

# 抗老年性痴呆复方开心散有效提取物血清药物化学研究

刘学伟, 刘爽, 黄树明\*

(黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** **目的:**分析开心散 60% 乙醇提取物(KXS-60% E)体外各成分的归属来源及大鼠灌服 KXS-60% E 后药物入血成分。 **方法:**应用 UPLC-TOF-MS 技术建立 KXS-60% E 体外成分以及大鼠灌服药物后含药血清样品的分析方法,根据各单味药的色谱峰确定全方主要成分的来源归属;对比空白血清、含药血清的成分异同,分析药物的入血成分。 **结果:**通过对比 KXS-60% E 与各单味药的正负总离子流图,归属了 94 个主要色谱峰的来源;大鼠口服 KXS-60% E 后,在血中分析指定了 41 个入血成分,其中 13 个为新产生的代谢产物,28 个成分为 KXS-60% E 的原形成分。 **结论:**血中移行成分及其代谢产物是 KXS-60% E 防治老年性痴呆(AD)的更直接药效物质基础,对其进行深入的研究将有助于阐明开心散防治 AD 的作用机制。

**[关键词]** 开心散乙醇提取物;液质联用技术;老年性痴呆

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0179-05

**[doi]** 10.11653/syfy2014060179

## Plasma Pharmacochemistry Study of Effective Extracivet from Kai-xinsan on Alzheimer's Disease

LIU Xue-wei, LIU Shuang, HUANG Shu-ming\*

(Research Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyse the origin of peaks in Kaixinsan (KXS) extracted by 60% ethano (KXS-60% E) and the constituents in rat plasma after oral administration of KXS-60% E. **Method:** A UPLC-TOF-MS method for analyzing the constituents in KXS-60% E and in rat plasma after oral administration of KXS-60% E, has been established. The origin of peaks in KXS-60% E were pointed out compared with each single herb in the formula similarly, the origin of peaks in treated serum after oral KXS-60% E were identified by contrasting the control rat serum. **Result:** Ninety-four compounds were detected in KXS-60% E *in vitro*, by compare with control rat plasma, 41 peaks were pointed out in treated plasma. Concluding 28 original form in KXS-60% E and 13 metabolites. **Conclusion:** The constituents absorbed into blood and their metabolites of KXS-60% E were the direct basis of action of the drug, further study on these constituents may clarify the mechanism of KXS prevention and treatment on Alzheimer's disease.

**[Key words]** kaixinsan extracted by 60% ethano; UPLC-TOF-MS; Alzheimer's disease

开心散是古代经典名方,临床应用广泛,原方或加减后用于防治阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性疾病<sup>[1]</sup>。近年来,包括其各单味药在内的该类方(包括配伍剂量而产生的变方及有

**[收稿日期]** 20130528(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81303248);黑龙江省教育厅海外学人科研项目(1153h18);黑龙江省科技厅面上项目(LC2008C264);哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项基金项目(2013RFQXJ154);黑龙江中医药大学科研基金面上项目(2010)

**[第一作者]** 刘学伟,硕士,助理研究员,从事中医药防治 AD 作用及机制研究, Tel:0451-87266816, E-mail:liuxuewei2001@163.com

**[通讯作者]** \* 黄树明,博士,教授,从事天然药物防治神经退行性疾病的作用及机制研究, Tel:0451-87266812, E-mail:huangsm1958@163.com

效组分)能明显改善多种拟痴呆小鼠等动物的学习记忆能力<sup>[2]</sup>。课题组前期研究结果显示,开心散及开心散 60% 乙醇提取物(KXS-60% E)能明显改善痴呆动物学习和记忆能力,而含有开心散类方的大鼠血清对 A $\beta$  诱发的 PC12 细胞损伤的改善作用<sup>[3]</sup>,含药脑脊液对离体培养的 PC12 细胞具有明显的促生长作用<sup>[4]</sup>,说明其药效物质基础客观存在。开心散成分复杂,究竟是其何种成分在体内以何种形式发挥作用以及作用机制如何鲜见报道。中药血清药物化学是以传统药物化学方法为基础,分析鉴定口服中药后血清中移行成分,确定中药药效物质基础的应用学科<sup>[5-6]</sup>。本研究利用 UPLC-TOF-MS 技术,通过对 KXS-60% E 体外及入血成分进行分析,旨在探索其药效作用的更直接作用成分,并为进一步阐明该方的物质基础提供研究方向。

## 1 材料

**1.1 仪器** 美国 Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪(四元梯度泵-在线真空脱气机-自动进样器-二极管阵列检测器-柱温箱),美国 Waters LCT Premier XE 飞行时间质谱仪(电喷雾离子源-负压离子扫描方法-Lockspray),MassLynx V4.1 工作站;HITACHI-CT-15RE 型高速冷冻离心机(日本),SK-1 型快速混匀器(昆山市超声仪器有限公司),KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Sartorius BT25S 型分析天平(德国),202-3AB 型恒温干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司)等。

**1.2 药品与试剂** 乙腈(色谱级,德国,Merck 公司),甲醇(色谱级,美国,Fisher 公司),蒸馏水(中国,广州屈臣氏食品饮料有限公司),甲酸(色谱级,中国,天津科密欧化学试剂有限公司)。人参、茯苓、远志、石菖蒲药材购于哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司,经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定均为正品。

**1.3 动物** Wistar 大鼠,雄性,体重 200 ~ 240 g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供[清洁级,许可证号 SCXK(沪)2006-003],室温饲养,自由摄食饮水。于实验前 24 h 禁食,自由饮水。

## 2 方法

**2.1 KXS-60% E 及各单味药的制备** 按原处方比例(人参-茯苓-远志-石菖蒲 3:3:2:2)称取药材,结合实验室前期研究结果所获得的最佳提取工艺,即 60% 乙醇 12 倍回流提取 2 次,第 1 次 2 h,第 2 次 1.5 h,合并药液过 16 层纱布,滤液减压回收后干燥(80 °C 水浴烘至稠膏后置恒温干燥箱 80 °C 烘干至

恒重),研末过 80 目筛后于低温冰箱内冷藏备用。同法制备各单味药醇提取物备用。

**2.2 KXS-60% E 及各单味药分析样品溶液制备** 取开心散全方粉末 100 mg、人参单味粉末 53.4 mg、茯苓单味粉末 3.2 mg、远志单味粉末 27.5 mg 及石菖蒲单味粉末 15.8 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,以上各样品分别以 60% 的色谱乙醇溶解,超声助溶 10 min,定容至 25 mL,吸取适量溶液高速离心(13 000 r·min<sup>-1</sup>),取上层溶液供 UPLC 分析使用。

**2.3 空白及含药血清样品的制备** 取 Wistar 大鼠 7 只,禁食 12 h(自由饮水),采用乙醚吸入麻醉法,待动物麻醉后,自眼底取血 1.5 mL,4 °C 13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,分离获得空白血清备用;动物自由饲养 7 d 后,按 5.4 g·kg<sup>-1</sup> 体重灌服 KXS-60% E 药粉,给药 30 min 后,采用相同方法制备含药血清;取大鼠空白血清及给药血清各 0.5 mL 上样到预先以 2 mL 甲醇、2 mL 水活化平衡好的 SPE 柱上,分别以 4 mL 水和 2 mL 甲醇淋洗,淋洗液弃去,再以 3 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,35 °C 下空气流吹干,残渣用 100  $\mu$ L 流动相复溶,超声 1 min,再混悬震荡 30 s 后,4 °C,13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上层清液,进样 2  $\mu$ L 供 UPLC 分析。

## 2.4 分析条件

**2.4.1 色谱条件** ACQUITY UPLCTM BEH C<sub>18</sub> column 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.7  $\mu$ m),流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 40 °C,流动相 A 0.1% 甲酸-水溶液,B 0.1% 甲酸-乙腈溶液,进样体积 2  $\mu$ L,梯度洗脱程序见表 1。样品不经紫外检测器直接导入质谱仪进行正负离子扫描分析。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	流速/mL·min <sup>-1</sup>	A/%	B/%
0.0	0.300	5.0	95.0
5.0	0.300	30.0	70.0
12.0	0.300	50.0	50.0
15.0	0.300	80.0	20.0
16.0	0.300	100.0	0.0

**2.4.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),采用正负离子扫描检测;毛细管电压 1 000 V,样本锥孔电压 40 V,离子源温度 100 °C,脱溶剂温度 350 °C,脱溶剂气流量扫描 700 L·h<sup>-1</sup>,锥孔气流量 10 L·h<sup>-1</sup>;微通道板电压 2 300 V,扫描时间 0.3 s。准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin,[M + H]<sup>+</sup>556.277 1),质量浓度 1.0  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>,校正溶液进样速度 30  $\mu$ L·min<sup>-1</sup>,校正频率 15 s;扫描方式为全

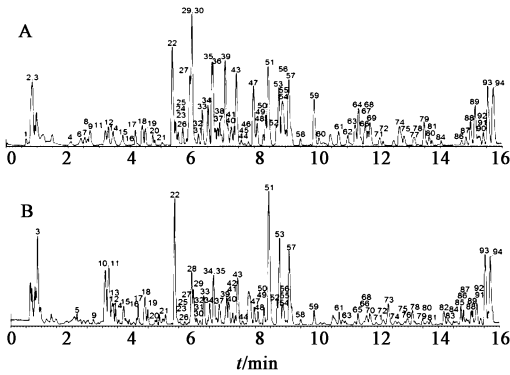
扫描,质量扫描范围  $m/z$  100 ~ 1 500。

**2.5 KXS-60% E 全方体外成分色谱峰的指认** 对比 KXS-60% E 全方、各单味药的正负及空白对照溶液的离子峰,确定主要离子峰的来源归属。

**2.6 大鼠口服 KXS-60% E 后血中移行成分分析** 对比含药血清样品、空白血清样品及 KXS-60% E 供试样品,比较指认血中的移行成分,并对照体外全成分,区分成分的来源。

### 3 结果

**3.1 体外成分的初鉴定及来源归属** 通过对比 KXS-60% E 与各单味药的正负总离子流图(图 1),结合一级质谱数据,归属了 94 个主要色谱峰的来源。其中 35 个色谱峰(1, 7, 9, 10, 13, 14, 25, 26, 28 ~ 30, 45 ~ 47, 49 ~ 59, 68, 72, 74, 75, 77, 79, 80, 84, 87, 89 号峰)来源于人参,44 个色谱峰(2 ~ 5, 8, 11, 12, 15 ~ 24, 27, 31 ~ 44, 48, 60 ~ 67, 69, 71 号峰)来源于远志,6 个色谱峰(78, 81, 90, 92 ~ 94 号峰)来源于茯苓,9 个色谱峰(6, 70, 73, 76, 82, 83, 85, 88, 91 号峰)来源于石菖蒲。



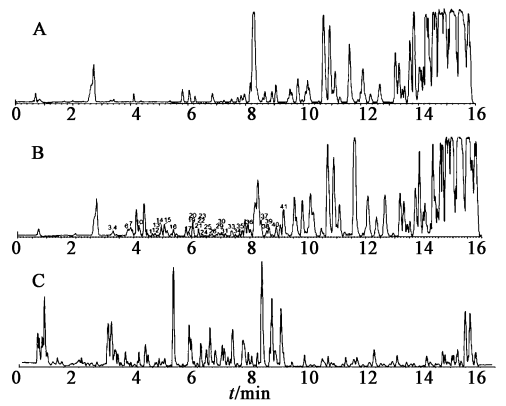
A. 正离子;B. 负离子

图 1 KXS-60% E 成分分析 HPLC-MS 总离子流

**3.2 KXS-60% E 血中移行成分研究** 按照上述分析方法,对比研究 KXS-60% E 样品、空白以及给药血清样品的 UPLC-MS 色谱图(图 2,3),利用已获得的体外成分质谱数据,确定各成分的来源及归属(图 4)。找出了大鼠口服 KXS-60% E 后的 41 个血中移行成分,其中 14 个代谢成分,27 个为原型成分,在原型成分中,18 个来源于远志,7 个来源于人参,未发现来源于石菖蒲及茯苓的入血成分。

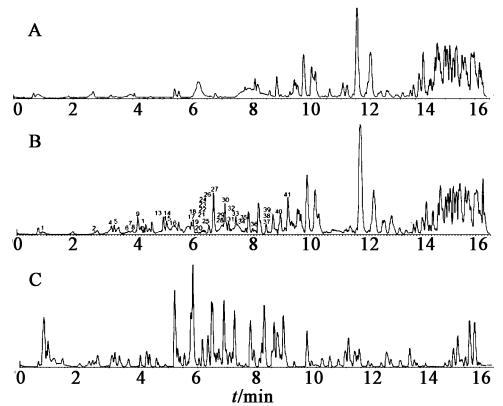
### 4 讨论

由于生物血清样本成分复杂,而药物吸收入血的成分含量又较低,为避免血清中杂质峰对入血成分的干扰,本实验对血清进行处理,考察了有机溶剂沉淀(甲醇、乙腈)法、溶液萃取(乙酸乙酯,乙醚)以及固相萃取(SPE)等方法,结果有机溶剂沉淀以及



A. 空白血清;B. 含药血清;C. KXS-60% E

图 2 KXS-60% E 及经口服给药后大鼠血清样品 UPLC-MS 正离子流比较



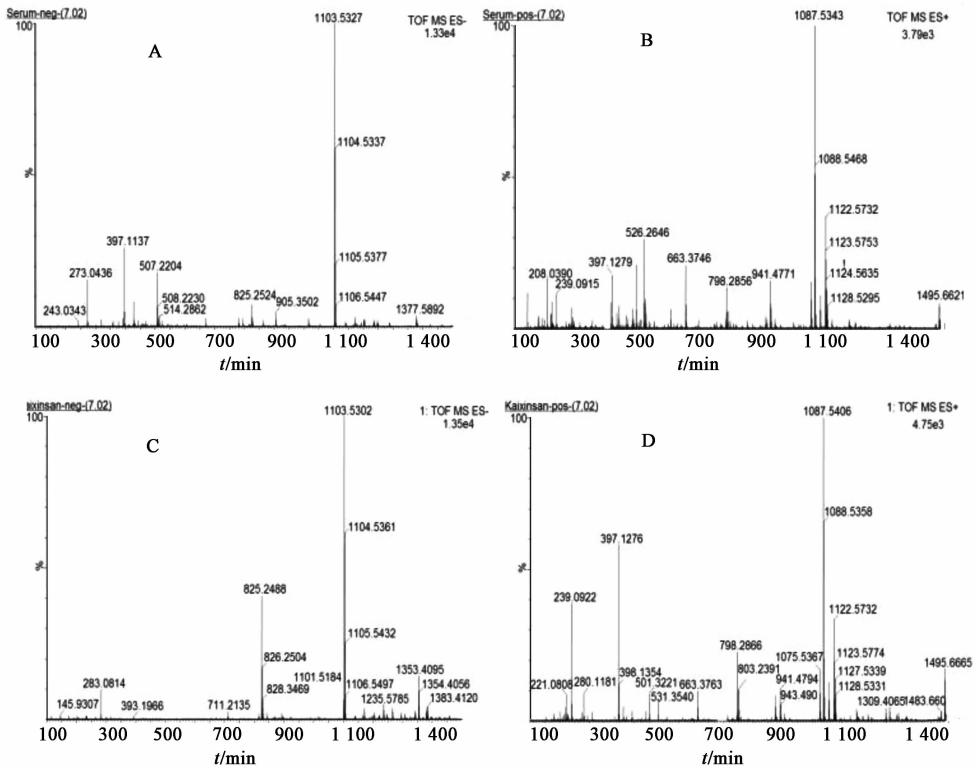
A. 空白血清;B. 含药血清;C. KXS-60% E

图 3 KXS-60% E 及经口服给药后大鼠血清样品 UPLC-MS 负离子流比较

液液萃取后的样品色谱图的背景较高,而 SPE 方法处理后的色谱图背景相对较低,且利于样品的富集,故选择固相萃取法。

在采血方法及时间点上,为吻合前期实验的采血方式,同时避免不同大鼠之间的个体差异,本实验采用同一只动物自眼底静脉丛采血;在灌胃给予大鼠 KXS-60% E 后,分别在 15, 30 min, 1, 2, 4 h 于眼底静脉采血,分析结果表明,30 min 的血中移行成分最多,因此选择 30 min 作为最佳采血时间。

研究表明,在含药血清中,未发现石菖蒲及茯苓血中移行成分。对茯苓单味药物体外成分分析结果显示,茯苓的体外成分色谱峰较少,其入血成分可能较少。但高冰冰<sup>[7]</sup>的研究表明,开心散原方比开心散去茯苓方更利于改善痴呆小鼠学习记忆能力,因此不能勿视其作用;而对于以挥发油为主要成分的石菖蒲而言,采用乙醇提取及高效液相的方法对石菖蒲挥发油类成分的检测有其局限性。尽管如此,缺少挥发油成分的开心散醇煎剂含药血清仍具



A. 含药血清负离子; B. 含药血清正离子; C. KXS-60% E 负离子; D. KXS-60% E 正离子

图 4 Peak TR7.02 号峰在 KXS-60% E 和大鼠血清中的正负离子一级质谱

表 2 大鼠灌服 KXS-60% E 后血中移行成分信息

No.	$t_R$ /min	ESI <sup>-</sup>	ESI <sup>+</sup>	峰来源	No.	$t_R$ /min	ESI <sup>-</sup>	ESI <sup>+</sup>	峰来源
1	0.80	377.087	-	B	22	6.23	537.235	-	M
2	2.64	507.134	-	B	23	6.25	1 295.392	1 297.405	B
3	3.20	-	369.117	B	24	6.37	1 341.393	1 297.399	B
4	3.20	563.157	519.153	B	25	6.52	1 353.397	1 309.405	B
5	3.30	593.172	549.173	B	26	6.59	1 383.424	1 339.418	B
6	3.76	593.175	549.172	B	27	6.68	1 265.592	-	B
7	3.80	530.184	532.151	M	28	6.84	1 235.570	-	B
8	3.91	982.966	-	M	29	6.92	273.040	239.090	M
9	4.03	945.490	-	M	30	7.02	1 103.532	1 087.535	B
10	4.29	918.918	920.925	M	31	7.21	1 395.414	1 351.407	B
11	4.57	-	906.926	M	32	7.29	397.113	-	M
12	4.72	-	963.465	M	33	7.35	505.210	507.226	M
13	4.90	1 237.567	1 239.578	M	34	7.43	1 425.431	1 381.442	B
14	4.95	1 395.646	1 397.643	M	35	7.59	1 383.419	1 339.417	B
15	5.05	754.823	756.833	M	36	8.10	1 425.423	1 381.431	B
16	5.36	799.229	755.293	B	37	8.42	1 153.608	1 109.611	A
17	5.89	727.213	683	B	38	8.58	1 193.602	1 149.598	A
18	5.95	991.554	-	A	39	8.79	1 123.597	1 079.602	A
19	6.00	845.498	801.497	A	40	8.86	955.489	911.492	A
20	6.11	1 025.562	981.571	A	41	9.16	983.469	-	M
21	6.20	1 311.396	1 267.393	B					

注: A 为人参, B 为远志, M 为代谢产物。

有明显的药理作用,表明醇溶剂中也存在有效成分,或者存在具有促进药物有效成分吸收的间接活性成分。

人参入血成分相对较少,仅为7个。刘昌孝院士曾总结“人参皂苷吸收很差”,张均田等<sup>[8]</sup>研究结果也显示“人参皂苷肠道吸收率低,分布到各脏器的量甚微,给药物代谢研究带来一定难度”,表明人参难以以原型成分吸收入血。然而这并不悖于人参在方中的作用,原型成分在血中检测不到并不等同于无作用。早些研究已证实,人参的皂苷类成分多在肠道内代谢后,以次级或三级代谢产物的吸收入血而作用于机体<sup>[9]</sup>,在本研究中有14个代谢产物出现,尽管尚不能完全确定其分子结构,但有理由相信,这些代谢产物可能是来源于人参,也为后续研究提供了新的方向。

KXS-60% E 血中移行成分以远志为主,在27个原型成分中,有20个成分源于远志,这一结果与现有的同类研究相类似,如巴寅颖等<sup>[10]</sup>采用HPLC测定的开心散24个血中移行成分中有18个源于远志,谢宁等<sup>[11]</sup>也对地黄饮子血清药物化学研究中表明远志有较多吸收。尽管方中远志为臣药,但其对全方的贡献不容忽视。根据传统医学理论,远志具有安神益智的作用,且全方冠以“主好忘”,用于治疗痴呆,其科学内涵体现其中。

#### [参考文献]

[1] 卞慧敏,郭海英,黄玉芳,等. 开心散对4种动物模型

记忆功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,1999,5(5):51.

[2] 曾毅丹,黄芳,汪家梨. 开心散现代药理作用的研究[J]. 海峡药学,2006,18(5):12.

[3] 温薇,张超,黄树明,等. 开心散含药血清对A $\beta$ 诱发的PC12细胞损伤的改善作用[J]. 中医药信息,2012,29(4):80.

[4] 李福东,王艳华,黄树明,等. 开心散含药脑脊液对无血清培养PC12细胞的促生长作用[J]. 中医药学报,2012,40(6):12.

[5] 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,2002,4(2):1.

[6] 王莉梅,金向群. 中药血清化学在中药及中药复方研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(1):77.

[7] 高冰冰,徐淑萍,刘新民,等. 开心散与去茯苓开心散改善拟AD动物学习记忆作用比较[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(7):57.

[8] 张均田. 人参研究的最新进展[J]. 江苏大学学报:医学版,2009,19(3):186.

[9] Kobashi K. Relatio of intestinal bacteria to pharmacological effects of giusenosides[J]. Bioscience Micmflom,1997,16(1):1.

[10] 巴寅颖,刘洋,姜艳艳,等. 开心散血清HPLC特征图谱研究[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(6):409.

[11] 郭司群,朱魁元,谢宁,等. 地黄饮子血清药物化学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):74.

[责任编辑 邹晓翠]

## 《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医药卫生类科技核心期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被万方数据、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中国期刊全文数据库、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库、中文科技期刊数据库收录。每期定价20元,全年36期优惠价540元。

本刊设有专家论坛、研究进展、论著、临床研究、药理与毒理、中医中药、生物医药、病理分析、药品鉴定、制剂与技术、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、护理研究、教学研究、药物经济学、科研管理、政策研究、医药监管等栏目,是广大医药科研、教育、临床等人员开阔视野、交流经验、增进学术交流的贴身参谋和得力助手,也是发表学术论文的园地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表,来稿注明单位名称、地址、电话、联系人姓名。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿邮箱:yyzx68@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn