

二神丸不同提取部位温脾止泻的谱效关系研究

耿媛媛¹, 胡昌江^{1*}, 潘新¹, 赵玲¹, 熊瑞¹, 张乐¹, 胡麟²

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

2. 成都中医药大学国际教育学院, 四川 成都 610075

摘要: 目的 阐明二神丸中药物炮制后(盐炙补骨脂+麸煨肉豆蔻)其不同提取部位的指纹图谱特征峰所代表的化学成分及其对温脾止泻药效贡献的大小, 表征二神丸的药效物质基础。方法 采用 HPLC 法建立二神丸不同提取部位的指纹图谱, 以不同提取部位对番泻叶所致急性腹泻小鼠腹泻指数的影响研究其止泻作用, 采用灰关联分析法建立其谱效关系。结果 建立了二神丸不同提取部位的指纹图谱, 相似度均大于 0.90; 二神丸温脾止泻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对其止泻药效贡献的大小顺序(按特征峰编号)为 6 号>18 号>7 号>20 号>14 号>21 号>1 号>25 号>24 号>23 号>4 号>3 号>8 号>11 号。结论 所构建的二神丸不同提取部位 HPLC 指纹图谱方法简单, 重复性好, 可为二神丸的质量评价提供参考; 不同部位指纹图谱与其止泻药效之间有一定的对应关系, 为进一步研究二神丸的炮制机制奠定了基础。

关键词: 二神丸; 指纹图谱; 温脾止泻; 谱效关系; 补骨脂; 肉豆蔻; 腹泻指数

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2658-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.016

Spectrum-effect relationship of different parts from Ershen Pill on warming spleen to relieve diarrhea

GENG Yuan-yuan¹, HU Chang-jiang¹, PAN Xin¹, ZHAO Ling¹, XIONG Rui¹, ZHANG Le¹, HU Lin²

1.College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2.International Education College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To clarify the contribution of the fingerprint peaks from different parts of prepared Ershen Pill to the effect of warming spleen to relieve diarrhea, and to reflect the material basis. **Methods** The HPLC fingerprints of different parts of Ershen Pill (composed of *Psoraleae Fructus* stir-baked with saltwater and *Myristica Fragrans* simmered with bran) were established. The diarrhea index of acute diarrhea in mice caused by senna leaf was researched to compare the effect of warming spleen to relieve diarrhea. **Results** The fingerprints of different parts of Ershen Pill were established, and all of the similarity degrees were over 0.90. The effect of warming spleen to relieve diarrhea of Ershen Pill was obtained from many constituents collaboratively. The contribution of different peaks to relieve diarrhea with astringents was ranked as 6 > 18 > 7 > 20 > 14 > 21 > 1 > 25 > 24 > 23 > 4 > 3 > 8 > 11. **Conclusion** The method for establishing HPLC fingerprints of different parts of Ershen Pill is simple and repeatable. The relationship between the fingerprints and the effect of warming spleen to relieve diarrhea is paralleled to some extent. And this will lay a foundation for the research of processing mechanism of Ershen Pill.

Key words: Ershen Pill; fingerprint; warming spleen to relieve diarrhea; spectrum-effect relationship; *Psoraleae Fructus*; *Myristica Fragrans*; diarrhea index

二神丸出自宋代许叔微的《普济本事方》, 由补骨脂和肉豆蔻 2 味药组成, 具有温肾暖脾、涩肠止泻的功效, 是治疗脾肾阳虚之五更泄泻的基础方^[1]。课题组前期工作已证实盐炙补骨脂和麸

煨肉豆蔻组成的二神丸温脾止泻效果优于生品组合^[2]。然而, 将中药炮制纳入复方二神丸中进行研究, 其药物炮制后导致药效增加的物质基础尚不明确。

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274085)

作者简介: 耿媛媛(1988—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药炮制学。Tel: 13438020595 E-mail: yyg1103@126.com

*通信作者 胡昌江(1952—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制原理与质量标准方面的研究工作。

Tel: 13980980796 E-mail: hhccjj@hotmail.com

中药及复方化学成分复杂,从中寻求其产生疗效的物质基础会有较大难度^[3]。本实验采用系统溶剂法分离二神丸中药物炮制后(盐炙补骨脂+麸煨肉豆蔻)的不同部位,通过建立各部位的指纹图谱并比较其温脾止泻药效的不同,采用灰色关联分析方法计算指纹图谱共有峰与止泻药效的关联度,以关联度的大小衡量各指纹图谱共有峰对药效贡献的大小,最终确定其主要药效成分,从而为科学阐明二神丸的止泻药效提供物质基础,为二神丸中药物炮制机制的研究提供依据。

1 仪器与材料

Agilent1200 高效液相色谱仪,含 DAD 检测器,美国 Agilent 公司;KQ5200DB 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;RE-52A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-III 型循环水式真空泵,天津华鑫仪器厂;小鼠代谢笼、电子天平,德国 Sartorius 公司。

补骨脂、肉豆蔻:10 批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补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,肉豆蔻为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁。

盐炙补骨脂:称取净补骨脂,加入盐水闷润 24 h,以 40 次/min 的频率于 150 ℃ 的炒锅中炒炙 10 min 后取出,置烘箱内(40 ℃)烘干。每 100 g 补骨脂用食盐 2 g,50 mL 水溶解食盐^[4]。

麸煨肉豆蔻:取净肉豆蔻与麦麸同置锅内,用文火加热,温度控制在 130~150 ℃,翻炒 20 min,至麦麸呈焦黄色,肉豆蔻呈棕褐色时取出。麦麸用量以能掩埋药物为度。

石油醚(60~90 ℃,批号 20130712)、氯仿(批号 20110413)、醋酸乙酯(批号 20120312)、正丁醇(批号 20120308),成都市科龙化工试剂厂;色谱纯甲醇、乙腈,娃哈哈纯净水;1 g/mL 番泻叶药液(自制);易蒙停购自西安杨森制药有限公司,批号 110901627,作为阳性药。

补骨脂素、异补骨脂素、去氢二异丁香酚对照品,均由成都曼斯特生物科技有限公司提供,质量分数均大于 98%,批号分别为 MUST-12122112、MUST-12081804、MUST-12062804。

昆明种小鼠,雄性,体质量 18~22 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2008-24。

2 方法与结果

2.1 二神丸不同提取部位供试品溶液的制备

采用醇水双提法以使药物提取完全,分别取 10 批次的盐炙补骨脂 20 g 和麸煨肉豆蔻 10 g,粉碎(过 2 号筛),加入 8 倍量 75%乙醇回流提取 2 次,时间分别为 1.5、1 h,合并滤液得醇提液。药渣加入 10 倍量水煎煮 2 次,时间分别为 1、0.5 h,合并滤液得水提液。醇提液减压回收乙醇至无醇味,与水提液合并,浓缩得到药液稠膏,加入适量硅藻土拌干,依次用石油醚(60~90 ℃)、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇和水进行索氏提取,得到 5 个不同提取部位的浸出物^[5],分别挥干有机溶剂后称取浸膏质量,再称取浸膏总质量的 2%加入甲醇-氯仿(7:3)混合溶液^[6]定容至 10.00 mL(由于纯甲醇不能充分溶解浸膏,加入一定比例的氯仿后可以完全溶解),经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得,以备建立不同提取部位指纹图谱用;其余浸膏分别加入 5%聚山梨酯-80 助溶,配成药物 0.5 g/mL 的各部位药液,合并不同批次相同部位的药液(10 批次药液混合的药效与 10 批次药物的图谱相对应),即得二神丸 5 个提取部位的供试液,以备不同提取部位的药效实验用。

2.2 二神丸不同提取部位指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水,梯度洗脱:0~15 min, 30%~45%乙腈;15~45 min, 45%~65%乙腈;45~55 min, 65%~100%乙腈;55~65 min, 100%乙腈;柱温 35 ℃;检测波长 230 nm;进样量 10 μL;体积流量 1 mL/min。

2.2.2 方法学考察^[7]

(1)精密度考察:按照“2.1”项下的方法制备供试品溶液,同一样品精密吸取 10 μL,连续进样 6 次,按“2.2.1”项下色谱条件记录 HPLC 图谱,采用中药色谱指纹图谱相似度软件(2004A 版)计算其相似度^[7]。结果表明,相似度大于 0.98,仪器的精密度良好。

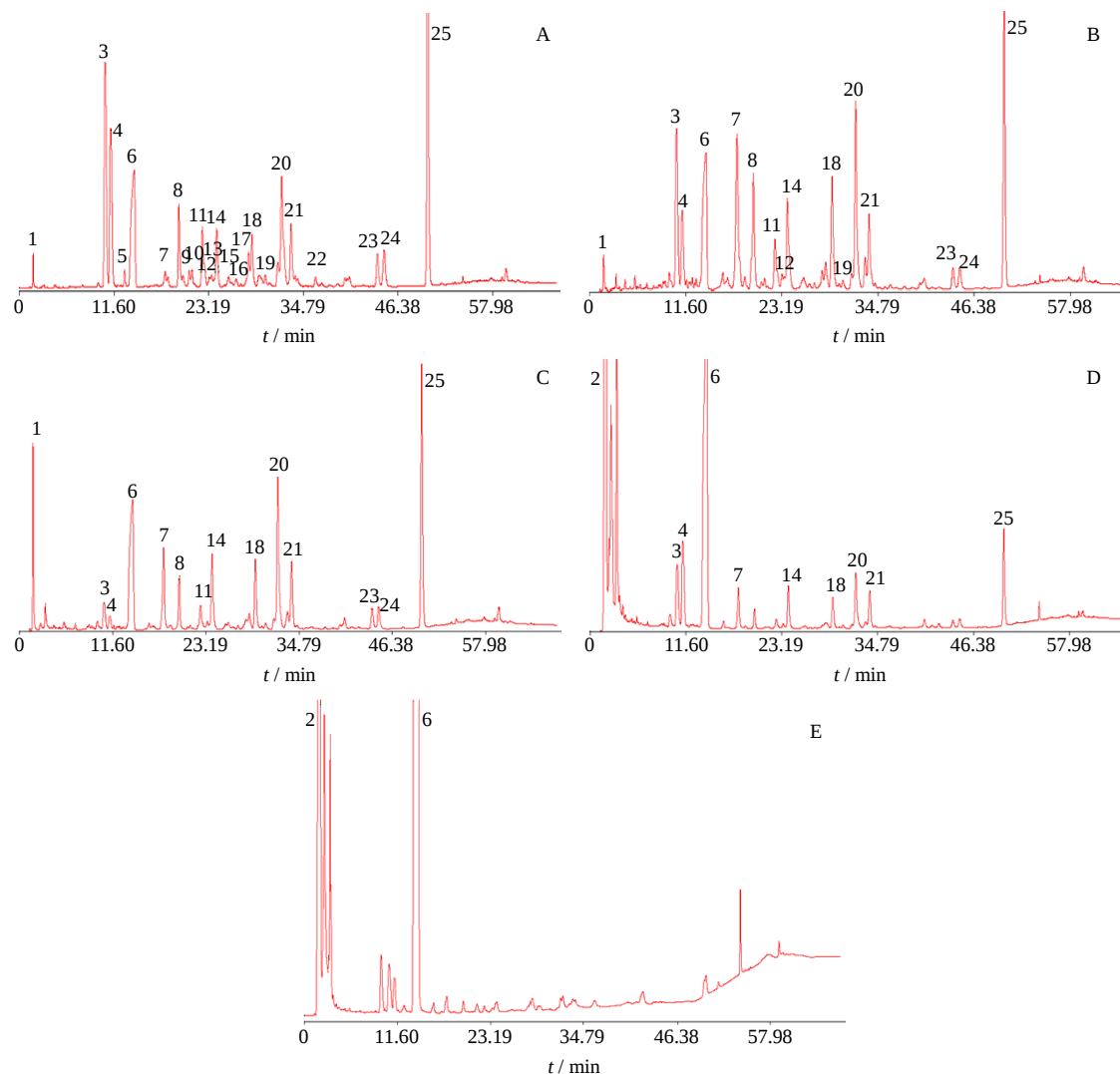
(2)重复性考察:取同一批次的二神丸 6 份,按照“2.1”项下的方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL 进样,按“2.2.1”项下色谱条件记录 HPLC 图谱,用中药色谱指纹图谱相似度软件(2004A 版)计算其相似度^[6]。结果表明,相似度大于 0.95,该方法的重复性良好。

(3)稳定性考察:按照“2.1”项下的方法制备供试品溶液,同一样品精密吸取 10 μL,分别在 0、

2、6、12、24、48 h 时按“2.2.1”项下色谱条件记录 HPLC 图谱,用中药色谱指纹图谱相似度软件(2004A 版)计算其相似度^[7]。结果表明,相似度大于 0.96,样品在 48 h 内稳定性良好。

2.2.3 不同部位指纹图谱的建立 供试液按“2.2.1”项下的色谱条件建立相应的 HPLC 图谱,通过 Agilent 液相化学工作站和中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A 版)处理,选取中位数法分别生成二神丸 5 个不同提取部位的对照指纹图谱,并

计算其相似度。分离二神丸得到的石油醚部位、氯仿部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位的指纹图谱,石油醚部位有 24 个共有峰,氯仿部位有 16 个共有峰,醋酸乙酯部位有 14 个共有峰,正丁醇部位有 10 个共有峰,水部位有 2 个共有峰。见图 1,其相似度均大于 0.9,共有峰的面积见表 1。表 1 中编号为 3 号的峰为补骨脂素,编号为 4 号的峰为异补骨脂素,编号为 21 号的峰为去氢二异丁香酚。



A-石油醚部位 B-氯仿部位 C-醋酸乙酯部位 D-正丁醇部位 E-水部位
A-petroleum ether part B-chloroform part C-ethyl acetate parts D-n-butanol part E-water parts

图 1 二神丸不同提取部位的指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of different parts of Ershen Pill

2.3 二神丸不同部位的药效实验对比

取健康的清洁级昆明种雄性小鼠(因二神丸治疗脾肾阳虚之泄泻,故选用雄性小鼠)70只,随机分成7组,分别为对照组、阳性(易蒙停胶

囊内容物加蒸馏水配制,0.8 mg/kg)组、石油醚部位组、氯仿部位组、醋酸乙酯部位组、正丁醇部位组和水部位组,适应性喂养2 d后,各组分别ig相应药液0.2 mL/10 g,对照组ig等剂量的纯

表 1 二神丸不同提取部位指纹图谱的峰面积

Table 1 Peak areas of HPLC fingerprints of different parts of Ershen Pill

编号	峰面积				
	石油醚部位	氯仿部位	醋酸乙酯部位	正丁醇部位	水部位
1	160.441 812 2	324.014 923 4	547.239 940 2	0	0
2	0	0	0	9 891.148 294	3 925.295 802
3	4 208.513 926	2 270.060 439	547.238 423 8	258.834 579 7	0
4	3 059.594 942	1 155.046 213	150.985 819 5	354.714 338 9	0
5	213.299 534 9	0	0	0	0
6	3 950.477 225	3 350.592 56	1 891.887 236	2 125.639 859	2 706.975 959
7	385.078 570 5	2 655.134 724	672.181 305 9	136.737 649 6	0
8	1 164.969 438	1 678.862 438	360.951 029 5	0	0
9	221.603 385 1	0	0	0	0
10	280.888 520 2	0	0	0	0
11	1 034.136 315	733.058 505 1	205.871 099 4	0	0
12	157.348 370 5	196.221 829 5	0	0	0
13	213.838 979 8	0	0	0	0
14	991.789 434 3	1 562.849 928	599.687 851	151.620 901 3	0
15	257.322 619 5	0	0	0	0
16	167.942 486 7	0	0	0	0
17	577.895 023 9	0	0	0	0
18	919.455 162 8	1 658.187 008	674.315 511	115.214 753 6	0
19	252.119 456 9	149.402 547 6	0	0	0
20	2 312.138 333	2 660.073 281	1 283.410 743	234.115 855 2	0
21	1 054.590 286	1 245.969 662	552.921 127 8	143.556 264 2	0
22	188.463 958 4	0	0	0	0
23	615.192 034 5	344.726 408 9	160.876 567 3	0	0
24	757.565 241 9	383.134 757 1	194.216 442 7	0	0
25	6 229.037 731	3 230.240 782	1 727.492 639	303.483 775 6	0

水,连续 5 d。实验前小鼠禁食不禁水 12 h,末次给药后 0.5 h,各组小鼠分别 ig 1 g/mL 的番泻叶药液 0.1 mL/10 g,随后将小鼠放入自制代谢笼中,下垫滤纸,每隔 1 h 更换 1 次,连续观察小鼠 5 h 内的排便情况,记录干便数、稀便数、稀便直径,计算稀便级、稀便率及腹泻指数^[8]。结果见表 2。

稀便级:表示稀便的程度。以稀便污染滤纸形成污迹面积的大小定级。分为 4 级,标准:级数(污染直径):1(<1 cm)、2(1~1.9 cm)、3(2~3 cm)、4(>3 cm)。统计时先逐个统计每一堆稀便的级数,然后将该鼠所有稀便级数相加除以稀便次数得稀便的平均级数。

稀便率=稀便数/(干便数+稀便数)

腹泻指数=稀便率×稀便级

表 2 不同提取部位组药物对小鼠腹泻指数的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Influence of different parts on diarrhea index of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	腹泻指数
对照	—	0.65±0.20
阳性	0.000 8	0.46±0.15*
石油醚部位	10	0.39±0.16**
氯仿部位	10	0.44±0.16*
醋酸乙酯部位	10	0.55±0.14
正丁醇部位	10	0.66±0.26
水部位	10	0.68±0.26

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表2结果显示,与对照组的腹泻指数相比,石油醚部位组有极显著性差异($P<0.01$),阳性组和氯仿部位组有显著性差异($P<0.05$);与阳性组的腹泻指数相比,石油醚部位和氯仿部位均无显著性差异($P>0.05$);石油醚部位组的腹泻指数与氯仿部位组相比无统计学意义($P>0.05$),但石油醚部位组降低番泻叶所致急性腹泻小鼠腹泻指数的趋势更明显。

2.4 二神丸不同部位指纹图谱与其止泻药效的灰关联分析

2.4.1 原始数据的变换 原始数据的变换采用均值化变换法。以药效数据即腹泻指数作为参考序列,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。

2.4.2 求绝对差序列 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 $\Delta_{0i}(m)=|Y_0(m)-Y_i(m)|$ 。

2.4.3 求关联系数 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 $K_{0i}=(\Delta_{0i \min}+\rho\Delta_{0i \max})/(\Delta_{0i}+\rho\Delta_{0i \max})$ 。

2.4.4 求关联度,排关联序 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起来即得关联序^[9-13]。关联序能直接反映比较序列对参考序列贡献的大小,从而可阐明二神丸不同部位指纹图谱中各共有峰对其止泻药效贡献的大小,揭示二神丸产生止泻作用的主要药效物质。灰关联分析数据见表3。

表3 二神丸不同部位指纹图谱与其止泻药效的灰关联分析
Table 3 Grey relational analysis of fingerprints and anti-diarrheic effect of different parts from Ershen Pill

编号	关联度	编号	关联度	编号	关联度
1	0.712 4	10	0.604 4	19	0.620 6
2	0.714 4	11	0.659 9	20	0.722 7
3	0.665 8	12	0.614 2	21	0.719 1
4	0.675 6	13	0.604 4	22	0.604 4
5	0.604 4	14	0.719 6	23	0.684 9
6	0.838 7	15	0.604 4	24	0.688 9
7	0.723 5	16	0.604 4	25	0.700 7
8	0.662 8	17	0.604 4		
9	0.604 4	18	0.729 6		

由表3中不同部位指纹图谱与其止泻药效的关联分析数据可知,对止泻药效贡献较大的共有峰(编号)主要有6号>18号>7号>20号>14号>21号>1号>25号>24号>23号>4号>3号>8号>11号,且这些共有峰的关联度相差较小。虽然2号共有峰的关联度也较大,但结合表1可知,2号峰在石油醚、氯仿和醋酸乙酯部位几乎没有,而这3个部位又是产生止泻药效的部位,故2号峰所代表的物质可能不是药效成分。

3 讨论

本实验建立了二神丸(盐炙补骨脂+麸煨肉豆蔻)不同部位的指纹图谱,方法简便,重复性良好。

经对比不同部位药液对番泻叶所致急性腹泻小鼠腹泻指数的影响,可知石油醚和氯仿部位降低小鼠腹泻指数的作用较强,提示二神丸中产生止泻作用的主要是极性较小的化学成分。

经不同部位指纹图谱与其温脾止泻药效的灰关联分析,可知多种成分对二神丸止泻药效的关联度均较大,推测药效成分不是单一成分,可能是多种成分共同产生作用的,二神丸不同部位指纹图谱与其温脾止泻药效之间有一定的对应关系。

本实验在建立二神丸不同提取部位的指纹图谱时,考察了甲醇-水和乙腈-水2种流动相系统,结果表明以乙腈-水系统进行梯度洗脱时各色谱峰的分离效果较好,且色谱峰的数目较多,故选用乙腈-水系统为流动相;考察了25、30、35℃3种柱温,表明35℃是色谱峰的分离效果优于其他2种柱温;对于检测波长的选择,采用DAD检测器考察了210、230、246、254、270、280 nm,在230 nm时分离效果最佳;考察了溶解样品溶剂,单独用甲醇溶解时样品溶液较浑浊,放置后有白色絮状沉淀析出,在甲醇中加入不同比例的氯仿后沉淀逐渐溶解,用甲醇-氯仿(7:3)作溶剂时各部位样品溶解完全。

饮片炮制和复方入药是中医用药的特色,近年来对中药炮制的研究多局限于单味药,很少纳入复方中研究,导致中药炮制的研究与中医临床复方入药的实际不相符。本实验将中药炮制纳入复方二神丸中展开研究,经筛选出药效最佳的炮制品组合后,经建立不同部位谱效关系以更全面地揭示其药效物质基础,为二神丸中药物炮制机制的研究提供依据。

参考文献

- [1] 王 缙,付庆会. 宋明期间二神丸和五味子散两方的发展演变[J]. 四川中医, 2010, 28(9): 115-116.

- [2] 潘新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. 补骨脂、肉豆蔻炮制前后在“二神丸”中对脾肾阳虚泄泻小鼠的止泻研究 [J]. 中成药, 2014, 36(5):1059-1062.
- [3] 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: 人文社会医学版, 2007, 28(3): 76.
- [4] 林辉, 胡昌江, 李兴迎, 等. 正交试验法优选补骨脂的盐炙工艺 [J]. 中国药业, 2008, 17(7): 35-36.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 人民卫生出版社, 2006.
- [9] 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.
- [10] 张静, 杨义芳, 吴春珍, 等. 当归-川芎药对超临界提取物配伍红花抗心肌缺血的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1944-1950.
- [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] 张华锋, 刘炯, 张杰, 等. 基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2696-2702.
- [13] 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.