

砂仁挥发油抗炎活性谱效关系研究

李生茂¹, 曾滨阳², 叶强³, 敖慧^{3*}, 李鸿翔³

(1. 川北医学院药学院, 四川南充 637000; 2. 武警辽宁省总队医院, 沈阳 110034;
3. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的:研究7批不同产地砂仁挥发油气象色谱-质谱联用(GC-MS)指纹图谱与抗炎活性的关系,为揭示砂仁挥发油抗炎物质基础提供依据。**方法:**7批不同产地的砂仁分别为广西、吴川、蟠龙、春城、永宁的阳春砂,云南、缅甸的绿壳砂,采用GC-MS建立不同产地砂仁挥发油指纹图谱。取昆明种小鼠90只,随机分为9组,分别为模型组,地塞米松组(12.5 mg·kg⁻¹),广西组、吴川组、蟠龙组、春城组、永宁组、云南组、缅甸组(均为3.2 g·kg⁻¹的砂仁挥发油),每组10只,ig给予相应剂量药物,模型组给予等体积的生理盐水,每天1次,连续ig 4 d,经二甲苯造模,测定耳肿胀。数据统计分析后,采用灰色关联度分析法研究谱效关系。**结果:**建立7批不同产地砂仁挥发油GC-MS指纹图谱,确定了其中13个色谱峰为共有峰,并对各共有峰进行了化学成分鉴定;7批砂仁挥发油均有不同程度的抗炎作用,与模型组比较,广西和春城的砂仁无明显的抗炎作用,其他产地和地塞米松均有明显的抗炎作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。13个共有峰与抗炎活性均存在一定的关联度,关联度在0.857~0.734,关联度大小依次为:龙脑>芳樟醇>樟脑> α -松油醇> α -香柠烯醇>*D*-柠檬烯>乙酸龙脑酯> α -檀香醇>月桂烯>匙叶桉油烯醇> α -杜松醇>茨烯> α -蒎烯。**结论:**砂仁挥发油抗炎作用为“多成分”共同起效的结果,其中抗炎作用较好的吴川和永宁的阳春砂其龙脑、芳樟醇含量均较高,具有明显的关联度。

[关键词] 砂仁挥发油; GC-MS图谱; 抗炎活性; 谱效关系

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0133-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015090133

Correlation Analysis Between GC-MS Fingerprint of Essential Oil of Amomi Fructus and Anti-inflammatory Activity LI Sheng-mao¹, ZENG Bin-yang², YE Qiang³, AO Hui^{3*}, LI Hong-xiang³ (1. School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 2. General Hospital of Chinese People's Arm ed Police Forces of Liaoning Province, Shenyang 110034, China; 3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study the correlation between gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) fingerprint of the essential oil of Amomi Fructus and anti-inflammatory activity, and to provide a reference for revealing its efficacy material basis of anti-inflammatory. **Method:** The fingerprints of the essential oil of Amomi Fructus from different habitats (*Amomum villosum* from Guangxi, Wuchuan, Panlong, Chuncheng and Yongning; *A. villosum*, *xanthioides* Wu et Senjen from Yunnan and Myanmar) were established by GC-MS, and anti-inflammatory activity of the essential oil was observed by the ear swelling caused by dimethylbenzene in mice. The 90 mice were randomly divided into the model group, the dexamethasone group (12.5 mg·kg⁻¹), the Guangxi, Wuchuan, Panlong, Chuncheng, Yongning, Yunnan and Myanmar groups (3.2 g·kg⁻¹) of 10 mice each. The mice in the model group were intragastrically administrated with normal saline and the other mice were intragastrically administrated with the corresponding medicines once daily for 4 days. The correlation between the fingerprint and anti-inflammatory activity was analyzed by grey relational analysis. **Result:** The GC-MS fingerprint of the essential oil of Amomi Fructus was established from different habitats, and 13 common peaks were identified. Compared with model group, the essential oils from Guangxi and Chuncheng had no obvious anti-inflammatory

[收稿日期] 20140826(002)

[基金项目] 四川省中医药管理局青年中医药课题(2014K090);成都中医药大学科技发展基金项(ZRVI5201271);成都中医药大学实验技术项(13117)

[第一作者] 李生茂,博士,讲师,从事中药药效物质基础及质量标准化研究,Te1:0817-3300337,E-mail:lsm9110@163.com

[通讯作者] *敖慧,博士,高级实验师,从事中药药理与中药质量控制研究,Tel:028-61800192,E-mail:aohui2005@126.com

activity, and the others had obvious anti-inflammatory activity as compared to the dexamethasone group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The correlation between GC-MS fingerprint and the anti-inflammatory activity was from 0.857 ~ 0.734, with ranking of borneol > linalool > camphor > α -terpineol > α -bergamotenol > *D*-limonene > bomyl acetate > α -santalol > myrcene > spathulenol > α -juniper alcohol > camphene > α -pinene. **Conclusion:** The anti-inflammatory activity of the essential oil of Amomi Fructus may be the combined effect of a variety of chemical constituents. There are definite correlations between the abundant borneol, linalool from Wuchuan, Yongning and the anti-inflammatory activity.

[**Key words**] essential oil of Amomi Fructus; GC-MS; anti-inflammatory activity; spectrum-activity relationship

砂仁功能化湿开胃,温脾止泻,理气安胎^[1]。现代研究发现,挥发油是砂仁主要的药效部位,具有抗溃疡、抗炎、镇痛、止泻、抗菌等广泛的药理作用^[2]。乙酸龙脑酯是砂仁挥发油部位主要化学成分和重要的药效活性成分,具有显著的抗炎、镇痛等活性^[3],《中国药典》2010 年版亦以其含量作为砂仁质量控制的指标之一^[1]。然而众所周知,砂仁挥发油成分复杂^[4],其中的其他主要成分如樟脑、蒎烯、柠檬烯、龙脑等是否也在砂仁挥发油抗炎药效中发挥作用。同时,以单指标测定砂仁中乙酸龙脑酯的含量控制砂仁药材的质量是否合理。目前尚不清楚。基于此,本实验以砂仁挥发油重要且明确的抗炎活性为切入点,在建立其 GC-MS 图谱的基础上,采用灰色关联度分析法研究其化学信息谱与抗炎活性的关系,以期为揭示砂仁挥发油抗炎物质基础及进一步控制砂仁药材质量提供一定依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠 90 只,雄性,SPF 级,合格证号 SCXK(川)2008-11,体重 18 ~ 22 g,由成都中医药大学动物中心提供。

1.2 药物及试剂 醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 140108);7 批不同来源的砂仁药材经成都中医药大学中药资源与鉴定系陈璐讲师鉴定确认为 *A. villosum* 或 *A. villosum/xanthioides* 的干燥成熟果实,见表 1。轻油提取器,四川蜀牛玻璃仪器有限公司;正己烷、无水硫酸钠、二甲苯均为分析纯,水为超纯水。

1.3 仪器 7890A-5975C 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent Technologies 公司),HP 型毛细管柱(250 $\mu\text{m} \times 30 \text{ m}$,0.25 μm)(美国 Agilent Technologies 公司),BP211D AG 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方法与结果

2.1 砂仁挥发油抗炎活性研究

2.1.1 样品制备 将各批次砂仁药材粉碎,过 20

表 1 砂仁来源

Table1 Source of Amomi Fructus

编号	产地	品种
S1	广西	阳春砂(<i>A. villosum</i>)
S2	吴川	阳春砂(<i>A. villosum</i>)
S3	蟠龙	阳春砂(<i>A. villosum</i>)
S4	春城	阳春砂(<i>A. villosum</i>)
S5	永宁	阳春砂(<i>A. villosum</i>)
S6	云南	绿壳砂(<i>A. villosum/xanthioides</i>)
S7	缅甸	绿壳砂(<i>A. villosum/xanthioides</i>)

目筛,各称取粗粉 10 g,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 30 倍量(300 mL)水,按《中国药典》2010 年版一部挥发油测定法(附录 XD 甲法)提取挥发油,水蒸气蒸馏 5 h,收集挥发油,均为淡黄色,油状,加 3% 的阿拉伯树胶,配制成相当于生药 80 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药液备用。

2.1.2 砂仁挥发油抗炎活性实验 取小鼠 90 只,随机分为 9 组,每组 10 只,分别是模型组、阳性药组(地塞米松)和 7 个给药组。阳性药物组 *ig* 给予 12.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的地塞米松,各给药组分别 *ig* 给予 3.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (生药)的砂仁挥发油,模型组 *ig* 给予相应体积的生理盐水,每天 1 次,连续 *ig* 4 d,于末次给药后 2 h,分别用二甲苯均匀涂抹每只小鼠右耳内外两面,45 min 后,按时间顺序分别脱臼处死每组小鼠,分别用打孔器取相同部位左右耳片,电子天平称重,以右耳和左耳质量差为肿胀度,计算抑制率。结果显示,与模型组比较,7 批砂仁挥发油均有一定的抗炎作用,其中吴川、蟠龙和永宁的阳春砂,云南和缅甸的绿壳砂抗炎作用明显($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 2。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{给药组两耳质量差} / \text{模型组两耳质量差}) \times 100\%$$

2.2 砂仁挥发油 GC-MS 指纹图谱数据测定

2.2.1 样品制备 参照 2.1.1 项下方法制备砂仁

表 2 不同产地砂仁挥发油对小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of volatile oil from Amomi Fructus of different regions on ear swelling in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肿胀度/mg	抑制率/%
模型	8.83 ± 1.87	-
地塞米松	3.33 ± 1.89	62.29
S1	7.28 ± 1.79	17.55
S2	4.93 ± 2.32 ¹⁾	43.83
S3	6.85 ± 1.54 ²⁾	22.42
S4	8.30 ± 2.72	6.00
S5	4.94 ± 1.94 ¹⁾	44.05
S6	6.90 ± 2.42 ²⁾	21.86
S7	6.03 ± 2.98 ²⁾	31.71

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 不同产地砂仁挥发油 GC-MS 图谱共有峰面积值

Table 3 Volatile oil from Amomi Fructus of different regions GC-MS spectrum of common peak area

峰号	化合物	样品峰面积						
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
1	α -蒎烯	4 237 649	627 757	9 226 256	46 279 601	2 436 984	1 930 906	4 321 512
2	蒎烯	24 824 901	2 640 585	40 785 894	121 438 120	12 349 681	17 373 809	25 001 345
3	月桂烯	20 502 649	2 068 898	9 893 711	42 323 071	16 615 156	7 267 070	17 212 631
4	D-柠檬烯	71 151 917	12 435 384	37 011 413	120 180 324	79 110 661	29 584 018	53 995 459
5	芳樟醇	3 298 055	7 040 468	1 688 204	3 380 145	4 609 905	933 165	5 650 437
6	樟脑	68 470 308	187 009 879	158 364 596	259 826 701	396 088 421	146 350 199	91 482 082
7	龙脑	22 287 524	77 473 588	22 238 373	79 645 733	83 839 436	52 685 102	16 338 829
8	α -松油醇	1 043 569	2 172 569	75 6391	2 962 408	2 703 295	500 010	691 967
9	乙酸龙脑酯	84 845 7192	393 322 842	391 789 286	624 186 227	363 933 663	390 971 519	130 871 524
10	匙叶按油烯醇	2 615 036	2 120 347	360 633	1 722 477	6 587 949	1 127 391	477 344
11	α -杜松醇	3 307 703	889 527	371 681	1 236 104	3 224 978	382 462	8 532 870
12	α -檀香醇	3 425 670	2 083 488	473 609	1 410 467	2 514 145	471 928	4 162 197
13	α -香柠烯醇	3 506 554	2 219 737	369 033	1 314 375	2 506 090	376 394	601 430

2.3 灰色关联度分析 对获得的 7 批砂仁挥发油 GC-MS 指纹图谱共有峰峰面积数据与抗炎活性进行灰色关联度分析,研究两者的相关性。将不同批次的砂仁挥发油抗炎药效设为参考序列(母序列),13 个共有峰设为比较序列(子序列)。1 ~ 13 个共有峰分别用 $x_1 \sim x_{13}$ 表示。参考文献[5-6]方法和步骤。

2.3.1 求绝对差序列 经数据变换的母序列标记为 $\{Y_o(m)\}$,子序列记为 $\{Y_i(m)\}$,则绝对差序列 $\Delta_{oi}(m)$ 。

$$\Delta_{oi}(m) = |Y_o(m) - Y_i(m)| (1 \leq i \leq m)$$

2.3.2 求关联系数 关联系数反映 2 个被比较序列的靠近程度。母序列与子序列的关联系数 $L_{oi}(k)$, Δ_{\min} 和 Δ_{\max} 分别表示所有比较序列绝对差中

挥发油,加 1 mL 正己烷稀释,用无水硫酸钠除去水分,微孔滤膜过滤,GC-MS 分析。

2.2.2 气相色谱-质谱联用分析方法 GC 条件为载气为氦气,体积流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;采用程序升温,初始温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$,以 $4 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $124 \text{ }^\circ\text{C}$,以 $8 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 上升至 $196 \text{ }^\circ\text{C}$ 保持 5 min, $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 上升至 $260 \text{ }^\circ\text{C}$ 保持 5 min;分流进样,分流比 1:60;进样量 $1 \mu\text{L}$;进样口温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$ 。MS 条件:EI 电离方式;电子能量 70 eV ;离子源温度 $220 \text{ }^\circ\text{C}$;全扫描方式。

2.2.3 测定与结果 GC-MS 分析测得 7 个产地挥发油的总离子流图,确定了其中的 13 个色谱峰为共有峰,所确定的 13 个共有峰峰面积之和均占各样品总峰面积的 90% 以上,可较好的代表该样品。进一步通过 NIST08 质谱数据系统检索,并与标准图谱比较分析,鉴定了共有色谱峰所代表的成分。见表 3。

的最小值与最大值; ρ 为分辨系数,其意义是削弱最大绝对差数值太大引起的失真,提高关联系数之间的差异显著性,取值在 $0 \sim 1$,本研究选取 0.5。关联系数反映 2 个被比较序列的靠近程度。

$$L_{oi}(k) = (\Delta_{\min} + \rho\Delta_{\max}) / [\Delta_{oi}(m) + \rho\Delta_{\max}]$$

2.3.3 关联度计算 关联度按两比较序列的关联系数的均值计算。 r_{oi} 为子序列 i 与母序列 o 的关联度, N 为比较序列的数据个数。公式如下。

$$r_{oi} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N L_{oi}(k)$$

2.3.4 排关联序 将 m 个子序列对同一母序列的关联度按大小顺序排列起来,便组成关联序,记为 (x) ,它直接反映各个子序列对母序列的“贡献”的大小。据此可寻找指纹特征峰对应的化学成分与药

效间的联系。

2.3.5 谱效相关性分析 对砂仁挥发油指纹图谱中各共有峰峰面积数据与抗炎活性进行灰色关联度及关联序分析。依据相对关联度的大小,确定了各成分对抗炎作用贡献的大小顺序依次为 $x7 > x5 > x6 > x8 > x13 > x4 > x12 > x9 > x3 > x10 > x11 > x2 > x1$ 。见表 4。

表 4 不同产地砂仁挥发油 GC-MS 图谱与抗炎活性关联序
Table 4 Correlation order of volatile oil from Amomi Fructus of different regions GC-MS spectrum and anti-inflammatory activity

色谱峰	成分	关联度
x7	龙脑	0.857
x5	芳樟醇	0.852
x6	樟脑	0.848
x8	α -松油醇	0.842
x13	α -香柠烯醇	0.795
x4	<i>D</i> -柠檬烯	0.792
x12	乙酸龙脑酯	0.778
x9	α -檀香醇	0.776
x3	月桂烯	0.766
x10	匙叶桉油烯醇	0.765
x11	α -杜松醇	0.743
x2	茨烯	0.740
x1	α -蒎烯	0.734

3 讨论

阳春砂、绿壳砂和海南砂均为《中国药典》2010 年版收载砂仁品种,属于正品,其中又以阳春砂质量好,并尤以广东阳春阳产的春砂仁品质最佳,为道地药材。但本实验发现,仅就抗炎作用而言,其与砂仁的品种及道地性并无明显的相关性,即不是阳春砂的效果一定比绿壳砂好,也不是阳春产的道地阳春砂的抗炎效果比其他地区产的阳春砂的效果好。

中药是一个复杂的混合体系,药效的发挥是其含有的多种化学成分共同起效的结果,因此研究和表征中药活性物质基础的难度很大。中药的指纹图谱可较全面地反映中药所含化学成分的数量与含量,体现该样品所含化学成分种类的多少和量的大小。可以以中药指纹图谱为基础,以效应学为主要内容,应用生物信息学方法,建立中药指纹图谱与中药疗效的关系,即中药谱效关系^[7],通过对“谱”与“效”相互作用关系的研究,从而揭示中药药效物质基础。灰色关联度分析法是构建谱效关系的常用分析方法之一,其作为对模糊系统研究的有效手段,适用于系统的信息量较少,而涉及的因素多,且这些因素往往相互影响、相互作用^[8],近年来在中药谱效关系的研究中广泛运用^[9]。

本实验对 7 批砂仁挥发油进行了 GC-MS 分析,确定了其中 13 个色谱峰为共有峰(占总峰面积的 90% 以上),并明确全部共有色谱峰所代表化学成分,可较好的表达该样品所含的化学成分信息。采用灰色关联度分析方法研究了共有色谱峰与抗炎活性之间的关系,发现各共有色谱峰与砂仁挥发油抗炎活性均有不同程度的关联度,关联度在 0.857 ~ 0.734。其中龙脑、芳樟醇、樟脑和 α -松油醇与砂仁抗炎药效关联度较强,关联度在 0.842 以上,它们在砂仁挥发油抗炎药效中叶发挥了重要的作用。此外, α -香柠烯醇、*D*-柠檬烯、乙酸龙脑酯、 α -檀香醇、月桂烯、匙叶桉油烯醇、 α -杜松醇、茨烯和 α -蒎烯与砂仁抗炎活性也有一定的关联度。结果表明,砂仁挥发油抗炎活性不仅仅是其中的主要化学成分乙酸龙脑酯发挥作用,还受挥发油中其他成分的影响,是“多成分”共同起效的结果,但这些成分在砂仁抗炎的过程中究竟起了什么样的作用,还有待于进一步的研究。同时,也有必要在结合活性评价的结果,引入多个指标以更好的控制砂仁药材的质量。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:236.
- [2] 张明发,沈雅琴. 砂仁临床药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学,2013,10(1):8-12.
- [3] 赵锦,董志,朱毅,等. 海南砂仁挥发油抗炎镇痛止泻的实验研究[J]. 中成药,2009,31(7):1010-1014.
- [4] 陈璐,敖慧,叶强,等. 阳春砂仁不同部位挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):80-83.
- [5] 于萍,李克. 使用 Microsoft Excel 进行数据的灰关联分析[J]. 微型电脑应用,2011,27(3):29-33.
- [6] 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度分析[J]. 中南药学,2009,7(1):55-59.
- [7] 罗国安,王义民,曹进,等. 建立我国现代中药质量标准体系的研究[J]. 世界科学技术——中药现代化,2002,4(4):5-9.
- [8] 曾建红,莫炫永,戴平,等. 广西莪术挥发油抗肿瘤作用的谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):91-94.
- [9] 秦昆明,郑礼娟,沈保家,等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考[J]. 中国中药杂志,2013,38(1):26-30.

[责任编辑 周冰冰]