

基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系

帖晓燕¹, 戴海蓉², 辛国雄¹, 张云鹤¹, 张文广¹, 王丹¹, 李芸^{1*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 平凉市中医医院, 甘肃 平凉 744000

摘要: 目的 研究甘草汁蒸制前后高乌头 *Aconitum sinomontanum* 石油醚部位 HPLC 指纹图谱与行气药效之间的相关性, 为明确甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位理气药效物质基础提供实验依据。方法 通过 HPLC 法建立 10 批不同产地生、制高乌头石油醚部位 (S1~S10、Z1~Z10) 指纹图谱; 采用炭末推进法评价甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位的行气作用; 同时采用灰色关联度分析方法, 对 7 批生、制高乌头石油醚部位进行谱效相关性分析, 找到各自药效贡献较大成分, 评价二者相似性。结果 不同产地生、制高乌头石油醚部位有促进小鼠小肠运动的作用, 其中以 Z2、S3 作用能力最强。甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位发挥行气作用的药效是多种成分共同作用的结果, 其中生品高乌头石油醚部位各共有峰所代表的化学成分对其行气作用贡献的大小顺序为 (关联度 > 0.8) 40 号峰 > 7 号峰 > 30 号峰 > 14 号峰 > 36 号峰 > 24 号峰 > 13 号峰 > 15 号峰 > 33 号峰 > 23 号峰 > 41 号峰 > 43 号峰 > 9 号峰 > 21 号峰 > 28 号峰 > 31 号峰 > 37 号峰 > 17 号峰 > 34 号峰; 制品高乌头石油醚部位各共有峰所代表的化学成分对其行气作用贡献的大小顺序为 (关联度 > 0.8) 41 号峰 > 29 号峰 > 4 号峰 > 27 号峰 > 30 号峰 > 33 号峰 > 34 号峰 > 20 号峰 > 1 号峰 > 45 号峰 > 22 号峰 > 19 号峰 > 38 号峰 > 31 号峰 > 18 号峰 > 14 号峰 > 28 号峰。结论 通过谱效关系研究获得了甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位的行气药效物质群, 其行气药效是多种成分共同作用的结果, 为探索甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用物质基础的研究提供了参考。

关键词: 高乌头; 制高乌头; 甘草汁; 石油醚部位; 谱效关系; 行气; 灰色关联分析; HPLC; 指纹图谱; 炭末推进法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)05-1303-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.010

Spectrum-effect relationship of petroleum ether fraction of *Aconitum sinomontanum* for promoting *qi* before and after steaming with licorice juice based on grey correlation analysis

TIE Xiao-yan¹, DAI Hai-rong², XIN Guo-xiong¹, ZHANG Yun-he¹, ZHANG Wen-guang¹, WANG Dan¹, LI Yun¹

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Pingliang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Pingliang 744000, China

Abstract: Objective To study the correlation between HPLC fingerprint of petroleum ether fraction and promoting *qi* effect of Wutou (*Aconitum sinomontanum*) before and after steaming with licorice juice, and provide experimental basis for clarifying the promoting *qi* material basis of petroleum ether fraction of *A. sinomontanum* before and after steaming of licorice juice. **Methods** HPLC method was applied to establish the fingerprint chromatography of 10 batches of raw and processed *A. sinomontanum* petroleum ether fraction at different habitats, and the effect of promoting *qi* of petroleum ether fraction of *A. sinomontanum* before and after steaming with licorice juice was evaluated by carbon powder propulsion method. At the same time, the method of grey correlation analysis was used to analyze the spectral correlation of seven batches of raw and processed *A. sinomontanum* petroleum

收稿日期: 2020-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81560650); 全国中药特色技术传承人才培养项目 (T20184828005)

作者简介: 帖晓燕 (1995—), 女, 硕士研究生, 从事中药炮制与制药工艺研究。Tel: 18153675913 E-mail: 1194570175@qq.com

*通信作者: 李芸 (1973—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药化学成分分离分析、中药加工炮制工艺研究与中药大健康产品开发。

Tel: 13893362959 E-mail: liyunherb@163.com

ether fractions, so as to find the ingredients with greater contribution to efficacy and evaluate the similarities. **Results** The raw and processed *A. sinomontanum* petroleum ether fraction at different habitats could promote the movement of small intestine in mice, among which Z2 and S3 had the strongest effect. The effect of promoting *qi* of petroleum ether fraction of *A. sinomontanum* before and after steaming with licorice juice was the result of the joint action of many components. Among them, the order of the contribution of the chemical components of petroleum ether fraction of raw *A. sinomontanum* for promoting *qi* at the common peaks was as follow ($r > 0.8$): P40 > P7 > P30 > P14 > P36 > P24 > P13 > P15 > P33 > P23 > P41 > P43 > P9 > P21 > P28 > P31 > P37 > P17 > P34. The order of the contribution of the chemical components of petroleum ether fraction of processed *A. sinomontanum* for promoting *qi* at the common peaks was as follow ($r > 0.8$): P41 > P29 > P4 > P27 > P30 > P33 > P34 > P20 > P1 > P45 > P22 > P19 > P38 > P31 > P18 > P14 > P28. **Conclusion** Through the study of spectrum-effect relationship, the active substance group of *A. sinomontanum* petroleum ether fraction before and after steaming with licorice juice was obtained, and its promoting *qi* effect was the result of the joint action of many components. It provides a reference for exploring the material basis of petroleum ether fraction of *A. sinomontanum* for promoting *qi* before and after steaming with licorice juice.

Key words: *Aconitum sinomontanum* Nakai; processed *Aconitum sinomontanum* Nakai; licorice juice; petroleum ether fraction; spectrum-effect relationship; promoting *qi*; grey correlation analysis; HPLC; fingerprint; carbon powder propulsion method

高乌头为毛茛科乌头属植物高乌头 *Aconitum sinomontanum* Nakai 的根, 又称麻布七、麻布袋、统天袋、穿心莲(四川)、麻布口袋等^[1], 在《中华本草》《中药大辞典》等本草著作中均有记载, 现收载于 2009 年版《甘肃省中药材标准》。高乌头为我国中西部地区民间习用中药, 是著名的“七药”之一^[2], 高乌头疗效良好, 却因其毒性而临床使用受限。其辛、苦、温, 有毒, 具祛风除湿、理气止痛、活血散瘀之功, 临床上常用于治疗类风湿性关节炎和局部镇痛, 还可用于治疗胃痛、脘腹胀满、急慢性菌痢、急慢性肠炎等。

高乌头含有生物碱、黄酮、甾体、糖苷类等化学成分^[3-5], 现代药理研究表明, 其具有镇痛、抗炎、局麻、解热、抗肿瘤等广泛作用^[6-7]。目前, 对高乌头报道最多的是其化学成分研究, 包括单体化合物提取、分离、衍生化等, 其次是资源开发, 包括人

工驯化及组织培养等, 而有关毒性药效的研究多以高乌甲素单体为主, 有效部位的研究较少^[8]。目前, 其理气作用的研究尚未见报道。

辛可行气, 与胃肠运动有一定联系, 为进一步全面研究高乌头石油醚部位药效作用, 更加科学地诠释该部位药效, 本实验从甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位的 HPLC 指纹图谱与行气药效的关系入手, 采用灰色关联分析^[9]对谱效关系进行研究, 从而明确其行气药效物质基础, 为高乌头的开发与应用提供实验依据和理论支持。

1 材料

10 批不同产地或采收期高乌头药材, 经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任中药师鉴定, 为毛茛科乌头属植物高乌头 *A. sinomontanum* Nakai 的干燥根, 具体编号及来源见表 1。

LDZX-30FA 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医

表 1 高乌头样品来源信息

Table 1 Source information of *A. sinomontanum* samples

编号	收集时间	采集地点	高乌头批号	制高乌头批号
1	2016-04-27	青海省海北藏族自治州海晏县	S1	Z1
2	2016-09-20	青海省西宁市大通回族土族自治县	S2	Z2
3	2016-05-05	甘肃省天祝藏族自治县先明峡	S3	Z3
4	2016-09-16	甘肃省临夏州和政县	S4	Z4
5	2016-04-27	甘肃省天祝藏族自治县朱岔峡	S5	Z5
6	2016-09-10	青海省海南藏族自治州贵德县	S6	Z6
7	2016-09-10	西藏藏族自治区日喀则地区日喀则	S7	Z7
8	2015-03-29	甘肃省天祝藏族自治县炭山岭	S8	Z8
9	2016-04-27	青海省互助土族自治县加定乡	S9	Z9
10	2016-09-08	青海省黄南藏族自治州同仁县	S10	Z10

疗器械厂; BT125D 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; KQ3200DB 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FW-400A 型高建万能粉碎机, 北京科伟永兴仪器有限公司; HHS-11S 型数显恒温水浴锅, 上海宜昌仪器纱筛厂; 1100 Series 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 科技有限公司, 含 DAD 检测器; SHB-3 型循环水多用真空泵, 郑州杜甫仪器厂; Buchi R-200 旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 实验室仪器公司。

高乌甲素对照品, 甘肃神龙药业股份有限公司, 批号 20001001, 质量分数 $\geq 98\%$; 冉乌头碱对照品, 成都克洛玛生物科技有限公司, 批号 150404, 质量分数 $\geq 98\%$; 乙腈、甲醇、三乙胺、磷酸二氢钠, 色谱纯, 天津大茂化学试剂厂; 石油醚、乙醇, 分析纯, 天津大茂化学试剂厂; 西沙比利胶囊, 山东淄博新达制药有限公司, 批号 180706, 规格 5 mg。

昆明种小鼠, SPF 级, 体质量 (20 ± 2) g, 雌雄各半, 由中国农业科学研究院兰州兽医研究所实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2015-0001。饲养条件: 甘肃中医药大学中药药理实验室, 环境温度 (23 ± 2) °C, 相对湿度 50%~60%。动物实验经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准文号 SYXK (甘) 2015-0002。

2 方法与结果

2.1 生、制高乌头饮片的制备

高乌头药材净制润软后, 切制约为 5 mm 的片段, 自然干燥, 即得高乌头生品饮片。生品饮片用 10% 的甘草汁 (3 mL 含 1 g 甘草) 润透后, 置立式压力蒸汽灭菌器内, 温度 127 °C, 压力 0.5 MPa 条件下蒸制 5 h, 取出晾干, 即得高乌头炮制品饮片^[10]。

2.2 生、制高乌头石油醚部位的制备

分别取生、制高乌头饮片, 加入 10 倍量 95% 乙醇冷浸 24 h 后超声提取, 超声 (功率 300 W、频率 40 kHz) 45 min, 冷浸超声提取 2 次, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 即得高乌头醇提物。所得稠膏继续加水制成混悬液, 用石油醚萃取 4 次, 每次 200 mL, 35 °C 以下减压回收石油醚, 即得生、制高乌头石油醚部位^[11-12]。

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液制备 分别取“2.2”项生、制高乌头石油醚部位浸膏 0.5 g, 精密称定, 加甲醇溶解, 定容至 10 mL, 密塞, 摇匀, 进样前用 0.45 μm 微孔膜滤过, 即得。

2.3.2 对照品溶液制备 分别精密称定高乌甲素、冉乌头碱对照品 8.01、2.96 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度线, 即得高乌甲素与冉乌头碱混合对照品溶液 (含高乌甲素 0.801 mg/mL、冉乌头碱 0.296 mg/mL)。

2.4 色谱条件

采用 Dikma spursil C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钠水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 洗脱条件见表 2, 进样量 10 μL , 柱温 35 °C, 检测波长 235、254、280、290、308 nm^[13-14]。

表 2 HPLC 洗脱程序

Table 2 Gradient procedures of HPLC

t/min	乙腈/%	体积流量/ (mL·min ⁻¹)	t/min	乙腈/%	体积流量/ (mL·min ⁻¹)
0	4	1.0	63	50	0.6
10	20	0.5	65	60	0.6
25	25	0.5	70	80	0.6
50	30	0.4	78	100	1.0
55	50	0.8	85	100	1.0

2.5 HPLC-DAD 指纹图谱的建立

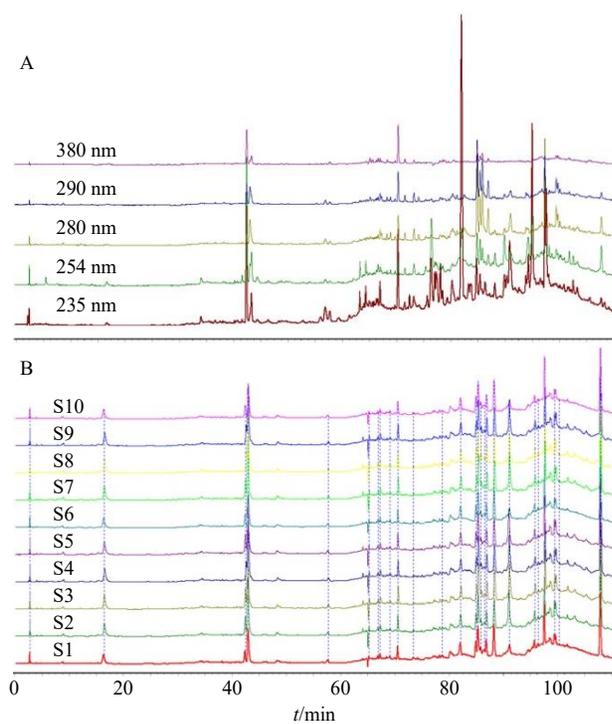
2.5.1 精密度试验 取适量高乌头石油醚部位浸膏 (S1), 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进样分析, 连续进样 6 次, 将所得色谱图数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 得到各图谱的相似度均大于 0.96, 计算 45 个主要共有峰相对保留时间 RSD < 2%, 峰面积 RSD < 2%, 表明此方法精密度较好。

2.5.2 稳定性试验 取适量高乌头石油醚部位浸膏 (S1), 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h, 按“2.4”项下色谱条件进行测定, 将所得色谱图数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 得到各图谱的相似度均大于 0.94, 计算 45 个主要共有峰相对保留时间 RSD < 2%, 峰面积 RSD < 2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 取适量高乌头石油醚部位浸膏 (S1), 按“2.3.1”项下方法平行制得 6 份供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进行测定, 将所得色谱图数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 得到各图谱的相似度均大于 0.90, 计算 45 个主要共有峰相对保留时间 RSD < 2%, 峰

面积 RSD < 2%，表明该方法重复性较好。

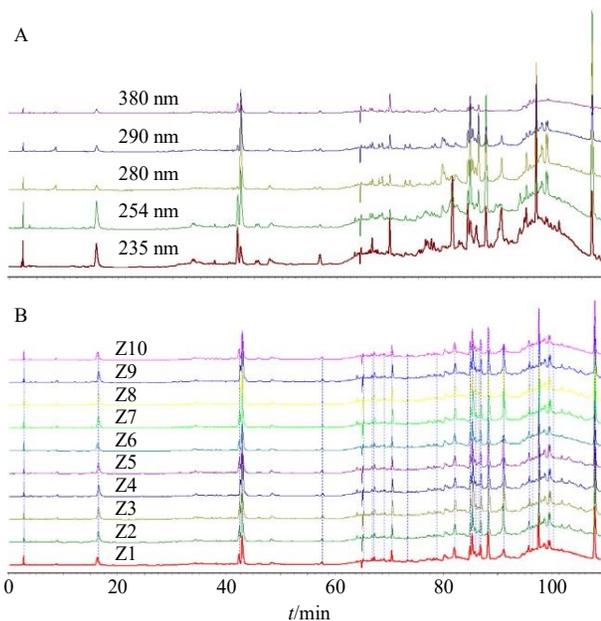
2.5.4 生、制高乌头石油醚部位 HPLC-DAD 指纹图谱建立 取“2.2”项下制备的 10 个不同批次高乌头石油醚部位，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件进样分析，每个样品选取 235、254、280、290、380 nm 5 个色谱峰信息相对丰富的波长作为匹配基准，将不同波长检测到的同一成分进行匹配，若该成分不出峰则峰积分计 0^[15-16]，将其导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，以 S1、Z1 样品为参照图谱，采用中位数矢量法进行多点校正生成生、制高乌头石油醚部位多波长融合 HPLC-DAD 指纹图谱（MWFF），并生成对照指纹图谱（R），再对其进行相似度评价。在 0~110 min 内，以稳定性和重复性好、特征明显的色谱峰作为共有峰。5 个不同波长下 10 批生、制高乌头石油醚部位的 HPLC 图谱、MWFF 指纹图谱共有模式及对照指纹图谱分别见图 1~3，生、制高乌头石油醚部位的共有峰峰面积见表 3、4。每批生、制高乌头石油醚部位样品非共有峰总面积占总峰面积的比值均 < 10%，符合指纹图谱要求。



A-5 个波长 HPLC 共有指纹图谱 B-MWFF 共有模式
A-HPLC chromatogram at five wavelengths B-MWFF common pattern

图 1 10 批 (S1~S10) 生高乌头石油醚部位的 HPLC 多波长指纹图谱

Fig. 1 MWFF of petroleum ether fraction of 10 batches of raw *A. sinomontanum* (S1—S10)



A-5 个波长 HPLC 共有指纹图谱 B-MWFF 共有模式
A-HPLC chromatogram at five wavelengths B-MWFF common pattern

图 2 10 批 (Z1~Z10) 制高乌头石油醚部位的 HPLC 多波长指纹图谱

Fig. 2 MWFF of petroleum ether fraction of 10 batches of processed *A. sinomontanum* (Z1—Z10)

2.6 高乌头石油醚部位行气作用的影响

取昆明种小鼠 224 只，雌雄各半，按随机数字表随机各分为 16 组，每组 14 只，雌雄各 7 只，即对照组（0.5% 甲基纤维素）、阳性组（西沙比利 0.1 mg/kg），S1~S7、Z1~Z7 组，分别称取 S1~S7、Z1~Z7 组的高乌头石油醚部位于量瓶中，加入 0.5% 甲基纤维素制成混悬液进行使用，配制成 3.04 mg/mL 的生品高乌头石油醚部位混悬液及 4.39 mg/mL 的制品高乌头石油醚部位混悬液，各组小鼠按 20 mL/kg 进行 ig 给药，1 次/d，连续给药 7 d，于末次给药前禁食 12 h，给药后 30 min，每只小鼠 ig 给予新鲜配制的炭末混悬液（活性炭和阿拉伯树胶各含 10%）0.4 mL，20 min 后脱颈椎处死，打开腹腔分离肠系膜，剪取上端至幽门，下端至回盲部的肠管。轻轻将小肠拉成直线，测量小肠全长与从幽门至炭末前沿的距离，计算小肠推进率，结果见表 5。

$$\text{小肠推进率} = \frac{\text{炭末推进长度}}{\text{小肠长度}}$$

2.7 生、制高乌头石油醚部位 HPLC 图谱与行气作用的灰色关联分析

2.7.1 原始数据的无量纲化处理 原始数据的变换采用均值化变换法。变换的母序列记为 $\{Y_0(k)\}$ ，子

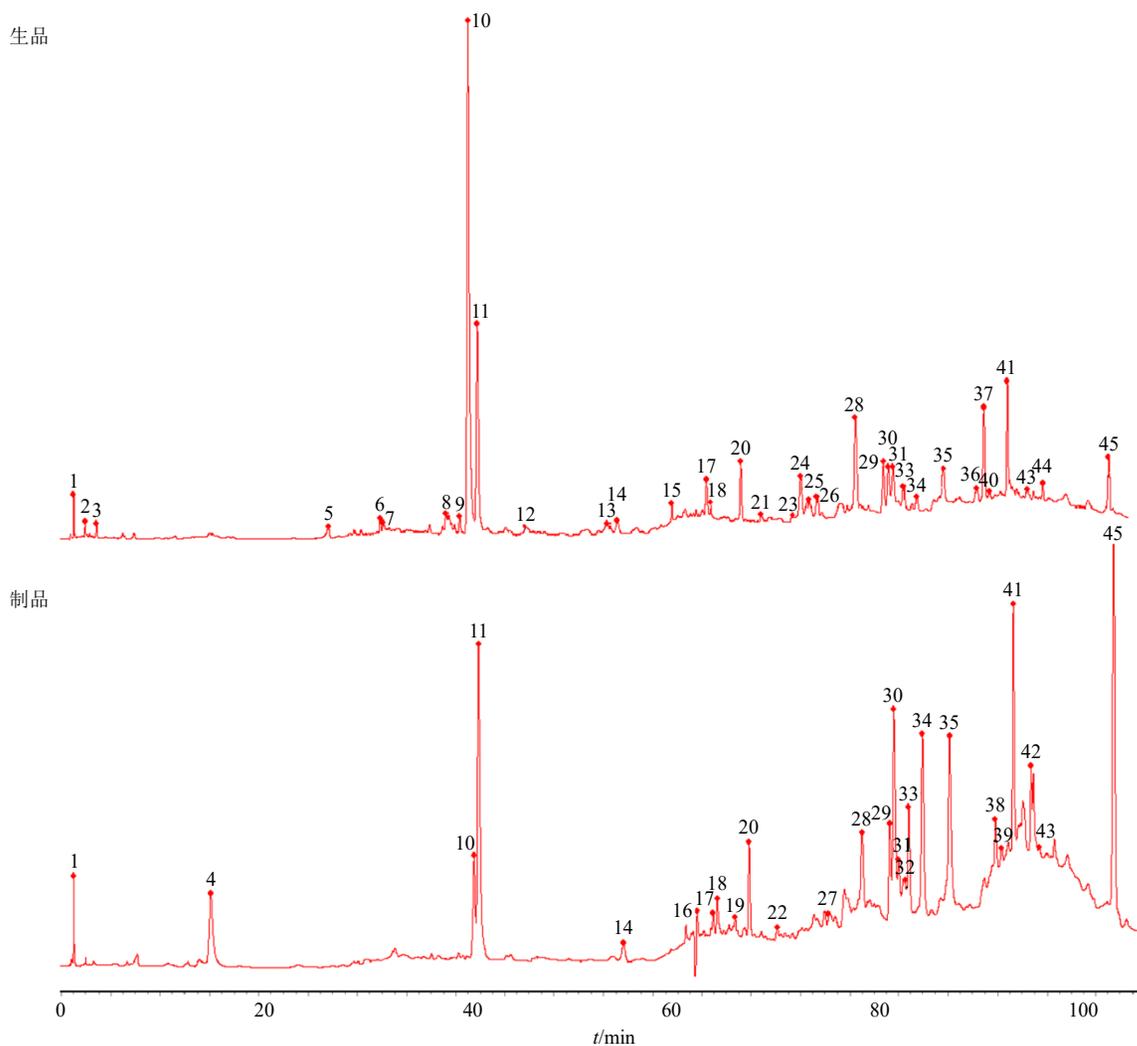


图3 生、制高乌头石油醚部位多波长 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 3 Control fingerprint of petroleum ether fractions of raw and processed *A. sinomontanum*

序列记为 $\{Y_i(k)\}$ 。将生、制高乌头石油醚部位行气作用的药效指标作为母序列，生、制高乌头石油醚部位的共有峰峰面积作为子序列。

2.7.2 绝对差序列及关联系数的计算 在 $t=k$ 时 (k 为不同产地批次编号)，母序列记为 $\{Y_0(k)\}$ ，子序列记为 $\{Y_i(k)\}$ ，母序列与子序列的绝对差序列 $\delta_{0i}(k) = |Y_0(k) - Y_i(k)|$ ($1 \leq i \leq m$)。计算在 $t=k$ 时母序列与子序列的关联系数 $\eta(k)$ 。

$$\eta(k) = (\min_{\min} |Y_0(k) - Y_i(k)| + \rho \cdot \max_{\max} |Y_0(k) - Y_i(k)|) / (|Y_0(k) - Y_i(k)| + \rho \cdot \max_{\max} |Y_0(k) - Y_i(k)|)$$

$Y_0(k)$ 为生、制高乌头石油醚部位行气作用药效指标； $Y_i(k)$ 为生、制高乌头石油醚部位各共有峰峰面积归一化数值； k 为不同产地批次编号； i 为峰号； ρ 为分辨系数，在 $0 \sim 1$ 取值，若 ρ 越小，关联系数间差异就越大，区分能力也越强，通常 ρ 取 0.5 ； $|Y_0(k) - Y_i(k)|$ 为母序列与子序列的绝对差值；

$\min_{\min} |Y_0(k) - Y_i(k)|$ 为绝对差值的最小值，又记为 δ_{\min} ； $\max_{\max} |Y_0(k) - Y_i(k)|$ 为绝对差值的最大值，又记为 δ_{\max} 。

2.7.3 关联度 (r) 的计算 r 实质上是对时间序列几何关系的比较，是母序列与子序列各个时刻的关联系数的平均值，结果见表 6、7。

$$r = 1/m \cdot \sum_{k=1}^m \eta$$

m 为子序列的数据个数

由表 6、7 中 7 批不同产地生、制高乌头石油醚部位共有峰与其行气作用的关联分析数据可知，生品高乌头石油醚部位各成分对行气作用药效贡献度较大的共有峰 (峰号) 主要有峰 $40 > 7 > 30 > 14 > 36 > 24 > 13 > 15 > 33 > 23 > 41 > 43 > 9 > 21 > 28 > 31 > 37 > 17 > 34 > 1 > 20 > 35 > 6 > 45 > 3 > 44 > 26 > 29 > 11 > 10 > 25 > 18 > 2 > 8 > 12 > 5$ ，其中峰

表3 生品高乌头石油醚部位指纹图谱共有峰峰面积

Table 3 Common peak area of fingerprint of petroleum ether fractions of raw *A. sinomontanum*

峰号	峰面积							峰号	峰面积						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
1	18.59	11.13	13.80	9.32	11.88	6.97	22.34	23	21.07	23.65	24.54	42.68	18.31	31.14	24.21
2	7.50	0.00	6.33	7.19	0.00	0.00	6.81	24	118.57	189.28	201.15	189.27	142.14	166.80	241.30
3	18.01	0.00	20.11	12.44	19.17	24.92	10.84	25	0.00	0.00	82.59	154.17	56.23	0.00	95.61
5	0.00	0.00	0.00	36.35	0.00	34.74	28.97	26	99.18	70.71	124.36	0.00	57.76	127.72	157.07
6	12.86	0.00	10.93	19.45	11.10	10.96	19.81	28	271.22	301.03	504.91	366.22	96.11	483.30	368.67
7	20.59	30.65	25.01	24.90	21.31	24.43	24.98	29	0.00	120.64	70.98	0.00	73.14	88.67	71.92
8	0.00	0.00	12.75	48.36	0.00	59.35	46.93	30	83.11	115.80	81.05	88.51	88.05	90.85	97.08
9	16.77	32.04	41.03	38.53	28.07	49.46	23.70	31	70.99	89.01	140.89	70.40	47.80	129.53	73.26
10	301.75	244.82	280.98	319.05	275.79	914.53	673.07	33	45.82	77.76	63.24	43.35	36.43	61.29	48.79
11	116.89	74.90	142.20	430.76	87.31	218.38	337.30	34	31.44	85.60	42.70	38.33	46.46	38.90	60.97
12	0.00	0.00	0.00	27.72	30.50	0.00	47.69	35	46.77	268.36	194.63	87.43	186.78	151.55	177.25
13	71.17	77.00	72.86	117.35	78.36	104.90	79.96	36	56.43	60.43	41.54	53.21	55.63	42.80	59.58
14	73.04	71.42	79.86	55.27	84.98	79.59	53.32	37	113.08	255.75	254.95	297.92	104.06	224.61	330.54
15	24.63	23.47	25.25	47.20	25.23	26.73	30.53	40	118.59	135.83	125.44	160.52	127.39	143.20	139.05
17	23.62	9.80	21.97	30.88	21.56	16.37	36.30	41	109.45	92.79	125.71	80.12	47.89	87.00	63.57
18	0.00	28.70	23.34	0.00	27.13	0.00	34.98	43	14.98	31.16	36.53	28.23	23.45	15.53	24.60
20	34.24	91.06	49.01	71.53	31.72	51.98	67.97	44	20.73	78.77	31.10	34.71	18.45	24.88	53.01
21	30.95	29.04	39.37	55.65	29.54	59.52	31.77	45	66.10	271.68	110.59	162.79	73.91	82.48	112.46

表4 制品高乌头石油醚部位指纹图谱共有峰峰面积

Table 4 Common peak area of fingerprint of petroleum ether fractions of processed *A. sinomontanum*

峰号	峰面积							峰号	峰面积						
	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7		Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7
1	17.68	17.54	39.19	23.39	22.63	23.60	28.56	29	109.26	101.11	133.85	109.67	104.47	90.51	132.76
4	157.28	143.08	176.24	122.44	117.41	112.06	157.28	30	208.86	214.21	368.25	241.32	233.81	245.11	117.75
10	82.68	438.66	908.41	122.34	129.76	134.71	446.49	31	79.41	77.75	102.66	80.73	79.17	90.95	209.77
11	226.81	27.93	67.93	369.30	387.79	395.74	203.47	32	118.95	57.64	50.05	177.48	161.41	194.47	69.84
14	54.89	43.02	106.00	61.63	59.90	66.33	110.76	33	114.09	95.86	156.01	137.33	132.73	142.77	76.73
16	56.69	63.75	290.41	75.97	80.33	89.73	76.83	34	253.19	224.93	406.07	231.29	231.38	242.44	75.90
17	14.99	14.28	54.71	16.58	15.81	16.55	26.07	35	140.65	244.74	457.63	369.16	374.07	373.93	156.70
18	29.00	35.18	94.98	36.56	38.41	38.03	42.32	38	79.01	83.53	31.24	103.76	95.90	107.24	103.35
19	14.10	16.96	33.30	13.99	13.93	18.56	16.75	39	48.11	32.28	288.07	54.47	47.89	62.79	20.53
20	55.65	58.43	134.54	68.44	69.99	72.73	70.81	41	257.29	248.10	273.68	273.85	309.32	303.44	271.57
22	19.02	22.38	33.95	15.54	15.42	15.92	17.19	42	56.25	72.39	123.93	92.26	109.69	139.10	19.24
27	51.66	61.52	62.33	46.21	46.26	46.62	83.64	43	17.28	37.89	96.01	88.18	114.50	121.45	16.32
28	270.21	327.84	463.20	263.13	267.62	276.54	788.31	45	473.18	457.81	891.76	521.69	487.85	521.69	167.05

40、7、30、14、36、24、13、15、33、23、41、43、9、21、28、31、37、17、34 的关联度均大于0.8, 初步确定这 19 个峰作为行气作用的主要成分;

制品高乌头石油醚部位各成分对行气作用药效贡献度较大的共有峰(峰号)主要有峰 41>29>4>27>30>33>34>20>1>45>22>19>38>31>

表 5 生、制高乌头石油醚部位对正常小鼠肠推进的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Table 5 Effects of raw and processed *A. sinomontanum* petroleum ether fraction on small bowel movement in normal mice ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	推进率/%	组别	推进率/%
对照组	57.18±10.23	S4	64.43±5.65*
阳性组	70.33±5.94**	Z4	63.94±7.33*
S1	60.91±9.55	S5	61.89±6.60
Z1	62.03±6.28	Z5	61.23±9.36
S2	63.14±7.94	S6	64.73±8.17*
Z2	66.79±6.32**	Z6	64.15±7.06*
S3	68.54±7.44**	S7	61.81±10.34
Z3	64.89±8.13*	Z7	64.80±8.80*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

表 6 生高乌头石油醚部位关联序结果

Table 6 Results of correlation sequence of petroleum ether fraction of raw *A. sinomontanum*

关联序	峰号	关联度	关联序	峰号	关联度
1	40	0.937 4	19	34	0.806 2
2	7	0.931 5	20	1	0.792 7
3	30	0.922 2	21	20	0.788 9
4	14	0.899 1	22	35	0.784 9
5	36	0.889 2	23	6	0.776 1
6	24	0.883 2	24	45	0.753 1
7	13	0.879 6	25	3	0.748 9
8	15	0.859 8	26	44	0.733 9
9	33	0.859 3	27	26	0.733 5
10	23	0.848 0	28	29	0.696 8
11	41	0.846 1	29	11	0.691 8
12	43	0.843 0	30	10	0.667 9
13	9	0.834 9	31	25	0.606 3
14	21	0.819 2	32	18	0.572 7
15	28	0.817 1	33	2	0.566 7
16	31	0.813 5	34	8	0.532 4
17	37	0.811 9	35	12	0.499 5
18	17	0.809 3	36	5	0.493 2

18>14>28>35>42>17>16>32>11>43>39>10; 其中峰 41、29、4、27、30、33、34、20、1、45、22、19、38、31、14、28 的关联度均大于 0.8, 初步确定这 17 个峰作为行气作用的主要成分, 说明甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位的行气作

表 7 制高乌头石油醚部位关联序结果

Table 7 Results of correlation sequence

关联序	峰号	关联度	关联序	峰号	关联度
1	41	0.955 0	14	31	0.844 4
2	29	0.932 3	15	18	0.837 2
3	4	0.909 2	16	14	0.835 3
4	27	0.898 9	17	28	0.804 6
5	30	0.888 8	18	35	0.798 0
6	33	0.881 0	19	42	0.792 8
7	34	0.880 8	20	17	0.781 4
8	20	0.880 3	21	16	0.769 4
9	1	0.879 1	22	32	0.759 9
10	45	0.879 1	23	11	0.7394
11	22	0.874 6	24	43	0.707 8
12	19	0.869 9	25	39	0.701 4
13	38	0.869 0	26	10	0.678 5

用是“化学成分群”共同作用的结果, 经过与对照品和文献信息进行指认后, 确定 10 号峰为高乌甲素, 11 号峰为冉乌头碱。

3 讨论

本研究对甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位 HPLC 指纹图谱特征与其行气作用量化数据的基础上, 采用灰度关联分析技术, 确定了指纹图谱特征峰所代表的化学成分对行气作用贡献的大小。以 235、254、280、290、308 nm 5 个最丰富的色谱峰为分析对象, 通过对高乌头生品及制品石油醚部位指纹图谱色谱峰的归属和比较, 发现炮制后高乌头石油醚部位多波长融合 HPLC-DAD 指纹图谱整体图貌、色谱峰检出数目及各色谱峰峰面积的变化均比较明显, 具体表现为 (1) 高乌甲素与冉乌头碱的比例由 2:1 变成 1:2; (2) 比较高乌头生、制品石油醚部位的特征色谱峰的检出数量发现, 制品石油醚部位新增了 8 个色谱峰, 消失了 18 个峰, 其色谱峰检出数目的多少反映了样品炮制前后化学成分种类的增减情况; (3) 各色谱峰峰面积的变化反映了该化学成分量的变化。由图 3、表 5 可知, 甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位指纹图谱发生了显著改变, 高乌头石油醚部位经甘草汁蒸制后仍然具有行气功效; 由表 6、7 数据可知, 生品高乌头石油醚部位 40、7、30 号峰及制品高乌头石油醚部位 41、29、4 号峰所代表的化学成分对行气作用贡献显著 (关联度>0.9)。

毒性中药的炮制应该从减毒和存效 2 个方面着手。甘草汁作为一种常用的炮制辅料,其解毒作用早在《神农本草经》中就有记载,历代炮制有毒药物如半夏、川乌等都用甘草解毒。在以往的乌头类中药配伍组方中以甘草和肉桂为多,减毒机制可能为促进肝药酶代谢或形成难溶性络合物^[17-18]。现代药理学研究表明,甘草甜素、甘草次酸等成分是甘草减毒的物质基础,其具有在体内或体外与毒物发生化学反应、肾上腺皮质激素样作用、多种药理活性对抗中毒症状、调节肝脏细胞色素 P450 酶系代谢以及诱导 P-糖蛋白表达等多种解毒机制^[19-25],但其解毒机制有待深入研究。乌头类药材中含有大量的双酯型生物碱,受热的状况下容易水解,使其毒性降低。高乌头经甘草汁蒸制后毒性、药效发生变化,其根源是内在物质基础发生了改变,炮制后消失的成分和含量降低的成分是高乌头表现出“减毒”的物质基础,炮制后产生大量新的物质及含量增高的成分,很可能是高乌头“存效”的物质基础。

高乌头含有生物碱,其石油醚部位多含挥发油,推测挥发油和生物碱类成分可能是高乌头“辛”味物质基础。因此,本研究基于石油醚部位所含化学成分的特殊性,从对胃肠运动的作用角度切入,首次以炭末推进实验探索了高乌头行气的功效,进一步全面诠释高乌头药效。该研究表明高乌头石油醚部位经甘草汁蒸制后仍然具有行气功效,这一结果与中药炮制存效的目的相符合。而不同产地高乌头石油醚部位药效研究比较,发现其行气作用存在差异,这与中药的药效受区域性影响较大的观点相一致^[26-27]。

生品高乌头石油醚部位 40、7、30 号峰及制品高乌头石油醚部位 41、29、4 号峰,对高乌头的药效具有较大的影响,介于目前没有对照品,下一步可通过质谱等手段进一步分析检测并鉴定成分,为明确药效成分提供理论基础。此外,甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位的行气作用可能是多成分共同作用的结果,提示下一步的工作重点将是对这 6 种药效成分进行定量分析以及药效评价等研究,以期可以进一步明确甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用的谱效关系,为科学阐明高乌头行气作用的药效物质基础提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 徐斌,张琴,郭夫江,等.高乌头的研究进展[J].中成

药,2016,38(4):882-890.

- [2] Shrestha B B, Dall'Acqua S, Gewali M B, et al. New flavonoid glycosides from *Aconitum naviculare* (Brühl) Stapf, a medicinal herb from the *trans*-Himalayan region of Nepal [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(12): 2161-2165.
- [3] 李芸,苗小楼,李剑勇,等.高乌头的研究进展[J].中药材,2015,38(11):2439-2441.
- [4] 谢海辉,韦璧瑜.高乌头的化学成分及其药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2010,22(B08):232-235,154.
- [5] 王菲,张娇,李玉泽,等.麻布七中 1 个新的二萜类生物碱[J].中草药,2021,52(3):626-629.
- [6] 魏华波,张宝华,谭兵,等.氢溴酸高乌甲素的药理作用及临床应用研究进展[J].重庆医学,2014,43(20):2660-2662.
- [7] 宋慧慧.高乌甲素的提取、衍生化与抗肿瘤活性研究[D].西安:陕西科技大学,2017.
- [8] 张立军,戴海蓉,杨志军,等.高乌头炮制前后镇痛抗炎活性部位 HPLC 指纹图谱建立及质量研究[J].中草药,2017,48(12):2442-2447.
- [9] 陈勇,陈明,王钧,等.基于灰色关联分析法辨识中药生产过程关键工艺参数[J].中草药,2019,50(3):582-587.
- [10] 李芸,胡昌江,侯桃霞,等.正交实验优选高乌头解毒的炮制工艺研究[J].中成药,2015,37(4):905-909.
- [11] 张立军,戴海蓉,杨志军,等.高乌头炮制前后毒性部位与镇痛抗炎药效部位筛选研究[J].中药药理与临床,2017,33(4):78-82.
- [12] 李芸,张立军,杨志军,等.甘草汁蒸制的高乌头不同溶剂萃取部分口服后在小鼠的急性毒性比较研究[J].中国临床药理学杂志,2017,33(1):47-50.
- [13] 李芸,张立军,戴海蓉,等.高乌头炮制品不同溶剂萃取部分 HPLC 多波长指纹图谱研究[J].中国中医药信息杂志,2018,25(10):66-72.
- [14] 李芸,张立军,戴海蓉,等.高乌头不同溶剂萃取部位 HPLC 多波长指纹图谱研究[J].中药新药与临床药理,2018,29(5):630-636.
- [15] 孙国祥,车磊,李闫飞.一种评价多波长中药色谱指纹图谱新方法-均谱法[J].中南药学,2011,9(7):533-538.
- [16] 王涛,张慧,古咸杰,等.川芎多波长叠加指纹图谱初步研究[J].药物分析杂志,2017,37(9):1648-1653.
- [17] 魏旭雅,邱子栋,陈金龙,等.有毒乌头类中药炮制与配伍减毒机制的研究进展[J].中国中药杂志,2019,44(17):3695-3704.
- [18] 曹玉洁,唐于平,沈娟,等.基于数据挖掘分析甘草药对配伍应用规律[J].中草药,2017,48(21):4552-4559.
- [19] 陆秀萍,叶林军.甘草的解毒作用及机理[J].海峡药

- 学, 2007, 19(2): 82-83.
- [20] 何丹, 刘凤琴, 李焕德. 甘草解毒作用研究进展 [J]. 中南药学, 2009, 7(12): 927-931.
- [21] 李鹏杰, 邓毅, 曼琼, 等. 甘草解毒现代研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(3): 137-140.
- [22] 张靖, 胡骞, 谭亲友, 等. 甘草提取物对雷公藤甲素损伤后人肝 L-02 细胞中 UGT1A、MRP2 表达的影响 [J]. 中国药房, 2018, 29(1): 65-68.
- [23] Lu Y, Xie T, Zhang Y, *et al.* Triptolide Induces hepatotoxicity via inhibition of CYP450s in rat liver microsomes [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 15.
- [24] 谭亲友. 甘草酸 18H 差向异构体及其水解产物对 II 相解毒酶的影响及其机制的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [25] 田圣志, 赖宝林, 施钧翰, 等. 甘草解毒作用研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(9): 560-562.
- [26] 许阳光, 曹晨, 尚明英, 等. 不同产地北细辛和华细辛镇痛抗炎药效学评价 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 625-631.
- [27] 刘小花. 基于抗胃溃疡作用的黄芪谱效关系和相关成分的体内代谢研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2015.

[责任编辑 郑礼胜]