

基于盐炙前后成分煎出差异与止泻作用相关性探讨补骨脂丸增效机制

毋启桐¹, 王金金¹, 杨安南¹, 周宁^{1,2}, 赵强³, 李凯^{1,2*}, 张振凌^{1,2*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046

3. 湖北省药品监督管理局技术审评核查中心, 湖北 武汉 430071

摘要: 目的 探讨盐炙对补骨脂丸中代表性成分煎出的影响, 以及成分与止泻药效的相关性。方法 采用 HPLC-MS 法测定补骨脂丸及 3 种补骨脂丸模拟品水煎液中 13 种代表性成分的含量差异, 并结合不同给药组对脾肾阳虚泄泻模型大鼠的胃肠激素和下丘脑-垂体-肾上腺轴相关指标的影响, 采用灰色关联分析法, 对代表性成分与止泻药效进行相关性分析, 寻找药效贡献较大成分。结果 与 3 种模拟品(模拟 I~III 号)相比, 补骨脂丸水煎液中黄酮类成分如芦丁、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、异补骨脂查耳酮及补骨脂二氢黄酮甲醚的含量较高, 挥发油类成分如茴香醛、反式茴香脑及补骨脂酚的含量较低; 与模拟 II、III 号相比, 香豆素类成分如补骨脂素及异补骨脂素的含量较低。不同成分对止泻药效的贡献具有差异, 黄酮类和挥发油类成分与止泻药效的关联度较高, 香豆素类成分(如补骨脂素与异补骨脂素)与止泻药效的关联度较低。结论 补骨脂、小茴香盐炙后组成补骨脂丸, 能促进黄酮类成分煎出, 抑制挥发油类、香豆素类成分煎出, 这可能是盐炙增强其止泻作用的关键环节之一。

关键词: 补骨脂丸; 补骨脂; 小茴香; 盐炙; 配伍; 止泻; HPLC-MS; 脾肾阳虚; 灰色关联分析; 黄酮; 香豆素; 挥发油
中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6493-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.006

To explore synergistic mechanism of Buguzhi Pills based on correlation between antidiarrheal effect and difference of ingredients before and after salt processing

WU Qi-tong¹, WANG Jin-jin¹, YANG An-nan¹, ZHOU Ning^{1,2}, ZHAO Qiang³, LI Kai^{1,2}, ZHANG Zhen-ling^{1,2}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. Center for Evaluation and Inspection of Hubei Medical Products Administration, Wuhan 430071, China

Abstract: Objective To explore the influence of salt processing on the representative decoction components of Buguzhi Pills (补骨脂丸), and the correlation between the components and the antidiarrhea effect. **Methods** HPLC-MS was used to determine the differences of 13 representative components in decoction of Buguzhi Pills and three simulants of Buguzhi Pills. Combined with the different experimental groups' results on spleen-kidney yang deficiency diarrhea model rats about their gastrointestinal hormone and related indexes of hypothalamus-pituitary-adrenal axis, then gray correlation analysis method was used to analyze the correlation between the ingredients and the antidiarrhea effects to determine major contributors in efficacy. **Results** Compared with the three simulants, the decoction of Buguzhi pills was higher in flavonoids such as rutin, isobavachin, neobavaisoflavone, bavachin, corylin, isobavachalcone and bavachinin, while it was lower in volatile oils, for instance, anisaldehyde, trans-anethol and bakuchiol. Moreover, compared with the group II and III, it was lower in coumarins like psoralen and isopsoralen. And the ingredients vary in the antidiarrhea efficacy: The flavonoid and volatile oil were highly correlated with the antidiarrhea efficacy, whereas the coumarin (such as psoralen and isopsoralen) had a low correlation. **Conclusion** After salt processing, *Psoraleae Fructus* and *Foeniculif*

收稿日期: 2021-06-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81873005); 河南省高校科技创新人才支持计划(21HASTIT047); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2018GGJS083); 大学生创新创业训练计划项目(201810471002)

作者简介: 毋启桐(1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药炮制物质基础及炮制机制研究。E-mail: 1106766001@qq.com

*通信作者: 李凯, 男, 教授, 硕士生导师, 从事中药炮制研究。Tel: (0371)65962746 E-mail: cpulikai@163.com

张振凌, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制研究。Tel: (0371)65962746 E-mail: zhangzhenling@163.com

Fructus formed Buguzhi Pills, which can promote the dissolution of flavonoids and inhibit the dissolution of volatile oils and coumarins, this may be one of the key processes in salt processing to enhance the antidiarrhea effect.

Key words: Buguzhi Pills; *Psoraleae Fructus*; *Foeniculif Fructus*; salt processing; compatibility of medicines; antidiarrheal; HPLC-MS; spleen-kidney yang deficiency; gray correlation analysis; flavonoids; coumarin; volatile oils

补骨脂丸来源于宋《魏氏家藏方》^[1],由盐补骨脂和盐小茴香组成,治肾气虚冷、小便无度。盐炙主要作用为“引药下行走肾经”,补骨脂、小茴香盐炙后配伍使用功效更著,入下焦则温肾散寒,入中焦则温脾暖胃。但盐炙后中药配伍增效的物质基础研究还相对缺乏。灰色关联分析法通常用来明确因素间关联程度,通过比较 2 个系统数据发展曲线的接近程度,来推测系统间关联强弱,发展曲线越接近,即变化趋势越接近,关联度就越大^[2],近年来常被用来探讨成分与药效指标的关联性,从而探寻中药作用的物质基础。

补骨脂丸中主要含有香豆素类、黄酮类、挥发油类等成分^[3-4]。汤剂是临床主要应用形式,补骨脂、小茴香为临床常用药对,既可作为传统丸剂,也可作为汤剂使用,为便于研究,本实验将补骨脂丸及 3 种补骨脂丸模拟品(模拟 I 号:盐补骨脂、生小茴香;模拟 II 号:生补骨脂、盐小茴香;模拟 III 号:生补骨脂、生小茴香)制备成水煎液,采用 HPLC-MS 法测定不同组合样品水煎液中香豆素类、黄酮类、挥发油类等共 13 种代表性成分含量差异,并结合相关止泻药效指标进行灰色关联分析,探讨成分与药效之间的相关性,从而丰富中药盐炙增效的科学内涵。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20ADXR 型高效液相色谱仪,配 SPD-M20A 检测器,LCMS-2020 单四级杆质谱仪,岛津企业管理(中国)有限公司;BT25S 型十万分之一分析天平,赛多利斯科技仪器有限公司;FA2104B 型电子天平,上海越平科学仪器(苏州)制造有限公司;TGL-16M 型高速冷冻离心机,常州金坛良友仪器有限公司;KQ-500DV 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DZTW 型电子调温电热套,天津工业实验室仪器有限公司。

1.2 药物与试剂

补骨脂,批号 180301,亳州市张仲景中药饮片有限责任公司,产地河南,经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为豆科植物补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 的干燥成熟果实;小茴香,

批号 170101,亳州市永刚饮片厂有限公司,产地甘肃,经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为伞形科茴香属植物茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 的干燥成熟果实;对照品补骨脂素(批号 C12J8Q39802)、异补骨脂素(批号 Y18O8H46134)、异补骨脂二氢黄酮(批号 YM0509HA14)、新补骨脂异黄酮(批号 ZN1112BD13)、补骨脂二氢黄酮(批号 C19J8G28797)、补骨脂宁(批号 ZN1112BA13)、补骨脂定(批号 Y06J9S65151)、异补骨脂查耳酮(批号 Y23J9H64242)、补骨脂二氢黄酮甲醚(批号 Y21J3S1)、补骨脂酚(批号 YM0320SA14)、芦丁(批号 Y16M9S61523)、茴香醛(批号 H04J10Z78823)、反式茴香脑(批号 Y24N6S6391)均购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均≥98%;甲醇、甲酸、乙腈均为色谱级,美国 Thermo Fisher 公司;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 盐补骨脂 取净补骨脂 1.5 kg,加食盐水(100 kg 补骨脂用食盐 2 kg)拌匀,闷润 4 h,置炒锅中,以文火(120~150 ℃)加热,炒制 8.5 min,待表面黑色或黑褐色,微鼓起,气微香,味微咸时取出,放凉^[5]。

2.1.2 盐小茴香 取净小茴香 1.5 kg,用食盐水(100 kg 小茴香用食盐 2 kg)拌匀,闷润,待食盐水被吸尽后,置炒锅内,以文火(120~150 ℃)加热,炒至微黄、微鼓起,色泽加深,偶有焦斑,味微咸时,出锅,晾凉^[6]。

2.1.3 补骨脂丸 由盐补骨脂、盐小茴香等比例组成;补骨脂丸模拟 I 号、II 号、III 号分别由盐补骨脂、生小茴香,生补骨脂、盐小茴香,生补骨脂、生小茴香等比例组成。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm);柱温 30 ℃;流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱条件:0~2 min, 5%~20%乙腈;2~5 min, 20%~32%乙腈;5~10 min, 32%乙腈;10~11 min, 32%~45%乙腈;11~23 min, 45%乙腈;23~31 min, 45%~90%

乙腈; 31~33 min, 90%~5%乙腈; 检测波长为 254 nm; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 2 μ L。

2.2.2 质谱参数 电喷雾离子源 (ESI), 选择性扫描模式, 正、负离子同时扫描, 离子源喷雾电压 4.5 kV/-3.5 kV, 加热模块温度 350 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气温度 250 $^{\circ}$ C, 雾化气体体积流量 1.5 L/min, 干燥气体体积流量 15 L/min。各成分的分子式、保留时间 (t_R)、质荷比 (m/z) 及正、负离子模式等参数见表 1。混合对照品溶液及补骨脂丸供试品溶液的 HPLC 图及正、负离子模式 (ESI⁺、ESI⁻) 下总离子流图 (TIC) 见图 1。

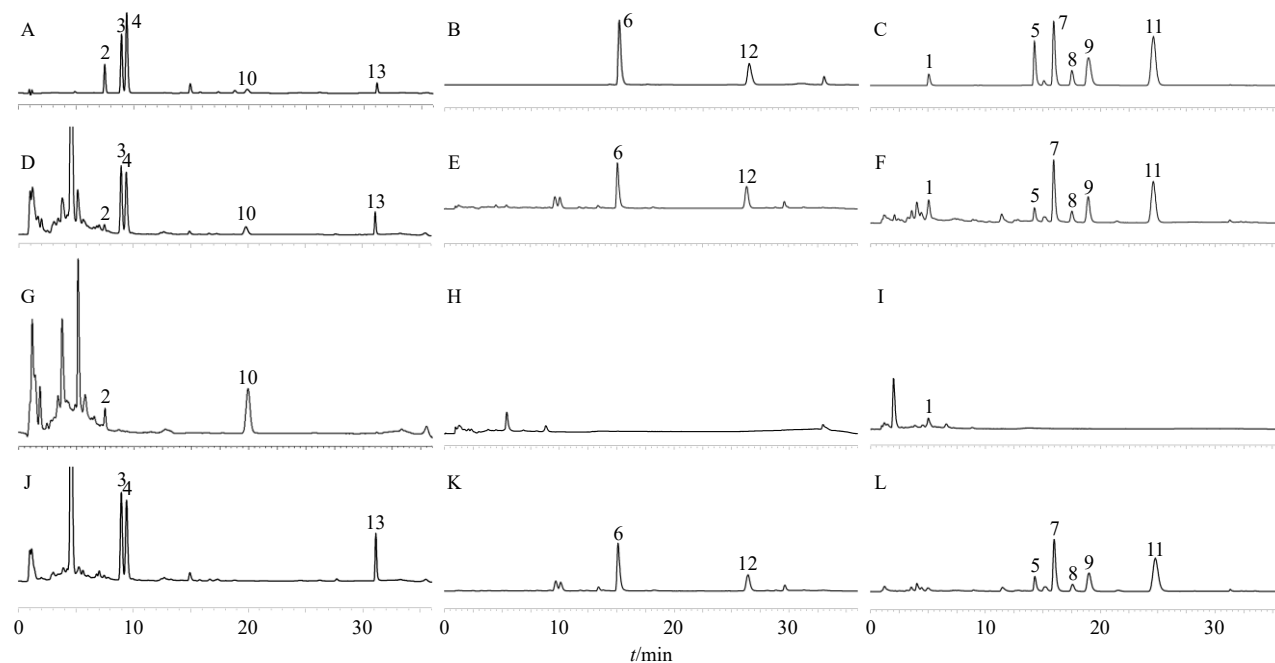
2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取芦丁、茴香醛、补骨脂素、异补骨脂素、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、反式茴香脑、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚

表 1 13 种代表性成分的检测信息

Table 1 Test information of 13 representative components

成分	分子式	t_R /min	m/z	离子模式
芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5.061	609.1	ESI ⁻
茴香醛 (HPLC)	C ₈ H ₈ O ₂	7.463	—	—
补骨脂素 (HPLC)	C ₁₁ H ₆ O ₃	8.922	—	—
异补骨脂素 (HPLC)	C ₁₁ H ₆ O ₃	9.375	—	—
异补骨脂二氢黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	14.265	323.1	ESI ⁻
新补骨脂异黄酮	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	15.063	323.1	ESI ⁺
补骨脂二氢黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	15.922	323.1	ESI ⁻
补骨脂宁	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	17.498	319.1	ESI ⁻
补骨脂定	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	18.899	335.1	ESI ⁻
反式茴香脑 (HPLC)	C ₁₀ H ₁₂ O	19.817	—	—
异补骨脂查耳酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	24.515	323.1	ESI ⁻
补骨脂二氢黄酮甲醚	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	26.264	339.0	ESI ⁺
补骨脂酚 (HPLC)	C ₁₈ H ₂₄ O	31.116	—	—



1-芦丁 2-茴香醛 3-补骨脂素 4-异补骨脂素 5-异补骨脂二氢黄酮 6-新补骨脂异黄酮 7-补骨脂二氢黄酮 8-补骨脂宁 9-补骨脂定 10-反式茴香脑 11-异补骨脂查耳酮 12-补骨脂二氢黄酮甲醚 13-补骨脂酚 A-13 种成分的混合对照品 (HPLC) B-13 种成分的混合对照品 (ESI⁺) C-13 种成分的混合对照品 (ESI⁻) D-补骨脂丸样品 (HPLC) E-补骨脂丸样品 (ESI⁺) F-补骨脂丸样品 (ESI⁻) G-缺补骨脂阴性样品 (HPLC) H-缺补骨脂阴性样品 (ESI⁺) I-缺补骨脂阴性样品 (ESI⁻) J-缺小茴香阴性样品 (HPLC) K-缺小茴香阴性样品 (ESI⁺) L-缺小茴香阴性样品 (ESI⁻)

1-rutinum 2-anisaldehyde 3-psoralen 4-isopsoralen 5-isobavachin 6-neobavaisoflavone 7-bavachin 8-corylin 9-psoralidin 10-trans-anethol 11-isobavachalcone 12-bavachinin 13-bakuchiol A-13 components mixed reference substances (HPLC) B-13 component mixed reference substances (ESI⁺) C-13-component mixed reference substances (ESI⁻) D-Buguzhi Pills sample (HPLC) E-Buguzhi Pills sample (ESI⁺) F-Buguzhi Pills sample (ESI⁻) G-negative sample without *Psoraleae Fructus* (HPLC) H-negative sample without *Psoraleae Fructus* (ESI⁺) I-negative sample without *Psoraleae Fructus* (ESI⁻) J-negative sample without *Foeniculif Fructus* (HPLC) K-negative sample without *Foeniculif Fructus* (ESI⁺) L-negative sample without *Foeniculif Fructus* (ESI⁻)

图 1 补骨脂丸中 13 种代表性成分含量测定的 HPLC 图和 TIC 图

Fig. 1 HPLC and TIC for determination of 13 representative components in Buguzhi Pills

对照品适量至 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度分别为 1.015、2.000、1.152、1.029、1.031、1.024、1.042、1.008、0.817、2.000、1.099、1.027、2.000 mg/mL 的单一对照品储备液;再分别精密量取上述单一对照品储备液适量,至同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得质量浓度分别为 4 922.75、35 000.00、131 328.00、118 849.50、2 113.55、8 845.31、10 107.40、1 310.40、5 424.88、25 000.00、7 583.10、7 529.96、208 000.00 ng/mL 的混合对照品母液;将混合对照品母液逐级稀释,得一系列不同质量浓度的混合对照品溶液,待测。

2.4 供试品溶液的制备

将盐补骨脂、盐小茴香捣碎,过 1 号药典筛。分别取盐补骨脂 20 g、盐小茴香 20 g 组成补骨脂丸,精密称定,置圆底烧瓶中,加 8 倍量水,浸泡 30 min,回流提取 30 min,滤过;再加 6 倍量水,回流提取 30 min,滤过,合并 2 次滤液,稀释至 1000 mL,离心(转速为 12 000 r/min)2 次,每次 10 min,取上清液,即得补骨脂丸供试品溶液。补骨脂丸模拟 I 号、II 号及 III 号供试品溶液的制备同上。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取各单一对照品储备液、供试品溶液、缺补骨脂阴性供试品溶液、缺小茴香阴性供试品溶液,按照“2.1”项所述的检测方法进样,13 种代表性成分分离度良好,其他成分对测定无干扰,色谱图见图 1。

2.5.2 线性关系考察、检测限和定量限 将“2.2”

项下配制的一系列混合对照品溶液按照“2.1”项所述的检测方法进样分析,以对照品的质量浓度为横坐标(X),相应峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得各指标成分的线性回归方程及相关系数(r),所有指标成分均呈现良好的线性关系。将混合对照品溶液进行连续稀释,以信噪比 3:1 和 10:1 来确定各指标成分的检测限和定量限,结果见表 2。

2.5.3 精密度试验 取混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱及质谱方法,连续进样 6 次,测得 13 种代表性成分芦丁、茴香醛、补骨脂素、异补骨脂素、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、反式茴香脑、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚峰面积的 RSD 分别为 1.12%、0.64%、0.60%、0.77%、1.13%、0.99%、0.91%、1.19%、1.02%、0.79%、1.00%、2.60%、2.89%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取模拟 III 号 6 份,精密称定,以“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱及质谱条件,记录峰面积,计算供试品溶液中 13 种代表性成分芦丁、茴香醛、补骨脂素、异补骨脂素、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、反式茴香脑、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚质量分数的 RSD 分别为 3.36%、2.91%、1.63%、3.66%、3.10%、4.87%、4.06%、3.54%、4.39%、4.16%、4.43%、3.18%、4.72%,表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取同一模拟 III 号供试品溶液,

表 2 13 种代表性成分的回归方程和相关参数

Table 2 Regression equations and related parameters of 13 representative components

成分	线性回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
芦丁	$Y=1\ 354.00 X-22\ 020.79$	0.999 7	351.63~4 922.75	28.96	58.44
茴香醛	$Y=27.30 X+980.48$	0.999 9	2 500.00~35 000.00	66.97	162.10
补骨脂素	$Y=42.94 X+8\ 955.89$	0.999 9	9 380.57~131 328.00	49.14	168.29
异补骨脂素	$Y=55.13 X+57\ 637.80$	1.000 0	8 489.25~118 849.50	41.77	147.27
异补骨脂二氢黄酮	$Y=3\ 027.13 X+100\ 506.24$	0.999 5	150.97~2 113.55	13.74	44.31
新补骨脂异黄酮	$Y=5\ 065.87 X+1\ 494\ 390.80$	0.999 4	631.81~8 845.31	5.85	20.54
补骨脂二氢黄酮	$Y=3\ 135.28 X+823\ 956.55$	0.999 8	721.96~10 107.40	17.69	53.62
补骨脂宁	$Y=3\ 131.31 X+79\ 561.05$	0.999 4	93.60~1 310.40	17.61	34.82
补骨脂定	$Y=2\ 216.81 X+622\ 970.54$	0.999 0	387.49~5 424.88	11.13	37.20
反式茴香脑	$Y=74.69 X-18\ 625.04$	0.999 9	1 785.71~25 000.00	50.42	204.90
异补骨脂查耳酮	$Y=4\ 144.73 X+142\ 178.79$	0.999 7	541.65~7 583.10	28.87	78.42
补骨脂二氢黄酮甲醚	$Y=3\ 397.58 X+452\ 916.72$	0.999 8	537.85~7 529.96	12.03	48.35
补骨脂酚	$Y=14.58 X+33\ 301.41$	0.999 8	14 857.14~208 000.00	145.70	396.15

分别在不同时间（制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h）进样分析，计算 13 种代表性成分芦丁、茴香醛、补骨脂素、异补骨脂素、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、反式茴香脑、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚峰面积的 RSD 分别为 2.25%、1.89%、1.04%、4.06%、4.48%、3.85%、4.55%、3.36%、4.33%、4.17%、4.66%、3.52%、2.95%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 分别精密称取已测定 13 种指标成分含量的模拟品（生补骨脂 10 g+生小茴香 10 g），平行 6 份，分别加入“2.2”项下单一对照品溶液适量，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，以“2.1”项下方法进样分析，计算得 13 种代表性成分芦丁、茴香醛、补骨脂素、异补骨脂素、

异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、反式茴香脑、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚的平均加样回收率分别为 92.49%、105.22%、96.52%、96.32%、88.76%、91.87%、92.23%、107.89%、103.06%、105.13%、89.88%、92.69%、102.34%，RSD 分别为 3.50%、2.76%、1.29%、2.07%、4.60%、3.90%、3.14%、5.08%、3.27%、4.79%、4.14%、3.25%、5.34%。

2.5.7 样品含量测定 按“2.3”项下方法制备补骨脂丸和 3 种模拟品供试品溶液，按“2.1”项下方法进样分析，计算 13 种代表性成分的质量分数（扣除水分，以干燥品计算含量，生补骨脂含水量 6.48%、盐补骨脂含水量 6.17%、生小茴香含水量 6.87%、盐小茴香含水量 5.51%），结果见表 3。

表 3 不同样品中 13 种代表性成分的含量测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Determination of 13 representative components in different samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	黄酮类质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	芦丁	异补骨脂二氢黄酮	新补骨脂异黄酮	补骨脂二氢黄酮	补骨脂宁	异补骨脂查耳酮	补骨脂二氢黄酮甲醚
补骨脂丸	0.098±0.008	0.021±0.000**	0.078±0.003**	0.068±0.004**	0.012±0.000	0.048±0.003	0.067±0.006*
模拟 I 号	0.089±0.000	0.019±0.000	0.069±0.004**	0.060±0.004	0.011±0.001	0.043±0.004**	0.057±0.005
模拟 II 号	0.095±0.001	0.017±0.001**	0.053±0.000**	0.050±0.001*	0.009±0.000	0.040±0.001**	0.048±0.000**
模拟 III 号	0.094±0.004	0.018±0.001	0.061±0.003	0.058±0.004	0.011±0.001	0.052±0.003	0.059±0.002

成分	香豆素类质量分数/(mg·g ⁻¹)			挥发油类质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	补骨脂素	异补骨脂素	补骨脂定	茴香醛	反式茴香脑	补骨脂酚
补骨脂丸	1.347±0.009**	1.044±0.034**	0.027±0.002	0.522±0.015**	0.219±0.007**	1.556±0.025
模拟 I 号	1.336±0.032**	1.009±0.019**	0.024±0.003	0.577±0.029	0.292±0.033**	1.587±0.136
模拟 II 号	2.218±0.031	1.725±0.023	0.018±0.001**	0.530±0.008**	0.341±0.023*	1.590±0.028
模拟 III 号	2.244±0.009	1.705±0.074	0.024±0.001	0.604±0.026	0.400±0.020	1.637±0.094

与模拟 III 号比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs simulants group III

2.6 补骨脂丸及补骨脂丸模拟品水煎液中代表性成分含量差异

通过 SPSS 20.0 软件对补骨脂丸及 3 种补骨脂丸模拟品中 13 种代表性成分的含量结果进行单因素方差分析，结果见表 3。与模拟 III 号（由生补骨脂、生小茴香组成）相比，补骨脂丸水煎液中，异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮明显升高（ $P<0.01$ ），补骨脂二氢黄酮甲醚明显升高（ $P<0.05$ ），补骨脂素、异补骨脂素、茴香醛及反式茴香脑明显降低（ $P<0.01$ ）；模拟 I 号水煎液中，新补骨脂异黄酮明显升高（ $P<0.01$ ），补骨脂素、异补骨脂素、反式茴香脑及异补骨脂查耳酮

明显降低（ $P<0.01$ ）；模拟 II 号水煎液中，异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂定和茴香醛明显降低（ $P<0.01$ ），补骨脂二氢黄酮和反式茴香脑明显降低（ $P<0.05$ ）。其余成分各组之间无显著性差异，但也具有一定的变化趋势。

与 3 种模拟品相比，补骨脂丸中芦丁、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定及补骨脂二氢黄酮甲醚 7 个成分含量均升高，而茴香醛、反式茴香脑及补骨脂酚含量降低；与模拟 II、III 号相比，香豆素类如补骨脂素、异补骨脂素的含量降低。

将补骨脂丸及补骨脂丸模拟品中 13 种代表性成分, 分别按照香豆素类、黄酮类及挥发油类进行分类, 并比较不同类型成分含量变化。与 3 种模拟品相比, 补骨脂丸水煎液中香豆素类和挥发油类成分煎出减少, 黄酮类成分煎出增加。与模拟 III 号相比, 模拟 I 号和 II 号呈现共同趋势: 黄酮类、香豆素类和挥发油类成分煎出均减少。

2.7 化学成分与止泻药效相关性分析

2.7.1 指标水平检测 盐炙对补骨脂丸成分煎出的影响, 最终表现为药理作用差异。课题组前期已建立脾肾阳虚泄泻大鼠模型, 探讨了补骨脂丸和 3 种补骨脂丸模拟品对脾肾阳虚泄泻大鼠的干预作用, 发现补骨脂丸温肾助阳、暖脾止泻的作用优于 3 种补骨脂丸模拟品, 本实验造模、分组、给药参照已发表文献方法^[7]。取雄性 SD 大鼠 (共 117 只, 造模过程中死亡 16 只, 剩余 101 只) 适应性喂养 3 d 后, 随机分为 9 组, 分别为对照组、模型组、阳性药参苓白术丸组、盐补骨脂组、生补骨脂组、补骨脂丸组及模拟补骨脂丸 I~III 组。除对照组外, 其他各组大鼠每天上午 ig 给予氢化可的松注射液 (15 mg/kg), 连续 14 d 致肾阳虚, 从第 15 天开始每天上午 ig 冰番泻叶水煎液 (10 g/kg), 连续 14 d, 致脾阳虚泻下。除对照组和模型组外, 其余各给药组从第 15 天开始, 每天下午 ig 给药, 阳性药组给予参苓白术丸混悬液 (2 g/kg), 盐补骨脂组、生补骨脂组、补骨脂丸组及模拟补骨脂丸 I~III 组按生药剂量 8 g/kg 给药, 连续给药 14 d, 对照组和模型组给予同等体积生理盐水。

胃肠激素中胃泌素促进胃酸和胃蛋白酶的分泌, 并促进消化道黏膜生长及胃肠道平滑肌收缩, 脾虚泄泻使胃肠运动加剧, 胃泌素水平偏高^[8]; 氢化可的松为外源性糖皮质激素, 可通过抑制垂体前叶促肾上腺皮质激素的释放, 而减少肾上腺酮的分泌, 同时促进蛋白质分解、加快能量代谢, 造成机体“耗竭”, 继而诱发肾阳虚症状。药效学指标选用胃肠激素和下丘脑-垂体-肾上腺轴相关指标胃泌素、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、肾上腺酮进行测定, 各组大鼠血清中指标水平测定结果见表 4。

本实验采用灰色关联分析法^[9-10], 对补骨脂丸及 3 种补骨脂丸模拟品中代表性成分和止泻药效指标进行相关性分析, 探讨化学成分与止泻作用的贡献度, 以探讨盐炙增效机制。

表 4 补骨脂丸及补骨脂丸模拟品大鼠血清胃泌素、ACTH、肾上腺酮水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Levels of gastrin, ACTH and corticosterone in rats of Buguzhi Pills and simulated Buguzhi Pills ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	胃泌素/ (pg·mL ⁻¹)	肾上腺酮/ (pg·mL ⁻¹)	ACTH/ (pg·mL ⁻¹)
对照	151.19 ± 31.36	744.22 ± 57.75	228.73 ± 33.39
模型	210.81 ± 16.47	431.64 ± 31.25	116.36 ± 14.48
阳性药	153.66 ± 9.85	686.97 ± 44.73	218.27 ± 28.25
盐补骨脂	177.04 ± 11.78	497.34 ± 53.72	140.79 ± 22.25
生补骨脂	188.06 ± 11.31	471.05 ± 44.74	127.31 ± 23.32
补骨脂丸	146.94 ± 14.89	652.82 ± 71.93	185.47 ± 16.64
模拟 I 号	172.02 ± 15.41	619.24 ± 59.15	172.31 ± 19.15
模拟 II 号	163.10 ± 12.69	585.01 ± 63.12	131.74 ± 12.86
模拟 III 号	175.07 ± 18.29	531.69 ± 47.53	140.54 ± 13.21

2.7.2 原始数据的处理 以胃泌素、ACTH、肾上腺酮数据作为参考数列, 以代表性成分的含量作为比较数列, 采用均值化方法变换原始数据, 得到均值化处理数列。

2.7.3 绝对差序列及关联系数的计算 经数据变换的比较数列记为 $Y_i(m)$, 参考数列记为 $Y_0(m)$, 计算各比较数列与参考数列的绝对差, 称为绝对差序列, 即 $\Delta_{oi}(m) = |Y_0(m) - Y_i(m)|$ 。

求比较数列 $\{Y_i(m)\}$ 与参考数列 $\{Y_0(m)\}$ 的关联系数 (K_{oi}), 分辨系数 $\rho = 0.5$ ($0 < \rho < 1$, 一般取 0.5), 其计算公式为 $K_{oi} = [\rho \Delta_{\max} + \Delta_{\min}] / [\rho \Delta_{\max} + \Delta_{oi}(m)]$ 。

2.7.4 关联度 关联度为各成分关联系数的平均值, 结果见表 5。补骨脂丸及 3 种补骨脂丸模拟品中, 与止泻作用相关指标胃泌素关联度较高的成分为茴香醛 > 补骨脂酚 (关联度 > 0.7); 与 ACTH 关联度较高的成分为新补骨脂异黄酮 > 补骨脂二氢黄酮 > 补骨脂二氢黄酮甲醚 > 补骨脂宁 > 补骨脂定 > 异补骨脂二氢黄酮 (关联度 > 0.7); 与肾上腺酮关联度较高的成分为异补骨脂二氢黄酮 > 补骨脂宁 > 芦丁 > 补骨脂酚 > 补骨脂二氢黄酮 > 新补骨脂异黄酮 > 茴香醛 > 补骨脂定 (关联度 > 0.7)。总体上, 补骨脂丸及 3 种补骨脂丸模拟品的止泻作用与黄酮类成分相关性较高, 与香豆素类相关性较低。

3 讨论

补骨脂丸与 3 种补骨脂丸模拟品相比, 香豆素类和挥发油类成分含量降低, 而黄酮类成分含量升高。模拟 I、II 号与模拟 III 号相比, 黄酮类、香豆

表 5 13 种代表性成分含量与止泻药效指标的关联度分析结果

Table 5 Correlation analysis results of the contents of 13 representative components and antidiarrheal effects

成分	胃泌素		ACTH		肾上腺酮	
	关联度	排名	关联度	排名	关联度	排名
芦丁	0.691	3	0.634	9	0.759	3
茴香醛	0.848	1	0.635	8	0.740	7
补骨脂素	0.435	13	0.385	12	0.394	12
异补骨脂素	0.437	12	0.384	13	0.391	13
异补骨脂二氢黄酮	0.621	6	0.779	6	0.824	1
新补骨脂异黄酮	0.584	10	0.892	1	0.742	6
补骨脂二氢黄酮	0.601	7	0.751	5	0.838	2
补骨脂宁	0.646	4	0.805	4	0.764	2
补骨脂定	0.635	5	0.792	5	0.709	8
反式茴香脑	0.525	11	0.451	11	0.500	11
异补骨脂查耳酮	0.591	9	0.656	7	0.657	10
补骨脂二氢黄酮甲醚	0.595	8	0.808	3	0.698	9
补骨脂酚	0.809	2	0.626	10	0.757	4

素类和挥发油类成分煎出均减少。因此，补骨脂和小茴香盐炙后组成补骨脂丸，可促进复方中黄酮类成分的煎出，抑制香豆素类和挥发油类成分的煎出。

盐炙促进黄酮类成分煎出。相比其他模拟品，补骨脂丸水煎液中黄酮类成分含量升高，可能原因是①盐炙过程中的“杀酶保苷”，使苷类成分更好的保留；②补骨脂中的磷脂类成分和小茴香中的脂肪酸类成分都属于表面活性剂，可形成单个胶束或磷脂-脂肪酸混合胶束。2 种以上表面活性剂缔合而成的混合胶束，具有更低的临界胶束浓度，更好的稳定性^[11-12]。而无机盐的存在，一是能降低表面活性剂临界胶束浓度^[13-14]，使其更易形成胶束，增大胶束直径；二是能降低离子头相互排斥作用，使更多表面活性剂离子进入胶团中，疏水端更集中，提高胶束缔合数量，增加增溶空间^[15-16]。黄酮类成分与胶束亲和性更强，这可能是盐炙后黄酮类成分含量升高的原因。

盐炙抑制香豆素类成分煎出。与模拟 III 号相比，补骨脂丸和模拟 I 号的水煎液中香豆素类成分补骨脂素、异补骨脂素的含量均明显降低，其原因可能为：①盐炙主要包括盐水闷润和炒制两个过程，在盐水闷润时，补骨脂处在低温、湿润的环境中，补骨脂苷和异补骨脂苷被酶解为补骨脂素和异补骨脂素；在炒制的过程中，酶在高温作用下失去活性，

而“热因素”大于“盐或水因素”，使苷类成分更好的保留，从而苷元成分补骨脂素和异补骨脂素含量下降^[17]；②补骨脂素和异补骨脂素为呋喃香豆素类化合物，盐炙过程中的高温可能致其开环而含量降低^[18]；③表面活性剂可以形成具有增溶作用的胶束，但不同的化合物在同一胶束体系中存在竞争性，致使同一体系中，与疏水端极性相近的物质会占领更多的结合位点，从而抑制极性更大或极性更小的物质与胶束结合。黄酮类成分较香豆素类成分可能占据了更多结合位点，使香豆素类成分含量降低。基于以上 3 大方面因素的影响，补骨脂盐炙后与小茴香配伍，补骨脂素和异补骨脂素的含量降低。

盐炙抑制挥发油类成分煎出。与补骨脂丸模拟品相比，补骨脂丸中挥发性成分补骨脂酚、茴香醛和反式茴香脑的含量降低，可能与盐炙过程中高温降低挥发油含量，及不同成分竞争性结合胶束能力不同有关，从而影响挥发油类成分的煎出。

研究证明，芦丁具有一定的止泻作用^[19-20]，新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚、补骨脂素和异补骨脂素等成分止泻药效贡献率较高^[21]，这与本实验灰色关联分析的结果基本一致。补骨脂酚是补骨脂肝肾毒性的来源之一^[22-24]，小茴香中以反式茴香脑和茴香醛等为主的挥发油类成分具有促进胃肠蠕动的作用^[25-26]。相关性分析结果表明，黄酮类成分与止泻药效相关度较高，挥发油类成分次之，香豆素类成分中补骨脂素和异补骨脂素与止泻药效相关性较低。盐炙后配伍组成补骨脂丸，促进黄酮类成分煎出，抑制挥发油类成分煎出，可能是盐炙后止泻作用增强的主要原因之一。

盐炙炮制目的主要体现在增效和缓燥，补骨脂“性本大燥毒”，盐炙可缓和其燥性。补骨脂素和异补骨脂素作为补骨脂的主要成分，盐炙后体外溶出降低，但与止泻作用关联度较小，这是否与盐炙缓和燥毒有关，需要进一步研究。此外炮制增效不仅与化学成分体外溶出相关，还与化学成分体内过程有关，课题组将继续研究补骨脂丸中成分体内过程，以进一步丰富中药盐炙炮制机制科学内涵。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋·魏岷撰. 魏氏家藏方 [M]. 中医古籍出版社, 1987: 378.
- [2] 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.
- [3] 鲁亚奇, 张晓, 王金山, 等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 180-189.
- [4] 王金山, 毋启桐, 时博, 等. 小茴香炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 178-190.
- [5] 李凯, 许梦莹, 周宁, 等. 炮制时间对盐补骨脂中 10 种化学成分的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 710-713.
- [6] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 31.
- [7] 李凯, 王金山, 周宁, 等. 基于功效评价探讨补骨脂丸组方及盐炙用药的合理性 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5508-5514.
- [8] 蔺晓源, 邓娜, 李霞, 等. 四神丸对脾肾阳虚泄泻模型大鼠实验研究 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(5): 756-758.
- [9] 武鹤婷, 赛那瓦尔·芒思尔, 高彦华, 等. 红花降糖活性成分谱效关系研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(2): 188-197.
- [10] 王莹, 吴红杰, 管庆霞, 等. 基于灰色关联分析法探索芍药甘草汤对癫痫小鼠脑保护作用的谱效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 56-62.
- [11] 毕学玲, 刘建波, 张海波. 混合胶束在口服递药系统的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2016, 23(1): 78-81.
- [12] 李扬龚, 沈园园, 钱嫦云, 等. 混合胶束作为药物载体的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(19): 3784-3785.
- [13] 杨普华, 翁蕊, 罗幼松, 等. 阴离子混合表面活性剂体系的胶束性质 [J]. 石油勘探与开发, 2004, 31(3): 129-132.
- [14] Akram M, Yousuf S, Sarwar T, *et al.* Micellization and interfacial behavior of 16-E2-16 in presence of inorganic and organic salt counterions [J]. *Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2014, 441: 281-290.
- [15] Markina A A, Ivanov V A, Komarov P V, *et al.* Self-assembly of lecithin and bile salt in the presence of inorganic salt in water: Mesoscale computer simulation [J]. *J Phys Chem B*, 2017, 121(33): 7878-7888.
- [16] Duan Y W, Wang J, Yang X Y, *et al.* Curcumin-loaded mixed micelles: Preparation, optimization, physicochemical properties and cytotoxicity *in vitro* [J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(1): 50-57.
- [17] 刘玲, 朱星宇, 陆金兰, 等. 盐炙对青娥丸主要成分溶出的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(12): 2714-2718.
- [18] 颜翠萍, 吴育, 翁泽斌, 等. 盐制对补骨脂中主要化学成分的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(11): 2470-2474.
- [19] 任守忠, 梁娴, 苏文琴, 等. 枫蓼提取物抗炎、止泻作用的物质基础研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(1): 32-34.
- [20] Kalita B, Ranjan R, Gupta M L. Combination treatment of podophyllotoxin and rutin promotes mouse Lgr5⁺ve intestinal stem cells survival against lethal radiation injury through Wnt signaling [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(3/4): 326-340.
- [21] 耿媛媛. 二神丸中药物炮制前后的对比及其谱效关系的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [22] 胡超. 基于代谢组学的补骨脂安全性评价及补骨脂酚的体内代谢研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2016.
- [23] 江芳, 周昕睿, 王旗, 等. 补骨脂酚及其与补骨脂素合用对 HK-2 细胞的毒性及其机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(1): 50-58.
- [24] 赵子婧, 巩政, 史少泽, 等. 补骨脂及其与甘草配伍单次给药大鼠的毒代动力学及肝肾毒性初探 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2221-2226.
- [25] 何玉琨. 快速康复外科中小茴香热敷对胃肠吻合术后患者胃肠功能恢复的影响 [D]. 武汉: 武汉大学, 2017.
- [26] Asano T, Aida, Suemasu S, *et al.* Anethole restores delayed gastric emptying and impaired gastric accommodation in rodents [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(1): 125-130.

[责任编辑 郑礼胜]