

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.003

文章编号: 1005-8982 (2019) 07-0013-05

牡丹皮、赤芍配伍对活血化瘀疗效及有效成分的影响

张欢¹, 何丽丽²

(1. 湖北省中西医结合医院 药学部, 湖北 武汉 430015; 2. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: **目的** 探讨牡丹皮、赤芍配伍对家兔血小板聚集、凝血酶时间、血栓溶解、全血凝块溶解的影响。并考察两药配伍对没食子酸、芍药苷、丹皮酚的影响。**方法** 比浊法测定血小板聚集抑制率和凝血酶时间, 重量法测定血栓溶解率和全血凝块溶解率, HPLC 法测定主要成分的含量。**结果** 对照组的家兔体外血小板最大聚集率为 42.62%, 血浆凝血酶时间 13.45 s, 给予不同药液后, 各组血小板最大聚集率均下降 ($P < 0.05$), 血浆凝血酶时间均上升 ($P < 0.05$), 其中, 合煎组药效最好, 其体外血小板聚集率为 20.77%, 凝血酶时间为 21.01 s。同时 24 h 内, 两药合煎与单煎再混合的血栓溶解率及全血凝块溶解率高于单煎牡丹皮及单煎赤芍。HPLC 分析结果显示, 两药合煎后与单煎再混合比较, 芍药苷含量增加 ($P < 0.05$)、没食子酸含量几乎持平, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 牡丹皮、赤芍合煎, 能够促进有效成分的溶出, 提高活血化瘀疗效, 具有配伍合理性, 为临床合理用药提供科学依据。

关键词: 活血化瘀 / 药理学; 牡丹皮; 赤芍; 配伍; 有效成分; 动物实验

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Effect of Moutan cortex and Paeoniae rubra radix on coagulation and their active ingredients

Huan Zhang¹, Li-li He²

(1. Department of Pharmacology, Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese & Western Medicine, Wuhan, Hubei 430015, China; 2. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of Moutan cortex and Paeoniae rubra radix on coagulation and potential casual ingredients. **Methods** Platelet aggregation was determined by turbidimetric method. Thrombolytic rate and the rate of whole blood clot were determined by gravity method. The content of each plant was determined by HPLC. **Results** The maximum platelet aggregation rate of rabbits in the control group was 42.62%, and the plasma thrombin time was 13.45 s. After different drug solutions, the maximum aggregation rate of platelets decreased ($P < 0.05$), and plasma thrombin time increased ($P < 0.05$); combined decoction group had the best efficacy, the platelet aggregation rate was 20.77%, and the thrombin time is 21.01 s. Within 24 h, the thrombolytic rate and the whole blood clot dissolution rate of the two medicines combined frying and single frying then combining were higher than that of single fried Moutan cortex and single fried Paeoniae rubra radix. The results of HPLC analysis showed that the content of paeoniflorin increased ($P < 0.05$) and the content of gallic acid was almost the same after the two medicines were combined with single frying, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions**

收稿日期: 2018-07-26

Joint application of Moutan cortex and Paeoniae rubra radix exerts better anti-coagulation effect by enhancing dissolution of casual ingredients, which has rational compatibility, and provides scientific basis for clinical rational drug use.

Keywords: promoting blood circulation for removing blood stasis/pharmacology; Moutan cortex; Paeoniae rubra radix; compatibility; active ingredient; animal experimentation

牡丹皮、赤芍均为毛茛科植物,化学成分类似^[1]。牡丹皮具有清热凉血、活血化瘀的功效,赤芍具有活血散瘀、止痛的功效,临床常相须为用,协同增效,为活血化瘀常用药对,如《金匱要略》中“温经汤”^[2]《外科正宗》之“活血散瘀汤”^[3]《备急千金要方》之“犀角地黄汤”^[4]。但该药对配伍活血化瘀疗效及有效成分的变化研究少见报道。本文依据该药对的临床用药特点,以水煎汤剂为主要研究对象,考察两药配伍对家兔体外血小板聚集抑制率、体外凝血酶时间等活血化瘀药效指标的影响。同时,测定两药配伍后没食子酸、芍药苷、丹皮酚的含量变化。从生物效应及物质基础两方面研究该药对配伍的变化,初步探究其用药合理性,为临床用药提供科学依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 牡丹皮、赤芍(武汉天济饮片公司),经湖北中医药大学詹亚华教授鉴定分别为毛茛科植物牡丹(*paeonia suffruticosa andr*)的干燥根皮、毛茛科植物川赤芍(*paeonia veitchii lynch*)的干燥根。没食子酸、丹皮酚、芍药苷购自中国食品药品检定研究院,腺苷二磷酸(ADP)购自北京中勤世帝科学仪器公司,枸橼酸钠购自国药集团化学试剂公司,牛凝血酶购自美国 Sigma 公司,乙腈、甲醇购自美国 Teddia 公司。

1.1.2 仪器 Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司),BS124S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司),BE COMPACT X 全自动血凝检测仪(德国 BE 公司),DM0412 型离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司),移液器(德国 Eppendorf 公司)。

1.1.3 动物 健康新西兰大耳白家兔,雄性,体重 2.0 ~ 2.5 kg,由华中科技大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2016-0009。

1.2 各组供试品溶液的制备

1.2.1 牡丹皮组供试品溶液的制备 称取牡丹皮 20 g,加 10 倍量的水,浸泡 1 h,置于电炉上直火煎

煮 3 次,每次 40 min。合并 3 次滤液,过滤,浓缩至 100 ml,0.45 μm 有机微孔滤膜滤过,即得 0.2 g/ml 的牡丹皮浓缩液,临用时加水稀释至 0.1 g/ml,即得 0.1 g/ml 的牡丹皮组供试品溶液。

1.2.2 赤芍组供试品溶液的制备 同牡丹皮组供试品溶液的制备方法,制备 0.1 g/ml 的赤芍组供试品溶液。

1.2.3 牡丹皮、赤芍合煎组供试品溶液的制备 分别称取牡丹皮、赤芍各 20 g,同按牡丹皮组供试品溶液的制备方法,制备 0.2 g/ml 的牡丹皮、赤芍合煎组供试品溶液。

1.2.4 牡丹皮、赤芍单煎再混合组供试品溶液的制备 分别精密移取 10 ml 的牡丹皮、赤芍浓缩液,混合均匀,浓缩后加水定容至 10 ml,即为 0.2 g/ml 的牡丹皮、赤芍单煎再混合组供试品溶液。

1.2.5 混合对照品溶液的配制 分别精密称取没食子酸、芍药苷、丹皮酚对照品 0.00210、0.00184 和 0.00163 g,于 10 ml 容量瓶中,加甲醇定容,混匀,即得混合对照品溶液。其中没食子酸、芍药苷、丹皮酚的浓度分别为 210、184 和 163 μg/ml。

1.3 各组活血作用检测

1.3.1 对 ADP 诱导家兔体外血小板聚集的影响 家兔颈总动脉取血 4.5 ml,加至含有 38 g/L 枸橼酸钠 0.5 ml 的离心管中,混匀。另取肝素钠抗凝血 5 ml。每次均采集 6 个样本,室温下,将新鲜全血 1 000 r/min 离心 10 min,取上层液,即为富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP);剩余部分以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即为贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP)。采用血小板聚集仪进行血小板聚集功能测定,以纯净水为空白对照组,PPP 调零。测定时分别取各组供试品溶液 100 μl 与 150 μl PRP 在 37℃ 比浊杯内孵育 3 min,加搅拌珠,分别加入诱导剂 ADP 10 μl 诱导血小板聚集,此时,牡丹皮组、赤芍组、合煎组、单煎再混合组的药液终浓度分别为 40、40、80 及 80 mg/ml,测试并记录 6 min 内最大聚集率。

1.3.2 对血浆凝血酶时间的检测 测试杯通道中加入 100 μl PPP 和各样品溶液 80 μl,37℃ 温育 3 min,再加入已预温的 1.5 × 10⁴ u/L 凝血酶 20 μl,混匀,此时,

牡丹皮组、赤芍组、合煎组、单煎再混合组的药液终浓度分别为40、40、80及80 mg/ml,用血小板聚集凝血因子分析仪测定凝血时间。对照组加100 μ l纯净水,每组重复6次,取平均值,记录各组凝血时间。

1.4 各组化瘀作用检测

1.4.1 对血栓溶解的检测 取家兔枸橼酸钠抗凝血10 ml,然后依次加入200 μ l 0.5% 纤维蛋白原溶液、100 μ l 50 g/L 氯化钙 CaCl_2 溶液、200 μ l 1.0×10^5 u/L 凝血酶溶液。混匀,注入平底玻璃试管中,37℃水浴20 min后取出血栓,切成0.5 cm的小段,放入装有2 ml不同质量的药液中,对照组为2 ml的纯净水,37℃温育,于0、6、12、24、48 h分别测定剩余血栓段的质量,按照公式计算血栓溶解率:血栓溶解率=(血栓初始质量-药物作用后各时间点血栓质量)/血栓初始质量,各给药组平行测定6次。

1.4.2 对全血凝块溶解的检测 家兔采血20 ml置于表面皿中,2 h后自然凝固后切成0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm的小块,用生理盐水冲洗3次,待用。将不同质量浓度的药液各2 ml加入15 ml EP管中,加纯净水至5 ml,对照组加5 ml的纯净水,此时,牡丹皮组、赤芍组、合煎组、单煎再混合组的药液终浓度分别为40、40、80及80 mg/ml,向各装有药液的EP管中加入6个血块,37℃温育,于0、6、12、24、48 h分别测定血块的质量,按照公式计算全血凝块溶解率:全血凝块溶解率=(血凝块初始质量-药物作用后各时间点血凝块质量)/血凝块初始质量。

1.5 没食子酸、芍药苷、丹皮酚的含量测定

色谱条件:色谱柱:Acclaim™ 120 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(1~6 min, 10% A; 6~20 min, 10%~14% A; 20~30 min, 14%~35% A; 30~40 min, 35% A);流速:1 ml/min;柱温:25℃;检测波长:230 nm;进样量:10 μ l。

1.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 13.0统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组不同时间点的比较采用重复测量设计的方差分析,两两间比较用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牡丹皮、赤芍配伍前后活血作用比较

2.1.1 对家兔体外血小板聚集的影响 空白对照组的

血小板最大聚集率为42.62%,给予不同药液后,各组血小板最大聚集率均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中,牡丹皮组下降至24.84%,赤芍组下降至27.03%,合煎组的体外血小板聚集率为20.77%,单煎再混合组下降至23.45%。结果显示两药合煎能抑制家兔体外血小板聚集。见表1。

2.1.2 对血浆凝血酶时间的影响 空白对照组的家兔体外血浆凝血酶时间为13.45 s,加入各组药液后凝血酶时间均上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中牡丹皮上升至17.32 s,赤芍组上升至18.94 s,合煎组上升最高,为21.01 s,单煎再混合组为19.87 s。结果显示两药合煎后,血浆凝血酶时间增加。见表1。

表1 家兔体外血小板最大聚集率和血浆凝血酶时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 / (mg/ml)	血小板最大聚集率 / %	血浆凝血酶时间 / s
空白对照组	-	42.62 \pm 1.08	13.45 \pm 1.94
牡丹皮组	40	24.84 \pm 2.16 [†]	17.32 \pm 1.57 [†]
赤芍组	40	27.03 \pm 1.52 [†]	18.94 \pm 3.51 [†]
合煎组	80	20.77 \pm 1.98 [†]	21.01 \pm 1.68 [†]
单煎再混合组	80	23.45 \pm 2.11 [†]	19.87 \pm 3.87 [†]
F值		511.22	94.95
P值		0.000	0.000

注:†与空白对照组比较, $P < 0.05$

2.2 各组化瘀作用比较

2.2.1 对血栓溶解的影响 给药组与空白对照组在6、12、24、48 h血栓溶解率的比较采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的血栓溶解率有差异($F = 1344.74$, $P = 0.000$);②各组血栓溶解率有差异($F = 1989.56$, $P = 0.000$);③各组血栓溶解率变化趋势有差异($F = 182.02$, $P = 0.000$)。各给药组均能促进体外血栓溶解,且与时间呈依赖性递增。48 h后,各给药组血栓溶解率几乎持平。见表2。

2.2.2 对全血凝块溶解的影响 各组在6、12、24、48 h全血凝块溶解率的比较采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的全血凝块溶解率有差异($F = 1254.15$, $P = 0.000$);②各组血栓溶解率有差异($F = 1756.69$, $P = 0.000$);③各组血栓溶解率变化趋势有差异($F = 1021.54$, $P = 0.000$)。各给药组均能促进家兔体外全血凝块溶解,且与时间呈依赖性递增。48 h后,各组全血凝块溶解率几乎持平。见表3。

表 2 各组体外血栓溶解率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 / (mg/ml)	血栓溶解率 /%			
		6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	-	16.12 ± 3.18	23.12 ± 1.06	41.58 ± 4.27	64.13 ± 1.85
牡丹皮组	40	18.43 ± 2.14 [†]	29.77 ± 3.16 [†]	51.99 ± 1.64 [†]	74.54 ± 3.51 [†]
赤芍组	40	20.52 ± 3.30 [†]	31.43 ± 2.65 [†]	57.01 ± 2.46 [†]	75.03 ± 2.63 [†]
合煎组	80	29.01 ± 4.61 [†]	45.76 ± 3.66 [†]	70.68 ± 2.96 [†]	76.11 ± 3.26 [†]
单煎再混合组	80	27.65 ± 2.11 [†]	43.51 ± 4.10 [†]	65.87 ± 4.31 [†]	75.82 ± 3.68 [†]

注: † 与空白对照组比较, $P < 0.05$

表 3 各组全血凝块溶解率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

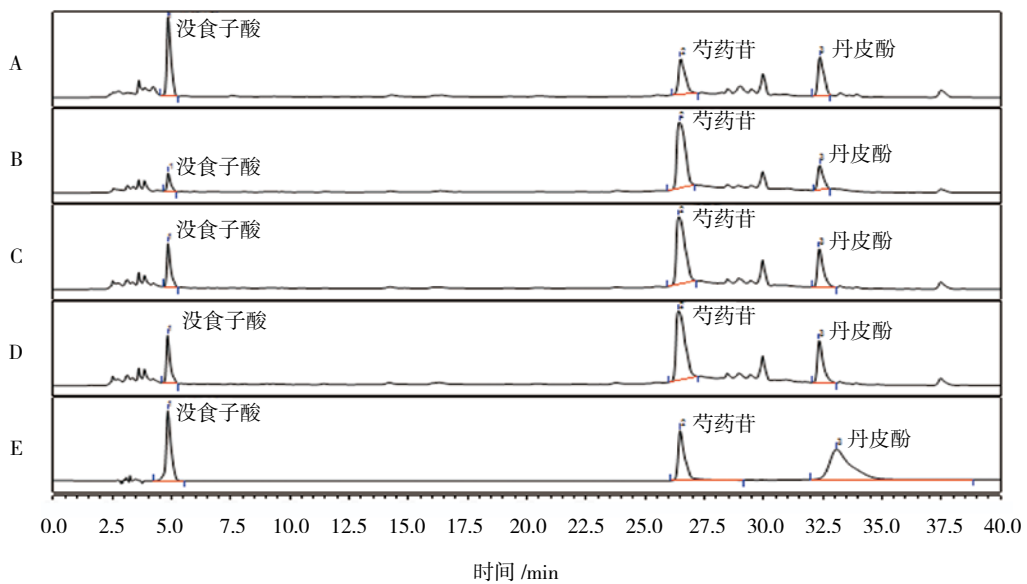
组别	浓度 / (mg/ml)	全血凝块溶解率 /%			
		6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	-	11.11 ± 2.75	19.76 ± 2.10	34.13 ± 2.09	60.12 ± 3.58
牡丹皮组	40	20.16 ± 1.64 [†]	31.27 ± 1.33 [†]	56.55 ± 2.23 [†]	76.29 ± 2.35 [†]
赤芍组	40	21.44 ± 2.56 [†]	33.03 ± 2.61 [†]	57.26 ± 3.15 [†]	77.51 ± 3.01 [†]
合煎组	80	27.01 ± 3.01 [†]	48.46 ± 2.35 [†]	72.08 ± 3.29 [†]	80.13 ± 4.21 [†]
单煎再混合组	80	25.25 ± 1.51 [†]	44.98 ± 3.66 [†]	70.84 ± 1.52 [†]	78.62 ± 3.27 [†]

注: † 与空白对照组比较, $P < 0.05$

2.3 没食子酸、芍药苷、丹皮酚的含量

混合对照品及各供试品图谱见图 1, 以各色谱峰峰面积 (\hat{Y}) 对质量分数 (X) 进行线型回归, 各成分的回归方程、相关系数及线型范围见表 4。根据各成分的标准曲线计算各供试品中各成分的含量, 每个

样品重复测定 3 次。两两比较采用 LSD- t 检验, 结果表明, 与牡丹皮组比较, 赤芍组中没食子酸含量降低、芍药苷含量升高、丹皮酚含量升高 ($P < 0.05$)。两者合煎后, 与单煎再混合组比较, 合煎组芍药苷含量增加 ($P < 0.05$)、没食子酸含量几乎持平, 差异无统计学



A: 牡丹皮单煎供试品溶液; B: 赤芍单煎供试品溶液; C: 牡丹皮、赤芍合煎供试品溶液; D: 牡丹皮、赤芍单煎再混合供试品溶液; E: 混合对照品溶液

图 1 混合对照品及各供试品溶液色谱图

意义 ($P>0.05$), 说明两者配伍对没食子酸含量无明显影响; 丹皮酚含量在各组中均在较低水平。见表 5。

表 4 3 种成分的回归方程、相关系数及线型范围

成分	回归方程	相关系数 (r)	线型范围/ μg
没食子酸	$\hat{Y}=32.67X+6.806$	0.9996	0.0412 ~ 1.7861
芍药苷	$\hat{Y}=24.93X+2.796$	0.9998	0.0855 ~ 3.6714
丹皮酚	$\hat{Y}=71.94X+11.23$	0.9992	0.0701 ~ 2.9673

表 5 各组供试品溶液中 3 种成分的含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}$)		
	没食子酸	芍药苷	丹皮酚
牡丹皮组	13.23 ± 2.31	9.63 ± 4.23	3.06 ± 0.65
赤芍组	$6.44 \pm 2.601^{1)}$	$49.70 \pm 2.33^{1)}$	$5.95 \pm 0.82^{1)}$
合煎组	20.48 ± 1.08	$62.54 \pm 1.88^{2)}$	7.69 ± 1.77
单煎再混合组	19.06 ± 0.52	53.27 ± 3.15	7.03 ± 2.93
F 值	121.23	146.32	35.76
P 值	0.041	0.046	0.053

注: 1) 与牡丹皮组比较, $P<0.05$; 2) 与单煎再混合组比较, $P<0.05$

3 讨论

中医认为血瘀是因血液瘀滞所带来的病症, 凡血液运行不畅或体内离经止血未能消散, 都成为瘀血^[5]。

血小板聚集是血液运行不畅的一个重要原因, ADP 诱导血小板凝集法较为成熟^[6]。凝血酶时间是指在血浆中加入标准化的凝血酶后血液凝固的时间。这些指标可作为评价药物活血功能的参考。实验表明, 牡丹皮与赤芍均能抑制 ADP 诱导的血小板凝集, 两者配伍使用后抑制作用增强。说明牡丹皮、赤芍作为常用药对, 可协同增强活血作用, 具有组方合理性。

离经之血易形成血栓、血凝块^[7], 本实验采用体外溶栓等实验, 考察牡丹皮、赤芍及其两者配伍后的化瘀药效。结果表明, 牡丹皮、赤芍均可提高血栓溶解率及全凝血块溶解率, 且赤芍药效优于牡丹皮。两药配伍使用, 溶栓及溶血疗效优于单独使用, 合煎药液优于单煎后再混合药液。说明牡丹皮、赤芍配伍使用在化瘀作用方面具有合理性。

没食子酸、芍药苷、丹皮酚具有抗血小板聚集, 溶解血栓的作用^[8-10], 说明该成分与活血化瘀存在一定的联系。含量测定结果可见: ①没食子酸含量: 单

煎再混合 \leq 牡丹皮单煎 + 赤芍单煎 \leq 合煎; ②芍药苷含量: 单煎再混合 $<$ 牡丹皮单煎 + 赤芍单煎 $<$ 合煎; ③丹皮酚含量: 再混合 $<$ 合煎 $<$ 牡丹皮单煎 + 赤芍单煎。由此可见, 合煎可以促进没食子酸及芍药苷的溶出。再混合后, 芍药苷含量降低, 这可能是由于溶液微环境的变化导致芍药苷水解所致。丹皮酚含量则始终较低, 可能由于丹皮酚水溶性差、熔点低、易挥发、不稳定等特点所致^[11-12]。

药对是中医临床实践经验积累的结晶, 是中医辨证施治、遣方用药的物质基础^[13]。本研究分别从活血及化瘀两方面, 设计体外药效实验方法。同时建立 HPLC 同时测定没食子酸、芍药苷、丹皮酚含量的方法。实验结果表明, 牡丹皮、赤芍药对配伍合煎能促进有效成分的溶出, 协同增强活血化瘀药效, 具有配伍合理性。该结果为深入阐明其配伍机制奠定一定的基础, 同时也为临床合理用药提供支持。

参考文献:

- [1] 章丽, 赵冰洁, 袁嘉瑞, 等. 基于“组分结构”理论对丹皮、赤芍和白芍化学成分的对比较研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1835-1842.
- [2] 姜雅晴. 温经汤合并西药治疗月经不调 85 例疗效分析[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(1): 73-74.
- [3] 胡晓峰. 中医外科学名著集成. 外科正宗[M]. 北京: 华夏出版社, 1997: 386.
- [4] 张保国, 程铁峰, 刘庆芳. 犀角地黄汤药效研究及临床新用[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1919-1921.
- [5] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 303.
- [6] 张彦华, 唐于平, 郭建明, 等. 活血化瘀方对 ADP 诱导的家兔血小板聚集和凝血酶时间的影响及量效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2822-2825.
- [7] 苏于纳. 浅谈血瘀[J]. 河北中医, 2013, 35(6): 845-846.
- [8] 李哈奎, 洪晓华, 张东, 等. 丹皮酚和芍药苷及其不同配比对急性心肌梗死大鼠的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 254-256.
- [9] 孙蓉, 衣银萍, 吕丽莉, 等. 芍药苷对大鼠全脑缺血模型的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2518-2522.
- [10] YE S, LIU X, MAO B, et al. Paeonol enhances thrombus recanalization by inducing vascular endothelial growth factor 165 via ERK1/2 MAPK signaling pathway[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 13(6): 4853-4858.
- [11] 李雪, 王芳, 赵晓宏, 等. 丹皮酚溶解性能的测定[J]. 中医学报, 2013, 28(2): 221-223.
- [12] 王森, 朱卫丰, 欧水平, 等. 丹皮酚理化性质及体外经皮渗透性的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(2): 215-219.
- [13] 段金殿, 宿树兰, 唐于平, 等. 中药药对配伍组合的现代认识[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(5): 330-333.

(张蕾 编辑)