

茯苓水提物 UPLC 指纹图谱的建立及其镇静催眠作用的谱效关系研究[△]

王天合^{1*}, 李慧君¹, 张丹丹¹, 罗心遥¹, 夏和元¹, 韩思婕¹, 潘翔¹, 万明², 叶晓川^{1#}(1.湖北中医药大学药学院中药资源与中药化学省级重点实验室, 武汉 430065; 2.湖北省中医药研究院/湖北省中医院药事部, 武汉 430061)

中图分类号 R284.1; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)05-0564-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.05.10

摘要 目的:建立茯苓水提物的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并考察其与镇静催眠作用的谱效关系。方法:将10批不同产地茯苓经水提后得水提物。采用UPLC法测定该水提物,色谱柱为Waters HSS-C₁₈,流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈-甲醇(梯度洗脱),流速为0.4~0.2 mL/min,检测波长为210、242 nm,柱温为40 ℃,进样量为2 μL。采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)建立10批茯苓水提物的指纹图谱并进行共有峰指认。以小鼠的入睡率、入睡潜伏期和睡眠持续时间为单一药效指标,考察戊巴比妥钠协同作用下10批不同产地茯苓水提物的镇静催眠作用;将单一药效指标和总药效(由单一指标经层次分析法计算而得)进行数据转化后,采用灰色关联度分析法分析茯苓水提物指纹图谱中各共有峰与单一药效及总药效的关联度。结果:10批茯苓水提物共有24个共有峰,指认出11个成分,分别为16-羟基松苓新酸(6号峰)、16 α -hydroxytrametendic acid(7号峰)、茯苓酸B(9号峰)、去氢土莫酸(10号峰)、茯苓酸A(12号峰)、猪苓酸C(15号峰)、3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸(17号峰)、去氢茯苓酸(20号峰)、茯苓酸(21号峰)、松苓新酸(22号峰)、脱氢齿孔酸(24号峰)。经灰色关联度分析发现,24个峰与睡眠持续时间的关联度均大于0.6(0.611 5~0.811 8),与入睡潜伏期的关联度除14、24、2号峰外,其余均大于0.6(0.605 9~0.790 4);与入睡率的关联度除23、19、17、5号峰外,其余均大于0.6(0.606 4~0.721 6);与总药效的关联度除2、5、19号峰外,其余均大于0.6(0.619 0~0.781 2);与总药效关联度排名前10位的色谱峰分别为15号峰(猪苓酸C)、16号峰、8号峰、11号峰、12号峰(茯苓酸A)、1号峰、7号峰(16 α -hydroxytrametendic acid)、3号峰、9号峰(茯苓酸B)、20号峰(去氢茯苓酸)。结论:本研究建立了茯苓水提物的UPLC指纹图谱,指认了11个共有峰成分;猪苓酸C等10种成分与镇静催眠总药效关联较大,初步揭示了茯苓镇静催眠作用的药效物质基础。
关键词 茯苓;超高效液相色谱;指纹图谱;镇静;催眠;谱效关系;灰色关联度分析;小鼠

相关性,且与文献报道一致^[3]。经验证后发现,预测值和实测值的相对误差未超过15%,表明本研究建立的谱-效关系模型可较好地预测和评价黄连花萼的抗氧化、抑菌作用。

综上所述,本研究建立的谱-效相关性模型可用于预测和评价黄连花萼的抗氧化、抑菌作用,1、2、3、4、6、7号峰所代表化学成分是黄连花萼抗氧化作用的物质基础,盐酸小檗碱是其抑菌作用的物质基础。

参考文献

- [1] 魏华波,董洋,谭兵,等.黄连花萼化学成分和药理作用的研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(27):5342-5344.
- [2] 屠大伟,张保顺,李学刚.黄连花茶加工工艺及其抗氧化作用研究[J].食品工业科技,2007(5):165-167.

[△] 基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2017YFC1703004);湖北省科技计划项目(No.2019ACA121)

* 硕士研究生。研究方向:中药新制剂、新剂型。E-mail:1417926751@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药及其制剂的物质基础。E-mail:yxxcc1965@163.com

- [3] 尹良军,周振旗,绍元,等.盐酸小檗碱、人参皂苷Rb₁、黄芩苷及绿原酸对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J].医学综述,2016,22(24):4969-4972.
- [4] 伍利华,杨慧,等.反相高效液相色谱法及紫外-可见分光光度法测定黄连花萼的含量[J].时珍国医国药,2019,30(6):1330-1332.
- [5] 李琛,张婷,罗安伟,等.8种猕猴桃抗氧化活性评价及基于HPLC与FT-IR指纹分析的品种区分[J].现代食品科技,2016,32(6):288-297.
- [6] 李海华,郭蔚冰,陈志强,等.45味中药对多重耐药大肠杆菌的抑菌效果[J].中国现代中药,2019,21(6):791-796.
- [7] 李鹏,李祥,陈建伟,等.桃红四物汤干预痛经模型小鼠有效部位的谱效关系研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):144-149.
- [8] 伍利华,张佳,邓燕君,等.基于酶活性的丹参茎叶活血活性谱-效模型[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):133-138.

(收稿日期:2020-09-15 修回日期:2021-01-16)

(编辑:唐晓莲)

Establishment of UPLC Fingerprint of *Poria cocos* Aqueous Extract and Study on Its Spectrum-effect Relationship with Sedative and Hypnotic Effect

WANG Tianhe¹, LI Huijun¹, ZHANG Dandan¹, LUO Xinyao¹, XIA Heyuan¹, HAN Sijie¹, PAN Xiang¹, WAN Ming², YE Xiaochuan¹ (1. Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Resources and Chinese Medicine Chemistry, College of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Academy of TCM/Dept. of Pharmaceutical Administration, Hubei Hospital of TCM, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the UPLC fingerprint of *Poria cocos* aqueous extract, and to investigate its relationship with sedative and hypnotic effect. METHODS: Ten batches of *P. cocos* from different areas were extracted with water to obtain the aqueous extract. UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters HSS-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile-methanol (gradient elution) at the flow rate of 0.4-0.2 mL/min. The detection wavelengths were set at 210 and 242 nm. The column temperature was 40 °C, and sample size was 2 μL. The fingerprints of 10 batches of *P. cocos* aqueous extracts were established by using the *Similarity Evaluation System of TCM Fingerprint* (2012A version), and the common peaks were identified. The sedative and hypnotic effects of 10 batches of *P. cocos* aqueous extracts from different areas under the synergistic action of pentobarbital sodium were investigated by taking the sleeping rate, sleep latency and sleep duration of mice as the single efficacy index. After data transformation of single efficacy index and total efficacy (single indexes calculated by analytic hierarchy process), grey correlation analysis was used to analyze the correlation between the common peaks in fingerprint of *P. cocos* aqueous extract and the single efficacy index and total efficacy. RESULTS: There were 24 common peaks in 10 batches of aqueous extract of *P. cocos*, and 11 components were identified, i.e. 16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid (peak 6), 16 α -hydroxytrametendic acid (peak 7), poricoic acid B (peak 9), dehydrotumulosic acid (peak 10), poricoic acid A (peak 12), polyporenic acid C (peak 15), 3-*O*-acetyl-16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid (peak 17), dehydropachymic acid (peak 20), pachymic acid (peak 21), dehydrotrametenolic acid (peak 22), dehydroeburicoic acid (peak 24). Grey correlation analysis showed, the correlation between 24 peaks and sleep duration was greater than 0.6 (0.611 5-0.811 8); the correlation between 24 peaks and sleep latency was greater than 0.6 (0.605 9-0.790 4), except for peaks 14, 24 and 2; the correlation of 24 peaks between sleeping rate was greater than 0.6 (0.606 4-0.721 6), except for peaks 23, 19, 17 and 5; the correlation of 24 peaks between total efficacy was greater than 0.6 (0.619 0-0.781 2), except for peaks 2, 5, 19. The top 10 chromatographic peaks related to the total efficacy were peak 15 (polyporenic acid C), peak 16, peak 8, peak 11, peak 12 (poricoic acid A), peak 1, peak 7 (16 α -hydroxytrametendic acid), peak 3, peak 9 (poricoic acid B) and peak 20 (dehydropachymic acid). CONCLUSIONS: UPLC fingerprint of *P. cocos* aqueous extract was established and 11 components were identified. Ten components such as polyporus acid C are closely related to the total efficacy of sedation and hypnosis, which preliminarily reveal the material basis of the sedative and hypnotic effect of *P. cocos*.

KEYWORDS *Poria cocos*; UPLC; Fingerprint; Sedation; Hypnosis; Spectrum-effect relationship; Grey correlation analysis; Mice

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,其药用历史悠久,始载于《五十二病方》,也收载于历代版本的《中国药典》中;其味甘、淡、平,在《神农本草经》中归为上品,属药食同源中药,久服可安魂养神,为九大仙品药草之一,具有利水渗湿、健脾、宁心的功效^[1]。茯苓在临床上可单用或与其他中药组成复方,常用于治疗水肿、痰饮、脾虚、便溏泄泻、心神不安、惊悸失眠^[2]。茯苓主要含有多糖类、三萜类、蛋白质类、甾体类等化学成分^[1],已有文献报道茯苓的多糖部位和乙酸乙酯部位均具有良好的镇静催眠作用^[3],但上述部位的成分复杂,具体有哪些成分具有镇静催眠活性尚不清楚。

中药谱效关系研究是将中药化学成分谱与中药药效活性有机结合,采用回归分析、相关性分析、灰色关联度分析、主成分分析、人工神经网络、聚类分析等多种数

学分析模型,可更全面、多角度地对中药进行评价,常用于中药质量评价、药效物质基础研究、质量标志物筛选、中药组方配伍、中药有效部位筛选以及提取纯化工艺优化等方面^[4-5]。基于此,本研究先将10批不同产地茯苓以水煎煮制得水提物,并建立其超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱;同时,以阈上剂量戊巴比妥钠协同作用下的小鼠入睡潜伏期和睡眠持续时间,以及阈下剂量戊巴比妥钠协同作用下的小鼠入睡率为镇静催眠指标,并结合灰色关联度法进行谱效相关性分析,以期初步揭示茯苓镇静催眠的药效物质基础,为完善茯苓的质量评价标准提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:Agilent1290型系列四元泵UPLC仪(美国Agilent公司)、Milli-Q型超纯水系统(美

国 Millipore 公司)、BT25S 型十万分之一分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、AL204 型万分之一分析天平(瑞士 Metter Toledo 公司);SCIENTZ-10ND 型真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、DZF-6050 型真空干燥箱(上海博讯实业有限公司)、KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、JSB6-02 型电子计重秤(上海浦春计量仪器有限公司)、RE-6000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、PC3830A 型三排 A 型秒表计时器(深圳市惠波工贸有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的 10 批不同产地茯苓药材由本课题组前期在茯苓种植区收集,经湖北中医药大学药学院叶晓川教授鉴定均为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的菌核(10 批茯苓药材来源信息见表 1)。其它药品与试剂有:16-羟基松苓新酸、16 α -hydroxytrametenolic acid、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、猪苓酸 C、3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、脱氢齿孔酸对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号分别为 PS010073、PS011188、PS010102、PS19092902、PS010109、PS011211、PS010088、PS010110、PS010086、PS010087)、松苓新酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 Y08J7H8750)、氯化钠注射液(武汉滨湖双鹤药业有限责任公司,批号 1901070801,规格 100 mL:0.9 g)、戊巴比妥钠(天津天力化学试剂有限公司,批号 20130307)、艾司唑仑片(华中药业股份有限公司,批号 20190303,规格 1 mg/片)、安神胶囊(长春海外制药集团有限公司,批号 20190401,规格 0.25 g/粒);甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,水为超纯水。

表 1 10 批茯苓药材来源信息

Tab 1 Information of 10 batches of *P. cocos* sources

编号	产地	批号
S1	云南省丽江市	201804
S2	安徽省岳西市	201911
S3	云南省楚雄市	201807
S4	云南省大理市	201804
S5	河南省商城县	201907
S6	湖南省怀化市	201804
S7	湖北省英山县	201807
S8	湖北省罗田县	201807
S9	湖北省麻城市	201709
S10	福建省南平市	201906

1.3 动物

本研究所用动物为 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量为 18~22 g,由辽宁省实验动物资源中心提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(辽)2015-0001。小鼠饲养于湖北中医药大学实验动物中心,环境温度为 20~25 ℃,相对湿度为 40%~60%,每日光照与黑暗时间各 12 h。本文涉及的动物实验经湖北中医药大学伦理委员

会批准,批准号为 HUCMS201910010。

2 方法与结果

2.1 茯苓水提取物 UPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 茯苓水提取物的制备 10 批不同产地茯苓药材打粉,过三号筛后,称取药材粉末 500 g,置于 10 L 圆底烧瓶中,加入 10 倍量(按 mL/g 计,下同)水浸泡过夜,加热回流 2 h,用 300 目滤布趁热滤过,收集滤液;残渣继续加 10 倍量水回流提取 1 h,用 300 目滤布趁热滤过;合并 2 次滤液,于 100 ℃水浴条件下浓缩为浸膏,再于真空条件下冷冻干燥,粉碎,即得茯苓水提取物粉末。按茯苓生药量计,S1~S10 号茯苓水提取物的得率分别为 2.77%、3.11%、6.43%、4.33%、3.16%、3.77%、3.04%、3.45%、4.25%、3.64%。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为 Waters HSS-C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相为 0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B)-甲醇(C),梯度洗脱(0~4 min,42%A→12%A,55%B→85%B,流速为 0.4~0.2 mL/min;4~8 min,12%A→0%A,85%B→97%B,流速为 0.2 mL/min;8~10 min,97%B→100%B,3%C→0%C,流速为 0.2~0.4 mL/min;10~15 min,100%B,流速为 0.4 mL/min);进样量为 2 μL;柱温为 40 ℃;检测波长为 210、242 nm[采用二极管阵列检测器(DAD)]。

2.1.3 供试品溶液制备 取“2.1.1”项下 10 批不同产地茯苓水提取物粉末各约 1 g,精密称定,分别置于 50 mL 锥形瓶中,加入甲醇 20 mL,超声(功率 500 W,频率 40 kHz)提取 60 min,放冷后加甲醇补足丢失质量;以 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液 5 mL 于试管中,置于真空干燥箱中于 60 ℃挥干溶剂,再加入 1 mL 甲醇复溶,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.4 对照品溶液制备 分别精密称取 16-羟基松苓新酸 1.14 mg、16 α -hydroxytrametenolic acid 1.08 mg、茯苓酸 B 1.32 mg、去氢土莫酸 1.02 mg、茯苓酸 A 1.01 mg、猪苓酸 C 0.49 mg、3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸 1.30 mg、去氢茯苓酸 1.92 mg、茯苓酸 2.18 mg、松苓新酸 0.48 mg、脱氢齿孔酸 0.88 mg 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,即得单一对照品溶液。精密吸取各对照品溶液 2 mL 于同一 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,以 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得混合对照品溶液。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(S7 号样品水提取物)适量,按“2.1.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录色谱图,以 20 号峰(因其出峰时间适中、峰形良好,下同)为参照,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.6%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.2%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取“2.1.1”项下 S7 号样品水提取物粉

末6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以20号峰为参照,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.4% ($n=6$),相对峰面积的RSD均小于3.0% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(S7号样品水提物),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h后,按“2.1.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以20号峰为参照,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.0% ($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.5% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.8 10批茯苓水提物样品UPLC指纹图谱的生成 取“2.1.1”项下S1~S10号样品水提物粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样,记录色谱图。采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012A版),以S7号样品水提物图谱为参照(因其色谱峰峰形较明显,峰信号强度适中),设置时间窗宽度为0.1 s,采用全谱峰匹配法^[6]进行色谱峰匹配,生成10批茯苓水提物的UPLC叠加指纹图谱,详见图1;采用中位数法^[6]生成对照图谱(R),详见图2。

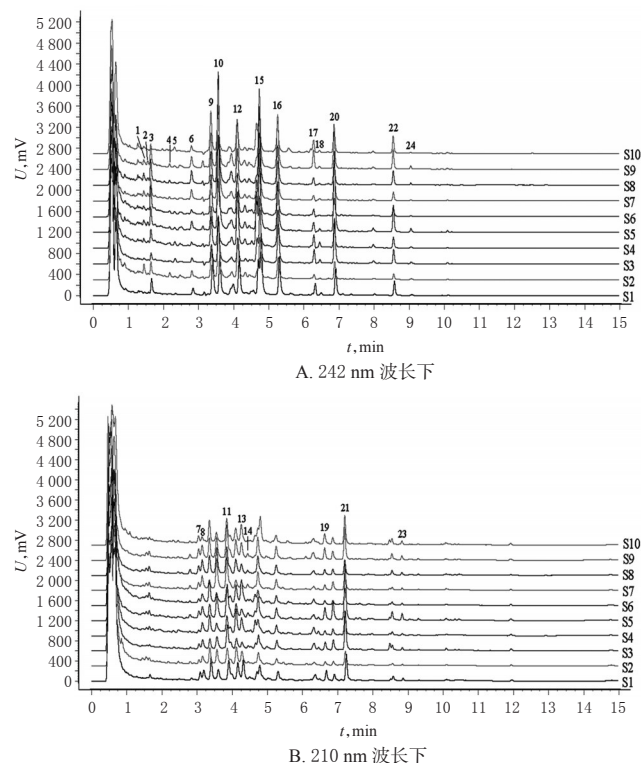


图1 10批不同产地茯苓水提物的UPLC叠加指纹图谱
Fig 1 UPLC superimposed fingerprint of 10 batches of *P. cocos* aqueous extract from different producing areas

2.1.9 共有峰指认 取“2.1.4”项下混合对照品溶液按“2.1.2”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图3。由图

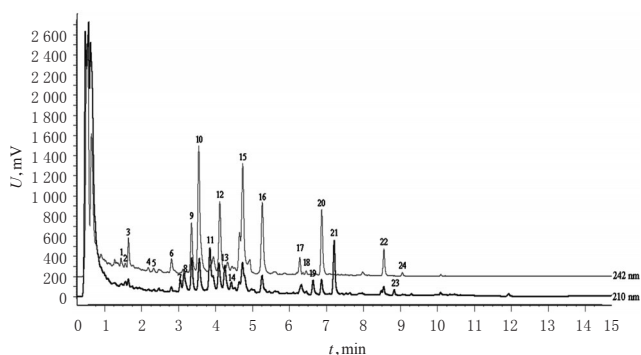
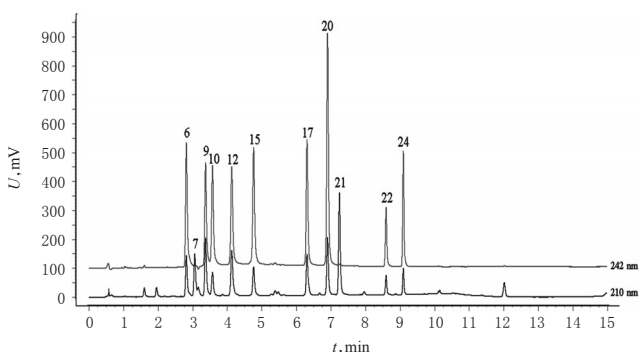


图2 茯苓水提物样品的对照图谱(R)
Fig 2 Reference fingerprint (R) of *P. cocos* aqueous extract

1和图2可见,10批茯苓水提物共含24个共有峰;通过与图3比对,指认其中的6号峰为16-羟基松苓新酸,7号峰为16 α -hydroxytrametendic acid,9号峰为茯苓酸B,10号峰为去氢土莫酸,12号峰为茯苓酸A,15号峰为猪苓酸C,17号峰为3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸,20号峰为去氢茯苓酸,21号峰为茯苓酸,22号峰为松苓新酸,24号峰为脱氢齿孔酸。



注:6. 16-羟基松苓新酸;7. 16 α -hydroxytrametendic acid;9. 茯苓酸B;10. 去氢土莫酸;12. 茯苓酸A;15. 猪苓酸C;17. 3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸;20. 去氢茯苓酸;21. 茯苓酸;22. 松苓新酸;24. 脱氢齿孔酸
Note: 6. 16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid; 7. 16 α -hydroxytrametendic acid; 9. poricoic acid B; 10. dehydrotramulosic acid; 12. poricoic acid A; 15. polyporenic acid C; 17. 3-O-acetyl-16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid; 20. dehydropachymic acid; 21. pachymic acid; 22. dehydrotrametenolic acid; 24. dehydroeburicoic acid

图3 混合对照品的UPLC图谱
Fig 3 UPLC chromatogram of mixed control

2.1.10 相似度评价 将10批不同产地茯苓水提物的指纹图谱导入《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)进行相似度评价。结果,242 nm波长下10批茯苓水提物的相似度在0.304~0.988范围内;210 nm波长下10批茯苓水提物的相似度在0.264~0.991范围内,详见表2、表3。

2.2 戊巴比妥钠协同作用下茯苓水提物的镇静催眠作用考察

茯苓药性缓和,对小鼠的镇静催眠力缓,故本研究参考文献[7-9]方法,考察阈上剂量戊巴比妥钠协同作

表2 242 nm 波长下10批不同产地茯苓水提物的相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of 10 batches of *P. cocos* aqueous extract from different producing areas under 242 nm

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照图谱(R)
S1	1.000	0.920	0.557	0.914	0.801	0.304	0.804	0.745	0.854	0.336	0.846
S2	0.920	1.000	0.592	0.964	0.897	0.344	0.919	0.879	0.950	0.383	0.915
S3	0.557	0.592	1.000	0.574	0.612	0.937	0.568	0.569	0.587	0.954	0.841
S4	0.914	0.964	0.574	1.000	0.857	0.336	0.837	0.788	0.907	0.362	0.881
S5	0.801	0.897	0.612	0.857	1.000	0.385	0.959	0.955	0.965	0.426	0.916
S6	0.304	0.344	0.937	0.336	0.385	1.000	0.340	0.377	0.359	0.988	0.661
S7	0.804	0.919	0.568	0.837	0.959	0.340	1.000	0.980	0.960	0.380	0.901
S8	0.745	0.879	0.569	0.788	0.955	0.377	0.980	1.000	0.959	0.414	0.892
S9	0.854	0.950	0.587	0.907	0.965	0.359	0.960	0.959	1.000	0.391	0.923
S10	0.336	0.383	0.954	0.362	0.426	0.988	0.380	0.414	0.391	1.000	0.692
对照图谱(R)	0.846	0.915	0.841	0.881	0.916	0.661	0.901	0.892	0.923	0.692	1.000

表3 210 nm 波长下10批不同产地茯苓水提物的相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation results of 10 batches of *P. cocos* aqueous extract from different producing areas under 210 nm

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照图谱(R)
S1	1.000	0.354	0.787	0.959	0.298	0.985	0.296	0.315	0.334	0.991	0.788
S2	0.354	1.000	0.380	0.354	0.954	0.311	0.975	0.982	0.991	0.355	0.838
S3	0.787	0.380	1.000	0.870	0.401	0.770	0.348	0.379	0.396	0.800	0.738
S4	0.959	0.354	0.870	1.000	0.313	0.961	0.302	0.326	0.343	0.962	0.788
S5	0.298	0.954	0.401	0.313	1.000	0.267	0.986	0.982	0.982	0.312	0.814
S6	0.985	0.311	0.770	0.961	0.267	1.000	0.264	0.284	0.300	0.992	0.765
S7	0.296	0.975	0.348	0.302	0.986	0.264	1.000	0.997	0.989	0.304	0.813
S8	0.315	0.982	0.379	0.326	0.982	0.284	0.997	1.000	0.993	0.324	0.827
S9	0.334	0.991	0.396	0.343	0.982	0.300	0.989	0.993	1.000	0.344	0.838
S10	0.991	0.355	0.800	0.962	0.312	0.992	0.304	0.324	0.344	1.000	0.795
对照图谱(R)	0.788	0.838	0.738	0.788	0.814	0.765	0.813	0.827	0.838	0.795	1.000

用下茯苓水提物对小鼠的入睡潜伏期(小鼠翻正反射消失到翻正反射出现的时间)和睡眠持续时间(注射戊巴比妥钠开始到小鼠翻正反射消失的时间)的影响,以及阈下剂量戊巴比妥钠协同作用下茯苓水提物对小鼠的入睡率(小鼠翻正反射消失达1 min以上即为入睡)的影响,以此来评价其镇静催眠的效果。

2.2.1 阈下剂量戊巴比妥钠协同作用下茯苓水提物的镇静催眠作用 将130只小鼠随机分为空白组(水)、艾司唑仑组(阳性西药对照,0.26 mg/kg,剂量根据临床等效剂量换算而得)、安神胶囊组(阳性中药对照,0.315 g/kg,剂量根据临床等效剂量换算而得)和茯苓S1~S10水提物组[27.3 g/kg(以生药量计),剂量根据文献[3]而得],每组10只。各药物用水制成灌胃混悬液。各组小鼠每天灌胃1次,灌胃体积为20 mL/kg,连续7天。末次给药30 min后,各组小鼠分别腹腔注射阈下剂量的戊巴比妥钠(28.5 mg/kg,参考文献[7-9]和预实验结果),观察各组小鼠入睡的数量,计算入睡率(入睡率=小鼠入睡只数/小鼠总数×100%)。采用SPSS 24.0软件对数据

进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,结果见表4。

表4 阈下剂量戊巴比妥钠协同作用下的茯苓水提物的镇静催眠作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Sedative and hypnotic effect of *P. cocos* aqueous extract under the synergistic effect of pentobarbital sodium at sub-threshold dose($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	入睡率, %	组别	入睡率, %
空白组	10	茯苓S5水提物组	70**
艾司唑仑组	90**	茯苓S6水提物组	30
安神胶囊组	50	茯苓S7水提物组	50
茯苓S1水提物组	40	茯苓S8水提物组	60*
茯苓S2水提物组	50	茯苓S9水提物组	50
茯苓S3水提物组	30	茯苓S10水提物组	40
茯苓S4水提物组	70**		

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

由表4可知,与空白组比较,艾司唑仑组和茯苓S4、S5、S8水提物组小鼠入睡率显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明云南大理、河南商城、湖北罗田产地的茯苓水提物促进小鼠入睡的作用较强。

2.2.2 阈上剂量戊巴比妥钠协同作用下茯苓水提物的镇静催眠作用 将130只小鼠按“2.2.1”项下方法分组及给药。末次给药30 min后,各组小鼠分别腹腔注射阈上剂量的戊巴比妥钠(36 mg/kg,参考文献[7-9]和预实验结果),记录小鼠的入睡潜伏期及睡眠持续时间。采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,结果见表5。

表5 阈上剂量戊巴比妥钠协同作用下的茯苓水提物的镇静催眠作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Sedative and hypnotic effect of *P. cocos* aqueous extract under the synergistic effect of pentobarbital sodium at supra-threshold dose($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	入睡潜伏期, min	睡眠持续时间, min
空白组	9.23±1.29	20.16±9.10
艾司唑仑组	5.98±1.60**	62.67±9.94**
安神胶囊组	7.15±1.36*	57.34±13.98**
茯苓S1水提物组	5.59±0.80**	50.30±5.67**
茯苓S2水提物组	6.00±0.30**	65.28±8.18**
茯苓S3水提物组	6.95±2.28*	50.76±5.95**
茯苓S4水提物组	6.41±1.33**	50.40±3.75**
茯苓S5水提物组	5.62±1.80**	50.10±6.24**
茯苓S6水提物组	6.40±1.59**	50.04±19.95**
茯苓S7水提物组	6.09±1.63**	60.00±11.25**
茯苓S8水提物组	7.71±0.55	57.90±4.96**
茯苓S9水提物组	5.96±1.48**	51.31±17.29**
茯苓S10水提物组	6.25±1.26**	45.60±9.40**

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

由表5可知,与空白组比较,艾司唑仑组、安神胶囊组和茯苓S1~S7、S9~S10水提物组小鼠入睡潜伏期均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);艾司唑仑组、安神胶囊组和茯苓S1~S10水提物组睡眠持续时间均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明大部分产地的茯苓水提物对小鼠的入睡潜伏期和睡眠持续时间均具有较好的改善作用。

2.3 谱效关系分析

2.3.1 单一药效和总药效的数据转化 参考文献[10]方法,将“2.2”项下小鼠入睡率、入睡潜伏期、睡眠持续时间采用升高率或降低率进行药效数据转化,其中,升高率或降低率计算公式为 $Y'_{(k)}=[Y_{0(k)}-\bar{Y}_{0(k)}]/\bar{Y}_{0(k)}$, k 为10批茯苓水提物的编号($k=1,2,3,\dots,10$), Y_0 表示给药组各单一药效的原始数据, \bar{Y}_0 表示空白组各单一药效的原始数据;采用层次分析法^[10]计算小鼠入睡率、入睡潜伏期和睡眠持续时间对总药效的权重系数,并计算镇静催眠总药效(总药效=入睡率权重系数×入睡率升高率+入睡潜伏期权重系数×入睡潜伏期降低率+睡眠持续时间权重系数×睡眠持续时间升高率)。结果,入睡率、入睡潜伏期、睡眠持续时间的权重系数分别为0.142、0.429、0.429,镇静催眠单一药效及总药效的转化数据详见表6。

表6 镇静催眠单一药效及总药效的转化数据

Tab 6 Sedative and hypnotic single efficacy and total efficacy data after conversion

组别	入睡率升高率	入睡潜伏期降低率	睡眠持续时间升高率	总药效
茯苓S1水提物组	3	0.39	1.49	1.24
茯苓S2水提物组	4	0.35	2.24	1.68
茯苓S3水提物组	2	0.25	1.52	1.04
茯苓S4水提物组	6	0.31	1.50	1.63
茯苓S5水提物组	6	0.39	1.48	1.66
茯苓S6水提物组	2	0.31	1.48	1.05
茯苓S7水提物组	4	0.34	1.98	1.56
茯苓S8水提物组	5	0.16	1.87	1.59
茯苓S9水提物组	4	0.35	1.54	1.39
茯苓S10水提物组	3	0.32	1.26	1.11

2.3.2 数据处理 由于茯苓水提物的UPLC指纹图谱共有峰数据与转化后的药效数据的量纲不一致,因此笔者参考文献[11]方法,将转化后的药效数据(入睡率升高率、入睡潜伏期降低率、睡眠持续时间升高率、总药效)与10批茯苓水提物共有峰数据采用均值法进行数据归一化处理。将归一化后的药效数据作为参考序列[记为 $Y_{(k)}$],将共有峰数据作为比较序列,记为 $X_{i(k)}$,计算参考序列与比较序列的灰色关联系数 $[A_{i(k)}]^{[12-13]}$,计算公式为 $A_{i(k)}=[\Delta_{i(k)\min}+\rho\times\Delta_{i(k)\max}]/[\Delta_{i(k)}+\rho\times\Delta_{i(k)\max}]$,其中 ρ 表示分辨系数,通常取0.5; $\Delta_{i(k)}=|Y_{(k)}-X_{i(k)}|$, i 表示茯苓水提物UPLC指纹图谱中的共有峰编号($i=1,2,3,\dots,24$)。

2.3.3 灰色关联度分析 基于“2.3.2”项下数据处理结果,分别计算各参考序列与比较序列之间灰色关联系数 $A_{i(k)}$ 的平均值,即为灰色关联度。将关联度按大小排序

后的关联序,可直观反映茯苓水提物UPLC指纹图谱中各共有峰对其镇静催眠作用的贡献大小,揭示其主要药效物质;当关联度大于0.6时,表示该色谱峰代表的化学成分与药效指标有关联性;当关联度大于0.8时,表示该色谱峰代表的化学成分与药效指标有较大关联性^[10]。结果显示,茯苓水提物UPLC指纹图谱中24个色谱峰与睡眠持续时间的关联度均大于0.6(0.611 5~0.811 8);与入睡潜伏期的关联度,除14、24、2号峰外,其余色谱峰均大于0.6(0.605 9~0.790 4);与入睡率的关联度,除23、19、17、5号峰外,其余色谱峰均大于0.6(0.606 4~0.721 6);与总药效的关联度,除2、5、19号峰外,其余色谱峰均大于0.6(0.619 0~0.781 2)。这说明茯苓水提物对小鼠的镇静催眠作用是由多组分共同作用的结果。其中,与总药效关联度较大的前10位峰分别为15号峰(猪苓酸C)、16号峰、8号峰、11号峰、12号峰(茯苓酸A)、1号峰、7号峰(16 α -hydroxytrametendic acid)、3号峰、9号峰(茯苓酸B)、20号峰(去氢茯苓酸),详见表7。

表7 茯苓水提物UPLC指纹图谱与镇静催眠药效的关联度

Tab 7 Correlation of UPLC fingerprint of *P. cocos* aqueous extract with sedative and hypnotic effect

关联序	入睡率		入睡潜伏期		睡眠持续时间		总药效	
	峰号	关联度	峰号	关联度	峰号	关联度	峰号	关联度
1	10	0.721 6	15	0.790 4	16	0.811 8	15	0.781 2
2	11	0.717 6	16	0.776 2	8	0.809 5	16	0.774 1
3	20	0.714 9	12	0.771 2	15	0.787 0	8	0.767 0
4	15	0.710 0	8	0.760 6	11	0.777 6	11	0.743 9
5	12	0.706 4	7	0.750 0	9	0.747 2	12	0.734 9
6	6	0.699 1	9	0.732 0	12	0.747 1	1	0.723 6
7	8	0.693 7	1	0.712 8	1	0.731 4	7	0.701 9
8	1	0.691 5	21	0.712 8	3	0.720 4	3	0.700 2
9	16	0.689 6	11	0.707 5	14	0.715 3	9	0.694 1
10	7	0.686 9	3	0.695 8	4	0.713 1	20	0.683 1
11	3	0.678 9	13	0.689 0	20	0.709 6	18	0.679 5
12	14	0.671 2	20	0.670 9	18	0.706 9	6	0.673 6
13	4	0.657 6	17	0.654 5	6	0.697 2	14	0.672 7
14	18	0.651 9	6	0.650 2	7	0.695 9	10	0.663 5
15	24	0.639 0	18	0.644 9	22	0.695 9	17	0.660 9
16	9	0.634 7	19	0.643 4	17	0.678 4	4	0.656 1
17	2	0.627 4	22	0.637 7	21	0.675 3	22	0.650 1
18	21	0.622 6	10	0.625 5	24	0.672 0	23	0.632 2
19	22	0.613 2	23	0.623 9	23	0.671 9	21	0.630 7
20	13	0.606 4	4	0.612 0	10	0.664 9	13	0.619 4
21	23	0.592 9	5	0.605 9	5	0.646 4	24	0.619 0
22	19	0.586 3	14	0.592 6	13	0.636 2	2	0.593 5
23	17	0.581 9	24	0.564 3	2	0.628 5	5	0.568 3
24	5	0.576 0	2	0.541 8	19	0.611 5	19	0.567 3

3 讨论

本研究基于茯苓的传统用法,将茯苓进行煎煮后获取其水提物,并建立其水提物的UPLC指纹图谱,以期研究茯苓水提物镇静催眠作用的药效物质基础。笔者在建立10批不同产地茯苓水提物的UPLC指纹图谱时,对

S7号样品水提物(湖北英山)进行全波长扫描,发现其色谱图中大多数色谱峰在242 nm有最大吸收,少部分色谱峰在210 nm有最大吸收,故本试验于242、210 nm双波长下进行扫描并建立UPLC指纹图谱。此外,在建立UPLC条件时发现,茯苓水提物的9、10号峰不易分离,后采取梯度流速的方法进行改善,可达到有效分离的目的。另由于茯苓药材的产地差异和各色谱峰成分的含量高低差异,使得在进行10批不同产地茯苓水提物的制备时,部分色谱峰成分的含量发生变化,或某些小峰成分丢失,从而造成不同产地茯苓水提物的UPLC指纹图谱的相似度偏低;也正是由于这些变化造成了这10批不同产地茯苓水提物镇静催眠的药效差异,因此更有利于进行后续的谱效相关分析。

茯苓药用历史悠久,常作为大宗中成药原料用于临床,其用于治疗精神类疾病或宁心安神时剂量宜大,临床常用剂量为60 g/d,有时用量为30~100 g/d^[14-16]。本课题组在前期研究基础上,结合临床宁心安神常用剂量,确定用于小鼠镇静催眠的生药剂量为27.3 g/kg(约为临床等效剂量的3倍)。

兴奋性神经递质及抑制性神经递质的失调可引起失眠、焦虑、抑郁等诸多精神及心理疾病;戊巴比妥钠是中枢神经系统的抑制剂,可通过抑制兴奋性神经递质谷氨酸、乙酰胆碱、去甲肾上腺素的释放,发挥中枢抑制作用^[17]。因此,本研究在阈上/阈下剂量戊巴比妥钠协同作用下考察茯苓水提物的镇静催眠作用,结果发现,在戊巴比妥钠协同作用下,茯苓水提物表现出一定的镇静催眠作用。

通过灰色关联度分析发现,茯苓水提物24个共有峰与小鼠睡眠持续时间的关联度均大于0.6,其中8、16号峰的关联度大于0.8;而只有21个共有峰与小鼠入睡潜伏期的关联度大于0.6、20个共有峰与入睡率的关联度大于0.6,表明茯苓水提物中有更多的成分与睡眠持续时间相关联,且从药效结果(表4、表5)也可以看出茯苓水提物对睡眠持续时间的影响强于对入睡潜伏期和入睡率的影响。茯苓水提物各共有峰与总药效的关联度,除2、5、19号峰外,其余各峰的关联度均在0.6~0.8之间(与镇静催眠总药效有关联),说明茯苓水提物发挥镇静催眠作用是其各色谱峰代表物质共同作用的结果。其中,与总药效关联度较大的前10位共有峰分别为15号峰(猪苓酸C)、16号峰、8号峰、11号峰、12号峰(茯苓酸A)、1号峰、7号峰(16 α -hydroxytrametendic acid)、3号峰、9号峰(茯苓酸B)、20号峰(去氢茯苓酸)。

综上所述,本研究建立了茯苓水提物的UPLC指纹图谱,指认了11个共有峰成分;猪苓酸C,16号峰、8号峰、11号峰代表的成分,茯苓酸A,1号峰代表的成分,16 α -hydroxytrametendic acid,3号峰代表的成分,茯苓酸B,去氢茯苓酸等10种成分与镇静催眠总药效关联较

大,茯苓水提物的镇静催眠作用是由多组分共同作用的结果。本研究初步揭示了茯苓镇静催眠作用的药效物质基础,可为茯苓质量标志物筛选以及茯苓饮片的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 邓桃妹,彭代银,俞年军,等.茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中草药,2020,51(10):2703-2717.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:251.
- [3] 徐煜彬,徐志立,李明玉,等.茯苓及其化学拆分组分学习记忆及镇静催眠的性味药理学研究[J].中草药,2014,45(11):1577-1584.
- [4] 张小艺,刘久石,高石曼,等.中药谱效关系的研究方法及应用进展[J].中国中药杂志,2019,44(20):4405-4411.
- [5] 蔡靛,张倩,杨丰庆.中药谱效学的应用进展[J].中草药,2017,48(23):5005-5011.
- [6] 缪艳燕,徐帮会,徐剑,等.金银花的HPLC指纹图谱建立及其抗炎作用谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(20):2497-2502.
- [7] 游秋云,王平.茯苓、茯神水煎液对小鼠镇静催眠作用的比较研究[J].湖北中医药大学学报,2013,15(2):15-17.
- [8] 赵天国.茯苓多糖对小鼠镇静、催眠作用的研究[J].畜牧与饲料科学,2017,38(4):73-74.
- [9] 邱麒,易开,郭素华.运用协同戊巴比妥钠动物模型初步探究闽产三味中药的镇静催眠活性[J].海峡药学,2019,31(12):21-23.
- [10] 蒋思怡,宋小英,张丹丹,等.菝葜UPLC指纹图谱与其抗大鼠盆腔炎作用的谱效关系研究[J].中国中药杂志,2019,44(15):3323-3329.
- [11] 罗心遥.基于谱效关系的茯苓健脾药效物质基础研究[D].武汉:湖北中医药大学,2020.
- [12] 刘吉爽,段连政,徐文慧,等.灰色关联度法优化葵花盘“精准炮制”饮片的加工炮制一体化工艺[J].中国药房,2019,30(24):3413-3418.
- [13] 刘雯,刘云,刘进宝,等.基于灰色关联分析的藤茶不同极性部位在小鼠体内抗炎作用的谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(19):2382-2386.
- [14] 苗婷婷.茯苓在《金匱要略》中的配伍运用规律探析[J].浙江中医药大学学报,2015,39(11):820-823.
- [15] 金琦,曹静,王淑华.大剂量茯苓的药理作用及临床应用概况[J].浙江中医志,2003,38(9):45-46.
- [16] 代礼润,郑星宇.茯苓功用浅谈[J].光明中医,2015,30(11):2452-2454.
- [17] 沈建忠,冯忠武,曹兴元.兽药手册[M].北京:中国农业大学出版社,2016:714.

(收稿日期:2020-12-10 修回日期:2020-12-30)

(编辑:唐晓莲)