

基于成分敲出策略辨识四制香附抗痛经的主要效应成分

郭慧玲¹, 董能峰¹, 胡律江^{1*}, 赵晓娟¹, 胡志方², 骆云霞¹, 高文军¹

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000)

[摘要] **目的:** 基于成分敲出策略对四制香附抗痛经的主要药效成分进行初步辨识, 为该药材的后续研究提供参考。**方法:** 采用硅胶柱色谱技术结合制备高效液相色谱法(HPLC)对四制香附石油醚部位中具有抗痛经作用的活性成分 α -香附酮(A), 香附烯酮(B)和 sugeonol(C)分别按照敲出 A, B, C, AB, AC, BC, ABC 的方法不断敲出, 从而得到各目标敲出成分 A+, B+, C+, AB+, AC+, BC+, ABC+ 及其相应的阴性样品 A-, B-, C-, AB-, AC-, BC-, ABC-, 利用 HPLC 对各目标敲出成分及其阴性样品进行检测, 通过小鼠离体子宫平滑肌收缩试验, 探究各敲出目标成分及其对应阴性样品、石油醚部位对小鼠离体子宫平滑肌的影响。**结果:** α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 这 3 种成分分别组合敲出的目标成分的抗痛经作用比单独敲出的目标成分强; 与石油醚部位比较, 阴性样品 A-, B-, C- 抗痛经作用明显下降; 目标成分 AB+ 的抗痛经作用强于敲出目标成分后的阴性样品 AB-; 阴性样品 ABC- 仍具有抗痛经作用; 各敲出目标成分与其阴性样品的平均抑制率之和均比石油醚部位的平均抑制率大。**结论:** 在中药整体水平上, 证明 α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 这 3 种成分都是香附抗痛经作用的活性成分, 并且三者之间可能存在着协同作用, 其中 α -香附酮与香附烯酮是香附抗痛经作用的主要药效物质, 除了目标成分 α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 外, 香附中还存在着其他的抗痛经活性成分, 各敲出目标成分与其阴性样品(其他成分的混合物)之间均可能存在着拮抗作用。

[关键词] 四制香附; 抗痛经; α -香附酮; 香附烯酮; sugeonol; 成分敲出/敲入

[中图分类号] R945; R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0007-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100007

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170307.1609.006.html>

[网络出版时间] 2017-03-07 16:09

Recognition of Main Anti-dysmenorrhea Effect Components in Cyperi Rhizoma Based on Constituents Knock-out Strategy

GUO Hui-ling¹, DONG Neng-feng¹, HU Lyu-jiang^{1*}, ZHAO Xiao-juan¹,
HU Zhi-fang², LUO Yun-xia¹, GAO Wen-jun¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;
2. Jiangxi College of TCM, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** Based on constituents knock-out strategy, the preliminary recognition of main anti-dysmenorrhea effect components in Cyperi Rhizoma with Jianchangbang processing method was investigated. **Method:** Silica gel column chromatography and preparative HPLC were used, the main active ingredients of anti-dysmenorrhea [α -cyperone (A), cyperotundone (B) and sugeonol (C)] in the petroleum ether part of Cyperi Rhizoma were knocked out, according to the method knocked out the component of A, B, C, AB, AC, BC, ABC in sequence, thus got the target components of A+, B+, C+, AB+, AC+, BC+, ABC+ and its corresponding negative samples of A-, B-, C-, AB-, AC-, BC-, ABC-. The target compositions and

[收稿日期] 20161208(027)

[基金项目] 江西省科技厅项目(20151BAB215035, 20151BAB205073, 20161BBG70072); 江西省高校落地计划产学研合作项目(KJLD14057); 江西省卫计委中医药科研重点项目(2016Z01); 江西中医药大学研究生创新基金项目(JZYC16S37)

[第一作者] 郭慧玲, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新技术研究, Tel:0791-87118645, E-mail: ghl6262@126.com

[通讯作者] * 胡律江, 博士, 讲师, 从事中药制剂新技术研究, Tel:0791-86360223, E-mail: 380085581@qq.com

corresponding negative samples were detected by HPLC, through the test of uterine smooth muscle contraction from isolated mouse uterus, to explore influence of various target compositions and corresponding negative sample, petroleum ether on the isolated mouse uterine smooth muscle. **Result:** Combination of α -cyperone, cyperotundone and sugeonol on the goal of the composition of anti-dysmenorrhea effect was better than separate on the goal of composition; compared with petroleum ether part, anti-dysmenorrhea effect of the negative samples A -, B -, C - decreased obviously; the anti-dysmenorrhea effect of AB + was significantly better than the knocked-out negative sample AB -; the knocked-out negative sample ABC - still remained a certain of anti-dysmenorrhea effect; the summary of average inhibiting rate in each target components and corresponding negative samples were more than in petroleum ether part. **Conclusion:** Cyperotundone, α -cyperone and sugeonol are anti-dysmenorrhea effect components in Cyperi Rhizoma based on the whole level of traditional Chinese medicine, and there is a synergy relationship among them, but there are other components about anti-dysmenorrhea effect in Cyperi Rhizoma except these three components. There may be an antagonistic effect between target components and corresponding negative samples (mixture of other components).

[**Key words**] Cyperi Rhizoma with Jianchangbang processing method; anti-dysmenorrhea; α -cyperone; cyperotundone; sugeonol; constituents knock-out/knock-in

香附是中医常用的妇科良药,《本草纲目》称香附为“气病之总司,女科之主帅”,临床多以炮制品入药,“建昌帮”四制香附采用“酒、醋、盐水、姜汁”4种辅料,既引药入肾,又入血分通行经脉,独特的炮制工艺使药效得到了最大限度的发挥。前期研究发现四制香附的石油醚部位具有显著的抗痛经作用^[1-2],并且证明从石油醚部位中分离得到的3个化学成分(α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol)是四制香附抗痛经的活性成分^[3-4],但对于除了这3个化学成分之外的其他化学成分是否具有抗痛经作用,目前还缺乏相关研究。中药质量控制是关乎中药现代化发展的重大课题,而中药药效物质辨识则是支撑中药质量控制的重要基石^[5-6]。为了探寻中药药效物质筛选与质量控制标准研究的新突破,肖小河等^[7]借鉴基因诊断治疗策略,提出“基于目标成分敲除/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式”的研究设想。本实验应用该成分敲出/敲入策略^[7],通过硅胶柱色谱技术结合制备高效液相色谱法对四制香附石油醚部位中 α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 分次不断的敲出,获得目标成分并收集其相应的阴性样品,通过小鼠离体子宫痛经模型对各目标敲出成分及其相应阴性样品的抗痛经作用进行评价,在中药整体水平上进一步研究四制香附抗痛经作用的关键药效物质,并探讨各成分之间的相互作用。

1 材料

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安), PowerLab 型生物信号采集系统(美国 AD 公司), AB204-N 型精密分析天平(瑞士梅特勒-托利多公

司),ZN1-1W 型电热套(巩义市予华仪器有限公司),FW 177 型中草药万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

香附购自江西药都樟树中药饮片有限公司,产地江西,批号 11100105,经江西中医药大学大学生药教研室邓可众教授鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* 的根茎;己烯雌酚(广州市汉普医药有限公司,批号 20110601),缩宫素(上海禾丰制药有限公司,批号 09151105), α -香附酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110748-201513,纯度 $\geq 98\%$),香附烯酮和 sugeonol 对照品(自制,纯度分别为 $> 98\%$, $> 90\%$),米醋(江苏恒顺醋业股份有限公司,批号 20130117,总酸 $\geq 0.09 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),黄酒(绍兴东江酒业有限公司,酒精度 $(10.0 \pm 1.0)\%$,批号 20130210),硅胶 G(200 ~ 300 目,青岛海洋化工厂),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

雌性(未孕)昆明种清洁级小鼠,体重 18 ~ 22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2011-0003,于温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和湿度 $(56 \pm 10)\%$ 的动物房内饲养,每天接受 12 h 的光照与自由饮食,按江西中医药大学实验动物伦理委员会的规定进行操作,符合实验动物福利伦理审查指南。

2 方法

2.1 目标成分及其阴性样品的制备 取香附药材按文献[8-9]的方法炮制为四制香附。取四制香附约 2.90 g,加 8 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次,每次

2 h, 滤过, 合并滤液, 回收溶剂, 得醇提物浸膏 343.16 g。浸膏加水分散, 用石油醚萃取, 萃取液减压浓缩, 得石油醚部位 81.56 g, 备用。称取石油醚部位约 2.0 g, 过硅胶柱色谱, 分别用石油醚, 石油醚-乙酸乙酯(100:1, 80:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 2:1, 1:1), 乙酸乙酯, 乙酸乙酯-乙醇(1:1), 乙醇等不同溶剂进行洗脱, 每个溶剂洗脱 5 个柱体积。分别以香附烯酮, α -香附酮与 *sugeonol* 对照品采用薄层色谱跟踪检测, 并对目标敲出成分出现与消失附近的馏分利用 HPLC 检测来进行验证。将其中含有目标敲出成分的所有馏分分别合并, 再用半制备 HPLC 进行纯化, 纯化的样品旋转蒸发至干, 用无水乙醇定容于 100 mL 量瓶中, 得敲出的目标成分; 将其他所有馏分及半制备 HPLC 收集的除目标成分所剩下的样品全部合并在一起, 旋转蒸发至干后用无水乙醇定容于 100 mL 量瓶中, 得敲出了目标成分后的阴性样品。按上述方法对石油醚部位中 3 个具有抗痛经作用的活性成分 α -香附酮(A), 香附烯酮(B)和 *sugeonol*(C)分别按照敲出 A, B, C, AB, AC, BC, ABC 的方法不断敲出, 得各目标敲出成分 A+, B+, C+, AB+, AC+, BC+, ABC+ 及其相应的阴性样品 A-, B-, C-, AB-, AC-, BC-, ABC-。

2.2 目标成分及其阴性样品的检测 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μ m), 流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min, 30%~70% A; 10~35 min, 70%~100% A), 检测波长 250 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C。

2.3 抗痛经作用评价

2.3.1 供试品溶液的配制 将 2.1 项下所得各目标敲出成分及其阴性样品溶液用无水乙醇稀释成 491.4 g·L⁻¹(以四制香附生药计)的溶液, 其中各敲出目标成分与其阴性样品溶液等体积, 并设置同质量浓度的石油醚部位组及无水乙醇对照组。

2.3.2 小鼠离体子宫平滑肌收缩试验^[10] 取未孕雌性小鼠, 于实验前连续 4 d 用己烯雌酚灌胃, 给药剂量 0.01 mg·g⁻¹·d⁻¹, 以同步化子宫并增加子宫的敏感性。于第 5 天将小鼠处死并取出子宫, 置于 Loke's 液(NaCl 9.2 g, KCl 0.42 g, CaCl₂ 0.24 g, NaHCO₃ 0.15 g, 葡萄糖 1.0 g, 溶于 1 L 水中, pH 7.3)中清洗, 从子宫颈端剪开, 子宫颈端固定于浴槽内固定器底部小钩上, 卵巢端连接在张力换能器上。置于含 Loke's 液 10 mL 的恒温(37 ± 0.1) $^{\circ}$ C 浴槽中, 通入 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体。通过调节

螺母加 2 g 的负荷, 平衡持续 40 min, 每 10 min 换营养液 1 次, 待子宫收缩稳定, 自发节律恢复后, 加入 3.5 U·L⁻¹ 缩宫素激动, 记录 15 min, 加入各供试品溶液, 设对照组和样品组。记录给药后小鼠子宫肌张力的变化, 观察各供试品溶液对缩宫素引起小鼠子宫痉挛性收缩的对抗作用, 记录 10 min, 用 Loke's 液冲洗 3 次, 进行下一次试验。

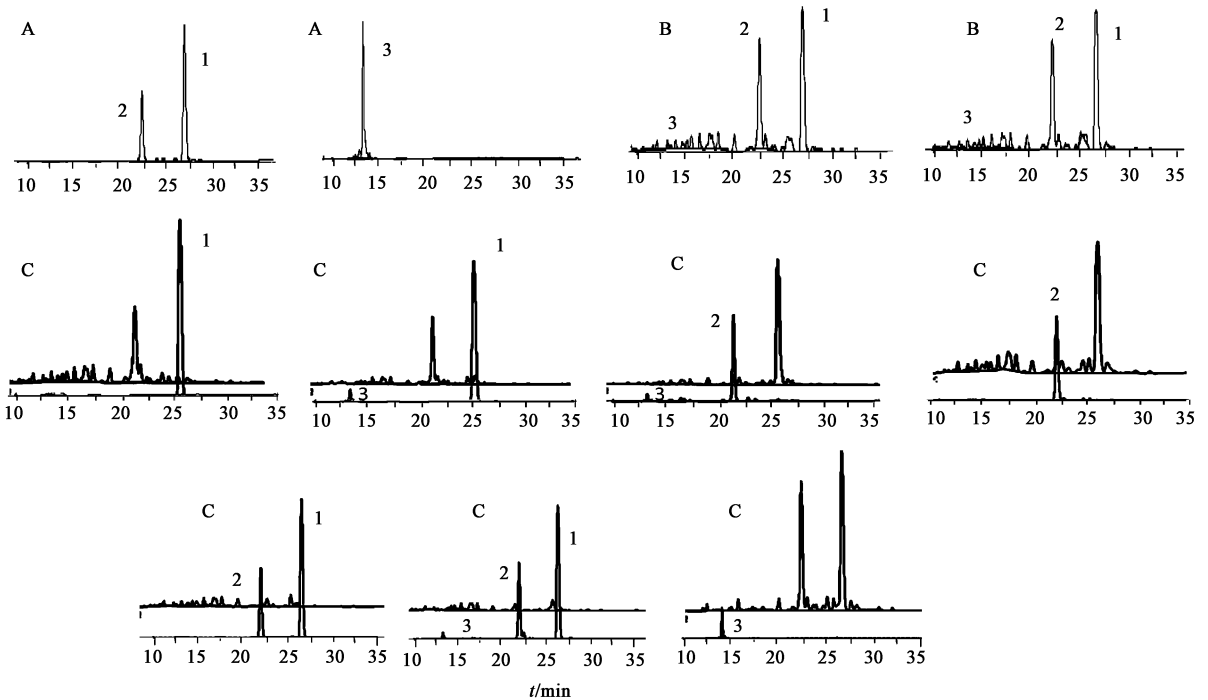
2.3.3 指标测试 在恒温平滑肌槽中温育肌条, 待子宫收缩稳定后, 加入 2.3.1 项下配制的各敲出目标成分及其阴性样品溶液、石油醚部位溶液、无水乙醇对照溶液 25 μ L, 统计各供试品溶液给药前 15 min 和给药后 10 min 子宫收缩的肌张力, 计算各供试品溶液的抑制率。试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 多组数据差异性检验采用单因素方差分析, 组间均数两两比较应用 LSD 检验。

3 结果

3.1 目标成分及其阴性样品的确认 将香附烯酮与 α -香附酮的混合对照品溶液, *sugeonol* 对照品溶液, 石油醚部位溶液, 过硅胶柱后的石油醚部位溶液, 各目标敲出成分及其阴性样品分别按 2.2 项下色谱条件进行 HPLC 检测, 见图 1。结果发现各目标成分均能被较好地敲出, 阴性样品中几乎不含有该目标成分, 说明敲出效率较高, 分离效果较好, 可采用此方法敲出香附中目标成分。

3.2 对离体子宫肌收缩的影响 目标敲出成分、阴性样品及石油醚部位对离体子宫肌收缩的影响见表 1 和图 2。由表 1 可知, 与无水乙醇对照组比较, 目标敲出成分 *sugeonol* 对离体子宫平滑肌的收缩有显著抑制作用($P < 0.05$), 其他目标成分对离体子宫平滑肌的收缩有极显著抑制作用($P < 0.01$), 抑制作用的大小顺序为 ABC+ > AB+ > AC+ > BC+ > A+ > B+ > C+, 其中 α -香附酮、香附烯酮的抑制作用明显比 *sugeonol* 强, 同时将这 3 种成分分别组合敲出的目标成分的抑制作用比单独敲出的目标成分强, 说明这 3 种成分之间可能存在着协同作用。

与石油醚部位比较, 敲出了 α -香附酮、香附烯酮和 *sugeonol* 后的阴性样品 A-, B-, C- 对小鼠离体子宫平滑肌收缩抑制作用明显下降, 在整体水平上证明这 3 种成分都是香附抗痛经的活性成分; 敲出的目标成分 A+, B+, C+ 对小鼠离体子宫平滑肌收缩抑制作用比与对应阴性样品 A-, B-, C- 弱, AC+, BC+ 与其对应的阴性样品 AC-, BC- 比较则无统计学差异, AB+ 对小鼠离体子宫平滑肌收



A. 对照品; B. 石油醚部位与过硅胶柱后的石油醚部位溶液; C. 各敲出目标成分及其阴性样品; 1. α -香附酮; 2. 香附烯酮; 3. saffronol

图 1 各对照品及供试品的 HPLC

Fig. 1 HPLC of reference substances and samples

表 1 各供试品对缩宫素引起的离子子宫肌收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of samples on contraction of oxytocin-induced isolated mice uterine muscle ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg	平均抑制率/%	组别	剂量/mg	平均抑制率/%
无水乙醇对照	-	17.82 ± 4.06	ABC+	-	54.59 ± 8.14
石油醚部位	12.3	78.96 ± 11.65	A-	12.3	54.87 ± 4.90
A+	12.3	38.53 ± 6.45	B-	12.3	53.59 ± 5.60
B+	12.3	36.20 ± 5.88	C-	12.3	65.11 ± 10.94
C+	12.3	26.92 ± 3.98	AB-	12.3	42.99 ± 4.52
AB+	12.3	51.72 ± 5.78	AC-	12.3	46.79 ± 7.33
AC+	12.3	45.19 ± 5.59	BC-	12.3	51.97 ± 17.91
BC+	12.3	44.04 ± 4.04	ABC-	12.3	40.64 ± 7.61

缩抑制作用强于敲出目标成分后的阴性样品 AB - ($P < 0.05$), 说明 α -香附酮与香附烯酮是香附抗痛经的主要有效成分; 将 α -香附酮、香附烯酮和 saffronol 全被敲出后的阴性样品 ABC - 对小鼠离体子宫平滑肌收缩仍具有抑制作用, 说明除了目标成分 α -香附酮、香附烯酮和 saffronol 外, 香附中还存在着其他的抗痛经活性成分。由图 2 可知, 各敲出目标成分与其阴性样品的平均抑制率之和均比石油醚部位的平均抑制率大, 说明各敲出目标成分与其阴性样品 (其他成分的混合物) 之间均可能存在着拮抗作用。

4 讨论

基于成分敲出策略的关键是采用合适的分离技

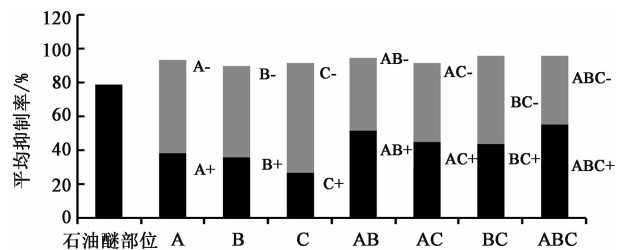


图 2 各目标敲出成分及其阴性样品对小鼠离体子宫肌收缩的抑制率

Fig. 2 Inhibition rates of target components and their negative samples on contraction of isolated mice uterine muscle

术, 尽可能无破坏、无残留地快速富集目标成分, 保持目标成分阴性样品相对于中药整体的完整性^[7],

目前已应用的分离方法主要有薄层色谱法(TLC),如孔维军等^[11-13]利用 TLC 对中药人工牛黄、黄连、姜黄中的目标成分进行敲出,并收集阴性样品,主要用于抗菌实验和细胞实验。但是大多数中药成分都较为复杂,药效评价需要较大量的样品才能够进行,TLC 难以完成目标成分的敲出与分离。本实验以香附抗痛经有效部位(石油醚部位)等效于香附整体为研究对象,使得目标成分的分离更加容易,采用硅胶柱色谱技术结合制备 HPLC 对香附石油醚部位中的活性成分进行分离,为了确保目标成分阴性样品的完整性,在使用硅胶柱色谱进行分离时尽可能采用较多不同比例的溶剂进行洗脱,并对等量的石油醚部位和过硅胶柱后的石油醚部位溶液的 HPLC 进行比较,发现其主要化学成分无明显变化,见图 1。说明样品经硅胶柱吸附后,损耗较少,本实验设置的方法可行。

本文应用成分“敲出/敲入”模式,对香附中抗痛经活性成分 α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 分次不断的进行敲出,以香附抗痛经作用有效部位石油醚部位作为参照,研究各活性成分对于中药整体的贡献。结果说明 α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 这 3 种成分之间可能存在着协同作用;且 α -香附酮与香附烯酮是香附抗痛经作用的主要药效物质;除了目标成分 α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 外,香附中还存在着其他的抗痛经活性成分;各敲出目标成分与其阴性样品(其他成分的混合物)之间均可能存在着拮抗作用。基于成分“敲出/敲入”模式始终将目标成分的药效作用与中药整体进行等效性比较,能够较好地体现出中医药的整体观、系统观。本文应用成分敲出的思路,对香附中的抗痛经活性成分进行敲出,在中药整体水平上,通过小鼠离体子宫痛经模型对各敲出成分及其阴性样品进行药效评价,初步阐释了香附各成分之间的相互作用关系,并辨识了抗痛经作用的主要药效物质,为香附质量标准

的制定和后续研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 胡律江,郭慧玲,胡志方,等. 建昌帮四制香附对小鼠痛经模型的影响[J]. 江西中医药,2011,42(12):66-67.
- [2] 郭慧玲,许茜茜,胡志方,等. 四制香附对大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响及作用机制研究[J]. 江西中医药大学学报,2014,26(5):76-78.
- [3] 胡律江,郭慧玲,曾辉,等. 基于 BP-ANN 模型的香附效应成分筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):27-30.
- [4] 胡律江,许茜茜,赵晓娟,等. 混料均匀设计优化四制香附活性成分配伍[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):1-3.
- [5] 肖小河,肖培根,王永炎. 中药科学研究的几个关键问题[J]. 中国中药杂志,2009,34(2):119-123.
- [6] 肖小河,金城,鄢丹,等. 中药大质量观及实践[J]. 中草药,2010,41(4):505-508.
- [7] 肖小河,鄢丹,袁海龙,等. 基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建[J]. 中草药,2009,40(9):1345-1348.
- [8] 梅旭辉. 实用中药炮制指南[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2005:134-135.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:258-259.
- [10] 华永庆,段金殿,王言才,等. 小鼠离体子宫收缩模型定量药理学研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(11):1527-1530.
- [11] 孔维军. 基于成分敲出/敲入的中药(牛黄)药效物质辨识和质量控制模式的初步研究[D]. 成都:成都中医药大学,2011.
- [12] 李俊贤. 基于成分敲出/敲入的中药(黄连)药效物质辨识和质量控制模式的研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2013.
- [13] 何静. 基于目标成分“敲出/敲入”质量控制模式的中药姜黄抗氧化药效物质辨识[D]. 昆明:昆明理工大学,2011.

[责任编辑 刘德文]