

益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸的缩尿部位指纹图谱比较

李梦琪，吴珊珊，龚晓猛，刘斯琪，胡昌江*

(成都中医药大学 药学院，中药材标准化教育部重点实验室，四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地，成都 611137)

[摘要] 目的:通过比较益智仁盐炙前后组成缩泉丸缩尿部位的指纹图谱,从物质基础上揭示益智仁盐炙后增强缩泉丸缩尿药效的原因。方法:采用 HPLC,流动相乙腈-水梯度洗脱,检测波长 230 nm。记录 10 批益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸的石油醚部位 HPLC 图谱,建立相应指纹图谱,标定特征共有峰并比较其平均相对峰面积和平均相对保留时间。结果:益智仁盐炙后组成缩泉丸时,有 11 个共有峰平均相对面积明显增加,包括对缩尿药效贡献较大的 1 号,4 号(teuhtenone A),5 号(7-表-香酮),7 号色谱峰,增加率分别为 123.08%,90.91%,53.33%,43.75%。结论:对缩尿作用贡献较大的 4 个成分含量的明显增加极有可能与缩泉丸缩尿作用的增强紧密相关,此外其他 7 个成分含量也有明显增加。

[关键词] 缩泉丸;益智仁;盐炙;指纹图谱;缩尿部位;圆柚酮

[中图分类号] R283.1;R284.1;R943.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0016-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040016

Comparison on Fingerprint Spectrum of Urine-reducing Part of Suoquan Wan Constituted with Non-processed or Salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus Fruits

LI Meng-qi, WU Shan-shan, GONG Xiao-meng, LIU Si-qi, HU Chang-jiang*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[Abstract] Objective: A comparison was made between fingerprint spectrum of urine-reducing part of Suoquan Wan constituted with non-processed and salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits to discuss the chemical composition changes after salt-processing that enhance the urine-reducing effect. Method: HPLC was used for analysis with mobile phase of acetonitrile-water for gradient elution and detection wavelength at 230 nm. HPLC spectra of 10 batches Suoquan Wan constituted with non-processed and salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits were recorded. Establishing the fingerprint spectra, 32 peaks marked on each fingerprint spectrum had been compared. Result: The average relative area of 11 common peaks increased after salt-processing of Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits. Chromatographic peaks of No. 1, No. 4 (teuhtenone A), No. 5 (7-epi-teucrenone B) and No. 7 were the major contribution to urine-reducing effect, which increased 123.08%, 90.91%, 53.33% and 43.75%, respectively. Conclusion: The change of those 4 components maybe closely related to the enhancement of urine-reducing effect of Suoquan Wan, and the change of other 7 components may be synergistic to it.

[收稿日期] 20160827(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473353)

[第一作者] 李梦琪,在读硕士,从事中药炮制学研究,Tel:18782903563,E-mail:lmqai@qq.com

[通讯作者] *胡昌江,教授,博士生导师,从事中药炮制原理与质量标准方面的研究,Tel:13980980796,E-mail:hhecjj@hotmail.com

[**Key words**] Suoquan Wan; Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits; salt-processing; fingerprint spectrum; urine-reducing part; nootkatone

缩泉丸出自《妇人良方》,由益智仁、乌药、山药组成,是治疗肾阳虚所致小便频数或遗尿的常用方。益智仁为方中君药,盐炙后可增强该方温肾缩尿的作用^[1-4],通过影响人水通道蛋白 2(AQP-2)与小鼠肾脏加压素二型受体(AVPR-V2)蛋白的表达,改善膀胱功能^[1-4]。目前,对于益智仁盐炙后温肾缩尿的机制研究较多,但中医临床用药多以复方形式,从复方角度入手,研究益智仁盐炙增强复方温肾缩尿作用的研究较少。课题组前期对盐益智仁组成的缩泉丸进行了谱效关系研究和有效部位筛选与验证,确定了对缩尿药效贡献较大的色谱峰及其缩尿部位——石油醚部位。但益智仁盐炙对该方缩尿部位的影响尚不明确,故本实验拟通过提取益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸的石油醚部位药液,采用 HPLC 进行检测,建立指纹图谱,比较益智仁盐炙后分别组成该复方后有效部位指纹图谱的主要色谱峰变化,从物质基础上揭示益智仁盐炙增强缩泉丸缩尿药效的原因,为阐明其增强温肾缩尿功效的机制提供依据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),YP30002 型电子天平(德国 Sartorius 公司),Molatom 1810 型超纯水机(重庆摩尔水处理设备有限公司)。益智仁、乌药、山药各 10 批购自成都市荷花池中药材市场,经成都中医药大学生药教研室卢先明教授鉴定,分别为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* 的干燥成熟果实,樟科植物乌药 *Lindera aggregata* 的根和薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* 的根茎;山药、乌药(净制)和盐益智仁(将 10 批益智分别去壳,得生益智仁。取生益智仁,加 5% 食盐水拌匀,闷润 30 min,在 250 ℃ 锅温下投药,利用红外测温仪控制温度,炒炙 8 min,得盐炙品。每 100 g 益智仁加入 5% 食盐水 40 mL^[5])均为自制,石油醚(60~90 ℃,成都市科龙化工试剂厂),圆柚酮对照品(美国 Sigma 公司,批号 101601721),乌药醚内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号 11568-201204),teuhenenone A 和 7-表-香科酮(自制),益智醇和益智酮甲对照品(由凯方医药科技有限公司合成),水为双蒸水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备 取 10 批生益智仁、盐益智仁、乌药、山药粉末(过 1 号筛),以生益智仁、乌药、山药粉末各 10 g 混合均匀组成缩泉丸 I(记为 S1~S10);盐益智仁、乌药、山药各 10 g 混合均匀组成缩泉丸 II(记为 P1~P10)。分别加 8 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并滤液,减压回收乙醇至稠膏,加入适量硅藻土拌匀后以石油醚(60~90 ℃)索氏提取至无色,挥干石油醚^[6],以甲醇-三氯甲烷(7:3)^[7]定容至 25 mL,作为供试品溶液,以备建立益智仁盐炙前后组成缩泉丸的石油醚部位指纹图谱用。取各对照品适量,加甲醇超声使溶解,得单一对照品溶液,分别取各单一对照品溶液 0.5 mL,混合均匀,得混合对照品溶液。

2.2 缩泉丸石油醚部位指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Inertsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min,5% A;5~8 min,5%~30% A;8~10 min,30%~45% A,10~25 min,45%~55% A;25~40 min,55%~65% A;40~52 min,65%~80% A;52~54 min,80%~90% A;54~56 min,90%~95% A;56~60 min,95%~30% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 230 nm,进样量 10 μL。

2.2.2 方法学考察^[8-9] 精密吸取同一供试品溶液 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评价系统”(2004A 版)计算相似度>0.9^[8],表明仪器精密程度良好。分别精密吸取同一批缩泉丸的 6 个供试品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件记录 HPLC 图谱,计算相似度>0.9^[8],表明该方法重复性良好。分别在 0,2,6,12,24,48 h 时精密吸取同一样品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件记录 HPLC 图谱,计算相似度>0.9^[7],表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.3 指纹图谱的建立^[10-12] 供试品溶液和对照品溶液按 2.2.1 项下色谱条件建立 HPLC 图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)处理,计算各 HPLC 图谱相似度均>0.9,见图 1,2。选取中位数法生成缩泉丸石油醚部位的对照

指纹图谱,见图 3、4。标定出 32 个共有峰(4 号为 teuhetenone A,5 号为 7-表-香科酮,18 号为乌药醚内酯,19 号为益智醇,22 号为益智酮甲,23 号的为圆柚酮),混合对照品 HPLC 见图 5,其色谱峰整体分布无明显区别,经比较 2 指纹图谱,发现相似度 > 0.9,说明益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸无新增和消失的色谱峰。前期研究表明圆柚酮在益智仁盐炙前后无明显变化,故选定其为参照峰^[9],计算各共有峰的平均相对保留时间(ST_x, PT_x),平均相对峰面积(SA_x, PA_x)及其改变率,见表 1。

由表 1 可知,益智仁盐炙后组成的缩泉丸缩尿有效部位的 1,2,3,4,5,6,7,11,12,13,18 号色谱峰的平均相对峰面积有明显改变(改变率 > 30%),且均呈增加趋势;其中 1,4(teuhetenone A),5(7-表-香科酮),7 号色谱峰在前期谱效关系研究中表明对缩泉丸的缩尿药效有较大贡献,增加率分别为 123.08%,90.91%,53.33%,43.75%,说明缩泉丸中益智仁盐炙后化学成分有所改变。

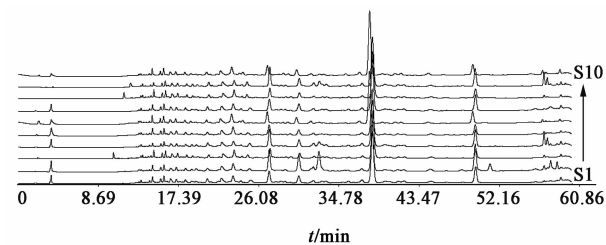


图 1 生益智仁组成的缩泉丸(S1~S10)石油醚部位 HPLC
Fig. 1 HPLC of petroleum ether part of Suoquan Wan constituted with non-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits

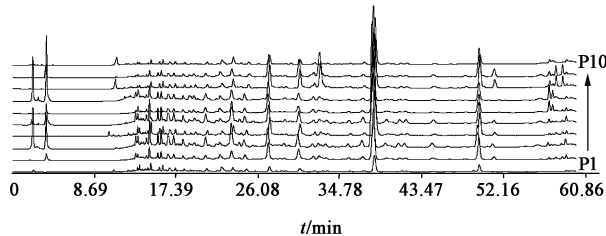


图 2 盐益智仁组成的缩泉丸(P1~P10)石油醚部位 HPLC
Fig. 2 HPLC of petroleum ether part of Suoquan Wan constituted with salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits

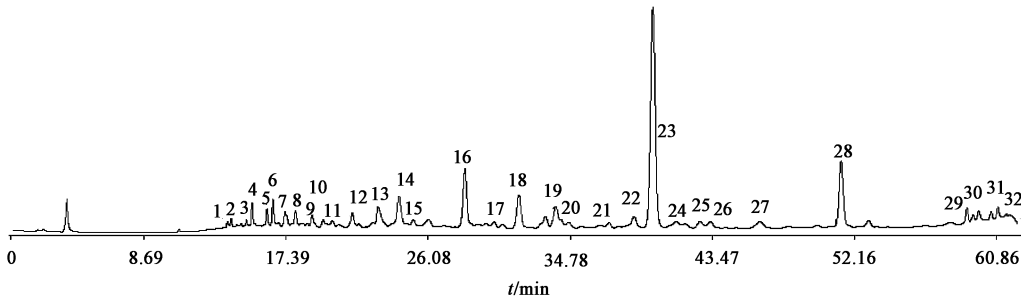


图 3 生益智仁组成的缩泉丸石油醚部位指纹谱
Fig. 3 Fingerprint spectrum of petroleum ether part of Suoquan Wan constituted with non-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits

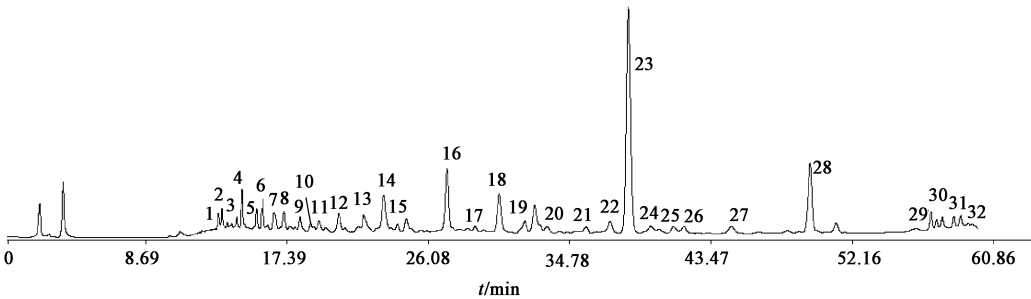


图 4 盐益智仁组成缩泉丸石油醚部位指纹谱
Fig. 4 Fingerprint spectrum of petroleum ether part of Suoquan Wan constituted with salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus fruits

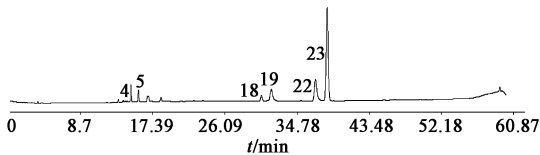


图 5 混合对照品溶液 HPLC
Fig. 5 HPLC of mixed reference substance solution

3 讨论

预试验考察了 210,230,254,280 nm 等检测波长,结果显示在 230 nm 处色谱图基线较平稳,出峰较多且峰形较好。经比较益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸石油醚部位的指纹图谱,发现有 11 个成分的平均相对峰面积在炮制后显著增加,其中包含对缩

表 1 益智仁盐炙前后组成缩泉丸石油醚部位共有峰的平均相对保留时间、平均相对峰面积及其改变率

Table 1 Comparison on average relative retention time and peak area of common peaks in petroleum ether part of Suoquan Wan constituted with non-processed and salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* fruits

No.	ST _x	PT _x	SA _x	PA _x	改变率/%	No.	ST _x	PT _x	SA _x	PA _x	改变率/%
1	0.34	0.34	0.026	0.058	123.08	17	0.75	0.75	0.050	0.061	22.00
2	0.35	0.35	0.031	0.069	122.58	18	0.79	0.79	0.187	0.253	35.29
3	0.37	0.37	0.037	0.062	67.57	19	0.83	0.83	0.105	0.109	3.81
4	0.38	0.38	0.055	0.105	90.91	20	0.87	0.87	0.062	0.073	17.74
5	0.40	0.40	0.060	0.092	53.33	21	0.93	0.93	0.052	0.065	25.00
6	0.41	0.41	0.067	0.088	31.34	22	0.97	0.97	0.133	0.133	0
7	0.43	0.43	0.080	0.115	43.75	23	1.00	1.00	1.000	1.000	0
8	0.45	0.45	0.071	0.086	21.13	24	1.04	1.04	0.099	0.116	17.17
9	0.47	0.47	0.072	0.086	19.44	25	1.07	1.07	0.071	0.077	8.45
10	0.49	0.49	0.049	0.054	10.20	26	1.09	1.09	0.083	0.090	8.43
11	0.50	0.50	0.049	0.073	48.98	27	1.17	1.17	0.135	0.128	5.19
12	0.51	0.52	0.043	0.056	30.23	28	1.29	1.29	0.337	0.395	17.21
13	0.54	0.54	0.086	0.119	38.37	29	1.49	1.49	0.118	0.118	0
14	0.58	0.58	0.133	0.146	9.77	30	1.50	1.50	0.104	0.102	1.92
15	0.63	0.63	0.061	0.061	0	31	1.52	1.52	0.095	0.100	5.26
16	0.71	0.71	0.269	0.315	17.10	32	1.53	1.53	0.116	0.106	8.62

注:ST_x 和 PT_x 分别表示 S1 ~ S10,P1 ~ P10 的平均相对保留时间;SA_x 和 PA_x 分别表示 S1 ~ S10,P1 ~ P10 的平均相对峰面积。

尿药效贡献较大的为 1,4,5,7 号色谱峰,4 和 5 号色谱峰分别为 teuhetenone A 和 7-表-香科酮,均是课题组从盐益智仁石油醚部位分离到的活性成分,1 号和 7 号还有待进一步定性,这 4 个成分含量的明显增加极有可能与缩泉丸缩尿药效的增强紧密相关,其他 7 个成分含量的明显增加可能在药效的增强上起到了协同作用,这些成分在炮制后的改变也说明了古人在缩泉丸方中采用盐益智仁有一定的科学内涵。本实验从药物发挥作用的有效部位着手,对益智仁盐炙前后组成缩泉丸的石油醚部位指纹图谱进行对比研究,在前期得到益智仁盐炙增强缩泉丸缩尿药效等结果的基础之上,从物质基础角度揭示了缩泉丸中益智仁采用盐炙品缩尿药效明显优于生品的原因。但本实验采用的研究方法较为单一,仅针对有效部位指纹图谱进行对比,后期可从益智仁炮制前后方中有效成分含量的变化及其吸收入血的情况等不同角度、不同层次去探索缩泉丸中益智仁盐炙所带来的影响。

[参考文献]

[1] 帅小翠,胡昌江,王虎,等. 益智仁盐炙前后对缩泉丸缩尿作用的影响[J]. 成都中医药大学报,2011,34(3):69-71.

[2] 吴珊珊,龚晓猛,张美,等. 缩泉丸中益智仁盐炙前后对肾阳虚大鼠肾脏功能的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):1-4.

[3] 李文兵,胡昌江,吴珊珊,等. 益智仁盐炙对水负荷多

尿模型大鼠缩尿作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):261-263.

[4] 吴珊珊,胡昌江,潘新,等. 益智仁盐炙前后对肾阳虚多尿大鼠 AQP-2 与 AVPR-V2 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(21):1747-1750.

[5] 李兴迎,胡昌江,林辉,等. 中药益智仁盐炙工艺的正交实验法研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(7):1574-1576.

[6] 李文兵. 基于中医“标本兼治”研究益智仁盐炙“温肾缩尿”作用机理[D]. 成都:成都中医药大学,2013.

[7] 耿媛媛,胡昌江,潘新,等. 二神丸不同提取部位温脾止泻的谱效关系研究[J]. 中草药,2014,44(18):2658-2663.

[8] 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.

[9] 任艳玲. 逍遙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.

[10] 李文兵,胡昌江,李兴华,等. 益智仁盐炙前后指纹图谱对比研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):305-306.

[11] 李楠楠,陈宇,王帅,等. 双莲方全时段多波长融合 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):71-74.

[12] 潘新,胡昌江,耿媛媛,等. 复方二神丸中两味药物炮制前后的指纹图谱对比研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(8):1868-1870.

[责任编辑 刘德文]