

缩泉丸不同提取部位缩尿作用的谱效关系

李梦琪, 吴珊珊, 龚晓猛, 胡麟, 陈银, 胡昌江*
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**益智仁盐炙后组成缩泉丸,建立缩泉丸不同提取部位的指纹图谱,阐明各共有峰所代表的化学成分对缩尿药效的贡献大小,揭示其药效物质基础。**方法:**通过观察不同提取部位对单纯水负荷模型小鼠尿量系数的影响研究缩泉丸的缩尿药效,流动相乙腈-水梯度洗脱,检测波长 230 nm,建立缩泉丸不同提取部位的 HPLC 指纹图谱,采用灰色关联分析法建立缩泉丸的谱效关系。**结果:**不同成分(共有峰编号)对缩泉丸缩尿作用贡献大小排序为 8 号 > 9 号 > 7 号 > 11 号 > 17 号 > 5 号 > 19 号 > 29 号 > 18 号 > 10 号 > 6 号 > 12 号 > 23 号。**结论:**建立的 HPLC 指纹图谱方法简便、重复性良好,可作为缩泉丸中益智仁盐炙后物质基础改变及药效改变的依据。初步证明缩泉丸的缩尿药效物质是一些极性较小的成分,且主要集中在石油醚部位,缩尿作用是这些成分协同作用的结果。

[关键词] 缩泉丸; 指纹图谱; 尿量系数; 缩尿; 谱效关系; 益智仁

[中图分类号] R945;R284.1;R284.2;R283.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0011-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230011

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0948.056.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:48

Spectrum-effect Relationship of Different Extract Parts of Suoquanwan Constituted with Salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus on Arresting Polyuria

LI Meng-qi, WU Shan-shan, GONG Xiao-meng, HU Lin, CHEN Yin, HU Chang-jiang*
(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprints of different extract parts of Suoquanwan constituted with salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus, to clarify the contribution of fingerprints peaks in different extract parts of Suoquanwan to reduce urination, and to reveal the pharmacodynamic material basis. **Method:** The influence of different extract parts on arresting polyuria of water-load mice was observed, HPLC fingerprints of different extract parts of Suoquanwan was established, grey relational analysis was adopted to establish spectrum-effect relationship. **Result:** Contribution of different peaks to reduce urination was ranked as No. 8 > No. 9 > No. 7 > No. 11 > No. 17 > No. 5 > No. 19 > No. 29 > No. 18 > No. 10 > No. 6 > No. 12 > No. 23. **Conclusion:** This HPLC fingerprints of different extract parts is simple with good reproducibility, it can be taken as a reference for quality evaluation of Suoquanwan. The pharmacodynamic substances are the low polar components, which concentrate in petroleum ether part, the effect of reducing urination is the result of synergistic action of those components.

[Key words] Suoquanwan; fingerprint; urination coefficient; arresting polyuria; spectrum-effect relationship; Alpiniae Oxyphyllae Fructus

[收稿日期] 20151221(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473353,30973941)

[第一作者] 李梦琪,在读硕士,从事中药炮制学研究,Tel:18782903563,E-mail:lmqai@qq.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:hheccj@hotmail.com

缩泉丸始载于《妇人良方》^[1],由盐益智仁、乌药、山药组成。生益智仁主入脾、胃经,以温脾摄唾为主;盐炙后主入肾经,以温补脾肾、涩精缩尿为主,与缩泉丸功效相吻合。故将益智仁盐炙后纳入复方缩泉丸中进行研究^[2-5]。复方用药是中医用药的一个重要特征与特色,但中药成分繁多,复方更甚,给药效物质基础研究造成了极大的困难。课题组前期对益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸的缩尿药效进行比较,发现益智仁盐炙后组成的缩泉丸对单纯水负荷与腺嘌呤致大鼠肾阳虚多尿模型的缩尿作用均优于以益智仁生品组方,但该作用的物质基础尚不明确^[5]。本实验采用系统溶剂法提取缩泉丸,在药理学实验基础上,联合灰关联分析法寻找与缩尿药效关联性较大的成分,探索产生药效的有效部位,为盐炙增强缩泉丸缩尿作用的物质基础研究缩小范围,使研究更有针对性^[6],为缩泉丸的物质基础研究提供参考。

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),1810 型超纯水机(重庆摩尔水处理设备有限公司)。圆柚酮对照品(美国 Sigma 公司,批号 101601721),乌药醚内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号 11568-201204),聚山梨酯-80(tween-80,成都市科龙化工试剂厂),水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。益智、乌药、山药各 10 批均购于成都荷花池中药材市场,经成都中医药大学卢先明教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版的相关项下要求。将 10 批益智分别去壳,得生益智仁。取生益智仁加入 5% 食盐水拌匀,闷润 30 min,在 250 °C 锅温下投药,用红外测温仪控制温度,炒炙 8 min,得盐益智仁。每 100 g 益智仁加入含盐量 5% 的盐水 40 mL^[7]。山药、乌药均净制即可。

昆明种小鼠,雄性,体重 18 ~ 22 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2013-0024。

2 方法与结果

2.1 缩泉丸各提取部位的制备^[8-10] 取 10 批盐益智仁、乌药、山药粉末(过 1 号筛)各 10 g,加 8 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并滤液,减压回收乙醇至无醇味,浓缩成稠膏,加入适量硅藻土拌匀,依次用石油醚(60 ~ 90 °C),三氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇和 75% 乙醇索氏提取,分别挥干溶剂后称定质量。称取各部位浸膏质量的 20%,加甲醇-

三氯甲烷(7:3)混合液溶解并定容至 5 mL,以备建立缩泉丸不同提取部位指纹图谱研究用。剩余部分按质量比 1:1 加入 tween-80 助溶,配成 0.5 g·mL⁻¹ 的各部位药液,以备缩尿药效学实验用。

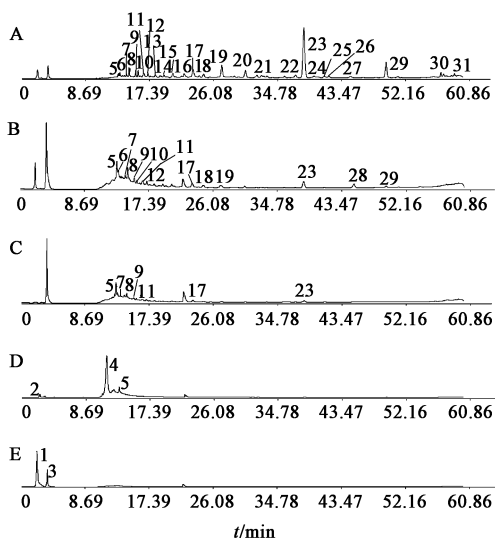
2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Inertsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% A; 5 ~ 8 min, 5% ~ 30% A; 8 ~ 10 min, 30% ~ 45% A, 10 ~ 25 min, 45% ~ 55% A; 25 ~ 40 min, 55% ~ 65% A; 40 ~ 52 min, 65% ~ 80% A; 52 ~ 54 min, 80% ~ 90% A; 54 ~ 56 min, 90% ~ 95% A; 56 ~ 60 min, 95% ~ 30% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 230 nm,进样量 10 μL。

2.2.2 方法学考察^[11-12] 按 2.1 项下方法制备供试品溶液。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)。精密吸取同一供试品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算相似度 > 0.97^[6],表明仪器精密度良好。精密吸取同一批次缩泉丸制备的 6 个供试品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算相似度 > 0.96^[12],表明该方法重复性良好。精密吸取同一供试品溶液适量,分别在 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算相似度 > 0.96^[11],表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.3 不同提取部位指纹图谱研究 按 2.2.1 项下色谱条件建立不同部位 HPLC 图谱,通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)处理,计算相似度。选取中位数法生成缩泉丸 5 个提取部位的对照指纹图谱,各部位指纹图谱相似度均 > 0.9。其中石油醚部位有 26 个共有峰,三氯甲烷部位有 14 个共有峰,乙酸乙酯部位有 7 个共有峰,正丁醇部位有 3 个共有峰,75% 乙醇部位有 2 个共有峰,见图 1。图中 20 号色谱峰为乌药醚内酯,23 号为圆柚酮。

2.3 缩尿药效试验^[3,5,13] 选用 Aston 法筛选合格的 60 只昆明种小鼠,按尿量和体重随机等分为 6 组,分别为模型组、石油醚部位组、三氯甲烷部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组和 75% 乙醇部位组,适应性喂养 3 d,按剂量 0.02 mL·g⁻¹ 分别灌胃各部位药液,第 6 d 晚上 18:00 开始禁食不禁水 18 h,第 7 d 末次给药 1 h 后,按 0.03 mL·g⁻¹ 给予水负荷,挤尽膀胱余尿,置小鼠代谢笼中,测定 6 h 内每小时的尿量,以尿量系数为度量(尿量系数 = 尿量/体重),见表 1。结果表明在 0 ~ 1 h,石油醚、乙酸乙



A. 石油醚部位; B. 三氯甲烷部位; C. 乙酸乙酯部位; D. 正丁醇部位;
E. 75% 乙醇部位

图 1 缩泉丸各提取部位 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of different extract parts of Suoquanwan

表 1 缩泉丸不同提取部位的尿量系数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Urination coefficient of different extract parts of Suoquanwan ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0~1 h	1~2 h	2~3 h	3~4 h	4~5 h	5~6 h
模型	-	27.8 ± 1.8	9.9 ± 2.5	12.8 ± 4.7	7.7 ± 1.9	6.5 ± 2.3	7.9 ± 1.4
石油醚部位	10	20.7 ± 1.6 ²⁾	8.9 ± 3.6	8.7 ± 2.5	6.3 ± 1.5	6.4 ± 2.6	7.4 ± 1.4
三氯甲烷部位	10	26.3 ± 5.2	7.7 ± 3.0	10.1 ± 3.2	7.1 ± 1.6	6.3 ± 1.9	6.5 ± 1.6
乙酸乙酯部位	10	23.2 ± 3.9 ¹⁾	9.3 ± 2.3	9.1 ± 2.3	7.6 ± 2.5	5.8 ± 3.5	6.4 ± 2.2
正丁醇部位	10	28.8 ± 4.8	9.0 ± 2.6	9.0 ± 2.2	7.0 ± 2.2	6.6 ± 1.9	6.6 ± 2.4
75% 乙醇部位	10	24.1 ± 4.3	8.2 ± 3.6	9.1 ± 4.3	7.5 ± 3.8	6.1 ± 1.9	7.7 ± 1.8

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

关联系数可衡量 2 个被比较序列的靠近程度。求得两极最大值与最小值,通过公式 $\xi_{0i} = (\Delta_{0i \min} + \rho \Delta_{0i \max}) / (\Delta_{0i} + \rho \Delta_{0i \max})$ 求得关联系数,分辨系数 $\rho = 0.5, 0 < \rho < 1$ 。关联度为各共有峰关联系数平均值,将各共有峰关联度排序即为关联序。关联序可直接反映缩泉丸各提取部位指纹图谱中共有峰对缩尿药效的贡献大小,从而揭示缩泉丸中产生缩尿药效的物质基础,见表 2。结果表明以下共有峰对缩泉丸缩尿药效贡献较大,排序为 8 号 > 9 号 > 7 号 > 11 号 > 17 号 > 5 号 > 19 号 > 29 号 > 18 号 > 10 号 > 6 号 > 12 号 > 23 号,但这些成分对药效的贡献相差不大,说明缩尿作用应是这些成分协同作用的结果,而非单一成分的作用。

3 讨论

预试验考察了 2 种流动相系统(甲醇-水、乙腈-水),3 种柱温(20, 25, 30 °C)和检测波长(210, 230, 254, 280 nm),发现在柱温 30 °C,流动相乙腈-水梯

度洗脱,检测波长 230 nm 的条件下,缩泉丸各提取部位的色谱信息更为丰富。在此条件下建立了缩泉丸不同提取部位的指纹图谱,该方法简便、重复性良好,可为缩泉丸的质量标准制定提供参考。

2.4 灰色关联分析^[14-18] 缩泉丸不同部位指纹图谱与其缩尿药效的灰色关联分析需经过原始数据的变换、求绝对差序列、求关联系数、关联度和排关联序等处理步骤。由于原始数据数列量纲不同,故需对其进行无量纲化处理——均值化变换。以 0~1 h 缩尿药效数据作为参考序列(缩尿药效仅在 0~1 h 有明显体现),指纹图谱峰面积数据作为比较序列,以均值化变换法处理原始数据得到均值化数据序列。经变换数据的参考序列记为 $X_0(m)$,比较序列记为 $X_i(m)$,计算各比较序列同参考序列的绝对差值,按 $\Delta_{0i} = |X_0(m) - X_i(m)|$ 求绝对差序列。

表 2 缩泉丸不同提取部位指纹图谱与其缩尿药效的灰关联分析

Table 2 Grey relational analysis for fingerprints and arresting polyuria of different extract parts of Suoquanwan

No.	关联度	No.	关联度	No.	关联度	No.	关联度
1	0.596	9	0.730	17	0.703	25	0.596
2	0.596	10	0.636	18	0.641	26	0.596
3	0.596	11	0.718	19	0.678	27	0.596
4	0.596	12	0.631	20	0.596	28	0.596
5	0.690	13	0.596	21	0.596	29	0.649
6	0.632	14	0.596	22	0.596	30	0.596
7	0.726	15	0.596	23	0.625	31	0.596
8	0.739	16	0.596	24	0.596		

度洗脱,检测波长 230 nm 的条件下,缩泉丸各提取部位的色谱信息更为丰富。在此条件下建立了缩泉丸不同提取部位的指纹图谱,该方法简便、重复性良好,可为缩泉丸的质量标准制定提供参考。

本课题组前期对益智仁进行了深入研究,基于“标本兼治”的理念对盐益智仁及其有效部位的缩尿作用进行了研究与验证,确定其对腺嘌呤所致肾阳虚多尿模型及单纯水负荷模型均有较好的缩尿作用,故本文选取单纯水负荷模型以达到治标的目的,获得其药效数据^[3]。前期还确定了盐炙能增强缩泉丸缩尿作用^[5],并显著改善水通道蛋白 AQP-2 mRNA 的表达^[19-20],但是缺乏对物质基础改变的研究,使缩泉丸中益智仁盐炙增强其缩尿药效的理论根据显得过于薄弱。本文通过谱效关系研究,确定了不同成分对药效的贡献大小,为盐炙增强药效的物质基础研究找到新的突破口。

本文不仅通过不同提取部位药效学对比,初步确定了石油醚部位缩尿作用最优,还通过对比各部位指纹图谱,发现对缩尿作用贡献较大的成分在石油醚部位均有分布,而极性较大的正丁醇与75%乙醇部位所含成分甚微,初步确定有效成分为极性较小成分。但实验中存在动物模型较为简单,使用的检测方法稍显单一的问题,一些极性较大成分可能未检测到,为实验结果带来了一定误差,后续可联合其他肾阳虚多尿模型造模方式,丰富检测方法,进一步深入研究。通过益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸中对药效贡献较大成分进行对比,分析盐炙使这些成分产生的变化,探讨盐炙对物质基础的影响,证明炮制对中药的重要性。

[参考文献]

[1] 邓义卫,韦国麟. 缩泉丸治疗遗尿症临床应用和实验研究概况[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(1): 129-132.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 吴珊珊,胡昌江,潘新,等. 益智仁盐炙前后对肾阳虚大鼠 AQP-2 与 AVPR-V2 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(21): 1747-1750.

[5] 帅小翠,胡昌江,王虎,等. 益智仁盐炙前后对缩泉丸缩尿作用的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(3): 69-71.

[6] 吴文博,魏晨玲,齐俊英. 对中药复方不同提取部位的相关研究之思考[J]. 医学与哲学, 2007, 28(3): 76-77.

[7] 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.

[8] 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, 2010, 1(3): 18-20.

[9] 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.

[10] 赖焕玲,吴清和,操红缨,等. 缩泉丸提取部位的尿动力学研究[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(1): 85-89.

[11] 李治建,周露,古力娜·达吾提,等. 地锦草洗脱部位指纹图谱特征与其抗真菌作用的灰关联度分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 580-584.

[12] 任艳玲. 逍遥散抗抑郁有效部位化学成分及质量控制研究[D]. 太原:山西大学, 2012.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 王薇. 黄芩指纹图谱及谱效关系研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2009.

[18] 刘旭,徐江平,程艳芹,等. 基于谱效关系表达的中药川芎药效物质筛选[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(23): 1969-1973.

[19] 吴珊珊,龚晓猛,张美,等. 缩泉丸中益智仁盐炙前后对肾阳虚大鼠肾脏功能的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 1-4.

[20] 龚晓猛,吴珊珊,李梦琪,等. 盐炙益智仁石油醚部位缩尿作用谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 1-5.

[责任编辑 刘德文]