study results for modeling of anemia model($\bar{x} \pm s, n = 10$)



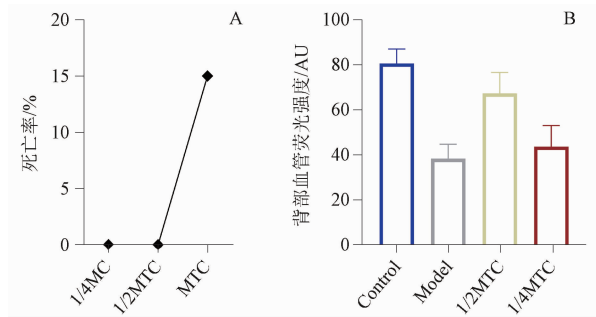
A. 空白组 B. $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苯肼处理组
C. $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苯肼处理组。
A. Blank group B. $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ phenylhydrazine treatment group
C. $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ phenylhydrazine treatment group.

图6 不同浓度苯肼处理 24 h 后斑马鱼背部血管图($\times 20$)
Fig. 6 Map of blood vessels on the back of zebrafish treated with different concentrations of benzene hydrazine for 24 h ($\times 20$)

($1/4\text{MTC}$)、中($1/2\text{MTC}$)、高(MTC)给药组,加入相应试药确保孔板终体积为 2 mL 。

最佳给药剂量考察结果见图 7~8,如图 7-A 所示,苯肼及当归补血汤共同处理 24 h 后, MTC 组斑马鱼出现死亡现象,其余组未出现死亡情况,推测原因为苯肼毒性较强,导致造模后斑马鱼对当归补血汤的耐受性弱于未造模处理的斑马鱼,故而出现死亡现象。因此继续考察 $1/2\text{MTC}$ 、 $1/4\text{MTC}$ 对贫血模型斑马鱼的背部血管荧光强度改善情况,结果如图 7-B 所示。结果显示,与对照组相比,模型组的背部血管荧光强度具有显著性差异 ($P < 0.05$);与 Model 相比, $1/2\text{MTC}$ 、 $1/4\text{MTC}$ 组的背部血管荧光强度均具有显著性差异

($P < 0.05$), 其中 1/2MTC 组效果优于 1/4MTC 组, 因此, 最佳给药剂量为 $375 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



A. 当归补血汤干预 24 h 后各组斑马鱼死亡率折线图
B. 各组斑马鱼背部血管荧光强度柱状图。

A. Line chart of mortality rate of zebrafish in each group after intervention with Danggui Buxue Tang for 24 h B. Bar chart of fluorescence intensity of blood vessels in the back of zebrafish in each group.

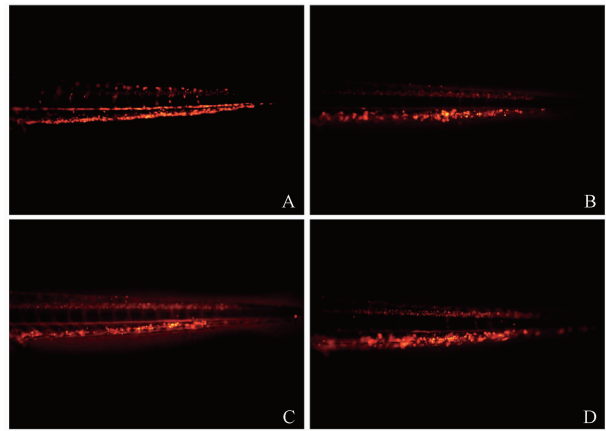
图 7 最佳给药剂量考察结果图 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Results of optimal dose administration ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.4.6 30 批次当归补血汤对贫血模型斑马鱼的药效作用研究

选取正常发育至 48 hpf 的斑马鱼放置于 12 孔

板中, 放置密度为 8 条/孔, 设置复孔。设置正常组、模型组 (苯酚 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 及 30 批次当归补血汤样品溶液给药组 (以下简称 T1-T30), 加入相应试剂确保孔板终体积为 2 mL, 实验结果见表 8。



A. 空白组 B. 模型组 C. 1/2MTC 组 D. 1/4MTC 组。

A. Blank group B. Model group C. 1/2MTC group D. 1/4MTC group.

图 8 不同浓度当归补血汤干预后斑马鱼背部血管图

Fig. 8 Zebrafish dorsal vasculature following Danggui Buxue

Decoction treatment at varying concentrations

表 8 30 批次当归补血汤对贫血模型斑马鱼的药效作用实验结果表 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 8 Evaluation of batch-to-batch variability in Danggui Buxue Decoction efficacy using zebrafish anemia models ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	背部血管荧光强度 (AU)	组别	背部血管荧光强度 (AU)	组别	背部血管荧光强度 (AU)
空白组	81.22 ± 4.53	T10	51.83 ± 6.85	T21	50.53 ± 11.45
模型组	33.39 ± 5.41	T11	57.02 ± 7.94	T22	47.50 ± 6.78
T1	60.72 ± 5.55	T12	57.64 ± 9.01	T23	44.22 ± 7.04
T2	50.55 ± 9.85	T13	61.43 ± 10.39	T24	56.16 ± 8.42
T3	62.60 ± 9.36	T14	51.87 ± 6.45	T25	51.30 ± 9.14
T4	54.96 ± 8.27	T15	76.58 ± 8.47	T26	54.97 ± 8.93
T5	51.68 ± 6.83	T16	58.14 ± 13.23	T27	54.41 ± 8.36
T6	54.17 ± 9.83	T17	49.82 ± 9.29	T28	58.48 ± 10.48
T7	49.22 ± 6.50	T18	59.91 ± 11.50	T29	48.97 ± 8.69
T8	47.47 ± 6.27	T19	51.66 ± 8.22	T30	72.80 ± 9.32
T9	58.88 ± 8.61	T20	50.41 ± 10.38		

2.5 基于灰色关联分析当归补血汤“补血”功效的药效物质基础研究

2.5.1 确定系统特征

因本研究分别针对当归补血汤各成分 (对应各峰) 对贫血模型斑马鱼背部血管荧光强度的影响, 故将背部血管荧光强度作为母序列, 记为 $X_0(k), k = 1, 2, \dots, n$ (n 为样本数); 分别将对应的当归补血汤指纹图谱 13 种成分的峰值作为子序列, 记为:

$X_1(k), X_2(k), \dots, X_{13}(k), k = 1, 2, \dots, n$ (n 为样本数)。

2.5.2 无量纲化处理

采用均值化变换, 即用各序列元素分别除以相应序列的平均值, 从而得到均值化序列。

$$Y_i(k) = \frac{X_i(k)}{\frac{1}{30} \sum_{k=1}^{30} X_i(k)} = \frac{30X_i(k)}{\sum_{k=1}^{30} X_i(k)}$$

$$i = 0, 1, 2, \dots, 13, k = 1, 2, \dots, 30$$

2.5.3 关联系数与关联度的确定

关联系数公式:

$$\xi_i(k) = \frac{i_{\min} k_{\min} |Y_0(k) - Y_i(k)| + \rho i_{\max} k_{\max} |Y_0(k) - Y_i(k)|}{|Y_0(k) - Y_i(k)| + \rho i_{\max} k_{\max} |Y_0(k) - Y_i(k)|}$$

$$i = 1, 2, \dots, 13, k = 1, 2, \dots, 30$$

关联度计算公式:

$$\gamma_{0i} = \frac{1}{30} \sum_{k=1}^{30} \xi_{0i}(k), i = 1, 2, \dots, 13$$

$$\Delta_{0i}(k) = |Y_0(k) - Y_i(k)|, i = 1, 2, \dots, 13, k = 1, 2, \dots, 30$$

其中, $\Delta_{0i}(k) = |Y_0(k) - Y_i(k)|, i = 1, 2, \dots, 26, k = 1, 2, \dots, 100$ 为分辨系数, $\Delta_{0i}(k) = |Y_0(k) - Y_i(k)|, i = 1, 2, \dots, 26, k = 1, 2, \dots, 100$, 一般取 $\Delta_{0i}(k) = |Y_0(k) - Y_i(k)|, i = 1, 2, \dots, 26, k = 1, 2, \dots, 100$;

$$\Delta_{0i}(k) = |Y_0(k) - Y_i(k)|, i = 1, 2, \dots, 13, k = 1, 2, \dots, 30$$

2.5.4 实验结果

根据灰色关联度原理, 关联度越大的成分对

背部血管荧光强度影响越显著, 关联度 ≥ 0.9 , 表明子序列对母序列有显著影响; 关联度在 $0.8 \sim 0.9$ 之间, 表示有相对显著影响; 关联度在 $0.7 \sim 0.8$ 之间, 表示有明显影响; 关联度在 $0.6 \sim 0.7$ 之间, 表示有较小影响; 关联度 < 0.6 , 表示有非常小影响^[17]。通过对 30 批实验室制备的当归补血汤与背部血管荧光强度值的灰色关联分析发现: 峰 1 以 0.905 的关联度位列第一, 表明其与目标系统的关联性最强系统行为的主要因素之一, 峰 1(4-胍基丁酸, 来自黄芪)、峰 2(异亮氨酸, 来自酒当归)、峰 3(6-甲氧基-2H-色烯-2-酮, 来自酒当归、黄芪)、峰 4(月桂酸, 来自酒当归)、峰 5(阿魏酸, 来自酒当归、黄芪)、未知峰 8(红车轴草素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 来自黄芪)的关联度大于 0.8, 对系统具有显著影响, 虽略逊于峰 1, 但仍保持在较高水平, 说明它们对背部血管荧光强度的作用不可忽视。其余化学成分与药理结果的相关性均小于 0.8, 有较小影响, 具体结果见表 9~10。

表 9 当归补血汤化学成分与背部血管荧光强度值的关联度

Tab. 9 Correlation network of Danggui Buxue Decoction chemical components and dorsal vascular fluorescence parameters

批次	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
T1	0.91	0.92	0.82	0.99	0.96	0.72	0.93	0.99	0.84	0.71	0.92	0.83	0.63
T2	0.94	0.86	0.89	0.99	0.99	0.85	0.89	0.87	0.98	0.77	0.92	0.69	0.60
T3	0.82	0.84	0.86	0.77	0.86	0.66	0.73	0.88	0.75	0.34	0.69	0.92	0.65
T4	0.99	0.95	0.94	0.94	0.96	0.72	0.85	0.89	0.86	0.79	0.84	0.87	0.62
T5	0.95	0.97	0.98	0.99	0.88	0.88	0.97	0.87	0.95	0.53	0.89	0.77	0.63
T6	0.82	0.86	0.99	0.95	0.85	0.71	0.94	0.83	0.94	0.80	0.87	0.90	0.64
T7	0.97	1.00	0.88	0.94	0.90	0.79	0.93	0.94	0.96	0.79	0.90	0.87	0.62
T8	0.87	0.89	0.96	0.92	0.97	0.84	0.95	0.90	0.89	0.88	0.88	0.80	0.62
T9	0.87	0.88	0.77	0.96	0.97	0.82	0.91	0.91	0.84	0.80	0.79	0.96	0.73
T10	0.98	0.92	0.96	0.93	0.93	0.80	0.79	0.76	0.74	0.77	0.80	0.90	0.67
T11	0.90	0.90	0.86	0.94	0.78	0.83	0.66	0.65	0.64	0.60	0.69	0.93	0.65
T12	0.98	0.93	0.82	0.83	0.95	0.98	0.67	0.74	0.65	0.74	0.68	0.98	0.60
T13	0.85	0.81	0.76	0.84	0.79	0.91	0.84	0.94	0.82	0.67	0.91	0.89	0.65
T14	0.99	0.87	0.73	0.95	0.76	0.63	0.91	0.97	0.94	0.70	0.86	0.91	0.60
T15	0.93	0.95	0.90	0.83	0.98	1.00	0.56	0.65	0.55	0.83	0.58	0.46	0.75
T16	0.94	0.74	0.82	0.88	0.80	0.96	0.92	0.88	0.76	0.80	0.87	0.81	0.66
T17	0.95	0.84	0.97	0.96	0.88	0.88	0.82	0.75	0.69	0.89	0.75	0.89	0.70
T18	0.88	0.92	0.89	0.78	0.82	0.62	0.76	0.81	0.78	0.33	0.74	0.77	0.72
T19	0.95	1.00	0.97	0.73	0.93	0.76	0.69	0.71	0.75	0.92	0.70	0.81	0.64
T20	0.96	0.94	0.91	1.00	0.87	0.70	0.74	0.75	0.75	0.96	0.69	0.98	0.70
T21	0.89	0.93	0.91	0.99	0.94	0.68	0.74	0.77	0.76	0.97	0.73	0.93	0.65
T22	0.95	0.94	0.76	0.97	0.92	0.88	0.82	0.96	0.89	0.87	0.83	0.87	0.66
T23	0.76	0.78	0.59	0.66	0.66	0.92	0.70	0.89	0.76	0.98	0.77	0.85	0.36

续表 9(Tab. 9 continued)

批次	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
T24	0.84	0.95	0.83	0.90	0.79	0.74	0.75	0.88	0.72	0.77	0.84	0.79	0.43
T25	0.73	0.94	0.63	0.67	0.74	0.57	0.63	0.73	0.60	0.86	0.75	0.88	0.36
T26	0.79	0.80	0.82	0.98	0.72	0.84	0.71	0.73	0.71	0.58	0.72	0.61	0.40
T27	0.94	0.92	0.78	0.80	0.96	0.85	0.73	0.74	0.72	0.58	0.72	0.65	0.43
T28	0.95	0.93	0.95	0.78	0.87	0.77	0.75	0.83	0.82	0.84	0.75	0.91	0.46
T29	1.00	0.87	0.94	0.95	0.75	0.72	0.81	0.92	0.90	0.86	0.86	0.97	0.41
T30	0.84	0.88	0.78	0.89	0.75	0.74	0.60	0.59	0.59	0.50	0.60	0.85	0.41

表 10 关联度结果表

Tab. 10 The result table of correlation

关联度结果		
评价项	关联度	排名
峰 1	0.905	1
峰 2	0.898	2
峰 4	0.890	3
峰 5	0.865	4
峰 3	0.856	5
峰 12	0.842	6
峰 8	0.825	7
峰 6	0.792	8
峰 7	0.790	9
峰 11	0.785	10
峰 9	0.784	11
峰 10	0.747	12
峰 13	0.589	13

3 讨论

本研究使用 LC-QE/MS 的方法对当归补血汤样品的原型成分进行了定性分析,根据化合物的一级和二级质谱信息并结合文献报道进行比对推测,最终鉴定原型成分 90 个化合物。

继而,在化学成分定性分析结果基础上,本研究通过建立 UPLC 指纹图谱对当归补血汤进行了化学成分定量研究。本研究采用外加内标的方法建立了当归补血汤定量指纹图谱,最终确定了 13 个响应值较高,出峰相对稳定的峰作为共有峰。当然共有峰构建不完善会影响谱-效相关分析的结果和准确性,这需要更多的样本量和已知成分的获取进一步完善实验结果。

众多现代研究表明,当归补血汤在治疗和改善各类贫血方面效果显著,涵盖肾性贫血、缺铁性贫血、妊娠贫血以及溶血性贫血等多种不同病因导致的贫血病症。陆泳萍^[18]通过对 43 例缺铁性

贫血的临床观察显示,与西医常规治疗比较,联合加味当归补血汤既能明显改善贫血提高临床有效率,又能降低不良反应发生率。廖大忠等^[19]研究显示,加味当归补血汤治疗肿瘤相关性贫血的效果优于常规西药。而斑马鱼作为新兴实验动物模型,具有繁殖能力强、发育速度快、胚胎透明、便于观察、基因与人类高度同源等优点。苯胍是一种能够诱导动物发生贫血的化学物质,可以通过氧化作用使红细胞膜上的血红蛋白氧化为高铁血红蛋白,导致红细胞失去携氧能力,进而引发贫血。这种诱导方式与多种贫血病症的发病机制有一定相似性,能够较好地模拟实际的贫血状态,符合研究对贫血模型的需求。背部血管荧光强度能够直观、快速地反映斑马鱼的贫血状况,以及药物干预后贫血症状的改善情况^[14-16]。因此本研究通过建立苯胍诱导的斑马鱼贫血模型,可更直观的探究当归补血汤的补血作用。

灰色关联度可对多指标数据进行综合分析,全面评估各成分对药效的影响,避免单一指标分析的局限性。因此基于以上结果,本研究通过采用灰色关联度法,对 30 批次当归补血汤 13 种化学成分及药效指标值(贫血模型斑马鱼的背部血管荧光强度)进行关联分析,得到的主要影响成分有 4-胍基丁酸(黄芪)、异亮氨酸(酒当归)、月桂酸(酒当归)、阿魏酸(酒当归、黄芪)、6-甲氧基-2H-色烯-2-酮(酒当归、黄芪)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(酒当归、黄芪)、未知峰 8。现代研究表明,阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等化学成分具有补血作用^[20-22];异亮氨酸是血红蛋白形成的必需氨基酸,可参与调节糖和能量水平,与其他氨基酸一起对血红蛋白合成有帮助,进而有助于补血^[23],和我们的分析结果有一定的一致性。以上结果说明当归补血汤发挥缓解贫血作用是黄芪及酒当归协同作用的结果,药效物质基础的挖掘为该经典名方制剂的临床使用和质量控制

提供了科学支撑,也为组分新药、AI 数智化活性成分数据库的构建奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 李东垣. 内外伤辨惑论[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:24.
- [2] 胡静,李科,李爱平,等. 当归补血汤物质基础研究进展[J]. 中草药,2020,51(21):5658.
- [3] 张硕,姜晓燕,符映均,等. 基于斑马鱼模型的补血生髓方对肿瘤相关性贫血和免疫功能低下的保护作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2024, 26(5): 1320.
- [4] 张恂,张楠,朱丹. 斑马鱼在血液系统研究中的应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2020, 29(4): 67.
- [5] 王历刚,杨柳,陈柳茵,等. 当归补血汤治疗肿瘤相关性贫血的研究现状述评[J]. 中国医学创新, 2022, 19(31): 180.
- [6] 李伟,冯育林,黎田儿,等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合诊断离子方法快速分析连钱草中黄酮类化合物[J]. 质谱学报, 2016,37(6):504.
- [7] WU YY, WANG L, LIU GX, et al. Characterization of principal compositions in the roots of *Angelica sinensis* by HPLC-ESI-MS and chemical comparison of its different parts[J]. J Chin Pharm Sci,2014,23(6):393.
- [8] 胡静. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合诊断离子与分子网络策略解析当归补血汤的化学成分[D]. 太原:山西大学,2021.
- [9] 蒋虎刚,赵信科,蔺文燕,等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析当归中多种香豆素类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,25(13):157.
- [10] 朱顺娟. 基于当归补血活血、润肠通便的有效部位筛选与化学成分分离分析[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2018.
- [11] 禹建芳,赵江源,杨智明,等. 膜荚黄芪化学成分研究[J]. 中药材,2022,45(2):341.
- [12] 王青虎,王秀兰,奥·乌力吉,等. 蒙古黄芪化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2014,49(5):357.
- [13] 刘璐,吕凌,李晨,等. 基于多指标成分和模式识别分析不同产地金银花的质量差异[J]. 中华中医药杂志,2023,38(9):4328.
- [14] 张硕,姜晓燕,符映均,等. 基于斑马鱼模型的补血生髓方对肿瘤相关性贫血和免疫功能低下的保护作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2024, 26(5): 1320.
- [15] 张恂,张楠,朱丹. 斑马鱼在血液系统研究中的应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2020, 29(4): 67.
- [16] 王历刚,杨柳,陈柳茵,等. 当归补血汤治疗肿瘤相关性贫血的研究现状述评[J]. 中国医学创新, 2022, 19(31): 180.
- [17] 高燕,丁晓彦,刘璐,等. Spearman 与 GRA 法联合熵值法解析双黄连口服液解热抗炎药效物质基础[J]. 中华中医药杂志,2024,39(4):1985.
- [18] 陆泳萍. 加味当归补血汤联合维铁缓释片治疗缺铁性贫血 43 例临床观察[J]. 中医药导报,2016,22(2):67.
- [19] 廖大忠,李静,鲁光洪,等. 加味当归补血汤治疗肿瘤相关性贫血 72 例临床观察[J]. 四川中医,2016,34(1):81.
- [20] 李惠莹,唐云丽,钟文等. 当归不同极性部位提取物 5 个成分含量测定及补血药效学研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(6): 1019.
- [21] 靳如娜,齐晓甜,孙蓉等. 经典名方当归补血汤的药效物质基础和质量控制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 220.
- [22] 刘洁丽,张瑛,马霞等. 新鲜和干燥当归干预血虚大鼠的补血作用及谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2308.
- [23] 刘晨. “复方补益汤”对长期运动大鼠血浆 Val、Leu、Ile 的影响[J]. 体育学刊,2008,15(6):104.

(收稿日期:2025-04-14)