

• 药理与临床 •

高良姜提取物促进黑素生成的谱效关系分析

霍仕霞^{1*}, 康雨彤², 彭晓明¹, 高莉¹, 闫明^{1*}

1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所 新疆维吾尔医方剂学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830049

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: 目的 建立高良姜提取物指纹图谱, 考察其对 B16 鼠黑素瘤细胞增殖、酪氨酸酶活性及黑素量的影响, 并分析其谱效关系。方法 HPLC 法建立高良姜醇提物 (G1)、G1 水沉物 (G2)、G2 大孔树脂纯化物 (G3)、G3 聚酰胺精制物 (G4) 指纹图谱; MTT 法检测各提取物对 B16 细胞增殖的影响; 比色法检测其对酪氨酸酶活性和黑素量的影响; 灰色关联度分析法研究其谱效关系。结果 与对照组相比, G1 浓度为 1.00~5.00 $\mu\text{mol/L}$ 、G2 浓度为 0.50~5.00 $\mu\text{mol/L}$ 、G3 浓度为 0.25~5.00 $\mu\text{mol/L}$ 、G4 浓度为 0.25~10.00 $\mu\text{mol/L}$, 能显著促进 B16 细胞增殖 ($P < 0.01$); G1、G2 浓度为 0.50 $\mu\text{mol/L}$, G3、G4 浓度为 0.50~1.00 $\mu\text{mol/L}$, 能显著增强酪氨酸酶的活性 ($P < 0.05$ 、0.01); G1 浓度为 0.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$, G2、G4 浓度为 0.50~5.00 $\mu\text{mol/L}$, G3 浓度为 0.25~5.00 $\mu\text{mol/L}$ 时, 促黑素合成作用显著 ($P < 0.05$); 在相同浓度下, G4 促 B16 细胞增殖和增强酪氨酸酶活性的作用最强。谱效关系分析表明, 与药效关联度最高的是高良姜素 (7 号峰)。G1、G2、G3、G4 含高良姜素分别为 27.61、88.72、348.53、693.35 mg/g, 验证实验结果表明高良姜素在 0.25~10.00 $\mu\text{mol/L}$ 均有显著的促 B16 细胞增殖、增强酪氨酸酶活性和促进黑素量升高的作用。结论 随着高良姜素量的增加, 高良姜各提取物对 B16 细胞增殖、酪氨酸酶活性及黑素量的作用逐渐增强, 表明高良姜素是高良姜治疗白癜风的有效物质之一。

关键词: 高良姜; 高良姜素; 黑素生成; 谱效关系; 灰色关联度分析

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-0995-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.015

Spectrum-effect relationship of extract from rhizome of *Alpinia officinarum* on promotion of melanogenesis

HUO Shi-xia¹, KANG Yu-tong², PENG Xiao-ming¹, GAO Li¹, YAN Ming¹

1. Xinjiang Laboratory of Uighur Medical Prescription, Xinjiang Institute of Traditional Uighur Medicine, Urumqi 830049, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830049, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint of the extract from the rhizome of *Alpinia officinarum*, to investigate the effects on the proliferation, tyrosinase activity, and melanogenesis in melanoma B16 cells, and to analyze the spectrum-effect relationship. **Methods** The fingerprint of alcohol extract from the rhizome of *A. officinarum* (G1), water sediments of G1 (G2), macroporous resin purified extract of G2 (G3), and refined polyamide extract of G3 (G4) were established by HPLC, and the proliferation of each extract on B16 cells was measured by MTT. The tyrosinase activity and melanin content were measured by colorimetry assay. The spectrum-effect relationship was analyzed by grey relation analysis. **Results** Compared with the control group, the proliferation of B16 cells was promoted significantly after treatment with 1.00—5.00, 0.50—5.00, 0.25—5.00, and 0.25—10.00 $\mu\text{mol/L}$ of G1, G2, G3, and G4, respectively. The tyrosinase activity was promoted by G1 and G2 with 0.50 $\mu\text{mol/L}$, and G3 and G4 with 0.50—1.00 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$, 0.01); The synthesis of melanin was promoted after the treatment with 0.5 and 5.00 $\mu\text{mol/L}$ of G1, 0.50—5.00 $\mu\text{mol/L}$ of G2 and G4, and 0.25—5.00 $\mu\text{mol/L}$ of G3 ($P < 0.01$); At the same concentration, G4 had the strongest effect to promote the cell proliferation and to increase the tyrosinase activity. The galangin (peak 7) had the highest correlation with pharmacodynamics, and the contents of galangin in G1, G2, G3, and G4 were 27.61, 88.72, 348.53, and 693.35 mg/g, respectively. The proliferation,

收稿日期: 2012-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160556)

作者简介: 霍仕霞, 女, 助理研究员, 研究方向为药物分析及中药药动学。Tel: 13565889322 E-mail: huoshixia1983@163.com

*通信作者 闫明 Tel: (0991)2574309 E-mail: yanming21cn@sohu.com

tyrosinase activity, and galangin content were promoted significantly after the treatment with galangin (0.25—10.00 $\mu\text{mol/L}$) by the verification experiment. **Conclusion** The effect of the extract from the rhizome of *A. officinarum* on the proliferation, tyrosinase activity, and melanogenesis of B16 melanoma cells could be enhanced with the increased content of galangin, which demonstrates that the galangin is one of the efficient substances in the rhizome of *A. officinarum* for the treatment of vitiligo.

Key words: rhizome of *Alpinia officinarum*; galangin; melanogenesis; spectrum-effect relationship; grey relational analysis

高良姜为姜科植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance. 的根茎, 为常用中药材, 具有抗溃疡、抗腹泻、镇痛抗炎、抗血栓、抗氧化、抗菌、抗癌等广泛的药理作用^[1], 具有重要药用价值。高良姜化学成分复杂, 主要包括二芳基庚烷类、挥发油类、苯丙素类和黄酮类等。在探寻治疗白癜风的维药时发现高良姜有效部位能够促进黑素生成, 具有治疗白癜风的作用^[2]。故本实验制备含不同质量分数高良姜素的高良姜提取物, 并建立相应的指纹图谱, 同时采用 B16 小鼠黑素瘤细胞对各提取物的促黑素生成作用进行体外药效学评价, 采用灰关联度分析法分析其谱效关系^[3-4], 并进行光谱、色谱、质谱比对, 筛选高良姜促黑素生成的活性物质。

1 材料

1.1 药物与试剂

高良姜(批号 20090321), 新疆华康药业有限责任公司, 经新疆自治区药物研究所张彦福研究员鉴定为姜科植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance. 的干燥根茎。高良姜醇提物(G1)、G1 水沉物(G2)、G2 大孔树脂纯化物(G3)、G3 聚酰胺精制物(G4)均为自制^[5](分别含高良姜素 27.61、88.72、348.53、693.35 mg/g)。高良姜素对照品, 批号 090217, 质量分数 99%, 上海融禾医药科技公司; 8-甲氧基补骨脂素(8-MOP), 东京化成工业株式会社。甲醇、乙腈为色谱纯, 美国 Fisher 公司; 优级纯磷酸, 天津市风船化学试剂科技有限公司; DMEM 干粉培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; 台盼蓝、胰酶、TritonX-100, Scientific Research Special 公司; 四甲基偶氮噻唑蓝, 美国 Amresco 公司; 七水磷酸氢二钠、一水磷酸二氢钠, 上海生工生物工程有限公司; 二甲基亚砜(DMSO), 天津市光复化工研究所; 水为超纯水。

1.2 仪器

LC 2010 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; VP—ODS 色谱柱, 日本岛津公司; 4000 QTRAP 离子阱串联质谱仪, 美国应用生物系统公司; BS224S 分析天平, 德国 Sartorius 公司; SK8210HP 超声清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; PHS—25 pH 计,

上海雷磁仪器厂; LDZX—75KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; YJ—875 净化工作台, 上海苏达实验仪器厂; MCO—18AIC 型 CO₂ 培养箱、MDF—192 超低温冰箱, 日本 Sanyo 公司; XD—101 倒置显微镜, 中国江南光电仪器有限公司; MM—3 微量振荡器, 江苏沈高康健生化器具厂; BIO—RAD550 型酶标仪, 美国伯乐公司; DHG—9123A 电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; SHZ—2A 水浴恒温振荡器, 上海梅香仪器有限公司。

1.3 细胞

B16 小鼠黑素瘤细胞, 上海中科院细胞库提供。

2 方法

2.1 高良姜提取物指纹图谱的建立^[6-7]

2.1.1 色谱条件

(1)用于指纹图谱建立: Shim-Pack Vp-OPS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1%磷酸水溶液; 梯度洗脱: 0~40 min, 30%~50% A, 40~80 min, 50%~100% A; 分析时间为 80 min; 检测波长 227 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

(2)用于成分测定: 色谱柱为 Shimadzu C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(50:50), 等度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 360 nm; 进样量 20 μL 。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密吸取质量浓度为 54 $\mu\text{g/mL}$ 的高良姜素对照品溶液 2 mL, 加甲醇 10 mL 稀释至刻度, 制成 10.8 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过后备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 分别精密称取 G1、G2、G3 和 G4 适量, 用 80%乙醇超声溶解并定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2 G1~G4 对 B16 细胞的影响^[8-12]

2.2.1 MTT 法检测 B16 细胞增殖 选取对数生长期的 B16 细胞, 0.25%胰酶消化, 收集并调整细胞密度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL , 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵箱培养。待细胞贴壁后弃去培养基, 分别加入终浓度均为 10.00、5.00、1.00、0.50、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 G1~G4 (按含高良姜素的量换

算)和阳性药 8-MOP (0.25~10.00 μmol/L) 培养液 200 μL, 对照组加相同体积的培养液, 继续培养 48 h。于结束前 4 h, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 继续培养 4 h 后弃上清液, 加入 DMSO 150 μL/孔, 振荡 10 min, 使结晶完全溶解, 立即于酶标仪检测 490 nm 处吸光度 (A) 值。每一浓度设 4 个复孔, 取平均值, 实验重复 3 次, 计算 B16 细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.2.2 比色法检测酪氨酸酶活性 细胞培养与给药同“2.2.1”项。给药后继续培养 48 h, 弃培养液, 用 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 1% TritonX-100 溶液 50 μL, 迅速置-80 °C 冻存 30 min, 室温融化使细胞完全裂解, 37 °C 预温后加入 0.25% 左旋多巴溶液 10 μL, 置 37 °C 电热恒温水槽中反应 2 h, 酶标仪测定 490 nm 处 A 值。每一浓度设 4 个复孔, 取平均值, 计算酪氨酸酶活性。

$$\text{酪氨酸酶活性率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.2.3 比色法测定黑素的量 选取对数生长期 B16 细胞, 0.25% 胰酶消化, 收集并调整细胞密度 2×10^4 /mL, 接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔 1 mL,

置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养。待细胞贴壁后弃去培养基, 分别加入浓度为 10.00、5.00、1.00、0.50、0.25 μmol/L 的 G1~G4 和阳性药 8-MOP 培养液, 每孔 1 mL, 对照组加等量培养液, 继续培养 48 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 将细胞收集入离心管, 3 000 r/min 离心 10 min, 倾去上清液, PBS 洗 2 次, 在 37 °C 下用 1 mol/L NaOH 0.5 mL 作用 48 h, 充分碱裂解细胞和溶解黑素颗粒。以 100 μL/孔加入 96 孔板中, 酶标仪测定 405 nm 处 A 值, 每一浓度设 4 个复孔, 取平均值, 计算黑素的质量分数。

$$\text{黑素质量分数} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.2.4 统计学处理 Teme 3.1 统计软件进行药理实验数据统计, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 高良姜提取物指纹图谱的建立

由图 1 可见, 随着提取纯化程度的加深, 各提取物样品指纹图谱中主要成分的量 and 峰的数量均产生变化, 但各提取物样品中均含有 7、8、15 号 3 个共有峰, 其中 7 号峰所示成分的量最高。

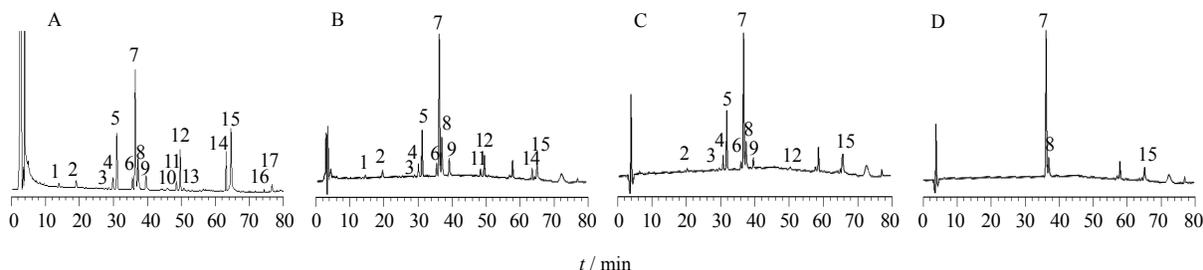


图 1 G1 (A)、G2 (B)、G3 (C)、G4 (D) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of G1 (A), G2 (B), G3 (C), and G4 (D)

3.2 G1~G4 对 B16 细胞的影响

3.2.1 对 B16 细胞增殖的影响 与对照组相比, G1~G4 对 B16 细胞有不同程度的促增殖作用: G1 在 1.00~5.00 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.01$), G2 在 0.50~5.00 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.01$), G3 在 0.25~5.00 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.01$); G4 在 0.25~10.00 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.01$)。在相同浓度下, G4 促 B16 细胞增殖作用最强。结果见表 1。

3.2.2 对酪氨酸酶活性的影响 与对照组相比, G1~G4 对酪氨酸酶活性均有不同程度的增强作用: G1、G2 浓度为 0.50 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.05$ 、0.01), G3、G4 浓度为 0.50~1.00 μmol/L 作用显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 在相同浓度下, G4 的作

用最强。结果见表 2。

3.2.3 对 B16 细胞黑素合成的影响 与对照组相比, G1~G4 对黑素合成有不同程度的促进作用: G1 浓度为 0.50、5.00 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.05$), G2、G4 浓度为 0.50~1.00 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.05$ 、0.01), G3 浓度为 0.25~5.00 μmol/L 时作用显著 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.3 高良姜提取物谱效关系的灰关联度分析^[13-16]

以 G1~G4 对 B16 细胞增殖、酪氨酸酶活性和黑素量的药效数据和指纹图谱中各峰的相对峰面积为基准, 采用灰关联度法寻找 G1~G4 指纹图谱中关联度较高的化合物。

3.3.1 G1~G4 指纹图谱中各峰的相对峰面积 由

表1 G1、G2、G3、G4对B16细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 1 Effects of G1, G2, G3, and G4 on proliferation of B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞增殖 / %	组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞增殖 / %
对照	—	100	G3	1.00	113.91 ± 1.21**
G1	0.25	103.15 ± 2.63	G4	5.00	109.14 ± 2.01**
	0.50	112.39 ± 2.11*		10.00	93.85 ± 2.38*
	1.00	121.25 ± 0.71**		0.25	124.05 ± 2.62**
	5.00	125.18 ± 1.07**		0.50	122.90 ± 4.07**
	10.00	103.52 ± 0.59		1.00	124.67 ± 3.25**
G2	0.25	106.82 ± 0.83	8-MOP	5.00	127.27 ± 2.20**
	0.50	124.34 ± 1.73**		10.00	112.71 ± 3.16**
	1.00	123.33 ± 2.22**		0.25	112.76 ± 1.28**
	5.00	123.02 ± 1.72**		0.50	117.61 ± 3.44
	10.00	104.83 ± 2.14		1.00	129.34 ± 2.56**
G3	0.25	110.26 ± 2.97**		5.00	117.72 ± 3.02**
	0.50	112.30 ± 2.95**		10.00	99.89 ± 2.74

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

表2 G1、G2、G3、G4对B16细胞酪氨酸酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 2 Effects of G1, G2, G3, and G4 on tyrosinase activities in B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	酪氨酸酶活性 / %	组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	酪氨酸酶活性 / %
对照	—	100	G3	1.00	120.12 ± 0.50*
G1	0.25	93.45 ± 1.08	G4	5.00	88.81 ± 1.46
	0.50	121.58 ± 0.86*		10.00	83.94 ± 0.59
	1.00	93.36 ± 1.39		0.25	106.88 ± 1.39
	5.00	94.32 ± 1.14		0.50	143.58 ± 2.21**
	10.00	88.02 ± 0.80		1.00	132.80 ± 1.48**
G2	0.25	102.75 ± 1.82	8-MOP	5.00	94.04 ± 0.50
	0.50	132.16 ± 0.68**		10.00	91.06 ± 0.91
	1.00	108.92 ± 0.36		0.25	96.51 ± 2.69
	5.00	100.41 ± 2.81		0.50	148.45 ± 1.29**
	10.00	94.57 ± 1.16		1.00	114.12 ± 1.00*
G3	0.25	90.14 ± 1.77		5.00	88.76 ± 3.12
	0.50	121.16 ± 0.87*		10.00	88.00 ± 0.55

图1可见, G1~G4有3各共有峰, 以7号峰为参比峰, 计算得相对峰面积, 结果见表4。表明随着样品的不断纯化, 7号峰所对应的化合物的量呈上升趋势, 其他化合物的量下降。

3.3.2 G1~G4 指纹图谱与 B16 细胞增殖间的关联度 依据关联度的大小, 确定各成分对细胞增殖的贡献, 综合4个提取物样品结果, 可见贡献最大为7号峰对应的化合物, 其次为8号峰对应的化合物。结果见表5。

3.3.3 G1~G4 指纹图谱与细胞酪氨酸酶活性间的关联度 依据关联度的大小, 确定各成分对酪氨酸酶活性的贡献, 综合4个提取物样品的结果, 可见贡献最大为7号峰对应的化合物, 其次为8号峰对应的化合物。结果见表6。

3.3.4 G1~G4 指纹图谱与细胞黑素量间的关联度 依据关联度的大小, 确定各成分对酪氨酸酶活性的贡献, 综合4个提取物样品结果, 可见贡献最大亦为7号峰对应的化合物, 其次为8号峰对应的化合物。

表3 G1、G2、G3、G4对B16细胞黑素量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Table 3 Effects of G1, G2, G3, and G4 on melanin content in B16 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	黑素 / %	组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	黑素 / %
对照	—	100	G3	1.00	115.60 \pm 1.36*
G1	0.25	96.45 \pm 1.43		5.00	106.81 \pm 0.66*
	0.50	110.95 \pm 0.97*		10.00	97.14 \pm 1.70
	1.00	103.47 \pm 3.59	G4	0.25	113.33 \pm 1.76
	5.00	108.53 \pm 0.93*		0.50	128.15 \pm 2.30**
	10.00	90.95 \pm 2.16		1.00	132.95 \pm 0.59**
G2	0.25	100.23 \pm 3.02		5.00	100.85 \pm 3.56
	0.50	127.47 \pm 0.59**		10.00	110.90 \pm 1.61
	1.00	111.79 \pm 1.43*	8-MOP	0.25	91.19 \pm 0.26
	5.00	98.23 \pm 3.56		0.50	135.22 \pm 1.56**
G3	10.00	88.67 \pm 1.04		1.00	90.15 \pm 2.08
	0.25	114.02 \pm 2.09*		5.00	98.95 \pm 1.90
	0.50	113.13 \pm 1.93*		10.00	95.07 \pm 0.96

表4 G1、G2、G3、G4共有峰相对峰面积
Table 4 Relative peak areas in common peaks of G1, G2, G3, and G4

样品	相对峰面积								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
G1	0.002 00	0.020 17	0.003 39	0.005 86	0.039 27	0.007 68	1.000 00	0.289 48	0.165 60
G2	0.001 46	0.019 53	0.002 66	0.005 39	0.027 59	0.006 67	1.000 00	0.294 00	0.171 05
G3	—	0.005 79	0.002 87	0.006 02	0.036 06	0.003 54	1.000 00	0.225 62	0.103 61
G4	—	—	—	—	—	—	1.000 00	0.146 62	—

样品	相对峰面积								
	10	11	12	13	14	15	16	17	
G1	0.011 83	0.006 10	0.045 05	0.022 32	0.033 63	0.011 99	0.003 34	0.003 97	
G2	—	0.008 27	0.020 95	—	0.005 71	0.007 62	—	—	
G3	—	—	0.001 62	—	—	0.018 67	—	—	
G4	—	—	—	—	—	0.009 91	—	—	

表5 指纹图谱与细胞增殖间的关联度
Table 5 Correlation between fingerprint and cell proliferation

样品	关联度								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
G1	0.379 3	0.383 3	0.379 6	0.380 1	0.387 5	0.380 5	0.882 3	0.453 6	0.418 3
G2	0.372 0	0.375 8	0.372 3	0.372 8	0.377 5	0.373 1	0.844 2	0.444 7	0.410 9
G3	—	—	—	—	—	—	0.903 8	0.449 5	0.415 3
G4	—	—	—	—	—	—	0.779 8	0.390 2	—

样品	关联度								
	10	11	12	13	14	15	16	17	
G1	0.381 4	0.380 2	0.388 8	0.383 7	0.386 2	0.381 5	0.379 6	0.379 7	
G2	—	0.373 4	0.376 1	—	0.372 9	0.373 3	—	—	
G3	—	—	0.390 5	—	—	0.394 4	—	—	
G4	—	—	—	—	—	0.361 3	—	—	

物。结果见表7。

3.4 G4 中主要成分确认^[17-20]

3.4.1 紫外光谱检测 由图2可见,G4 与高良姜素对照品的光谱图形一致。

3.4.2 HPLC 检测 由图3见,G4 色谱图(方法见“2.1.1”)中7号峰保留时间与高良姜素对照品一致。

3.4.3 质谱条件与检测 离子源为电喷雾源,脱溶剂气温度为300℃,体积流量为450 L/h,离子源温

表6 指纹图谱与酪氨酸酶活性间的关联度

Table 6 Correlation between fingerprint and tyrosinase activity

样品	关联度								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
G1	0.427 3	0.432 0	0.427 6	0.428 3	0.437 0	0.428 7	0.881 9	0.515 4	0.473 3
G2	0.404 4	0.408 6	0.404 7	0.405 3	0.410 5	0.405 6	0.898 5	0.484 2	0.447 1
G3	—	0.423 3	0.422 6	0.423 4	0.431 1	0.422 8	0.827 0	0.486 7	0.449 3
G4	—	—	—	—	—	—	0.811 4	0.429 0	—

样品	关联度								
	10	11	12	13	14	15	16	17	
G1	0.429 8	0.428 3	0.438 5	0.432 5	0.435 5	0.429 8	0.427 6	0.427 8	
G2	—	0.406 0	0.408 9	—	0.405 4	0.405 8	—	—	
G3	—	—	0.422 3	—	—	0.426 6	—	—	
G4	—	—	—	—	—	0.396 4	—	—	

表7 指纹图谱与黑素量间的关联度

Table 7 Correlation between fingerprint and melanin content

样品	关联度								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
G1	0.397 0	0.401 4	0.397 4	0.397 9	0.406 1	0.398 4	0.908 1	0.479 2	0.440 0
G2	0.391 0	0.395 2	0.391 3	0.391 9	0.397 1	0.392 2	0.879 4	0.472 6	0.434 4
G3	—	0.381 3	0.380 6	0.381 3	0.388 0	0.380 8	0.870 3	0.436 2	0.403 9
G4	—	—	—	—	—	—	0.812 9	0.396 5	—

样品	关联度								
	10	11	12	13	14	15	16	17	
G1	0.399 4	0.398 0	0.407 5	0.401 9	0.404 7	0.399 4	0.397 3	0.397 5	
G2	—	0.392 6	0.395 5	—	0.392 0	0.392 4	—	—	
G3	—	—	0.380 3	—	—	0.384 1	—	—	
G4	—	—	—	—	—	0.366 6	—	—	

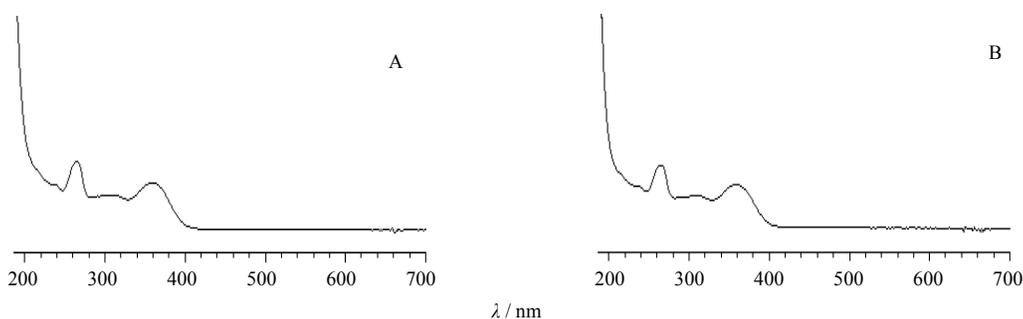


图2 高良姜素(A)和G4(B)紫外光谱图

Fig. 2 UV spectrograms of galangin (A) and G4 (B)

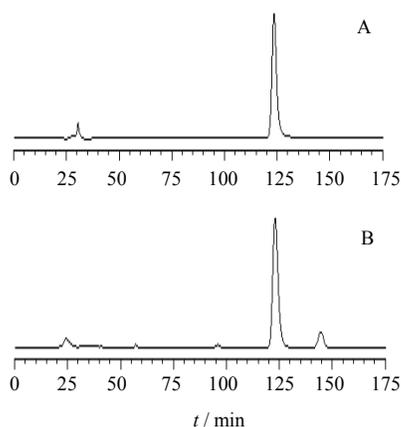


图3 高良姜素(A)和G4(B) HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of galangin (A) and G4 (B)

度 120 °C, 毛细管电压 3 000 V, 锥孔电压 60 V, 锥孔气体积流量 50 L/h, 采用负离子模式同时检测, 雾化气、气帘气、碰撞气及加热辅助气均为 N₂。由图 4 可见, G4 的 ESI⁻离子模式一级质谱中强度最高峰的 *m/z* 为 269.1, 鉴于负离子的形成机制, 并已知高良姜素的相对分子质量为 270.24, 结合文献与各图谱和数据, 最终确定 G4 中量最多的化合物为高良姜素。

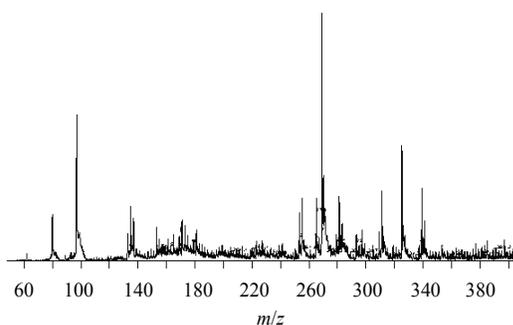


图4 G4 ESI⁻离子质谱

Fig. 4 (-) ESI-ion mass spectrogram of G4

3.4.4 G1~G4 中高良姜素测定^[5] G1、G2、G3、G4 含高良姜素的量分别为 27.61、88.72、348.53、693.35 mg/g, 由此可见高良姜在纯化过程中, 高良姜素的量不断增加, 经聚酰胺精制后, 高良姜素的量较醇提物提高了 24 倍。

3.5 高良姜素对 B16 细胞的影响

3.5.1 方法

(1) MTT 法检测细胞增殖: 取对数生长期 B16 单细胞悬液, 以 100 μL/孔加入 96 孔板, 培养 24 h 后分别依次加入质量浓度为 0.25、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00 μg/mL 的高良姜素对照品溶液和

8-MOP 的培养液; 200 μL/孔, 每一质量浓度设 8 个复孔, 培养 48 h, 于培养结束前 4 h 加 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h, 加 DMSO 200 μL/孔, 酶标仪检测 490 nm 处 *A* 值, B16 细胞增殖率计算同“2.2.1”项。

(2) 比色法检测酪氨酸酶活性: 取对数生长期 B16 单细胞悬液, 以 100 μL/孔加入 96 孔板, 培养 48 h 后分别加入质量浓度为 0.25、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00 μg/mL 的高良姜素对照品溶液和 8-MOP 的培养液, 200 μL/孔, 每一质量浓度设 8 个复孔, 培养 48 h 后弃培养液, 用 PBS 冲洗 2 次, 每孔加入 1 mol/L TritonX-100 溶液 50 μL, 迅速置 -70 °C 冻存 30 min, 室温融化使细胞完全裂解, 37 °C 预温后加入 0.25% 左旋多巴溶液 10 μL, 置 37 °C 电热恒温水槽中反应 2 h, 酶标仪检测 490 nm 处 *A* 值, 酪氨酸酶计算同“2.2.2”项。

(3) 比色法测定黑素质量分数: 细胞培养与给药同“3.5.1 (2)”, 给药后继续培养 48 h, 倾去上清液, 用 PBS 冲洗 2 次, 加入 1 mol/L NaOH 溶液 150 μL, 37 °C 下作用 48 h, 充分碱裂解细胞、溶解黑素颗粒, 酶标仪检测 490 nm 处 *A* 值, 黑素质量分数计算同“2.2.3”项。

3.5.2 结果 与对照组相比, 高良姜素浓度为 0.25~10.00 μmol/L 时, 促 B16 细胞增殖、增强酪氨酸酶活性、增加黑素量的作用显著, 但药物浓度升至一定数值, 上升作用呈降低趋势。结果见表 8。

4 讨论

中药是一个很复杂的“黑色”或“灰色”多组分体系。传统的植物化学方法强调分离纯化化合物, 而不是对中药的混合体系直接进行全面定性、定量分析, 导致越纯的化合物不一定有药效, 且耗费大量的人力、物力, 仍未阐明中药的药效组分。指纹图谱研究的高级阶段是对图谱中的指纹峰进行系统的指认以及指纹特征和药效相关性研究, 即谱效关系、指纹图谱的生物等效性研究等。这种包括了体现药效信息的多个有效部位的各种指纹图谱, 将进一步解决如何体现中药及其制剂的整体性和复杂性的难题, 同时能够建立一种合理、有效的中药内在品质的研究和评价方法, 并解决中药质量控制指标与药效研究相脱节的问题, 因此中药指纹图谱是中药现代化研究的重要组成部分, 是表征中药所含成分与其质量关系的有效手段, 已成为国内外广泛接受的中药质量评价模式。

表 8 高良姜素对 B16 细胞增殖、酪氨酸酶活性及黑色素合成作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 8 Effects of galangin on cell proliferation, tyrosinase activity, and melanin synthesis in B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞增殖 / %	酪氨酸酶活性 / %	黑色素 / %
对照	—	100	100	100
高良姜素	0.25	123.32 \pm 0.006**	103.31 \pm 0.011	111.11 \pm 0.009
	0.50	144.10 \pm 0.013**	106.87 \pm 0.008	119.33 \pm 0.010*
	1.00	162.11 \pm 0.007**	126.72 \pm 0.006*	138.25 \pm 0.011**
	5.00	173.91 \pm 0.006**	136.77 \pm 0.009**	145.11 \pm 0.008**
	10.00	164.60 \pm 0.004**	148.16 \pm 0.008**	126.67 \pm 0.005**
	20.00	116.68 \pm 0.015*	140.70 \pm 0.009**	99.38 \pm 0.015
	8-MOP	0.25	80.22 \pm 0.007	106.61 \pm 0.007
0.50		82.61 \pm 0.002	121.32 \pm 0.014*	128.00 \pm 0.014**
1.00		98.23 \pm 0.003	91.04 \pm 0.005	111.11 \pm 0.007
5.00		44.25 \pm 0.004	58.51 \pm 0.007	111.67 \pm 0.015
10.00		109.47 \pm 0.010*	59.70 \pm 0.005	120.44 \pm 0.013**
20.00		112.42 \pm 0.013*	88.36 \pm 0.009	112.09 \pm 0.004

本实验建立高良姜总黄酮精制工艺过程系列产品的 HPLC 指纹图谱, 并采用灰色关联度法分析指纹图谱中的色谱峰与药效相关性大小, 通过对照品比对及谱学方法确认得到相关性最大的色谱峰所对应的物质是高良姜素, 观察到随着高良姜素质量分数的升高, G1~G4 指纹图谱中的色谱峰逐渐减少, 然而其促进 B16 细胞增殖、提高酪氨酸酶活性和黑色素合成的能力却增强, 由此推测高良姜素是高良姜治疗白癜风的有效物质之一, 对高良姜素的药效实验也验证了这一点。其他色谱峰所对应的化合物对高良姜提取物的药效有一定的贡献, 也可能是有效物质, 今后将进一步深入研究。

参考文献

[1] 吕 玮, 蒋伶活. 高良姜的化学成分及药理作用 [J]. 中国药业, 2006, 15(3): 19-20.
 [2] 闫 明, 霍仕霞, 高 莉, 等. 高良姜有效部位在制备治疗白癜风的药用用途: 中国, CN201010422088 [P] 2011-11-30.
 [3] 申庆荣, 李 刚. 中药谱-效关系研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2010, 32(3): 412-413.
 [4] 苏薇薇. 沙田柚指纹图谱特征与其药效学关系的研究 [D]. 广州: 第一军医大学, 2005.
 [5] 康爱荣, 闫 明, 彭 英, 等. 高良姜中高良姜素的醇提和纯化工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 5(18): 44-46.
 [6] 刘晓东, 闫 明, 张兰兰, 等. 高良姜高效液相色谱法指纹图谱分离条件的优化 [J]. 中国药业, 2009, 18(9): 15-16.
 [7] 王丽峰, 彭敬东, 王 宁. 高良姜药材高效液相指纹图谱研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2008,

33(6): 33-38.

[8] 姚 莉, 尚 靖, 徐建国. B16 细胞中酪氨酸酶活性测定的方法学研究 [J]. 新疆中医药, 2007, 25(4): 16-18.
 [9] 刘邦民. 验方祛斑汤对 A375 人黑色素瘤细胞黑色素合成的影响 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 209-210.
 [10] 张建华. 七白膏各中药萃取物对黑色素细胞增殖及黑色素合成的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(1): 84-86.
 [11] 涂彩霞. 18 味中药乙醇提取物对小鼠 B16 黑色素瘤细胞增殖及黑色素生成的影响 [J]. 中国皮肤科杂志, 2006, 39(7): 400-402.
 [12] 张 蕾. 滋补肝肾方含药血清对 B16 黑色素细胞活性黑色素含量及 cAMP 水平的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(3): 467-468.
 [13] 朱诗塔. 掌叶大黄不同炮制品谱效关系初步研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2008.
 [14] 李 峰, 张振秋, 康延国. 灰关联度法评价鹿鞭药材质量研究 [J]. 中药材, 2008, 31(2): 189-192.
 [15] Luo G A, Wang Y M, Cao J, et al. A study on establishing modern standard system to control the quality of traditional Chinese medicine in our nation [J]. *World Sci Tech/Mod Tradit Chin Med*, 2002, 4(4): 5-11.
 [16] 曹利娟. 两面针药材对肿瘤细胞 NCI-H460 和 SK-OV-3 谱-效关系的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2010.
 [17] 黄 鑫. 色谱法纯化三七叶贰及其指纹图谱的方法学研究 [D]. 天津: 天津大学, 2004.
 [18] 王凤云. 棉茵陈谱效研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
 [19] 章丽华. 丰城鸡血藤活性成分黄酮类化合物提取分离及抗氧化活性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2006.
 [20] 黄肇峰. 应用高速逆流色谱分离中药中有效成分及质谱结构研究 [D]. 广州: 华南师范大学, 2007.