

桃红四物汤干预痛经模型小鼠有效部位的谱效关系研究

李鹏^{1,2}, 李祥^{1,2*}, 陈建伟^{1,2}, 武露凌³

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046;
3. 江苏省体育科学研究所, 南京 210014)

[摘要] 目的: 分析桃红四物汤抑制小鼠痛经有效部位的谱效关系, 以阐明相关的物质基础。方法: 采用己烯雌酚结合缩宫素致小鼠痛经模型, 对桃红四物汤及其单味药石油醚部位进行筛选; 并结合 GC-MS 法对其分析, 运用数理统计方法将药理数据与气相色谱峰相对面积相关联。结果: 桃红四物汤的石油醚部位有显著的调经止痛作用。桃红四物汤亲脂性化学成分主要为脂肪酸类成分。综合回归分析与相关分析结果表明: 23 号峰即亚油酸在延长扭体潜伏期和减少扭体次数方面起主要作用, 其次 24 号峰(十八碳烯酸), 45 号峰(花生酸)和 61 号峰(二十七烷)对镇痛效果有一定的协同作用。结论: 本方法结合药效筛选和化学分析, 运用相应的数理统计, 可以较客观的分析评价化学物质与效应之间的关系。

[关键词] 桃红四物汤; 痛经; 气相色谱-质谱; 谱效相关

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0144-06

Spectrum-effect Relationship of Active Components from Taohong Siwutang tang in Dysmenorrheal Model Mice

LI Peng^{1,2}, LI Xiang^{1,2*}, CHEN Jian-wei^{1,2}, WU Lu-ling³

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China; 3. Sports Science Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China)

[Abstract] Objective: To study the spectrum-effect relationship for active Components from Taohong Siwutang(THSWD) in dysmenorrheal model mice. **Method:** The effects of different extracted parts of THSWD were investigated in dysmenorrheal mice mode. The corresponding parts from THSWD and its constituent herbs were chemically analyzed using GC-MS and bioassays were carried out using dysmenorrheal mice mode *in vivo*. Regression and correlation analysis was made to discern the relationship between each peak and the pharmacologic data. **Result:** The petroleum ether extraction of THSWD is the active component. Unsaturated fatty acids are the essential components of THSWD. The linoleic acid as the major constituent is also significantly correlated with latency period and the frequency of writhing reaction. The 9-octadecenoic acid, eicosanoic acid and heptacosane have a certain degree of synergy on the analgesic effect. **Conclusion:** The data suggest that the methods are helpful for screening bio-active components from complex mixtures, such as the extracts of TCM.

[Key words] Taohong Siwutang; dysmenorrhea; GC-MS analysis; spectrum-effect relationship

[收稿日期] 2009-12-25

[基金项目] 江苏省方剂研究重点实验室开放课题(022021014004); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(06K. JA. 36022)

[通讯作者] * 李祥, 教授, 博士生导师, E-mail: Lixiang_8182@163.com, Tel: 13913925677

桃红四物汤出自清代吴谦等所著的《医宗金鉴》“妇科心法要诀·调经门”, 由桃仁、红花、当归、赤芍、生地黄、川芎组成, 全方活血调经, 主治血瘀所致的月经不调、痛经、闭经、崩漏以及眼底出血之暴盲者, 是活血化瘀的代表方之一, 被医家推崇为“妇科第一方”、“调经要方”, 为历代医家治疗妇科疾病

的首选良方。

汤剂是一个内涵丰富的复杂化学体系,既包含了水溶性物质,又由于各类成分相互作用所产生的助溶增溶等作用,使亲脂性成分在汤剂中的溶解度大大增加,富含脂溶性成分的组方汤剂实则为油水复合制剂。桃红四物汤组方有富含亲脂性成分的桃仁、当归、川芎,经过煎煮,其汤剂实为油水复合制剂。

前期实验结果表明桃红四物汤石油醚部位在整方及其各提取部位药效筛选中抑制痛经有显著效果^[1]。本实验采用气相色谱-质谱联用技术对桃红四物汤及其组方药材中石油醚部位进行分析鉴定,以痛经模型小鼠试验评价其生物效应,并采用多元回归分析和相关分析方法分析了化学成分与生物效应的相关性,以阐明桃红四物汤石油醚部位对痛经模型小鼠干预的相关药效物质基础。

1 材料

1.1 药物与试剂 桃仁,山东产,批号 090111;红花,新疆产,批号 090206;当归,甘肃产,批号 090101;生地黄,河南产,批号 090208;川芎,四川产,批号 090210;赤芍,内蒙产,批号 090208。药材均购于安徽丰厚铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定,符合《中国药典》(2005 年版)项下标准;己烯雌酚片(上海信宜康捷药业有限公司,批号 071001);缩宫素注射液(上海禾丰制药有限公司,批号 080206);正己烷、乙醚、甲醇、氢氧化钾等化学试剂均为分析纯。

1.2 动物 清洁级 ICR 小鼠,雌性,体重 18 ~22 g,扬州大学比较医学中心,许可证号 SCXK(苏)2007-0001。

1.3 仪器 气相色谱-质谱联用仪 HP6890 Series GC System, 5973 Mass Selective Detector, HP7683 自动进样器(Palo Alto, CA, USA), HP 化学工作站数据微处理系统。

2 方法

2.1 样品制备 依照桃红四物汤组方比例,取药材 510 g,水提后,药渣用 95% 乙醇回流提取 3 次,提取液合并,浓缩至无醇味。浓缩液用石油醚反复萃取($n=8$),减压浓缩,得石油醚部位。组方各单味药均按比例以上述程序制得石油醚部位。取复方及各单味药石油醚部位 50 mg,置 10 mL 具塞试管中,加入 1 mL 正己烷-乙醚(2:1)混合液,5 mL 甲醇,0.8 mol·L⁻¹ KOH 溶液 1 mL,摇匀,静置 5 min,加蒸馏水

置刻度,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,进行 GC-MS 分析。

2.2 催产素所致痛经模型的建立^[2-3] 将小鼠随机分组,每组 10 只。连续 12 d 于上午 8 时 ig 己烯雌酚(2 mg·kg⁻¹),并于第 10 天开始连续 3 d 于下午 12 时起,给药组 ig 受试药 10 mL·kg⁻¹,模型对照组给予生理盐水 10 mL·kg⁻¹,于末次给药后 1 h,ip 催产素 20 u·kg⁻¹,观察各组动物扭体反应潜伏期及 30 min 内扭体次数。若 30 min 内不出现扭体反应,潜伏期计为 30 min。

2.3 分组及给药方案 由前期试验筛选出的镇痛有效部位(即石油醚部位)为目标部位,组别依次设为模型组、空白溶剂组、复方组(A)、桃仁组(B)、红花组(C)、地黄组(D)、当归组(E)、川芎组(F)、赤芍组(G)。空白溶剂为吐温 80 和水以 1:19 配置而成。桃红四物汤成人日用剂量为 51 g 生药,各提取部位组剂量均折算成生药量。本试验以临床等效剂量的 4 倍量给药。

2.4 GC-MS 分析条件 色谱条件:色谱柱:HP-5 柱,200 μm×17 m,0.11 μm;进样口温度:280 ;程序升温:初始柱温 180 ,以 4 ·min⁻¹升温至 280 ,保持 10 min;进样量:1 μL;分流进样,流速:1 mL·min⁻¹;分流比:10:1,载气:He(纯度>99.99%)。质谱条件:电子轰击(EI)离子源,离子源温度 230 ;四极杆温度:150 ;接口温度:290 ;质量扫描范围 m/z 50 ~550。

2.5 统计学方法 各组药效数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间相关指标采用 t 检验。利用 SPSS for windows 11.5 多元线性回归分析和双变量相关分析方法处理各气相色谱峰与药效作用关系。

3 结果

3.1 复方及各单味药的目标部位对痛经模型小鼠

表 1 复方及各单味药对应的目标部位对痛经模型

小鼠干预作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·mL ⁻¹	潜伏期 /min	扭体次数	抑制率/%
模型	-	5.56 ±1.88	29.1 ±16.2	-
空白溶剂	-	5.65 ±2.16	26.0 ±16.5	-
A	30	12.40 ±9.94 ¹⁾	6.1 ±5.7 ²⁾	76.54
B	5.29	10.25 ±7.54 ¹⁾	9.5 ±6.5 ²⁾	63.46
C	3.53	5.30 ±3.16	21.6 ±12.2	16.92
D	7.06	7.90 ±4.07	16.7 ±10.3	35.77
E	3.53	15.60 ±10.49 ²⁾	4.4 ±5.4 ²⁾	84.88
F	5.29	12.90 ±7.53 ²⁾	5.8 ±5.3 ²⁾	77.69
G	5.29	10.43 ±6.39 ¹⁾	12.4 ±9.1 ¹⁾	52.31

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

的干预作用 结果表明, 复方、桃仁、当归、川芎和赤芍的石油醚部位对痛经模型小鼠有显著的镇痛作用和延长疼痛潜伏期的作用(表 1)。

3.2 GC-MS 分析结果 桃红四物汤石油醚部位共分离出 52 个峰, 通过计算机质谱库检索并与标准图谱对照, 定性鉴别出 39 个化合物, 按照面积归一化法计算, 已鉴定成分的相对百分含量占总量的 94.3%; 相同条件下, 桃仁分离出 23 个峰, 定性鉴别

出 15 个化合物, 已鉴定成分占 89%; 红花分离出 73 个峰, 定性鉴别出 33 个化合物, 已鉴定成分占 63.9%; 生地黄分离出 73 个峰, 定性鉴别出 43 个化合物, 已鉴定成分占 91.3%; 当归分离出 38 个峰, 定性鉴别出 18 个化合物, 已鉴定成分占 81.1%; 川芎分离出 35 个峰, 定性鉴别出 20 个化合物, 已鉴定成分占 91.3%; 赤芍分离出 67 个峰, 定性鉴别出 34 个化合物, 已鉴定成分占 70.4%。具体数据见表 2。

表 2 GC/MS 测定桃红四物汤及组方药材石油醚部位的化学成分

No.	t_R / time	化合物	相对含量 / %						
			复方	桃仁	红花	地黄	当归	川芎	赤芍
1	4.625	肉豆蔻酸甲酯	0.234	-	0.406	0.329	-	-	-
2	4.631	12-甲基-十三烷酸甲酯	-	-	-	-	-	-	0.328
3	5.665	1-甲基-4-(2-丙烯基)-苯	M	-	1.453	-	-	-	-
4	5.739	十五烷酸甲酯	0.570	-	-	1.116	1.167	0.653	0.440
5	6.025	6, 10, 14-三甲基-2-十五烷酮	-	-	0.346	-	-	-	-
6	6.443	邻苯二甲酸二异丁酯	-	-	-	0.837	M	-	0.703
7	6.460	环十六烷	0.132	-	-	-	-	0.860	-
8	6.757	(Z)-7-十六碳烯酸甲酯	-	-	0.283	-	-	-	-
9	6.820	(Z)-9-十六碳烯酸甲酯	0.352	0.554	-	0.654	-	-	0.345
10	7.111	十六烷酸甲酯	11.600	7.677	M	13.552	13.158	15.569	-
11	7.203	2-甲基菲	-	-	-	0.300	-	-	-
12	7.620	正十六烷酸	-	-	0.150	-	-	-	-
13	7.626	1-甲基蒽	-	-	-	0.523	-	-	-
14	7.768	邻苯甲二酸二丁酯	-	-	0.378	1.211	0.428	-	0.934
15	8.100	十六烷酸乙酯	0.118	-	-	0.455	-	0.540	0.278
16	8.163	二十烷	-	-	M	0.199	-	-	0.182
17	8.271	未知	0.170	-	-	0.365	M	-	0.520
18	8.340	2-己基-9, 10-亚甲基十六酸甲酯	-	-	-	-	-	-	0.323
19	8.620	十七烷酸甲酯	0.230	-	0.131	0.279	0.329	M	-
20	8.940	2, 7-二甲基菲	-	-	-	0.192	-	-	-
21	9.238	2, 5-二甲基菲	-	-	-	0.233	-	-	-
22	9.358	3, 6-二甲基菲	-	-	-	0.173	-	-	-
23	9.935	(Z, Z)-9, 12-十八碳二烯酸甲酯	36.547	21.006	9.981	23.826	47.598	50.134	30.279
24	10.015	(Z)-9-十八碳烯酸甲酯	24.810	50.663	8.534	10.252	5.784	14.788	-
25	10.163	叶绿醇	M	-	0.562	-	-	-	-
26	10.335	十八烷酸甲酯	1.530	1.589	1.578	1.493	0.619	1.545	7.657
27	10.552	(Z, Z)-9, 12-十八碳二烯酸	-	-	0.251	-	-	-	-
28	10.695	(Z)-9, 17-十八碳二烯醛	0.143	-	-	-	-	-	-
29	10.975	十八碳二烯酸乙酯	0.260	-	-	-	-	M	0.543
30	10.981	9, 12-十八碳二烯酸乙酯	-	-	-	0.761	-	1.142	-
31	11.072	油酸乙酯	0.290	0.347	-	0.501	-	0.189	-

续表 2

No.	t_R /time	化合物	相对含量 /%						
			复方	桃仁	红花	地黄	当归	川芎	赤芍
32	11.078	油酸	-	-	-	-	-	-	0.204
33	11.598	二十二烷	0.177	M	0.101	0.116	-	-	-
34	11.770	顺 2-辛基-环丙烷辛酸甲酯	-	-	-	-	-	-	0.100
35	12.130	十九烷酸甲酯	-	-	-	0.122	-	-	0.103
36	12.284	2-甲基茛菪	-	-	-	0.321	-	-	-
37	13.032	-亚甲基环己烷醇	0.290	-	-	-	-	0.222	-
38	13.221	1-二十三烯	-	-	-	0.191	-	-	-
39	13.430	二十三烷	-	M	3.266	-	-	-	-
40	13.433	1-氯二十七烷	-	-	-	-	-	-	0.231
41	13.438	11,13-二十碳二烯酸甲酯	-	-	-	-	-	0.518	-
42	13.450	未知	0.973	-	-	-	-	-	-
43	13.456	十七烷	-	-	-	0.362	-	-	-
44	13.535	11-二十烯酸甲酯	0.441	-	-	-	-	0.364	-
45	14.004	二十烷酸甲酯	0.601	M	M	0.791	0.348	0.825	0.681
46	14.541	4-(4-乙基环己烷)-1-戊基环己烷	0.187	-	-	-	-	-	-
47	15.319	二十四烷	0.056	M	0.276	0.297	0.237	-	0.305
48	15.433	11,13-二甲基-12-十四烯-1-醇乙酸酯	-	-	-	-	-	-	0.137
49	15.856	2,2'-亚甲基双(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	-	0.337	-	-	M	M	-
50	15.896	二十一烷酸甲酯	0.140	-	0.270	0.234	-	-	0.138
51	16.816	未知	-	-	-	-	-	0.324	-
52	16.805	苯并菲	-	-	-	0.468	-	-	-
53	17.050	1-(1,5-二甲基戊基)-4-(4-甲基戊基)-环己烷	M	-	0.135	-	-	-	-
54	17.194	四十四烷	-	-	-	-	-	-	0.314
55	17.199	二十烷	0.211	M	-	-	-	-	-
56	17.205	二十五烷	-	-	1.267	0.797	0.473	-	-
57	17.788	二十二烷酸甲酯	0.452	-	0.499	0.785	1.041	0.565	0.327
58	19.054	二十六烷	-	M	0.222	0.598	-	-	0.292
59	19.657	二十六烷甲酯	0.265	-	-	0.728	0.611	-	0.285
60	20.320	(Z)-9-二十三烯	0.168	-	1.135	-	-	-	-
61	20.908	二十七烷	2.134	-	9.731	1.259	-	-	1.206
62	21.211	3-3-乙酸酯-12-齐墩果烯	-	-	-	-	-	-	2.935
63	21.491	二十四烷酸甲酯	0.687	-	0.986	1.027	1.224	0.252	0.255
64	22.372	(Z)-13-二十二烯酰胺	-	-	-	M	-	-	0.181
65	22.680	未知	0.214	-	-	0.262	-	-	0.135
66	23.257	角鲨烯	1.002	1.412	0.367	0.958	-	1.569	0.800
67	23.875	9-十九碳烯	0.379	-	-	-	-	-	-
68	23.880	10-二十一碳烯	-	-	1.742	-	-	-	-
69	23.989	17-三十五烷烯	-	-	0.139	-	-	-	-

续表 2

No.	t_R /time	化合物	相对含量 /%						
			复方	桃仁	红花	地黄	当归	川芎	赤芍
70	24.446	二十九烷	1.647	-	8.498	-	-	-	0.739
71	25.024	二十六烷酸甲酯	-	-	0.100	0.901	-	-	-
72	26.201	13-十六碳烯酸	-	-	-	-	-	-	0.568
73	27.390	-生育酚	0.296	-	-	-	-	-	-
74	28.270	未知	1.109	-	-	-	-	-	-
75	28.259	二十一烷	-	-	-	-	-	-	0.832
76	28.264	1-氯二十七烷	-	-	-	0.239	-	-	-
77	28.355	未知	-	-	6.491	-	-	-	-
78	29.110	二十八烷酸甲酯	-	-	-	1.406	-	-	-
79	29.230	维生素 E	0.906	-	1.763	4.121	M	-	2.293
80	31.562	油菜甾醇	0.516	-	-	3.301	-	-	-
81	31.585	24-甲基-5-胆甾烯-3-醇	-	-	-	-	-	-	2.018
82	32.505	豆甾醇	1.269	-	-	2.115	2.329	-	-
83	34.363	22,23-二氢豆甾醇	5.346	5.455	2.925	-	5.741	1.530	13.333
84	34.448	-谷甾醇	-	-	-	13.268	-	-	-
85	34.860	24-亚丙基-5-乙二胺-3-胆甾醇	0.361	-	-	-	-	-	-

注：“-”表示未检出，“M”表示相对含量低于 0.05%。

3.3 谱效关系分析 将样品 A-G 的表 1 药效数据与各对应的石油醚部位 GC 峰面积数据进行多元回归分析和相关分析,研究有效部位中相关色谱峰所对应的化学成分含量变化与药效指标的相关性。

3.4 多元回归分析 利用 SPSS for windows11.5 统计软件进行多元线性回归分析中的逐步回归法 (Stepwise) 分析处理,相关峰被保留,结果见表 3。

表 3 逐步回归法色谱峰

药效指标	峰号						
扭体潜伏期	15 ²⁾	23 ²⁾	60 ²⁾				
扭体抑制率	23 ²⁾	24 ²⁾	30 ²⁾	33 ²⁾	45 ²⁾	53 ²⁾	61 ²⁾

注:相关¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

多元回归分析是研究一个或多个自变量与一个因变量之间是否存在某种线性或非线性关系的一种统计学分析方法。而多元回归分析方程中,可能有的自变量对因变量的影响很弱,甚至完全没有影响,所以运用逐步回归法对自变量进行筛选,尽可能将回归效果显著的自变量选入回归方程。经逐步回归分析,与潜伏期呈显著相关的是 15, 23, 60 号色谱峰,而正相关的为 23 号峰;与扭体抑制率呈显著相关的是 23, 24, 30, 33, 45, 53, 61 号色谱峰,而正相关

的为 23, 24, 45, 61 号峰。

3.5 相关分析 由 SPSS11.5 的双变量分析方法处理的 Pearson 相关系数,结果见表 4(仅列出经统计学检验具有显著性的色谱峰与药理数据的相关系数)。

双变量相关分析是研究变量之间密切程度的一种统计方法,反映了随机变量之间的线性相关情况,广泛应用于研究变量之间的相关关系。当分析多个事物之间的关系,而这种关系又往往是变量之间的数量关系时,可以用双变量相关分析,并作出统计学推断。结果表明,与延长扭体潜伏期和镇痛呈显著正相关的是 23 号峰,即 9, 12-十八碳二烯酸(亚油酸)。

表 4 色谱峰与药理数据的相关系数

药效指标	峰号			
	23	50	56	59
扭体潜伏期	0.918 ²⁾	-0.814 ¹⁾		
扭体抑制率	0.877 ²⁾	-0.858 ¹⁾	-0.762 ¹⁾	-0.767 ¹⁾

综合以上两种方法分析结果可知,23 号峰即亚油酸在延长扭体潜伏期和镇痛方面都起到了主要作用,其次 24 号峰(十八碳烯酸),45 号峰(花生酸)和

61 号峰(二十七烷)对镇痛效果有一定的协同作用。

4 讨论

痛经病理模型的制备以己烯雌酚或苯甲酸雌二醇增敏、缩宫素或前列腺素致痛较为常见。己烯雌酚为人工合成的非甾体雌激素物质,可增强子宫收缩,提高子宫对催产素的敏感性。缩宫素不仅可以直接作用于子宫肌细胞引起子宫收缩,而且还可同时刺激子宫内膜细胞释放 PGF_2 引起痛经,是较公认的在体子宫痉挛性(类痛经反应)的病理模型的造模药物。药效试验结果表明,该模型易操作、稳定、可靠,且药物作用后扭体潜伏期与扭体次数有较好的负相关性。

复方石油醚部位中以脂肪酸类成分为主,其中亚油酸含量最高,达到 36.547%,9-十八碳烯酸含量也较高,为 24.81%;还有较多数量的烷烃及甾醇类化合物,但含量均不高。组方单味药中,桃仁石油醚部位含量最高的是 9-十八碳烯酸,达 50.663%;红花石油醚部位检出成分数量较多,主要是亚油酸(9.981%)、9-十八碳烯酸(8.534%)、二十九烷(8.498%)等;生地黄石油醚部位含量比较高的为亚油酸(23.826%)、9-十八碳烯酸(10.252%)、谷甾醇(13.268%)、十六烷酸(13.552%);当归、川芎和赤芍石油醚部位含量最高的物质都是亚油酸,分别占各自总检出量的 47.598%,50.134%,30.279%。

桃红四物汤组方单味药中不饱和脂肪酸成分含量远高于饱和脂肪酸成分。桃红四物汤石油醚部位

的主要成分为亚油酸,它是人和动物营养中必需脂肪酸。缺乏亚油酸等不饱和脂肪酸,会使动物发育不良,皮肤和肾损伤,不育等。亚油酸能与胆固醇结合成酯,并可进而促使胆固醇降解为胆酸,然后排出体外,亦有降低甘油三酯作用^[5]。本试验结果表明,亚油酸在抑制痛经模型小鼠方面起到了主要作用。

中药复方药效物质基础研究是中药走向现代化的关键性问题,而复方中化学成分复杂性和多样性给研究和表征复方药效物质基础带来很大的难度。本研究以 GC-MS 分析方法较全面地分析了桃红四物汤及其组方单味药石油醚部位化合物组成,结合数理统计方法,初步表征了桃红四物汤石油醚部位对痛经模型小鼠的药效物质基础。

[参考文献]

- [1] 姚金梁. 桃红四物汤活血调经物质基础研究[D]. 南京中医药大学, 2008. 44.
- [2] 孙海燕, 曹永孝, 刘静, 等. 小鼠痛经模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 233.
- [3] 嵇波, 张露芬, 朱江, 等. 痛经模型建立和评价方法的思考[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(6): 711.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 33.
- [5] 唐传授, 徐建祥, 彭志英. 脂肪酸营养功能的最新研究[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 20.

[责任编辑 何伟]