

补阳还五汤血浆指纹图谱的建立

黄海艳¹, 祝赫¹, 韩彬^{1*}, 张继平^{2*}, 李蕾¹

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 南方医科大学 附属佛山医院, 广东 佛山 528000)

[摘要] 目的:建立补阳还五汤含药血浆指纹图谱,探讨补阳还五汤在大鼠体内的药效物质基础。方法:通过比较补阳还五汤水煎液、补阳还五汤水煎液含药血浆、空白血浆 HPLC 指纹图谱,推断大鼠口服补阳还五汤水煎液后,血浆中的原型成分及代谢产物。结果:口服补阳还五汤水煎液后,在大鼠血浆中发现了 30 个入血成分,其中 10 个为血浆固有成分,1 个为溶剂峰,19 个为药源性成分,其中 4 个为药材原型成分,15 个为代谢产物,其中 2 个为黄芪代谢产物,1 个为桃仁代谢产物。结论:该研究建立的方法准确、可靠,可用于补阳还五汤水煎液血浆指纹图谱和药效物质基础的研究。

[关键词] 补阳还五汤; 血浆指纹图谱; 药效物质基础

[中图分类号] R285.5; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0096-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150096

Estblish Fingerprint of Medicated Plasma of Buyanghuanwu Tang

HUANG Hai-yan¹, ZHU He¹, HAN Bin^{1*}, ZHANG Ji-ping^{2*}, LI Lei¹

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Affiliated Foshan Hospital of Southern Medical University, Foshan 528000, China)

[Abstract] **Objective:** In order to establish the plasma HPLC fingerprints of Buyanghuanwu Tang (BYHWT) and to further explore its pharmacodynamic material basis. **Method:** The prototype components and metabolites in rat plasma were identified through comparing the fingerprints of BYHWT, rat plasma-containing active components and blank plasma. **Result:** After the *ig* administration of BYHWT, 30 main components into blood were marked in the plasma fingerprint, 10 came from the original compound of rat plasma, one peak was the solvent peak. Other 19 were the drug-induced compositions, 4 of which were prototype constituents, other 15 were metabolites, such as 2 metabolites from Astragali Radix, 1 metabolite from Semen Persicae. **Conclusion:** The method established in this study was accurate, reliable, and can be used to research the BYHWT plasma fingerprint and efficacy material foundation.

[Key words] Buyanghuanwu Tang; plasma HPLC fingerprints; pharmacodynamic material basis

补阳还五汤出自《医林改错》^[1],由黄芪、当归尾、赤芍、红花、川芎、地龙、桃仁 7 味药组成。笔者查阅近几年的文献^[2-5],发现对于补阳还五汤的研究多集中在其抗脑缺血分子机制的研究上,但复方中到底是何种成分发挥药效,目前却尚未有结论,即其药效物质基础仍不明确,尤其是以血清药物化学角度研究的文献仍未见报道。课题组前期研究结果

表明:补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖损伤 PC12 细胞的形态和活力具有保护作用^[6],在一定程度上说明给药后血液中所含成分才是中药在人体内直接作用的物质^[7]。本文基于血清药物化学的基础上,结合前期建立的补阳还五汤体外指纹图谱^[8]深入探讨补阳还五汤在大鼠体内的药效物质基础,从而建立其含药血浆指纹图谱,试图找出其血中移行成

[收稿日期] 20150716(002)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2013010012284);广东省中医药局建设中医药强省立项资助科研课题(2009055,20111058)

[第一作者] 黄海艳,在读硕士,从事中药药效与安全性评价研究,E-mail:haiyanzero@hotmail.com

[通讯作者] * 韩彬,教授,硕士生导师,从事中药配伍和复方药理研究,Tel:13512752268,E-mail:hblz99@21cn.com; * 张继平,研究员,主任中药师,硕士生导师,从事中药复方药理研究,Tel:0757-88032005,Email:fszjping@163.com

分及其代谢产物,为阐明补阳还五汤药效物质基础研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪(包括 LC-20AT 泵,SPD-20A 紫外检测器,DGU-20A5 真空脱气机,CTO-10ASvp 柱温箱,SIL-20AC 自动进样器,LCsolution 色谱工作站,日本岛津),KQ-300E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),HH 型数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂),Gold-SIM FD5-3 型冷冻干燥机(美国 SIM 公司),VORTEX-6 型涡旋器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),BP211D 型电子分析天平(Sartorius),中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)。

1.2 药品与试剂 补阳还五汤复方药材:黄芪、当归、川芎、赤芍、桃仁、红花及地龙药材均购于佛山市第二人民医院中药房,经广东药学院中药学院李钟副教授鉴定为正品,饮片性状均符合 2010 年版《中国药典》规定。乙腈色谱纯,磷酸、甲醇、高氯酸、乙酸乙酯均为分析纯,屈臣氏蒸馏水。

1.3 实验动物 雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重(200 ± 10) g,购于广州中医药大学实验动物中心,实验动物合格证号 SCXK(粤)2013-0020,饲养于广东药学院动物实验中心。

2 方法

2.1 补阳还五汤供试品的制备 处方量取(黄芪 120 g,当归 6 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g,地龙 3 g)共 142.5 g,加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min,加热煮沸 10 min 后,转小火煮 1 h,趁热过滤,药渣再加 8 倍量蒸馏水加热煮沸,沸后 10 min,转小火煮 1 h,合并 2 次煎出液,浓缩,定容至含生药 3.60 g·mL⁻¹的水煎液,供灌胃使用。另按上述方法分别制备各单味药以及各缺味方水煎液样品。取上述药液 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中,用 50% 的甲醇定容,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,供 HPLC 分析使用。

2.2 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex Security Guard 保护柱,柱温 30 °C,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 230 nm,流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(0 ~ 10 min, 2% A; 10 ~ 35 min, 10% A; 35 ~ 50 min, 15% A; 50 ~ 80 min, 25% A; 80 ~ 100 min, 60% A; 100 ~ 130 min, 65% A),进样量 15 μL,其中血浆样品进样量 25 μL,进样前以流动相梯度初始条件平衡 30 min。

2.3 血浆指纹图谱的建立 取 SD 大鼠,灌胃前禁食 12 h,自由饮水,按 10 mL·kg⁻¹ 的剂量灌胃补阳还五汤水煎液,连续灌胃 3 次,每次间隔 1 h,末次给药 150 min 后大鼠腹主动脉取血,得 5 批含药血清样品,血液置于肝素钠抗凝管中,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,分离血浆,血浆置 -20 °C 中冷冻,后冷冻干燥成血浆冻干粉,冻干粉置 -20 °C 保存备用。

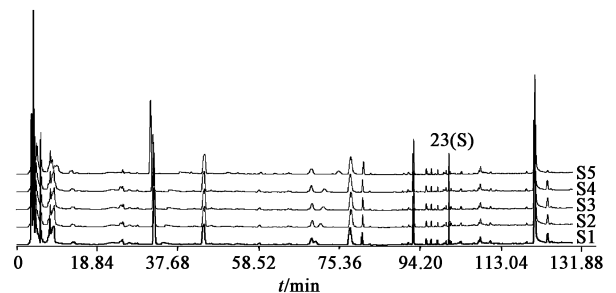
2.4 血浆样品处理 取待测冻干粉 0.2 g,置于 5 mL 离心管中,加入甲醇 4 mL 沉淀蛋白,涡旋振荡 3 min,然后放入超声仪中超声 30 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,于 60 °C 水浴浓缩至 1 mL^[9],进样前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,供 HPLC 分析。

2.5 图谱分析 取补阳还五汤水煎液供试溶液、补阳还五汤含药血浆样品及空白血浆样品在相同色谱条件下进行 HPLC 分析,建立 HPLC 指纹谱,比较确定入血成分^[10]。此外,通过各单味药、阴性药体外供试溶液及其血浆样品在相同色谱条件进行 HPLC 分析,确定入血成分来源^[11]。

3 结果与讨论

3.1 补阳还五汤含药血浆指纹图谱 将五批补阳还五汤含药血浆图谱数据导入(2004 A)中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行色谱峰匹配,确定其主要色谱共有峰为 30 个,结果见图 1。并建立补阳还五汤 HPLC 指纹图谱的共有模式(平均值),见图 2。5 批样品与对照指纹图谱的相似度在 0.82 ~ 0.93,见表 1。

以 23 号峰为参照确定 30 个共有峰中的 11 个共有峰构成补阳还五汤指纹图谱的特征峰^[12],其保留时间和峰面积为 1,11 个特征峰的相对保留时间及相对峰面积分别列于表 2,3。



S1 ~ S5.5 批补阳还五汤

图 1 补阳还五汤含药血浆 HPLC 指纹谱

Fig. 1 Plasma HPLC fingerprint chromatograms of BYHWT

3.2 补阳还五汤入血成分的确定 补阳还五汤体外供试液、空白血浆以及含药血浆的 HPLC 见图 3,体内和体外色谱图差异较大,说明大多药物成分已

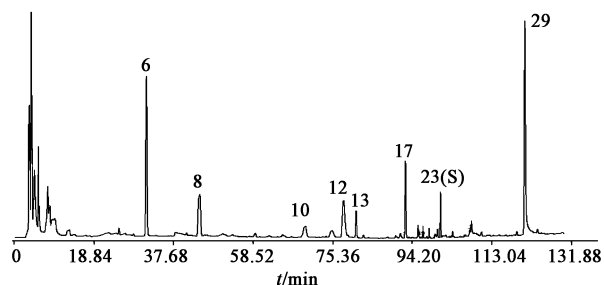


图 2 5 批补阳还五汤含药血浆 HPLC 指纹谱共有模式
Fig.2 Common pattern of plasma HPLC fingerprint of 5 batches BYHWT

表 1 5 批补阳还五汤含药血浆相似度
Table 1 Similarity of 5 batches of plasma HPLC chromatograms after BYHWT treatment

编号	S1	S2	S3	S4	S5	R
S1	1.000	0.913	0.860	0.716	0.678	0.929
S2	0.913	1.000	0.948	0.603	0.712	0.932
S3	0.860	0.948	1.000	0.671	0.761	0.946
S4	0.716	0.603	0.671	1.000	0.703	0.822
S5	0.678	0.712	0.761	0.703	1.000	0.858
R	0.929	0.932	0.946	0.822	0.858	1.000

表 2 5 批补阳还五汤含药血浆特征峰的相对保留时间
Table 2 Relative retention time of Characteristic absorption peaks for 5 batches of plasma HPLC chromatograms after BYHWT treatment

编号	峰 6	峰 8	峰 12	峰 13	峰 20	峰 21	峰 30
S1	0.310	0.435	0.773	0.802	0.959	0.973	1.228
S2	0.319	0.434	0.771	0.799	0.959	0.973	1.236
S3	0.318	0.435	0.773	0.800	0.958	0.973	1.236
S4	0.318	0.435	0.773	0.800	0.959	0.973	1.236
S5	0.316	0.434	0.772	0.800	0.959	0.974	1.236

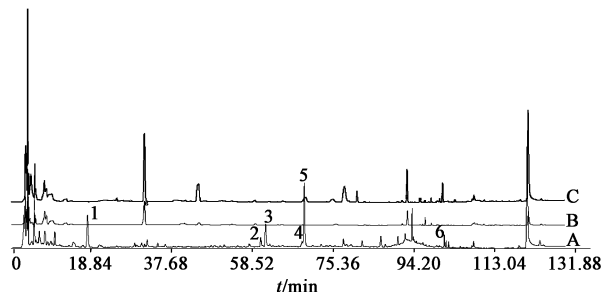
注:峰 23 均为 1.000。(表 3 同)。峰 17 均为 0.918,峰 18 均为 0.947,峰 29 均为 1.198。

在大鼠体内代谢成其他化学成分,比较分析各色谱的数据,找到了补阳还五汤入血成分有 30 个,其中有 10 个为血浆原有的成分,分别为峰 2,3,6,9,14,16,17,19,20,21;峰 29 为溶剂峰;19 个为药源性成分,其中峰 25,26,28,30 为药材原形成分,另外 16 个为代谢产物,可见血中移行成分并不等于补阳还五汤中各单味药化学成分的简单加和。对补阳还五

表 3 5 批补阳还五汤含药血浆特征峰的相对峰面积
Table 3 Relative peak area of characteristic absorption peaks for the 5 batches plasma HPLC chromatograms after BYHWT treatment

编号	峰 6	峰 8	峰 12	峰 13	峰 17	峰 18	峰 20	峰 21	峰 29	峰 30
S1	6.800	3.482	3.310	0.849	2.310	0.358	0.185	0.203	10.17	0.163
S2	7.084	3.780	3.476	0.912	2.465	0.405	0.199	0.224	10.40	0.173
S3	6.851	3.601	3.338	0.870	2.300	0.373	0.195	0.216	10.11	0.173
S4	7.080	3.523	3.427	0.888	2.339	0.430	0.204	0.206	10.14	0.171
S5	6.695	3.371	3.296	0.840	2.229	0.358	0.179	0.224	9.163	0.093

汤含药血浆,各单味药以及阴性药材的含药血浆 HPLC 中各色谱峰进行比较分析,以各峰保留时间、紫外光谱图为鉴定标准,进行色谱峰的指认,并对 19 个药源性成分峰作了相应药材的来源归属,见图 4。峰 13,18 来源于黄芪,其中 18 号峰在黄芪单味药含药血浆中并未体现,但在其阴性药中去掉黄芪这味药此峰也消失了,估计是大鼠给药后黄芪和复方中其他药在血中共同作用产生的新物质,黄芪是协同其他药味产生代谢产物而起作用的,这在一定程度上说明中药配伍的合理性;峰 10 来源于桃仁,桃仁具有活血祛瘀功效,虽药量不大,但能在血中表达药效。其余的药源峰,推测为大鼠口服补阳还五汤水煎液中某种组分或多种组分综合作用的代谢产物,抑或是给药后大鼠应激产生的内源性物质^[13]。黄芪虽是方中君药,但在复方给药后血中移行成分的贡献不大,分析原因可能为黄芪所含多为极性较大的化合物成分,在血浆中受干扰较大,形成的代谢产物不能入血也可能为黄芪在当中的作用并不是依靠自身有效成分入血来发挥药效的,而可能是黄芪和复方中其他药味综合作用产生次生代谢产物而起药效的。补阳还五汤水煎液中已确定的物质(峰 1,2,3,4,5,6)在含药血浆中未能检测处,可能未被吸收,或者已经被转化成其他成分。



1. 没食子酸;2. 羟基红花黄色素 A;3. 芍药苷;4. 阿魏酸;5. 毛蕊异黄酮苷;6. 芒柄花黄素

图 3 补阳还五汤供试品溶液(A)、空白血浆(B)和补阳还五汤含药血浆(C)的 HPLC

Fig.3 HPLC chromatograms of BYHWT (A), blank plasma (B) and plasma after BYHWT treatment (C)

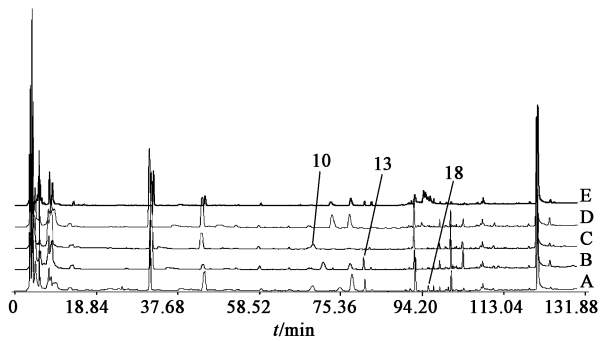


图 4 补阳还五汤含药血浆(A),黄芪含药血浆(B),桃仁含药血浆(C),补阳还五汤缺黄芪含药血浆(D)和补阳还五汤缺桃仁含药血浆(E)

Fig. 4 HPLC chromatograms of plasma after BYHWT treatment (A), plasma after Astragali Radix treatment (B), plasma after Semen Persicae treatment (C) and plasma after BYHWT treatment without Astragali Radix (D) and Semen Persicae (E)

4 结论

本文考察了在不同时间点收集血样,发现在大鼠灌胃补阳还五汤水煎液 150 min 后,血中移行成分较多,特征峰丰富,强度较大。本文采取将含药血浆立即进行冻干后再处理,使含药血浆的药性能够得到更好的保存,同时一定程度上能够减少外界环境对其的影响。

本文通过补阳还五汤水煎液体外、体内指纹图谱相关性研究,旨在确定补阳还五汤水煎液在血中的移行成分,为其药效物质基础研究提供实验依据。本文在大鼠含药血浆中发现了 30 个入血成分,其中 10 个为血浆固有成分,1 个为溶剂峰,19 个为药源性成分,均为未知结构,其中 4 个为药材原型成分,15 个为代谢产物,其中 2 个为黄芪代谢产物,1 个为桃仁代谢产物。补阳还五汤水煎液的体外指纹图谱鉴定出的 6 个成分在含药血浆中均未被检测出,推测可能未被吸收或者在肠道菌群的作用下被代谢成另一物质,这在一定程度上也说明复方中某些药味的有效成分并不一定是药效成分,血中移行成分并不是复方中各单味药化学成分简单加和。

本文建立了补阳还五汤含药血浆指纹图谱,对血中移行成分进行系统分析,确定了 11 个血中移行成分共有峰,并计算了 5 批含药血浆指纹图谱的相似度,结果都在 0.8 以上,说明建立的色谱条件具有可行性。

有文献报道^[14-16]在大鼠血浆中检测到阿魏酸,黄芪皂苷 I,黄芪皂苷 II,黄芪甲苷,芒柄花黄素,刺芒柄花苷,毛蕊异黄酮,毛蕊异黄酮苷,藜芦内酯 芍药苷等物质。本文根据临床用药的要求,提取方法采用水

煎煮法,与临床保持一致,更具说服力。此外本文受检测手段的限制未能对未知组分进行定性分析,同时一些微量组分也可能未被检测到,对于这些问题,有待于进一步采用 HPLC-MS 联用技术及现代分离技术从药材及血浆中分离未知组分并进行结构鉴定。

[参考文献]

- [1] 王清任著. 医林改错[M]. 上海:上海科学技术出版社,1966:31.
- [2] 蔡俊,张继平,姚晖,等. 补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(6):122-126.
- [3] 饶晓,汤轶波,潘彦舒,等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血损伤血脑屏障的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(6):49-52.
- [4] 刘微,关莉,丁文婷,等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血后星形胶质细胞谷氨酰胺合成酶的影响[J]. 时珍国医国药,2014,25(5):1035-1037.
- [5] 刘宏祥,赵永辰,王涛,等. 补阳还五汤作用于脑梗死大鼠血管新生的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志,2013,22(30):3329-3330.
- [6] 刘俊娥,张继平,姚晖,等. 补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖损伤 PC12 细胞形态和活力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):186-190.
- [7] 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—中医药现代化,2002,4(2):1-4,78.
- [8] 黄海艳,祝赫,张继平,等. 补阳还五汤 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理,2015,27(6):814-817.
- [9] Yang D H, Cai S Q, Liu H Y, et al. On-line identification of the constituents of Buyang Huanwu decoction in pig serum using combined HPLC-DAD-MS techniques[J]. J Chromatography B, 2006,831(2006):288-302.
- [10] 李强,朱晓红. 三黄汤的血清药物化学初步研究[J]. 中国药房,2015,26(10):1332-1335.
- [11] 唐峰,尹然,毕开顺,等. 栀子大黄汤血清药物化学的初步研究[J]. 中草药,2015,45(23):3377-3382.
- [12] 李强,朱晓红. 三黄汤 HPLC 指纹图谱初步研究[J]. 中药新药与临床药理,2015,26(1):87-91.
- [13] 赵刚,杜玮,魏玉辉,等. 银黄口服液血清药物化学的初步研究[J]. 中成药,2009,31(3):465-467.
- [14] 李再新,吴小红,贺福元,等. 大鼠血浆中补阳还五汤及总苷元的阿魏酸药物动力学研究[J]. 中国药师,2007,10(10):943-945.
- [15] 贺福元,刘平安,邓凯文,等. 反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中补阳还五汤中黄芪甲苷的含量及药理学研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(21):1647-1649.
- [16] Shaw L H, Lin L C, Tsai T H. HPLC-MS/MS analysis of a traditional Chinese medical formulation of Bu-Yang-Huan-Wu-Tang and its pharmacokinetics after oral administration to rats[J]. PLoS One, 2012,7(8):1-13.

[责任编辑 顾雪竹]