

· 药剂与炮制 ·

盐炙益智仁石油醚部位缩尿作用谱效关系分析

龚晓猛, 吴珊珊, 李梦琪, 张美, 胡麒, 胡昌江*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**通过盐炙益智仁石油醚部位的指纹图谱特征峰所代表的化学成分及其对豚鼠膀胱逼尿肌抑制作用贡献的大小,阐明盐炙益智仁的药效物质基础。**方法:**采用HPLC建立盐炙益智仁石油醚部位的指纹图谱,Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~25% B; 10~60 min, 25%~65% B; 60~75 min, 65%~100% B),柱温35℃,检测波长254 nm,进样量10 μL,流速1 mL·min⁻¹。考察盐炙益智仁石油醚部位对豚鼠离体膀胱逼尿肌活动的影响,分析盐炙益智仁缩尿药效的物质基础,利用灰色关联分析法建立谱效关系。**结果:**建立了盐炙益智仁石油醚部位的指纹图谱,相似度均>0.9;盐炙益智仁缩尿的药效是多种成分共同作用的结果,各特征峰所代表的化学成分缩尿药效贡献的大小顺序(按特征共有峰编号)为20号>9号>11号>17号>16号>13号>15号>24号>18号>23号>14号>32号>34号>22号>25号>19号>31号>27号>21号>29号>28号>30号。**结论:**构建的盐炙益智仁石油醚部位HPLC指纹图谱重复性好、稳定性高、方法简单,石油醚部位指纹图谱与其缩尿药效之间有较明显的对应关系,为盐炙益智仁的缩尿药效评价提供参考。

[关键词] 益智仁; 盐炙品; 指纹图谱; 膀胱逼尿肌; 谱效关系; 缩尿; 圆柚酮

[中图分类号] R283.1; R945; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160415.1012.020.html>

[网络出版时间] 2016-04-15 10:12

Spectrum-effect Relationship of Petroleum Ether Fraction of Salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae* Fructus on Arresting Polyuria

GONG Xiao-meng, WU Shan-shan, LI Meng-qi, ZHANG Mei, HU Qi, HU Chang-jiang*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify pharmacodynamic material basis of salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae* Fructus by investigating the contribution of chemical components from petroleum ether fraction of salt-processed products to the effect on detrusor in bladder of Guinea pig. **Method:** The fingerprint of petroleum ether fraction of salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae* Fructus was established by HPLC, the mobile phase consisted of water and acetonitrile for gradient elution. Effect of petroleum ether fraction on detrusor in bladder of Guinea pig was investigated, and its material basis was analyzed, grey relational analysis method was used to establish the

[收稿日期] 20150826(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473353,30973941)

[第一作者] 龚晓猛,在读硕士,从事中药炮制学研究,Tel:13880687572,E-mail:gongjin20080621@126.com

[通讯作者] *胡昌江,教授,博士生导师,从事中药炮制原理与质量标准方面的研究,Tel:13980980796,E-mail:hhecj@hotmail.com

relationship between spectrum and efficacy. **Result:** The fingerprint of petroleum ether fraction of salt-processed products was established with similarity > 0.9. Detrusor inhibitory effect was the result of many kinds of components, the contribution of different peaks to relieve polyuria was ranked as 20 > 9 > 11 > 17 > 16 > 13 > 15 > 24 > 18 > 23 > 14 > 32 > 34 > 22 > 25 > 19 > 31 > 27 > 21 > 29 > 28 > 30. **Conclusion:** The HPLC fingerprints is simple and repeatable. The relationship between fingerprints of petroleum ether fraction and efficacy is paralleled to some extent, and this study will lay a foundation for the further research on inhibitory of salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* for polyuria.

[**Key words**] *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; salt-processed products; fingerprint; detrusor of bladder; spectrum-effect relationship; arresting polyuria; nootkatone

益智仁主产于海南、广东等地,具有温脾止泻摄唾、暖肾固精缩尿等功效。本品辛温而燥,主归脾经,以温脾止泻、收摄涎唾力胜;盐炙后辛燥之性减弱,主归肾经,专行下焦,长于固精、缩尿(缩减泌尿量);张仲岩在《修事指南》指出:“……益智仁盐炒,止小便频数……”。前期研究表明盐炙益智仁缩尿作用的有效部位为石油醚部位,并建立了盐炙益智仁缩尿有效部位的 HPLC 指纹图谱^[1-2]。在前期研究基础上,本实验拟通过优化 HPLC 色谱条件对盐炙益智仁石油醚部位进行分段研究,采用灰关联分析法建立该部位谱效关系,探讨盐炙益智仁缩尿物质基础,为阐明益智仁盐炙的科学内涵提供实验依据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), YP30002 型电子天平(德国 Sartorius 公司), J-型恒温平滑肌槽(成都遨生电子有限公司), JH-2 型肌张力传感器(北京航天医学工程研究所), BL-420E 型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)。

10 批益智仁药材均购自成都市荷花池中药材市场,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* 的干燥成熟果实。圆柚酮对照品(上海彼艾孚实业发展有限公司,批号 YJ20120923), 聚山梨酯-80(tween-80, 成都市科龙化工试剂厂), 磷酸组胺(上海伯奥生物科技有限公司), 硅胶(200~300 目, 青岛海浪硅胶干燥剂有限公司), 水为重蒸馏水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

英国种豚鼠, 清洁级, 雄性, 体重 250~300 g, 由成都达硕生物科技有限公司提供, 合格证号 SCXK(川)2013-24。

2 方法与结果

2.1 盐炙益智仁的制备 取益智仁 100 g, 与溶解了食盐 2 g 的 40 mL 水拌匀, 闷润 30 min, 在 250 °C

锅温下投药, 利用红外测温仪控制温度, 炒炙 8 min, 即得^[3]。

2.2 盐炙益智仁石油醚部位的制备^[1] 分别取 10 批盐炙益智仁 200 g, 粉碎过 1 号筛, 加入 8 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 减压回收至无醇味, 浓缩, 得药液稠膏, 加入硅藻土拌匀, 用石油醚(60~90 °C) 索氏提取至无色。所得石油醚部位减压回收, 于水浴 60 °C 挥至无石油醚味。

2.3 供试品溶液的制备 石油醚部位上硅胶柱, 用不同比例的乙酸乙酯-石油醚 [A(1:0), B(95:5), C(90:10), D(80:20), E(50:50), F(25:75), G(0:1)] 混合液梯度洗脱, 合并流分, 减压浓缩干燥, 得 A, B, C, D, E, F, G 共 7 个石油醚部位, 分别挥干有机溶剂后称取浸膏质量, 取浸膏总量的 10%, 加甲醇-三氯甲烷(7:3) 定容至 25 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。其余浸膏分别配成 50 mg·L⁻¹ 的各部位药液, 合并相同部位的药液, 得盐炙益智仁 7 个不同部位的供试品溶液, 以供石油醚部位对豚鼠离体膀胱逼尿肌的药效试验用。

2.4 色谱条件及方法学考察^[4-5]

2.4.1 色谱条件及系统适用性试验 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相水(A)-乙腈(B) 梯度洗脱(0~10 min, 5%~25% B; 10~60 min, 25%~65% B; 60~75 min, 65%~100% B), 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL, 流速 1 mL·min⁻¹。

2.4.2 精密度考察 取 2.1 项下供试品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 采用“中药色谱指纹图谱相似度软件”(2004A 版) 计算相似度 > 0.97, 表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性考察 取同一批盐炙益智仁 6 份, 按 2.2 和 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 计算相似度 > 0.95, 表明该方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性考察 取同一供试品溶液分别在制备后 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 计算相似度 > 0.98, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5 石油醚部位指纹图谱的建立 供试品溶液按 2.4.1 项下色谱条件建立相应的 HPLC 图谱, 通过“中药色谱指纹图谱相似度软件”(2004A 版)处理, 选取中位数法分别生成盐炙益智仁 7 个不同部位的对照指纹图谱, 计算相似度。分离盐炙益智仁 A, B, C, D, E, F 和 G 部位的指纹图谱, 见图 1。结果显示石油醚部位有 34 个共有峰; A 部位有 8 个共有峰, B 部位有 9 个共有峰, C 部位有 9 个共有峰, D 部位有 12 个共有峰, E 部位有 13 个共有峰, F 部位有 13 个共有峰, G 部位有 17 个共有峰。相似度均 > 0.9, 共有峰的峰面积见表 1, 编号 24 号的色谱峰为圆柚酮^[6]。

2.6 药效试验 猛击豚鼠头部致昏, 快速取出膀胱, 用 Krebs 液漂洗干净, 置于盛有低温 Krebs 液的培养皿中。从三角区下横切, 将膀胱主体部分沿一侧面纵向切开, 沿肌纤维走向切取 2 条, 纵行肌条(长 8 mm, 宽 2 mm)。将肌条安置在盛有 (37 ± 0.5) °C 的 Krebs 液 50 mL 的平滑肌槽中, 持续通以氧气。肌条的一端固定在肌槽底部的不锈钢弯钩上, 另一端与肌张力传感器连接, 后者接生物机能实验系统记录肌条收缩时的平均张力和抑制率。肌条负荷 1 g 张力, 温育 30 min, 待肌条自发活动平稳后, 记录 2 min 正常收缩曲线^[7-9]。加入 1.0 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 氯化乙酰胆碱 (ACh) 溶液引起膀胱逼尿肌兴奋, 记录 2 min 曲线, 用 Krebs 液冲洗膀胱 3 次, 待豚鼠膀胱逼尿肌条自发活动平稳后, 记录 2 min 正

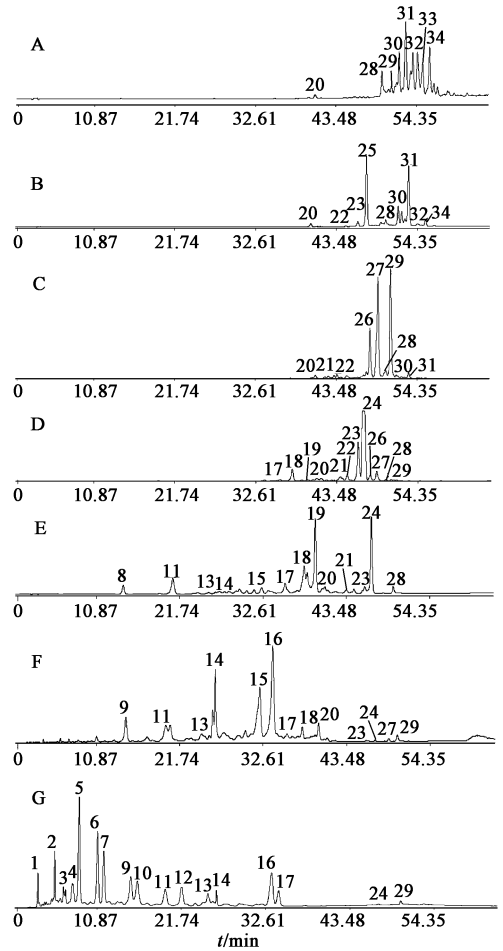


图 1 盐炙益智仁不同石油醚部位的指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of petroleum ether fractions of salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus

常收缩曲线, 分别累积给予上述 7 个部位的盐炙益智仁药液, 使终质量浓度达 6.67 × 10⁻³ g·mL⁻¹。操作同前, 完成磷酸组胺(终浓度 1.0 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)引起的膀胱逼尿肌兴奋试验。结果见表 2。

表 1 盐炙益智仁不同石油醚部位指纹谱的峰面积

Table 1 Peak areas of fingerprints of petroleum ether fractions of salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus

No.	A	B	C	D	E	F	G
1	0	0	0	0	0	0	1 036.3
2	0	0	0	0	0	0	723.7
3	0	0	0	0	0	0	1 375.6
4	0	0	0	0	0	0	1 569.8
5	0	0	0	0	0	0	5 285.3
6	0	0	0	0	0	0	10 034.6
7	0	0	0	0	0	0	6 733.1
8	0	0	0	0	1 711.7	0	0
9	0	0	0	0	0	2 139.8	10 809.4
10	0	0	0	0	0	0	12 208.9

续表 1

No.	A	B	C	D	E	F	G
11	0	0	0	0	428.4	2 845.8	10 146.9
12	0	0	0	0	0	0	11 199.1
13	0	0	0	0	332.4	838.4	5 467.3
14	0	0	0	0	615.8	7 158.5	5 297.8
15	0	0	0	0	293.6	2 526.7	0
16	0	0	0	0	0	3 540.2	16 740.9
17	0	0	0	914.6	982.5	1 301.9	7 212.6
18	0	0	0	8 252.2	474.6	1 156.5	0
19	0	0	0	527.4	2 113.7	0	0
20	245.3	66.3	665.4	1 836.3	4 940.3	1 842.7	0
21	0	0	358.5	949.3	1 290.1	0	0
22	0	293.5	579.4	1 963.9	0	0	0
23	0	453.5	0	1 004.2	116.1	161.7	0
24	0	0	0	2 994.1	334.5	280.2	1 150.8
25	0	184.2	5 746.1	0	0	0	0
26	0	0	0	4 568.6	0	0	0
27	0	0	298.4	7 020.6	0	368.1	0
28	654.1	490.6	1 381.7	1 281.5	360.1	0	0
29	241.8	0	5 732.4	534.4	0	961.1	2 287.3
30	718.2	260.9	210.1	0	0	0	0
31	1 680.5	2 478.9	134.5	0	0	0	0
32	956.3	145.1	0	0	0	0	0
33	785.3	0	0	0	0	0	0
34	1 005.1	147.7	0	0	0	0	0

表 2 盐炙益智仁对 ACh 和磷酸组胺兴奋豚鼠膀胱逼尿肌活动的影响 (n=8)

Table 2 Effect of salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on activity of detrusor (n=8)

组别	ACh		磷酸组胺	
	平均张力 ($\bar{x} \pm s$) /m·g ⁻¹	抑制率 /%	平均张力 ($\bar{x} \pm s$) /m·g ⁻¹	抑制率 /%
正常	0.98 ± 0.24	-	1.04 ± 0.17	-
A 部位	1.58 ± 0.42	20	1.42 ± 0.26	2
B 部位	1.45 ± 0.21	2	1.57 ± 0.21	7
C 部位	1.44 ± 0.27	15	1.44 ± 0.26	5
D 部位	1.30 ± 0.42	38	1.51 ± 0.38	5
E 部位	1.38 ± 0.33	27	1.67 ± 0.38	7
F 部位	1.23 ± 0.31	37	1.49 ± 0.44	14
G 部位	1.24 ± 0.30	53	1.24 ± 0.27	28

2.7 盐炙益智仁石油醚部位指纹图谱与其缩尿药效的灰色关联分析 以药效数据即抑制率指数作为

参考序列,指纹图谱共有峰的峰面积作为比较序列,采用均值化的方法变换原始数据得到均值化处理序列。经数据变换的参考序列记为 $Y_0(m)$,比较序列记为 $Y_i(m)$,计算各比较序列同参考序列的绝对值,即绝对差序列 $\Delta_{0i}(m) = |Y_0(m) - Y_i(m)|$ 。关联系数反映 2 个被比较序列的靠近程度。求参考序列 $Y_0(m)$ 与比较序列 $Y_i(m)$ 的关联系数,取分辨系数 $\rho = 0.5 (0 < \rho < 1)$,这个系数可调,目的在于调节最后结果是否明显,一般取 0.5),计算公式为 $K_{0i} = (\Delta_{0i} \min + \rho \Delta_{0i} \max) / (\Delta_{0i} + \rho \Delta_{0i} \max)$ 。关联度即各共有峰关联系数的平均值,将各关联度按大小顺序排列,即得关联序^[10-12]。关联序能直接反映比较序列对参考序列贡献的大小,从而阐明盐炙益智仁石油醚部位指纹图谱中各共有峰对其缩尿药效贡献的大小,揭示盐炙益智仁产生缩尿作用的主要药效物质。见表 3。

由表 3 可知,对豚鼠膀胱逼尿肌抑制率作用较

大的共有峰主要有 20 号 > 9 号 > 11 号 > 17 号 > 16 号 > 13 号 > 15 号 > 24 号 > 18 号 > 23 号 > 14 号 > 32 号 > 34 号 > 22 号 > 25 号 > 19 号 > 31 号 > 27 号 > 21 号 > 29 号 > 28 号 > 30 号, 且这些共有峰的关联度相差较小。24 号峰为圆柚酮。

表 3 盐炙益智仁石油醚部位指纹图谱与其抑制率的灰色关联分析
Table 3 Grey relational analysis between fingerprints and anti-polyuria effect of petroleum ether fractions of salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*

No.	关联度	No.	关联度	No.	关联度	No.	关联度
1	0.859 7	10	0.778 3	19	0.526 8	28	0.462 0
2	0.869 4	11	0.768 2	20	0.855 1	29	0.462 2
3	0.805 8	12	0.136 8	21	0.462 3	30	0.433 1
4	0.841 4	13	0.695 9	22	0.552 8	31	0.519 0
5	0.859 7	14	0.559 4	23	0.563 2	32	0.558 3
6	0.846 0	15	0.674 5	24	0.651 7	33	0.699 1
7	0.856 3	16	0.708 5	25	0.528 8	34	0.556 7
8	0.617 6	17	0.722 4	26	0.151 7		
9	0.806 2	18	0.581 9	27	0.513 7		

3 讨论

膀胱主要由平滑肌构成, 大部分形成逼尿肌, 其受交感神经和副交感神经支配, 从而阻抑或促进尿液的排放, 课题组前期实验结果提示益智仁具有类似 M 受体阻断剂的作用, 对 ACh 和磷酸组胺引起的膀胱逼尿肌兴奋有显著的拮抗作用, 故本文选择 ACh 和磷酸组胺 2 种激动剂进行试验, 研究益智仁石油醚部位不同成分缩尿功效的强弱。

经石油醚部位指纹图谱与其缩尿药效的灰色关联分析发现, 多种成分对盐炙益智仁石油醚部位与缩尿药效的关联度均较大, 推测药效成分不是单一成分, 可能是多种成分协同作用的结果。李文兵^[13]采用血清药物化学方法对盐炙益智仁石油醚有效部位的入血成分, 分离鉴定出了 11, 12-二羟基圆柚酮, 这个成分是圆柚酮的代谢产物。表明盐炙能增加圆柚酮的生物利用度。盐炙益智仁代表的化学物质还不明确, 还需要进一步研究灰色关联度较大的色谱

峰所代表的物质。课题组正在进行成分的分离实验, 有望在下一步试验中对各成分进行鉴定, 明确盐炙益智仁药效物质基础, 从而更好地反映益智仁盐炙的科学内涵。

[参考文献]

[1] 黄勤挽, 胡昌江, 李兴华, 等. 盐益智仁“缩尿”有效部位指纹图谱研究[J]. 中药与临床, 2011(1):18-20.

[2] 胡昌江, 黄勤挽, 余凌英, 等. 中药盐炙共性技术研究思路探析[J]. 中国药业, 2007, 16(13):1-2.

[3] 李兴迎, 胡昌江, 林辉, 等. 中药益智仁盐炙工艺的正交实验法研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7):1574-1576.

[4] 陀扬凌, 金玲, 张旭. 赶黄草花与茎、叶 HPLC 指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15):61-64.

[5] 耿媛媛, 胡昌江, 潘新, 等. 二神丸不同提取部位温脾止泻的谱效关系研究[J]. 中草药, 2014, 44(18):2658-2663.

[6] 石绍淮, 张晨宁, 刘爱敬, 等. 益智仁化学成分的分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17):97-100.

[7] 黄勤挽, 胡昌江, 李兴华, 等. 益智仁盐炙对豚鼠膀胱逼尿肌活动影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(19):2932-2933.

[8] 黄勤挽. 益智仁盐炙“缩尿”作用的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.

[9] 李文兵, 胡昌江, 吴珊珊, 等. 益智仁盐炙对水负荷多尿模型大鼠缩尿作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11):261-264.

[10] 孟庆刚, 王微, 李强, 等. 黄芩解热作用的谱效关系研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(6):379-383.

[11] 廖婉, 章津铭, 傅舒, 等. 醋莪术对气滞血瘀证血液流变学影响的表征及谱效相关性研究[J]. 中成药, 2013, 35(2):330-334.

[12] 刘小花, 蔺兴遥, 梁瑾, 等. 黄芪药材利尿作用的谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(5):491-495.

[13] 李文兵. 基于中医“标本兼治”研究益智仁盐炙“温肾缩尿”作用机理[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.

[责任编辑 刘德文]