

# 加味四妙丸有效部位群 HPLC 指纹图谱 归属分析及谱效关系研究\*

□钱 俊 尹 莲\*\* (南京中医药大学 南京 210046)

**摘要:**目的:明确加味四妙丸有效部位群中指纹图谱共有峰与组方药材有效部位及药效的相关性,表征加味四妙丸有效部位群药效物质基础。方法:用指纹图谱共有峰相对保留时间的相对偏差 $\Delta t$ 和紫外光谱夹角余弦特征相似度,考察共有峰与药材有效部位的相关性;将加味四妙丸中各有效部位及各组方药中的有效部位进行正交组合,测定指纹图谱及评价抗炎、镇痛及降尿酸作用,运用数理统计学的方法将药理数据与指纹图谱各色谱峰相对面积相关联,研究谱效相关性。结果:该方有效部位群12个共有峰分别来源于组方药苍术皂苷、黄柏皂苷、黄柏生物碱、土茯苓皂苷部位,与抗炎、镇痛、降尿酸作用均有相关性。结论:研究有效部位群指纹图谱共有峰的成分特征及谱效关系,是表征复方整体成分-配伍-药效相关性的有效途径。

**关键词:**有效部位群指纹图谱 共有峰归属分析 谱效相关性

四妙丸由黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁组成,是治疗痿证的经典名方,临床常加味治疗急性痛风<sup>[1]</sup>。经药效筛选和临床验证,四妙丸加清热药(忍冬藤和土茯苓)的有效处方(已申报专利),对急性痛风的治疗尤其突出<sup>[2]</sup>,现已筛选出该处方的有效部位群是挥发油、生物碱、皂苷、有机酸、黄柏、糖类的组合物<sup>[3]</sup>,并建立了有效部位群12个共有峰的HPLC指纹图谱(待发表)。

中药复方物质基础具有整体性、综合性及模糊性,复方有效部位群是从复方中获取的化学类型明确、主

要成分清楚且含量符合一定要求的物质群。因此,为表征加味四妙丸有效部位群成分的整体特征、组方药成分类型及多成分共存状态下的化学-配伍-药效的相关性,我们用指纹图谱共有峰相对保留时间的相对偏差 $\Delta t$ 和紫外光谱夹角余弦特征相似度,考察了共有峰与药材有效部位的相关性;将加味四妙丸中各有效部位及各组方药中的有效部位进行正交组合,测定了指纹图谱及评价抗炎、镇痛及降尿酸作用,运用数理统计学的方法将药理数据与指纹图谱各色谱峰相对面积相关联,进行了有效部位群指纹图谱药效物质基础研究,探索了表征复方有效部位群整体成分-配伍-

收稿日期:2006-09-10

修回日期:2006-11-11

\* 江苏省自然科学基金项目(BK2002033):治疗痛风加味四妙丸的筛选及有效部位群的研究,负责人:尹莲。

\*\* 联系人:尹莲,副教授,研究方向:中药复方化学研究, Tel 13813971246 E-mail yinlian162@163.com

药效相关性的有效途径。

## 二、方法与结果

### 一、试药与仪器

#### 1 药材

黄柏 (*Phellodendron chinense* Schneid)、苍术 (*Atractylodes chinensis* Koilz)、薏仁 (*Cox Lacryma-jobi* L var ma-yuen)、牛膝 (*Achyranthes bidentata* Bl)、忍冬藤 (*Lonicera japonica* Thunb)、土茯苓 (*Smilax glabra* Roxb)等6味药均自购,由南京中医药大学药学院中药鉴定教研室王春根教授鉴定。

#### 2 试剂

柱层析材料:大孔树脂 (HPD100)购于河南苍州化工厂;强碱型阴离子交换树脂 (20IX70)购于南开大学化工厂;30-60目聚酰胺粉购于83305部队701厂。

吡啶美辛,药用;二甲苯 (上海凌峰化学试剂有限公司),批号020402;冰醋酸 (上海试剂四厂),批号031208;二甲苯 (上海凌峰化学试剂有限公司),批号020402;95%医用酒精、石油醚、乙醚、丙酮等试剂为化学纯;甲醇,色谱纯;纯净水、磷酸,分析纯。

尿酸试剂盒 (SYSMEX 济南希森美康医用电子有限公司),批号ZG4004;尿酸酶抑制剂, Sigma-aldrich公司 5mg/mL,配制成油剂;次黄嘌呤 (天津市北洋化工厂),批号20031101;次黄嘌呤 25mg/mL,配制成油剂。

#### 3 仪器

高效液相色谱仪 (Waters 515及Waters 2487紫外检测器;Waters 2996二极管阵列检测器)。

旋转蒸发器 (上海亚荣);9mm打孔器;JA-1203上皿电子天平 (上海天平仪器厂);日立7020全自动生化仪。

#### 4 动物

昆明种小鼠,雄性, (20±2)g;昆明种大鼠,雄性,180~220g,由南京中医药大学实验动物中心提供,实验动物饲养许可证号:SYXK(苏)2002-0012。

#### 1 样品制备

提取制备全方及各组方药中各有效部位 (纯度均大于50%),方法见文献<sup>[3]</sup>,按表1正交设计方案得到1-8号组合以及药材有效部位组合得到9-17号组合。

#### 2 药理实验

(1)供试药配制方法。

阳性药对照组:吡啶美辛 (25mg/片),配制成1.25mg/mL,小鼠用量为0.2mL/10g。

处方对照组:6味药材按处方配伍量醇提后水提,将醇提液和水提液合并浓缩为浸膏 (3g生药/mL)。

表1 全方有效部位正交组合

样品号	A	B	C	D	E	F	G
	生物碱	皂苷	有机酸	挥发油	黄酮	水液	误差
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	0	0	0	0
3	1	0	0	1	1	0	0
4	1	0	0	0	0	1	1
5	0	1	0	1	0	1	0
6	0	1	0	0	1	0	1
7	0	0	1	1	0	0	1
8	0	0	1	0	1	1	0

表中1为有,0表示没有。

表2 全方各有效部位组合药理实验结果

样品号	耳廓肿胀度 (g)	扭体次数 (n)	尿酸值 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
			1h	3h
1	0.0127±0.0037 <sup>**</sup>	9.6±12.2 <sup>**</sup>	711.5±186.9 <sup>**</sup>	465.0±389.7 <sup>*</sup>
2	0.0174±0.0047 <sup>*</sup>	34.8±15.8	918.6±326.7	661.4±325.6
3	0.0109±0.0035 <sup>**</sup>	27.7±20.1	935.2±473.6	605.2±277.6 <sup>*</sup>
4	0.0163±0.0049 <sup>**</sup>	24.2±14.4 <sup>*</sup>	1128.2±323.1	735.0±242.7
5	0.0117±0.0061 <sup>**</sup>	27.6±13.0	813.4±117.9 <sup>*</sup>	504.2±193.2 <sup>*</sup>
6	0.0179±0.0038 <sup>*</sup>	20.7±15.9 <sup>**</sup>	1028.4±253.7	765.0±184.2
7	0.0184±0.0039 <sup>*</sup>	26.0±18.1	686.7±372.5 <sup>*</sup>	733.0±494.2
8	0.0166±0.0037 <sup>*</sup>	34.6±14.1	1022.4±309.6	638.0±326.6

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

(2) 二甲苯所致的小鼠耳肿胀抗炎实验。

将小鼠随机分 11 组, 分别给模型组、阳性组、处方组及有效部位组合 1-8 组, 灌服生理盐水、吲哚美辛、处方、样品 1-8 连续 3 天, 于第 3 天给药后 45min 于小鼠右耳两面涂二甲苯 0.05mL/只致肿, 左耳不涂为正常耳。45min 后脱颈椎处死小鼠, 用 9mm 打孔分别在相同部位打下圆片, 电子天平称重, 每鼠右耳重量 - 左耳重量 = 肿胀度, 结果见表 2。

(3) 醋酸致小鼠化学性刺激镇痛实验。

将小鼠随机分 11 组, 分别给模型组、阳性组、处方组及有效部位组合 1-8 组, 灌服生理盐水、吲哚美辛、处方、样品 1-8 给药后 0.5h 腹腔注射 0.7% 醋酸 0.2mL/只, 观察小鼠第一次因疼痛引起扭体的时间和 20min 内扭体次数。注: 扭体以同时收腹、鼠身弯曲为指标, 结果见表 2。

(4) 对小鼠高尿酸模型的降尿酸作用。

将小鼠分为空白组、模型组、全方组、各有效部位组合 11 组。空白组和模型组给予等体积生理盐水, 其它灌服各有效部位组合样品, 连续 3 天, 第 3 次给药后 1h 造高尿酸模型, 于造模后 1h、3h 给小鼠取血 0.3mL, 离心, 取血清, 测血尿酸值, 结果见表 2。

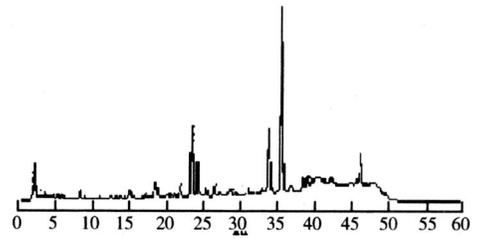


图 1 有效部位群 HPLC 指纹图谱

表 3 对高尿酸大鼠血尿酸的影响 (x±sD)

样品号	尿酸值 (μmol/L)	
	3h	9h
模型组	763.5±134.5	754.7±434.2
9	460.2±104.0 <sup>*</sup>	152.1±73.4 <sup>*</sup>
10	647.5±116.9 <sup>▲</sup>	222.0±71.8 <sup>*</sup>
11	442.6±80.6 <sup>*</sup>	241.6±124.9 <sup>*</sup>
12	518.9±164.8 <sup>*</sup>	296.5±196.2 <sup>*</sup>
13	482.0±186.5 <sup>*</sup>	237.0±77.1 <sup>**▲</sup>
14	676.9±129.4 <sup>▲▲</sup>	415.7±169.3 <sup>▲▲</sup>
15	523.9±117.8 <sup>*</sup>	514.1±122.0 <sup>▲▲</sup>
16	600.2±171.4	405.6±198.5 <sup>▲▲</sup>
17	592.5±153.2 <sup>*</sup>	185.7±84.3 <sup>*</sup>

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01

表 4 有效部位群共有峰相对偏差及紫外光谱特征相似度结果

	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
黄柏生物碱 Δ t	0.024		0.15			-0.03		-0.04	0.095	-0.003	-0.026
CO S0	0.9986		0.9997			1		1	0.9995	0.4304	0.9998
土茯苓酸 Δ t							-0.15				
CO S0							0.9887				
苍术皂苷 Δ t	0.47	2.1									
CO S0	0.9999	0.7927									
黄柏皂苷 Δ t	0.35	-0.72		0.79	0.38	-0.31		-0.3	0.16		
CO S0	0.9942	0.9990		0.9999	0.9995	0.8857		0.9981	0.9998		
忍冬黄酮 Δ t											0.023
CO S0											0.7504
忍冬皂苷 Δ t		-1.99					-0.15				
CO S0		0.91996					0.9939				
土茯苓黄酮 Δ t	0.14										
CO S0	0.9941										
土茯苓皂苷 Δ t							-0.14				
CO S0							0.9942				
薏苡皂苷 Δ t	-0.06										
CO S0	0.9996										

表 5 强迫引入法引入各色谱峰的标准化回归系数

共有峰	抗炎 (耳廓肿胀度)	镇痛 (扭体次数)	降尿酸(尿酸值)		
			1h	3h	9h
1	0.789	-0.121		0.161	-0.706
2	0.371	-1.407	1.547	-0.633	-0.503
3	-0.464	-1.114		-0.547	1.21
4	0.605	0.758	-23.062	0.714	0.391
5	-0.805	-0.142	9.261	-0.762	-0.937
6	10.582*	-4.814		5.767	
7	0.237	5.837		2.603	
8	-0.162	1.539		0.515	-1.219
9	-5.930* *	-0.691	-20.388	-4.947	
10	0.378	2.643	66.915	1.835	
11	-0.162	-2.745	-36.294	-0.509	0.263
12	-5.726*	-0.946	-0.849	-5.451	1.202

(5) 对大鼠高尿酸模型的降尿酸作用。

将大鼠分为空白组、模型组、全方组、各有效部位组合 12 组,方法同 2.2.4 项。于造模后 3h、9h 给小鼠取血 0.3mL,离心,取血清,测血尿酸值,结果见表 3。

### 3 HPLC/UV 指纹图谱测定

(1) 色谱条件。

色谱柱: Kromasil C18 柱 (4.6\*200mm, 10μm, 5μm)。

流动相: A 为甲醇; B 为 3% 磷酸水溶液。

梯度洗脱: 0 min 10% A, 90% B, 45 min 45% A, 55% B; 50 min 10% A, 90% B。

检测波长: 280nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量 10μL, T=30℃, 归一化法计算相对含量。

(2) 样品溶液制备。

2.1 项下“有效部位组合”、“组方药中有效部位组合”、全方、黄柏生物碱、土茯苓有机酸、苍术皂苷、黄柏皂苷、忍冬黄酮、忍冬皂苷、土茯苓黄酮、土茯苓皂苷、薏苡皂苷样品, 50% 甲醇定容, 配制浓度为 1g/mL, 用 0.45μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液备用。

按 2.3.1 项下色谱条件测定, 有效部位群指纹图谱见图 1。

### 4 指纹图谱峰共有峰归属分析

(1) 确定匹配峰。

表 6 逐步回归法引入各色谱峰号

药理指标	引入色谱峰号
镇痛(扭体次数)	9*, 12*
抗炎(耳廓肿胀度)	1*

根据该方有效部位群指纹图谱技术参数, 比较各组方药有效部位色谱峰相对保留时间, 在允许的波动范围内寻找匹配峰。

(2) 相对偏差  $\Delta t$  计算。

计算各共有峰相对应的匹配峰保留时间相对偏差  $\Delta t_i$  计算公式<sup>[4]</sup>为

$$\Delta t_i = \frac{t_{R(P)i} - t_{R(S)i}}{t_{R(S)i}}$$

其中, 以  $\Delta t_i$  表示各共有峰保留时间相对偏差,  $t_{R(S)i}$  表示有效部位群第  $i$  共有峰的保留时间,  $t_{R(P)i}$  表示各组方药有效部位指纹图谱与有效部位群第  $i$  对应匹配峰的保留时间。  $\Delta t$  值越接近 0, 说明两色谱峰偏差越小, 相关性越强, 见表 4。

(3) 紫外光谱特征相似度计算。

采用夹角余弦法<sup>[4]</sup>计算对应色谱峰紫外光谱特征相似度。取色谱峰半峰宽以上光谱的均值进行计算。

$$\cos\theta = \frac{X \cdot Y}{|X| \times |Y|}$$

其中,  $x_t(t=1, 2, 3, \dots, n)$ 表示某波长下指纹峰  $R(S)_i$  的响应值,  $y_t(t=1, 2, 3, \dots, n)$ 表示某波长下谱峰  $R(P)_j$  的响应值,  $n$ 为采集的总波长数。

COS $\theta$ 值越接近 1, 说明两峰光谱越相似, 相关性越高。

结果(表 4)表明, 有效部位群共有峰归属为: 1号峰来自苍术皂苷, 3、6、9、12号来自黄柏生物碱部位, 2、4、5、10号共有峰来自黄柏皂苷部位, 8号共有峰来自土茯苓皂苷部位。

#### 5 指纹图谱共有峰谱效相关分析

将 2.3.2项下各样品指纹图谱共有峰相对峰面积与 2.3.2项下抗炎、镇痛、降尿酸药效数据进行相关性分析。

##### (1) 多元线性回归分析。

用 SPSS 11.5 统计软件多元线性回归分析中的强迫引入法 (enter) 和逐步回归法 (stepwise) 处理, 结果见表 5 和表 6。

##### (2) 相关分析。

用 SPSS 11.5 中统计软件双变量相关分析, 相关系数见表 7(仅列出经统计学检验具有显著性的色谱峰与药理数据的相关系数)。

回归分析是研究一个或多个自变量与一个因变量之间是否存在某种线性或非线性关系的一种统计学方法。通过回归分析表明, 有效部位群中 12 个共有峰均与抗炎、镇痛、降尿酸作用相关。用逐步回归法和相关分析进一步表明, 1、3、6、9、12 号共有峰与抗炎作用显著相关, 1、3、5、6、7、9、11、12 号共有峰与镇痛作用显著相关, 5 号共有峰与降尿酸作用显著相关。

### 三、结果分析

色谱峰保留值可用于化合物定性鉴别分析, 本实验采用保留值相对偏差  $\Delta t$  作为考察指标之一, 衡量相关性程度。从理论上讲, 具有相同保留值的化合物并不一定为同一物质, 加上实验过程中常有的色谱峰漂移现象, 以及复方配伍后成分变化的复杂性, 仅以  $\Delta t$  定性分析可靠性不高。因此, 结合紫外光谱特征相似度计算, 使共有峰的归属更准确。

本研究根据共有峰保留时间相对偏差及紫外光谱特征相似度计算结果可知, 与 1 号共有峰相近的各组方药有效部位色谱峰最多, 保留时间相对偏差均较小。但根据共有峰紫外光谱特征相似度, 苍术皂苷的紫外光谱图最相近, 应归属于苍术皂苷。与 11 号共有峰相对保留时间匹配度最相近的是黄柏生物碱, 但紫外光谱特征相似度 (0.43) 较低, 分析是生物碱成分配伍后发生变化所致。

中药复方药效物质基础研究是中药走向现代化的关键性问题, 而复方中化学成分复杂, 研究和表征复方药效物质基础有很大的难度。本研究在加味四妙丸有效部位群 HPLC 指纹图谱的研究基础上, 用保留时间相对偏差及紫外光谱特征相似度归属分析方法和数理统计分析方法, 明确了有效部位群指纹图谱共有峰的成分特征及与抗痛风药效的相关性, 初步表征了加味四妙丸有效部位群的药效物质基础。有效部位群中各类成分的结构、性质差异很大, 如能进一步建立多维多息指纹图谱, 充分反映有效部位群各类成分信息及与药效的关系, 是表征复方整体成分-配伍-药效的有效途径。

表 7 色谱峰与药理数据的相关系数

药理指标	色谱峰号						
	1	3	5	6	7	9	11
抗炎(耳廓肿胀度)	0.563 <sup>**</sup>	0.438 <sup>*</sup>					
镇痛(扭体次数)	-0.542 <sup>*</sup>	-0.579 <sup>**</sup>	-0.413 <sup>*</sup>	-0.455 <sup>*</sup>	-0.45 <sup>*</sup>	-0.623 <sup>**</sup>	-0.413 <sup>*</sup>
尿酸 9h(尿酸值)			-0.663 <sup>*</sup>				

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

## 参考文献

- 1 尹莲, 史欣德. 四妙丸加味治疗急性痛性关节炎概述. 中国中医药科技, 2004, 11(1): 63~ 64
- 2 尹莲, 史欣德. 治疗痛风加味四妙丸处方的筛选研究. 世界科学技术—中医药现代化, 2006 8(6): 27~ 30
- 3 尹莲, 徐立, 时乐. 加味四妙丸有效部位群的筛选研究. 世界科学技术—中医药现代化, 2005 7(4): 28~ 33
- 4 陈闽军, 程翼宇, 林瑞超. 中药色谱指纹图谱相似性计算方法的研究. 中成药, 2002 24(12): 905~ 908.
- 5 宋宗华, 冯东, 许俊博, 等. 苯柱术甘汤配伍机制及药效物质基础研究. 中成药, 2003 25(2): 132~ 137.

## Jiaw eisim iao' s HPLC Fingerprint and Associated Pharmacodynamics

Qian Jun, Yin Lian

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046 China)

The purpose of this study is to understand the therapeutical basis of Jiaw eisim iao Decoction using the chromatographic pharmacodynamic approach. In the study, effective elements of the Jiaw eisim iao Decoction are taken as examples. The fingerprints of both effective and relevant elements of the herb are collected through the HPLC/DAD analysis. Relative deviations of retention time and similarities of peak UV spectra are employed to evaluate the correlativity. Different combinations of effective elements are also designed for the purpose. The fingerprints of different combinations are tested using the HPLC method, and 12 chromatographic peaks have been obtained. Correlation and regression analysis is made to discern the interrelationship between each peak and the pharmacologic data collected. The results have confirmed the sources of 12 chromatographic peaks and their pharmacologic correlativity. Authors therefore conclude that studying the fingerprints of effective elements and their pharmacologic correlativity makes a valid approach for understanding the therapeutical basis of TCM.

Key words: fingerprints of effective elements; correlativity; TCM chromatographic pharmacodynamics

(责任编辑: 张述庆, 责任编审: 果德安, 责任译审: 邹春申)

## 科技部将采取四措施贯彻落实 规划纲要配套政策

科技部将采取有效措施, 营造良好的政策和制度环境, 推进《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006-2020年)》配套政策全面落实。这是科技部副部长李学勇 24 日向在京全国政协科技界、科协界和其他界别从事科技工作的委员通报一年来科技工作有关情况时透露的。

“政府引导推动科技发展, 关键是要营造良好的政策和制度环境。”李学勇说, 最近, 国务院发布了规划纲要配套政策, 一共 60 条, 涉及财税、金融、政策采购、技术引进消化吸收等多个方面, 对增强我国自主创新能力, 确保规划纲要各项重大任务的顺利完成, 将提供重要的政策保障。

为此, 科技部将从以下四个方面着手, 重点抓好规划纲要配套政策的贯彻落实工作:

根据国务院的有关要求, 会同有关部门抓紧研究制定配套政策的实施细则。

推进科技中介服务机构税收政策、创业风险投资政策、有关捐赠政策等的出台, 编制必须掌握自主知识产权的重要产品和装备目录。

与国资委紧密配合, 推动国有高新技术企业股权激励试点和转制院所产权制度改革工作。

加强对政策实施的监督和评估, 跟踪研究配套政策实施过程中出现的新的情况和问题, 及时进行必要的调整和完善。定期发布各部门、各地方落实配套政策情况的报告。

(文摘)