

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.009

石菖蒲大孔树脂不同洗脱部位高效液相图谱与抗抑郁效应的关联性研究*

周雅菲,朱显婷,邓雨晴,周威[△]

(武汉轻工大学医学技术与护理学院,武汉 430023)

[摘要] **目的** 研究石菖蒲大孔树脂不同洗脱部位高效液相图谱与抗抑郁效应的关联性。**方法** 采用 AB-8 大孔树脂制备石菖蒲不同部位。采用梯度洗脱法建立石菖蒲原药材及不同树脂洗脱部位的高效液相特征图谱,并确认图谱中特征峰及对应特征峰之间的峰面积数据关系。运用小鼠悬尾实验(TST)、游泳实验(FST)等小鼠行为学实验,观察口服石菖蒲及不同树脂洗脱部位抗抑郁效应。**结果** 石菖蒲原药材及不同 AB-8 树脂洗脱部位的特征图谱具有特征共有峰。石菖蒲大孔树脂 90%及 70%乙醇洗脱部分能显著缩短 TST 和 FST。石菖蒲抗抑郁效应与特征峰具有关联性。**结论** 石菖蒲具有抗抑郁作用,其主要抗抑郁效应来源于 AB-8 树脂 70%及 90%乙醇洗脱部位。石菖蒲液相特征图谱及相关峰数据关系可用于衡量石菖蒲的抗抑郁效应,为今后石菖蒲用于抗抑郁效应研究及开发提供依据。

[关键词] 石菖蒲;AB-8 大孔树脂不同洗脱部位;高效液相图谱;抗抑郁**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)32-4490-03

Correlation study on high performance liquid chromatography and antidepressant effect of different eluting fractions of acorus tatarinowii schott macroporous resin*

Zhou Ya fei, Zhu Xianting, Deng Yuqing, Zhou Wei[△]

(College of Health Science and Nursing, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

[Abstract] **Objective** To research the correlation on high performance liquid chromatography (HPLC) and antidepressant effect of different elution fractions of acorus tatarinowii schott macroporous resin. **Methods** Prepared different fractions by using AB-8 macroporous resin. Establish HPLC characteristic chromatograms of crude drugs and different elution fractions from AB-8 acorus tatarinowii schott macroporous resin by using gradient elution. Confirm characteristic peaks in chromatograms. despair models of male mice, including tails suspension test (TST), forced swimming test (FST) were used to evaluate antidepressant effects by taking orally. **Results** HPLC chromatograms of crude drugs and different fraction of acorus tatarinowii schott showed that they had same characteristic peaks. Elution of 90% and 70% alcohol solution from AB-8 macroporous resin can obviously reduce TST and FST time. The anti-depressant effect were associated with characteristic peaks on chromatogram. **Conclusion** Acorus tatarinowii schott has anti-depressant effect, and mainly from 70% and 90% alcohol solution eluted from AB-8 macroporous resin. HPLC characteristic chromatography and data relationship between relative peaks can be used to judge the antidepressant effects of acorus tatarinowii schott, and give reference to research and product development.

[Key words] acorus tatarinowii schott; different fraction eluted from AB-8 macroporous resin; high performance liquid chromatography; anti-depression

石菖蒲药材来源于天南星科植物石菖蒲的根茎,味辛、苦,性温,具有开窍豁痰、醒神益智、化湿开胃功能;其主要化学成分为挥发油类(主要含单萜、倍半萜、苯丙素等)及苯甲酸类、多糖等^[1]。本课题组成员前期研究表明,石菖蒲具有良好的抗抑郁效果^[2]。但在现有研究中,石菖蒲的抗抑郁效应集中在化学成分、效应、单个成分的作用等层面,少有石菖蒲成分与抗抑郁效应的关联性研究^[3-5]。本次研究是以“抗抑郁成分群”研究为核心,通过 AB-8 大孔树脂制备石菖蒲不同洗脱部位,建立其高效液相特征图谱,确认图谱特征峰及对应特征峰之间的峰面积数据关系,并以小鼠悬尾、游泳等经典行为学实验为观察项目,探讨石菖蒲的特征化学成分组与抗抑郁效应的相关性。

1 材料与方

1.1 仪器、药品与试剂 THERMO 自动进样高效液相(FINNIGAN SURVEYOR, PDA 检测器); Milli-Q Integral 超纯水一体化智能系统制备(Merck Millipore); 手提式中药粉碎

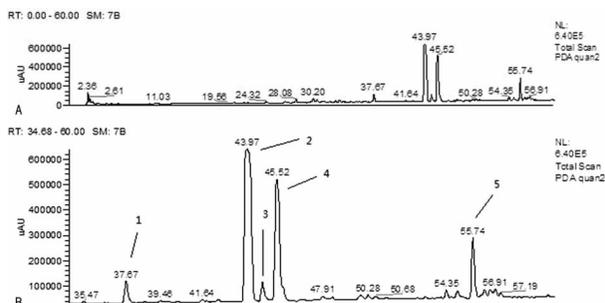
机(型号: DFT-200, 江阴市洲元药化机械制造有限公司); 真空泵(型号: 金叶 SHZ-III 型, 上海亚荣生化仪器厂); 旋转蒸发器(型号: RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂); 超声波振荡器(型号: KH3200DB, 江苏昆山禾创超声仪器有限公司); 真空干燥箱(型号: DZF6020, 上海齐欣科学仪器有限公司); 恒温水浴锅(型号: B-260, 上海亚荣生化仪器厂); JY6001 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); 1/100S 电子秒表。95%乙醇购自武汉点达化工有限公司; 色谱试剂甲醇购自 Fisher 公司; AB-8 大孔树脂购自天津波鸿树脂科技有限公司; 石菖蒲饮片(批号: 20121106)购自武汉市神草中药饮片有限公司, 经武汉轻工大学生物制药与工程学院陈平教授鉴定为天南星科植物石菖蒲的干燥根茎, 药材标本现存于本实验室。实验用雄性昆明小鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 许可证号为 SCXK(鄂)2004-0007, 体质量为(25±5)g。

1.2 方法

* 基金项目:湖北省教育厅科学技术研究计划重点项目(D20131702);湖北省卫生厅科研项目(JX6B100)。 作者简介:周雅菲(1993-),本科,主要从事药理学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zhouwei8001@163.com。

1.2.1 原药材浸膏及不同极性部位制备方法 取石菖蒲原药材粉碎过 40 目筛,加 8 倍量 75%乙醇,浸泡 30 min,煮沸 60 min,倾出药液,药渣加入 4 倍量水,煮沸 45 min,滤过除渣。合并提取液,减压浓缩并真空干燥制成药材干浸膏,称质量。使用 AB-8 大孔树脂,将粉碎后的石菖蒲药材干浸膏用适量蒸馏水超声溶解,定容至折算药材量 1 g/mL,以 1 倍树脂体积/小时上样,以 3 倍树脂体积/小时的洗脱速度,先后以 3 倍体积的水、20%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇等进行洗脱,收集洗脱液,浓缩、减压干燥制成干浸膏,称质量并编为 AB-8 不同浓度乙醇洗脱部位。根据干浸膏质量与原药材质量比,折算成对应原药材质量。

1.2.2 高效液相实验 供试样品制备实验前取制备的原药材及不同部位干浸膏,精确称质量,使用色谱甲醇溶解,超声 10 min 后色谱甲醇定容;使用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。色谱条件色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×250.0 mm,5 μm) 柱温 30 °C,流速为 1.0 mL/min。采用流速:1.0 mL/min,溶剂为甲醇(A)-0.01%甲酸水(B)。经条件筛选,确定洗脱梯度为:5%甲醇 60 min 100%甲醇,样品进样量固定为 10 μL,检测波长以全波长(PDA,190~400 nm)。由于其 1~5 峰面积积分值总和占石菖蒲药材 PDA 液相峰积分总面积 80%以上,确定图谱中峰为石菖蒲特征峰。石菖蒲原药材液相特征图谱见图 1。



A:石菖蒲药材液相 PDA 全谱;B:石菖蒲药材液相 PDA 特征谱段。

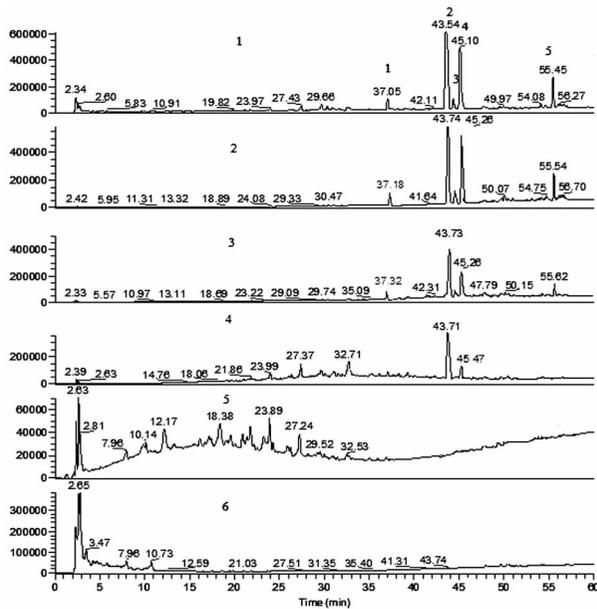
图 1 石菖蒲药材高效液相 PDA 图谱

日内及日间精密度的实验取室温放置的石菖蒲原药材供试液,按方法进行液相试验,日内测定 5 次,测定各特征峰峰面积 A_{sn} ,计算 A_{sn} 平均值及相对标准差(RSD),分析日内精密度的。连续测定 5 d,同法测定各特征峰的峰面积及计算 A_{sn} 平均值和 RSD,分析日间精密度的。

石菖蒲药材及 AB-8 不同洗脱部位特征峰自比较分析取的原药材及 AB-8 不同洗脱部位的供试样品,按照液相色谱条件进行实验,测定不同样品各特征峰峰面积 A_{sn} ,不同样本平行测试 5 次。将不同样本中各特征峰峰面积除以样本对应折算的原药材质量(A_{sn}/m)得到对应值 B_{in} ,以计算所得的原药材 B_{in} 量值为基准(100%),计算各洗脱部位不同特征峰的 B_{in} 值占原药材对应特征峰 B_{in} 值的百分比。见图 2。

1.3 小鼠用药剂量及分组 根据药典推荐剂量,取 10 g/d 的人用剂量。小白鼠分成对照组、石菖蒲药材组及 AB-8 不同浓度乙醇洗脱部位组,每组 10 只,根据所确定用药剂量,灌胃给药。依据《中药药理实验方法》^[6]中动物与人体表面积比换算法,将其换算成 20 g 小鼠用石菖蒲药材量为 26 mg/d。根据药材提取物干浸膏及 AB-8 不同浓度乙醇洗脱部位干浸膏折算后对应的原药材量,药液按 0.1 g/mL 的原药材浓度进行配置。根据小鼠体重计算实际给药量,1 d 分两次灌胃给予。

1.3.1 小鼠悬尾实验(TST) 根据文献^[2],在各组小鼠适应环境 1 周后,均按剂量要求灌胃给药,每天 2 次;对照组给予同等体积的蒸馏水。连续给药 7 d,并于实验第 1、3、7 天进行 TST。在测试当天第 2 次给药 1 h 后,用胶布将小鼠尾在距尾尖 2 cm 处粘于悬尾平衡支架,勿使小鼠尾部扭曲折叠,使其头部向下悬挂呈倒悬状,头部距离桌面 15 cm。每只小鼠悬尾 6 min,前 2 min 适应,记录后 4 min 内的累计不动时间(不动指小鼠除呼吸外所有肢体均不动)。



1:石菖蒲药材;2:90%乙醇洗脱部分;3:70%乙醇洗脱部分;4:50%乙醇洗脱部分;5:20%乙醇洗脱部分;6:水洗脱部分。

图 2 石菖蒲药材及 AB-8 树脂不同洗脱部位高效液相图谱

1.3.2 小鼠游泳实验(FST) 根据文献^[2],各组小鼠适应环境 1 周后,均按剂量要求灌胃给药,每天 2 次;对照组给予同等体积的蒸馏水。连续给药 7 d,并于实验第 1、3、7 天进行 FST。实验前 24 h 动物进行游泳训练 15 min,并单笼饲养,禁食不禁水。实验时将当天第 2 次给药 1 h 后的小鼠单只放入直径约 18 cm、水深 18 cm、水温(25±1)°C 的圆形容器内,适应 2 min 后开始计算后 4 min 内累计不动时间(漂浮不动状态,仅露出鼻孔保持呼吸,四肢偶尔划动以保持身体不至沉下)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 石菖蒲液相特征峰精密度的实验 结果表明日内及日间精密度的良好。见表 1。

表 1 精密度的实验

特征峰 峰号	日内精密度(n=5)		日间精密度(n=5)	
	测得峰面积	RSD(%)	测得峰面积	RSD(%)
1	1 080 503±25 932	2.40	1 079 302±30 224	2.80
2	14 544 866±302 453	2.08	14 395 667±294 357	2.04
3	907 652±24 132	2.66	899 052±23 980	2.67
4	6 978 846±127 894	1.83	7 023 101±130 046	1.85
5	2 343 253±48 269	2.06	2 294 651±46 973	2.05

表 2 石菖蒲药材及 AB-8 不同浓度乙醇洗脱部位特征峰峰面积自比较分析

样品	特征峰峰面积 Bin 值/原药材特征峰 Bin 值(%)									
	峰 1	RSD	峰 2	RSD	峰 3	RSD	峰 4	RSD	峰 5	RSD
药材	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
90%乙醇	66.82±4.42	6.61	64.77±2.19	4.07	61.87±2.89	4.67	64.23±3.26	5.08	72.86±4.89	6.71
70%乙醇	21.46±0.84	3.91	21.24±1.01	4.00	36.86±1.06	2.88	25.16±1.13	4.49	24.56±1.03	4.19
50%乙醇	7.64±0.31	4.06	13.54±0.68	5.02	—	—	10.21±0.37	3.62	—	—
20%乙醇	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

—:此项无数据。

表 3 石菖蒲药材及 AB-8 不同浓度乙醇洗脱部位对小鼠悬尾不动时间、游泳不动时间的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	悬尾不动时间(s)			游泳不动时间(s)		
		第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 7 天
对照组	10	186.09±13.26	164.28±9.12	148.26±6.26	153.07±10.26	142.15±9.87	151.29±9.89
药材组	10	91.23±4.56	83.21±5.09	62.36±3.84	79.65±4.37	71.34±3.65	67.98±4.24
90%乙醇组	10	101.34±5.26	94.87±5.43	73.26±4.98	98.67±8.83	94.82±7.93	86.87±8.64
70%乙醇组	10	119.87±7.86	110.87±7.96	97.67±6.65	121.94±7.56	115.67±9.76	101.23±6.98
50%乙醇组	10	172.49±9.87	152.73±8.62	139.26±8.87	159.49±9.98	144.83±10.77	154.69±11.23
20%乙醇组	10	177.49±10.98	166.87±10.42	157.74±10.53	150.27±10.33	142.14±9.49	151.27±10.77
水	10	182.18±11.27	162.28±11.75	144.19±12.83	161.27±11.33	149.87±9.88	154.54±9.95

2.2 石菖蒲药材及 AB-8 不同浓度乙醇洗脱部位特征峰自比较 结果表明,各特征峰在不同极性部位 Bin 值占石菖蒲原药材对应 Bin 值的百分比存在显著差异。1~5 号特征峰主要集中在 90%乙醇洗脱部位,70%乙醇洗脱部位也有分布。50%乙醇洗脱部位只有特征峰 1、2、4 的分布,且相对比例低于 15%。20%乙醇及水洗脱部位无特征峰分布。见表 2。

2.3 TST、FST 分析 从给药第 1 天开始,同测试时间点石菖蒲药材组、90%乙醇组、70%乙醇组与对照组比较,小鼠悬尾不动时间、游泳不动时间明显缩短($P<0.05$);各组小鼠悬尾不动时间第 1、3、7 天逐渐缩短;由于小鼠给药量折合原药材量一致,90%乙醇组、70%乙醇组能部分代表石菖蒲药材的抗抑郁功能,而其他部位在药典推荐剂量下几乎无作用。见表 3。

3 讨论

在同石菖蒲药材折算计量的前提下,本次研究所确定的液相特征峰群在石菖蒲药材及 AB-8 不同浓度乙醇洗脱部位表达有明显差异,其在 TST 及 FST 中也表现出了不同效果。石菖蒲、AB-8 树脂 90%及 70%乙醇洗脱部位在药典推荐剂量下有抗抑郁效应,且 90%部位强于 70%部位。其效应与特征峰具有特征相关性。90%乙醇洗脱部位集中了药材中超过一半质量(峰面积折算)的 1~5 特征峰对应物质;70%乙醇洗脱部位集中了近 1/4 质量的 1~5 特征峰对应物质;而 50%、20%乙醇及水的部位无法发现峰 3、5 对应的峰。结合以上分析可知,1~5 号峰群同时出现与石菖蒲的抗抑郁效应具有良好的相关性,其抗抑郁效应与其含量呈正相关;如缺失峰 3、5 的表达,则在药典剂量下几无抗抑郁效应。证明对 1~5 号峰群的富集且全表达有利于石菖蒲抗抑郁效应。

中药是一个多种成分的复合体,科学合理的质量控制方法是保证中药质量的前提和基础。现有很多研究运用高效液相等现代设备,建立相应特征图谱来描述及控制中药质量^[7-9]。

本次研究依据“成分-效应”相结合的思路,建立石菖蒲抗抑郁有效成分群的高效液相紫外特征谱,为今后的进一步研究及确定中药石菖蒲抗抑郁产品的质量控制方法提供借鉴。

参考文献

- [1] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994:686.
- [2] 谭安娜,周威,包祖晓. “助阳舒心方”及其拆方抗抑郁作用[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(15):1317-1318.
- [3] 曾志,叶雪宁,沈妙婷,等. 不同产地石菖蒲的挥发性成分研究[J]. 分析测试学报,2011,30(4):407-412.
- [4] 董小萍,邓放. 石菖蒲质量标准研究进展[J]. 成都中医药大学学报,2001,24(1):60-62.
- [5] 房敏峰,张文娟,李云峰,等. GC-MS 分析药对远志-石菖蒲中的脂溶性成分[J]. 药物研究,2009,18(23):3-5.
- [6] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:206.
- [7] 戴莹,姜艳艳,刘洋,等. 基于类药有效组分特征图谱的中药复方质量表征模式研究[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(5):326-331.
- [8] 姜艳艳,戴莹,巴寅颖,等. 基于开心散远志类药有效组分特征图谱的远志质量表征研究[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(8):544-547.
- [9] 周威,石任兵,孙建宁. 清脑宣窍有效组分在正常及不同模型大鼠体内的心脏药理学[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(17):1437-1440.