

· 药物代谢 ·

## 骨疏灵的大鼠血清药物化学分析

桑冉<sup>1</sup>, 王肖肖<sup>2</sup>, 朱妍妍<sup>2</sup>, 朱裕林<sup>1</sup>, 陈卫东<sup>2\*</sup>

(1. 蚌埠医学院第一附属医院, 安徽蚌埠 233004; 2. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230031)

**[摘要]** 目的:对骨疏灵血清药物化学进行研究,通过分析其入血成分探讨该复方发挥药效的物质基础,为骨疏灵的临床应用提供参考。方法:采用血清药物化学研究方法,建立骨疏灵体外和血清的全方、缺味组方及单味药材的 HPLC,通过对比分析骨疏灵体外和血清的全方、缺味组方及单味药材的 HPLC 色谱峰,初步确定骨疏灵的入血成分、移行成分及各成分的主要归属。结果:骨疏灵灌胃后在大鼠体内发现 21 个入血成分,其中 11 个来自该复方的原型,4 个是新产生的物质,其余均为代谢物。结论:骨疏灵入血成分是各味药材复方配伍后共同作用的结果,其中淫羊藿贡献最大,复方血清药物化学研究为深入阐述骨疏灵药效物质基础提供实验依据。

**[关键词]** 骨疏灵; 血清药物化学; 药效物质基础; 黄芪甲苷; 淫羊藿苷;  $\beta$ -蜕皮甾酮

**[中图分类号]** R969.1; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0078-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210078

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150924.1035.004.html>

**[网络出版时间]** 2015-09-24 10:35

**Serum Pharmacochimistry Analysis of Gushuling in Rats** SANG Ran<sup>1</sup>, WANG Xiao-xiao<sup>2</sup>, ZHU Yan-yan<sup>2</sup>, ZHU Yu-lin<sup>1</sup>, CHEN Wei-dong<sup>2\*</sup> (1. The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To make a preliminary study on serum pharmacochimistry of Gushuling and investigate medicinal mechanism by a blood component analysis. **Method:** *In vitro*, *in vivo* HPLC of Gushuling, Gushuling without a certain receipt and every single receipt were established according to pharmacochimistry research method. And by comparing those HPLC, constituents absorbed into blood and components metabolized in blood were determined. **Result:** A total of 21 components in serum were determined after intragastric administration of Gushuling in rats, 11 of them were prototype compound of preparation, 4 of them were constituents generated by receipts interaction *in vivo* and the rest were metabolites. **Conclusion:** Components of Gushuling in rat serum are generated by interaction of all receipts, and the greatest contribution come from Epimedii Folium. This pharamcochimistry study of Gushuling provides a substance foundation for further pharmacodynamic mechanism of compound.

**[Key words]** Gushuling; serum pharmacochimistry; pharmacodynamic material basis; astragaloside IV; icariin;  $\beta$ -ecdysterone

骨疏灵为安徽中医药大学第一附属医院开发的一种预防与治疗骨质疏松症的院内制剂(专利号 ZL200310112848.5),由淫羊藿、牛膝、黄芪和牡蛎 4 味药材组成,其中淫羊藿为君药,牛膝和黄芪为臣药,牡蛎为佐药。经过多年临床实践证明,骨疏灵在

预防和治疗骨质疏松方面具有较好的疗效,其安全性和有效性已得到充分证明<sup>[1-4]</sup>,但有关该复方的药效物质基础方面的研究目前还未见报道。血清药物化学是以传统药物化学方法为基础,综合应用多种现代分析技术(色谱、质谱等),分析鉴定中药给

**[收稿日期]** 20150417(014)

**[基金项目]** 安徽省自然科学基金项目(1208085MH127)

**[第一作者]** 桑冉,硕士,主管药师,从事医院药学研究, Tel:13865521220, E-mail:sangzhou1980@126.com

**[通讯作者]** \* 陈卫东,博士,主任药师,从事中药复方及其药动学研究, Tel:0551-68129123, E-mail:anzhongdong@126.com

药后的血清移行成分,研究其与药效的相关性,最终确定中药药效物质基础的一种应用科学。本实验拟采用血清药物化学研究方法,对骨疏灵体外及给药后的血清 HPLC 图谱进行对比研究,以期探索其发挥药效的物质基础。

### 1 材料

LC-15 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),R-1001N 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司),BF-2000 型氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海博讯实业有限公司),PL601-S 型电子天平(瑞士梅特勒公司),LC-4016 型离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

黄芪(批号 130610,产地内蒙)、淫羊藿(批号 130610,产地河南)、牛膝(批号 130610,产地河南)、牡蛎(批号 120910,产地山东)均购自亳州市药材大市场,经安徽中医药大学刘鹤龄教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下规定;黄芪甲苷、淫羊藿苷和  $\beta$ -蜕皮甾酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110781-200613,110737-200415,111638-201304),甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 200 ~ 220 g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(苏)2011-0003,所有动物的操作规程都严格按照蚌埠医学院实验动物中心动物护理和使用委员会的监管标准进行,并通过蚌埠医学院实验动物中心实验动物伦理委员会。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Cosmosil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相乙腈(B)-0.1% 磷酸盐水溶液(A)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 13% ~ 20% B; 20 ~ 30 min, 20% B; 30 ~ 60 min, 20% ~ 45% B; 60 ~ 70 min, 45% B; 70 ~ 80 min, 45% ~ 13% B),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 30  $^{\circ}$ C,进样量 20  $\mu$ L,检测波长 260 nm。

**2.2 供试品溶液的制备**<sup>[5]</sup> 取黄芪饮片 20 g,淫羊藿饮片 15 g,牛膝饮片 12 g,牡蛎饮片 8 g。将淫羊藿与牛膝合提,加 8 倍量(第 1 次多加 3 倍量)70% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h;黄芪与牡蛎合提,加 8 倍量(第 1 次多加 1.5 倍量)水煎煮 2 次,每次 1 h;将醇提药液回收乙醇后与水提药液合并,浓缩至每 1 mL 含生药质量 1.8 g,4  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。同上制备各缺味及单味灌胃液。

**2.3 对照品溶液的制备** 精密称取黄芪甲苷、淫羊藿苷和  $\beta$ -蜕皮甾酮对照品,分别加甲醇溶解并定容,

均配制成 0.2 g · L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,置冰箱中待用。

**2.4 空白血清和含药血清的制备** 取 SD 大鼠,随机分为 7 组,每组 4 只,给药前禁食 12 h,全程自由饮水,按生药量/体重 0.018 g · g<sup>-1</sup> 分别灌服 2.2 项下全方、缺味组方及各单味药材的灌胃液,给药 3 d,每天 2 次,于最后一次给药后 15,30,60,90 min 时从大鼠眼眦静脉取血 1 mL 于离心管中,静置,于 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,吸取上层血清置具塞离心管中,密塞,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。取 SD 大鼠 4 只,灌服同体积水代替药物,同法制得空白血清样品溶液。

**2.5 血清样品的处理** 取血清样品 0.2 mL,置于 2 mL 离心管中,加入 3 倍量甲醇,涡旋振荡 2 min,于 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液用氮气吹干仪吹干溶剂,用流动相复溶,经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,供 HPLC 分析。

**2.6 骨疏灵及其血中成分分析** 取 3 批骨疏灵全方体外供试品溶液及 4 批骨疏灵全方、缺味组方、单味药材的血清样品按 2.1 项下色谱条件进行 HPLC 分析。通过对比分析骨疏灵全方体内 HPLC 及体内全方、缺味组方、单味药材的 HPLC 确定骨疏灵进入血液的成分及各入血成分的来源。

**2.6.1 采血时间点的确定** 考察了给药后 15,30,60,90 min 共 4 个时间点的大鼠血清 HPLC,通过对各时间点的 HPLC 对比发现,60 min 测得的 HPLC 出峰较多,各色谱峰分离较好,可较好地反应骨疏灵在大鼠体内的化学特征,故确定采血时间点为给药后 60 min。

**2.6.2 骨疏灵入血成分分析** 骨疏灵全方体内 21 个人血成分归属见表 1。骨疏灵全方体外药液、体内含药血清及空白血清 HPLC 对比见图 1。骨疏灵

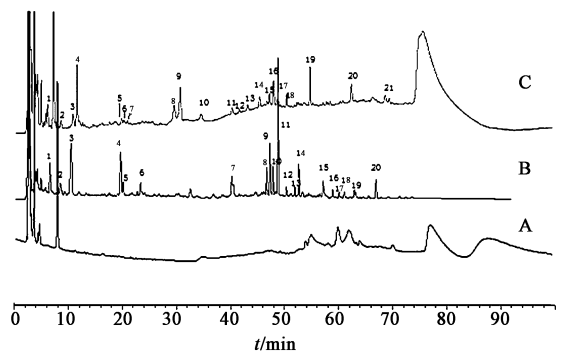


图 1 空白血清(A),骨疏灵体外药液(B),体内含药血清(C)的 HPLC 比较

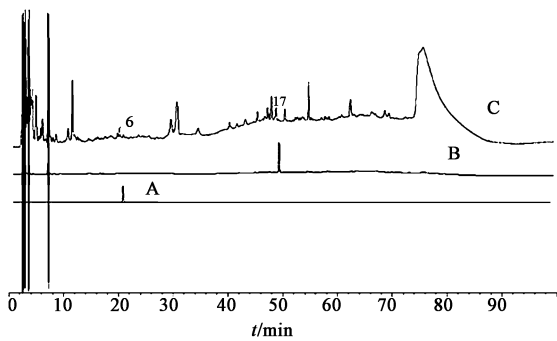
Fig.1 Comparison of HPLC chromatograms among blank serum (A), *in vitro* drug solution of Gushuling (B) and serum containing (C)

表 1 骨疏灵入血成分归属

Table 1 Adscription of constituents migrating to blood from Gushuling

峰号	入血成分	归属
1	原型	淫羊藿
2	原型、代谢物、代谢物	淫羊藿、牛膝、黄芪
3	代谢物	黄芪
4	原型	淫羊藿
5	原型	黄芪
6	$\beta$ -蜕皮甾酮、淫羊藿代谢物	牛膝、淫羊藿
7	代谢物	黄芪
8	复方体内新物质	复方制剂
9	代谢物	黄芪
10	复方体内新物质	复方制剂
11	原型	黄芪
12	代谢物	牛膝
13	复方体内新物质	复方制剂
14	代谢物	淫羊藿
15	原型	淫羊藿
16	原型、代谢物	淫羊藿、牛膝
17	淫羊藿苷、黄芪代谢物	淫羊藿、黄芪
18	原型、代谢物	淫羊藿、牛膝
19	代谢物	淫羊藿、牛膝、黄芪
20	原型、代谢物、代谢物	淫羊藿、牛膝、黄芪
21	复方体内新物质	复方制剂

全方体内含药血清、空白血清加淫羊藿苷对照品及空白血清加  $\beta$ -蜕皮甾酮对照品 HPLC 对比见图 2。骨疏灵全方、各缺味组方及单味药材体内含药血清 HPLC 对比见图 3~5。



6.  $\beta$ -蜕皮甾酮; 17. 淫羊藿苷

图 2 空白血清加对照品 (A, B) 与骨疏灵体内含药血清 (C) 的 HPLC 比较

Fig. 2 Comparison of HPLC chromatograms among *in vitro* serum containing of Gushuling (C) and blank serum joined reference substances (A, B)

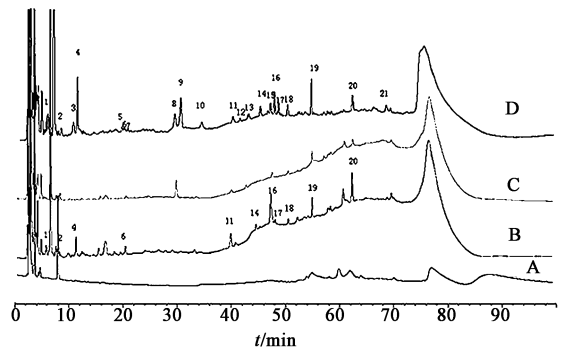


图 3 空白血清 (A), 淫羊藿血清 (B), 全方缺淫羊藿 (C), 骨疏灵全方 (D) 的 HPLC 比较

Fig. 3 Comparison of HPLC chromatograms among blank serum (A), Epimedium Folium serum (B), lack of Epimedium Folium serum (C) and Gushuling serum (D)

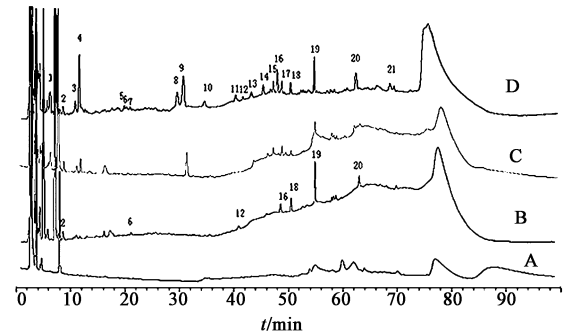


图 4 空白血清 (A), 牛膝 (B), 全方缺牛膝 (C), 骨疏灵全方 (D) 血清的 HPLC 比较

Fig. 4 Comparison of HPLC chromatograms among blank serum (A), Achyranthis Bidentatae Radix serum (B), lack of Achyranthis Bidentatae Radix serum (C) and Gushuling serum (D)

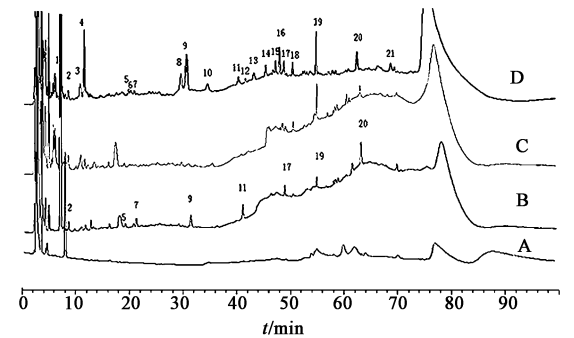


图 5 空白血清 (A), 黄芪 (B), 全方缺黄芪 (C), 骨疏灵全方 (D) 血清的 HPLC 比较

Fig. 5 Comparison of HPLC chromatograms among blank serum (A), Astragali Radix serum (B), lack of Astragali Radix serum (C) and Gushuling serum (D)

由图 1 可知, 骨疏灵体内含药血清 HPLC 中共检测到 21 个色谱峰, 通过与体外 20 个共有特征色谱峰的保留时间进行对比得知, 体内的 21 个成分峰

中有11个来自于骨疏灵的原型,其余10个成分峰为代谢物和新产生的成分。由图2可知,体内含药血清HPLC中的6号峰为 $\beta$ -蜕皮甾酮,17号峰为淫羊藿苷。通过图3~5对比研究得知,入血的21个成分峰中有11个来自于淫羊藿;有7个来自于牛膝;有8个来自于黄芪;剩余的8,10,13,21号4个色谱峰为体内新移行成分峰。

### 3 讨论

本文对血清样品预处理进行了考察,重点考察了甲醇、乙腈的沉淀及乙酸乙酯的萃取,结果显示用甲醇和乙腈沉淀所测得的HPLC中色谱峰比用乙酸乙酯萃取所得HPLC中的色谱峰多,且峰形较好;另通过用甲醇和乙腈对同一批样品进行处理并多次进样对比发现,甲醇处理后的样品的HPLC中的主要特征峰峰面积较乙腈处理的大,且比较稳定,故选择用甲醇沉淀法对血清样品进行预处理。

本文采用的给药方案为其他学者提出的通行给药方案,即每天给药2次,连续给药3d<sup>[6]</sup>,这种给药方案能使药物在体内达到稳态血药浓度,便于药物的研究。研究发现理想的采血点应该出现在血药浓度的高峰期,多数出现在给药后的30min~2h<sup>[7]</sup>,本文对末次给药后15,30,60,90min共4个时间点进行取血考察,结果显示,末次给药后60min时取血测得的HPLC出峰较多,各色谱峰分离较好。

本文通过对采用相同色谱条件建立的体内外全方、缺味组方及单味药材的HPLC进行对比,以保留时间为鉴定标准,确定了21个入血成分中11个是来自于复方中的原型,其余10个为代谢物,代谢物中有4个是新产生的物质。21个入血成分中多数是几种药材共同作用的结果,产生的4个体内新物质应该是复方配伍入血后体内共同作用的结果。结果均表明骨疏灵在体内发挥药效是各味药材复方配伍后共同作用的结果,验证了中药复方配伍的重要

意义。骨疏灵21个入血成分中淫羊藿贡献最多为11个,这也充分验证淫羊藿在该方中作为君药的理由,但淫羊藿苷在体内的吸收很低,这与淫羊藿苷在体内受肠道菌群发生代谢有关<sup>[8]</sup>。

本实验还未对骨疏灵体内的入血成分进行有效鉴定,需运用LC-MS或者LC-MS/MS等分析技术来确定各入血成分,同时通过比较不同组方的药效结果,结合不同组方的体内标示性化学成分的药代动力学行为变化,分析各主要活性成分在其抗骨质疏松中的贡献,从而真正确定骨疏灵在治疗及预防骨质疏松症的药效物质基础。

### [参考文献]

- [1] 方朝晖,刘健,章小平,等.骨疏灵治疗老年性骨质疏松症60例临床观察[J].中国医药学报,1999,14(6):30-32.
- [2] 方朝晖,鲍陶陶,费爱华,等.骨疏灵对骨质疏松症大鼠血、尿生化影响[J].中医药临床杂志,2005,17(6):576-578.
- [3] 方朝晖,鲍陶陶,费爱华,等.骨疏灵对骨质疏松症大鼠骨组织形态的影响[J].中成药,2007,29(4):587-588.
- [4] 方朝晖,刘健,章小平,等.骨疏灵改善维甲酸诱导的骨质疏松症大鼠骨质代谢作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(5):40-42.
- [5] 朱裕林.骨疏灵颗粒制备工艺及质量控制研究[D].合肥:安徽中医药大学,2013.
- [6] 刘建勋,韩笑,孙宇扬.含药血浆药理作用强度与体内给药的量效、时效关系研究[J].中国中药杂志,2006,31(10):829-831.
- [7] 刘焯.关于中药血清药理学实验方法的讨论[J].贵阳中医学院学报,2004,26(1):53-55.
- [8] 刘晓阳,訾慧,郑洪新,等.淫羊藿苷及其代谢产物在骨质疏松模型大鼠肾脏组织中的分布[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(17):125-128.

[责任编辑 刘德文]