

泻肺平喘灵的血清药物化学成分

刘菊燕,巢建国*,谷巍,单进军,王跃佳
(南京中医药大学,南京 210023)

[摘要] 目的:利用血清药物化学研究儿科复方制剂泻肺平喘灵的主要药效物质基础。方法:采用 UPLC-LTQ-Qorbitrap 技术,建立复方提取液和大鼠给药后血清的指纹图谱,并对比推断特征峰所归属的单味药及其成分。结果:检测并鉴定了泻肺平喘灵复方大鼠血中移行成分 18 个,其中 10 个成分被机体直接吸收入血;其余 8 个可能为原型成分经过机体代谢新产生的成分。结论:泻肺平喘灵的血中移行成分的基本信息,可运用中药血清药物化学的研究方法进行复方药效物质基础的研究。

[关键词] 泻肺平喘灵;血清药物化学;血中移行成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0110-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170110

Study on Serum Pharmacochemistry of Xiefei Pingchuanling Extract

LIU Ju-yan, CHAO Jian-guo*, GU Wei, SHAN Jin-jun, WANG Yue-jia
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** This article aimed to study the main pharmacodynamic substances of pediatric compound preparation Xiefei Pingchuanling by serum pharmacochemistry. **Method:** UPLC-LTQ-Qorbitrap technology was used to create fingerprints of both compound extract and rat serum after treatment. Then the peaks were compared and predicted to belong to which single herb and their constituents were inferred. **Result:** 18 transitional ingredients in Xiefei Pingchuanling were detected and identified in rat serum, 10 of which could be directly absorbed into the bloodstream by the body; the 8 remaining prototype components may be new ingredients produced through metabolism. **Conclusion:** UPLC fingerprint provides much medicinal information in plasma of rats treated with Xiefei Pingchuanling, therefore, it is of great value to studies on the metabolism of traditional Chinese medicine (TCM).

[Key words] Xiefei Pingchuanling; serum pharmacochemistry; constituents absorbed into blood

泻肺平喘灵是江苏省中医药儿科专家韩新民教授的临床实践经验方,主要功效为宣肺平喘、通腑、活血,用以治疗小儿痰热壅肺证哮喘。全方由麻黄、大黄、丹参、虎杖、苦杏仁、葶苈子、白芥子、瓜蒌皮、甘草 9 味中药组成,其中麻黄为君药,大黄、丹参、虎杖为佐药,加以清肺化痰药共奏泻肺活血,解痉平喘,通腑涤痰之功^[1]。经多年的临床实践验证,疗效确切,愈显率高达 72.7%^[2]。但是至今为止,对

于泻肺平喘灵的研究多集中在复方制剂及临床疗效^[3],仍然不能明确其药效物质基础,彻底阐明其作用机制,导致药材以及复方制剂的质量控制均无行之有效的方法和指标。因此研究清楚此复方的药效物质基础迫在眉睫。

另外,药物无论经过何种代谢方式,都必须由给药部位进入血液循环,以血液为介质输送到靶点,从而发挥药效(局部用药除外),因此给药后的血液才

[收稿日期] 20130822(004)

[基金项目] 国家级重点学科南京中医药大学中医儿科学科第二期开放研究课题项目(EZK2012024)

[第一作者] 刘菊燕,在读硕士,从事中药资源培育与利用的研究,Tel:18252067609, E-mail:niupi909@163.com

[通讯作者] *巢建国,教授,从事中药资源开发与研究,Tel:13851562488, E-mail:jgchao1016@163.com

是真正起作用的“制剂”^[4-5]。本研究采用黑龙江中医药大学王喜军教授提出的血清药物化学的方法对泻肺平喘灵的血中移行成分进行研究,初步确定其药效物质基础。

1 材料

1.1 仪器 UPLC-LTQ-Qorbitrap 超高效液相-质谱仪(四元梯度泵-在线真空脱气-自动进样器-PDA-3000 二极管阵列紫外检测器-柱温箱,电喷雾离子源-负离子扫描,美国 Thermo),KDC-160HR 型高速低温离心机(中科中佳),SHIMAZDHU AUW220D 型电子天平(日本岛津),Milli-Q 型纯水器(Millipore),RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),HGC-12A 型氮吹仪(金浪科技)。

1.2 试剂 乙腈(AR,批号 12100246,TEDIA),甲酸(AR,批号 A1309012,aladdin),重蒸水,本实验室纯水机制备。

1.3 对照品与药材 药材炙麻黄(批号 120601,安徽)、大黄(批号 120706,安徽)、丹参(批号 20120801,安徽)、虎杖(批号 120812,安徽)、苦杏仁(批号 20120901,内蒙古)、葶苈子(批号 120806,甘肃)、白芥子(批号 120701,安徽)、瓜蒌皮(批号 120803,安徽)、甘草(批号 120712,安徽)均购于江苏省中医院中药房。以上药材由南京中医药大学巢建国教授鉴定为《中国药典》品种。对照品大黄酸(批号 0757-200206)、大黄素(批号 110756-200110,鉴定药材用)、芦荟大黄素(批号 0795-9803)、大黄酚(批号 110796-200716)、大黄素甲醚(批号 0758-200206)、盐酸麻黄碱(批号 171241-201007)、盐酸伪麻黄碱(批号 1237-9601)、丹参酮 II_A(批号 110766-200417,鉴定药材用)、丹酚酸 B(批号 111562-200605),均购自中国药品生物制品检定所。

1.4 动物 清洁级健康 SD 大鼠,雄性,体重 180~250 g,由江苏大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(苏)2013-0001。室温饲养,动物自由摄食饮水。

2 方法

2.1 供试品的制备

2.1.1 泻肺平喘灵不同配伍水煎液干粉样品的制备 按临床用药要求,准确称取复方制剂炙麻黄 5 g,大黄 3 g,丹参 12 g,虎杖 12 g,苦杏仁 10 g,葶苈子 10 g,白芥子 10 g,瓜蒌皮 10 g,甘草 3 g,浸泡 1 h,大黄另泡。加水 1 000 mL 煮沸,煎煮 60 min,大黄 15 min 后下,煎煮液纱布过滤,药渣继续煎煮 1 h,合并 2 次的滤液,浓缩成浸膏状,65 °C 烘干成

干粉,4 °C 冰箱保存供实验分析用。

同法制备缺炙麻黄、缺大黄、缺丹参和单味药炙麻黄、大黄、丹参水煎液的干粉样品。不同配伍的处方量和煎煮方法见表 1。其中泻肺平喘灵全方出粉率为 20.94%,缺炙麻黄的为 14.27%,缺大黄的为 20.02%,缺丹参的为 17.75%,单味炙麻黄为 28.12%,单味大黄为 40.79%,单味丹参为 43.10%。

表 1 处方不同配伍的煎煮方法

组成	MH/g	DH/g	DS/g	其他/g	质量浓度/g·mL ⁻¹
X	5	3	12	55	0.65
X-MH	-	3	12	55	0.51
X-DH	5	-	12	55	0.73
X-DS	5	3	-	55	0.57
MH	5	-	-	-	0.14
DH	-	3	-	-	0.12
DS	-	-	12	-	0.53

注:X 为泻肺平喘灵;MH 为麻黄;DH 为大黄;DS 为丹参;其他为虎杖、苦杏仁、葶苈子、白芥子、瓜蒌皮、甘草。

2.1.2 体外分析样品溶液的制备 称取泻肺平喘灵冻干粉约 0.2 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇适量,超声 30 min,冷却到室温后甲醇定容,离心(3 000 r·min⁻¹,10 min),取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液 5 μL 供 UPLC-LTQ-Qorbitrap 分析用。

同法制备缺味方和单味方体外分析样品。

2.1.3 体内分析样品的制备 选择成年健康 SD 大鼠,随机分为 8 组,每组 8 只,尾部标记。取泻肺平喘灵冻干粉适量,加重蒸水配成质量浓度约为 0.65 g·mL⁻¹的溶液^[6],以 0.01 mL·g⁻¹给 SD 雄性大鼠灌胃,空白组灌等量的重蒸水,每天早晚各 1 次,连续 3 d。末次给药后 2 h 眼眶取血,取血前大鼠禁食 12 h,自由饮水。血液室温静置 40 min 凝结后,4 000 r·min⁻¹离心 15 min,分离血清。并将同组 8 只大鼠的血清混合均匀,以减少动物间的个体差异量。取 1 mL 血清于离心管中,加入乙腈 5 mL,快速涡旋 3 min,5 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,45 °C 氮吹仪吹干。残渣用初始比例的流动相复溶,12 000 r·min⁻¹离心 10 min。取上清液,供 UPLC-LTQ-Qorbitrap 分析用。

同法制备缺味方和单味方的体内分析样品。

2.2 分析方法

2.2.1 色谱条件 Hedra C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,0.5 μm),保护柱(5 cm)(江苏汉邦科技有限公

司),流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,流动相 A-乙腈,B-0.2%甲酸水溶液,梯度洗脱程序为乙腈的浓度梯度 $5\% \sim 12\%$ ($0 \sim 30 \text{ min}$), 40% (35 min), 40% (52 min), 70% (63 min), 85% (67 min), 85% (70 min)。二极管阵列检测器全波长扫描。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),采用负离子扫描检测;脱溶剂气流量为 $600 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,脱溶剂气温度为 $300 \text{ }^\circ\text{C}$,雾化气流量为 $100 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,离子源温度为 $110 \text{ }^\circ\text{C}$,毛细管电压为 2400 V ,锥孔电压为 4 V ,微通道板电压为 2700 V ,碰撞能为 3 V 。每 0.1 s 采集 1 次谱图;质量扫描范围 $m/z 100 \sim 1000$ 。

3 结果

根据泻肺平喘灵复方血清、空白血清、缺味药血清、单味药血清及其体外提取物的 UPLC-LTQ-Q Orbitrap 色谱图,见图 1~3,比较分析各色谱图的数据,找到并鉴定了泻肺平喘灵血中移行成分 18 个,见表 2。通过比较泻肺平喘灵提取物与给药血清的图谱,发现两者共有的色谱峰有 10 个,分别是 1,2,4,5,6,8,9,10,14,17 号色谱峰,推断是泻肺平喘灵所含原型成分直接吸收入血形成。含药血清中检测到的一些化合物,在复方提取物未检测到,分别是 3,7,11,12,13,15,16,18 号色谱峰,表示为原型成分经过大鼠代谢新产生的成分。比较复方给药血清、单方给药血清及空白血清,15 号峰在缺大黄血清及空白血清中未检测到,在其他样品中均有出现,初步判定它的原型成分属于大黄,18 号峰的原型成分属于麻黄。7,13,16 号峰成分及来源均不能确定。

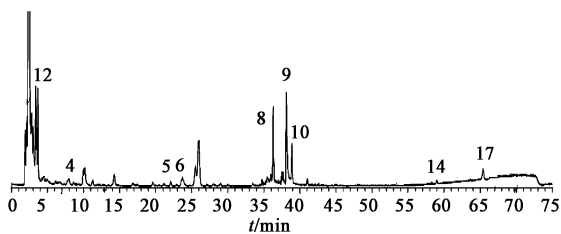


图1 泻肺平喘灵复方提取物 UPLC

经与泻肺平喘灵组方中君药和臣药的体内外色谱图的比较分析确定,血中移行成分 1 号峰为大黄中的鞣质类单体儿茶素,质谱中, $289 \rightarrow 245$ 为脱去 COO ,可作为儿茶素结构的质谱鉴别特征。9 号峰的质谱 $m/z 822$ 为甘草酸的基峰, $m/z 369$ 碎片离子为其水解后得的二分子葡萄糖醛酸,推断其为甘草酸。峰 10 的质谱中, $m/z 717, 699, 717 \rightarrow 699$ 为脱去一分子 H_2O ,故推断为丹酚酸 B。14 号峰的一级质谱基峰

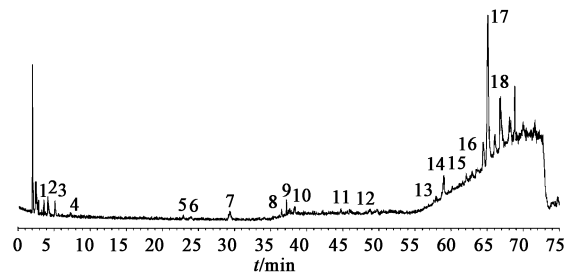


图2 泻肺平喘灵的大鼠含药血清 UPLC

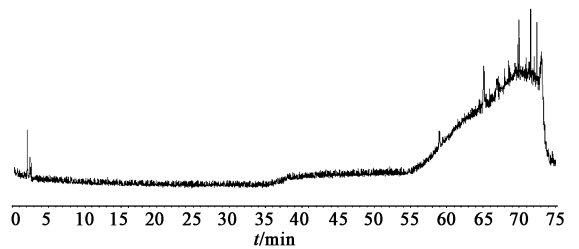


图3 空白大鼠血清 UPLC

为 $m/z 253$,同时出现较强峰 $m/z 187$ 和弱峰 $m/z 87$,与其质谱的碎片离子及其相关研究比较^[7-8],确定其为大黄酚。峰 17 观察到 $m/z 861, 721, 465$,与番泻苷 A 的质谱基本一致,故推断 17 号峰为番泻苷 A。

4 讨论

中药复方药效物质基础的研究一直都是困扰中药现代化研究的一个瓶颈问题,目前中药研究的主要途径是从各种中药中提取分离得到大量的化合物,并对这些化合物进行一系列的活性筛选,从而判断这些化合物是否有活性。由于中药成分复杂,复方组成多样,很多色谱峰并非单一纯物质,仅依据色谱峰组分的保留时间相同或相近判断不同图谱的组分是否为同一化合物,往往误差较大^[9]。近年来发展起来的联用仪器提供的色谱、质谱数据信息包括保留时间、全波长扫描图和质谱数据等有效信息,通过保留时间可与已有的化合物对照品比较,初步确定其来源;对于没有对照品的化合物,通过质谱的分子离子峰数据与已知化合物的相对分子质量及其结构对照来确定。本研究采用液质联用技术,结合已知化合物的数据对泻肺平喘灵复方体内外的成分进行认定和推测,检出入血成分 18 个,涉及复方的主要药效成分。其中,蒽醌类和酸苷类是大黄、虎杖通腑活血的主要成分,水溶性的芥子酸、芥子碱等是白芥子镇咳、祛痰、平喘的主要成分,甘草苷等是甘草起镇痉作用的主要成分,如果将检出的这些成分作为质量控制指标,与传统的单一成分指标相比,能更好的控制中药的质量,从而提高中药制剂的疗效,解决中药质量不可控等诸多问题^[10]。

表2 泻肺平喘灵制剂大鼠给药前后的图谱分析

No.	t_R /min	名称	m/z	分子式	相对分子质量	来源
1	3.39	儿茶素	289,245,203,137,109	$C_{15}H_{14}O_6$	290	大黄
2	4.18	3,4-二羟基苯基丙酸	161	$C_9H_{10}O_5$	162	丹参
3	5.17	芥子酸	223	$C_{11}H_{12}O_5$	224	白芥子
4	7.99	对甲氧基苯甲酸	165	$C_9H_{10}O_3$	166	白芥子
5	22.91	甘草昔	417,434/237,276,313	$C_{21}H_{22}O_9$	418	甘草
6	24.02	3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇	665	$C_{44}H_{58}O_5$	666	瓜蒌皮
7	29.38	-	-	-	-	-
8	36.23	虎杖昔	578	$C_{27}H_{30}O_{14}$	579	虎杖
9	36.52	甘草酸	822,369	$C_{42}H_{62}O_{16}$	823	甘草
10	38.33	丹酚酸 B	717,699	$C_{36}H_{30}O_{16}$	718	丹参
11	44.74	异硫氰酸-3-丁烯酯	112	$C_5H_7S_2$	113	葶苈子
12	48.69	芥子碱	193	$C_{11}H_{14}O_3$	194	白芥子
13	55.97	-	-	-	-	-
14	58.99	大黄酚	253,187,87	$C_{15}H_{10}O_4$	254	大黄、虎杖
15	62.11	-	212	$C_2H_4N_2O_8$	-	大黄
16	63.54	-	-	-	-	-
17	65.11	大黄酸昔 A	861,721,465	$C_{42}H_{38}O_{20}$	862	大黄
18	66.85	-	564	$C_{18}H_{46}N_9O_{11}$	-	麻黄

此外,血清药物化学的研究方法更接近临床用药的要求,提取方法采用水煎煮法,与临床保持一致;大鼠灌胃时间与次数也参考临床用药要求(每天早晚各1次)。此方法以口服药物后的含药血清为研究重点,关注血中移行成分,大大缩小了研究范围,锁定了研究目标,将有限的人力物力有目的性的投入到实验中,提高实验的效率^[11]。此研究利用血清药物化学的方法定向鉴定了泻肺平喘灵的血中移行成分,为血清药物化学方法用于指导复方制剂的药效物质基础提供了可靠的范例。

[参考文献]

- [1] 叶进,韩新民,杨江,等.泻肺平喘灵治疗小儿热性哮喘70例临床观察[J].甘肃中医,2008,21(4):19.
- [2] 韩新民,杨江,孙轶秋,等.“泻肺平喘灵”治疗小儿热性哮喘55例临床观察[J].江苏中医药,2007,39(11):39.
- [3] 丁小静,巢建国,韩新民,等.多指标优选泻肺平喘灵颗粒的水提工艺[J].医药导报,2013,32(1):66.
- [4] 王喜军.中药及中药复方的血清药物化学研究[J].世界科学技术——中药现代化药学前沿,2004,4(2):1.
- [5] 方建国,彭静,王文清,等.大青叶在大鼠中的血清药物化学研究[J].中国医院药学杂志,2008,28(6):434.
- [6] 王喜军,孙文军,孙辉,等.茵陈蒿汤不同配伍变化对大鼠血中移行成分的影响[J].中国天然药物,2008,6(1):43.
- [7] 李凤新.虎杖提取物抗病毒物质基础、药理作用及代谢研究[D].吉林:吉林大学,2009.
- [8] 郝晓霞,靳元鹏,轧霁,等.HPLC-DAD-MS/MS用于养血清脑颗粒蒽醌类成分分析[J].中成药,2012,34(1):66.
- [9] 沈岚,徐德生,冯怡,等.HPLC-DAD-MS/MS分析芍药甘草汤大鼠血中移行组分的研究[C].天津:2010年中国药学会暨第十届中国药师周,2010.
- [10] Wang B L, Hu J P, Tan W, et al. Simultaneous quantification of four active schisandra lignans from a traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis* (Wuweizi) in rat plasma using liquid chromatography/mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 865 (1):114.
- [11] Li R L, Huang Q H, You M X, et al. Pilot study on serum pharmacochimistry of extract of citrus reticulata ‘Chachi’ peel [J]. Medicinal Plant, 2012, 3(4):45.

[责任编辑 邹晓翠]