

## 五味降压方药效评价及血中暴露成分初探

赵保胜<sup>1</sup>, 杨文宁<sup>2</sup>, 隗丽<sup>2</sup>, 张凯伦<sup>2</sup>, 赵慧辉<sup>3\*</sup>, 刘洋<sup>2</sup>,

高晓燕<sup>1</sup>, 朱寅荻<sup>2</sup>, 桂海水<sup>2</sup>, 刘莉莹<sup>2</sup>, 曹燕飞<sup>2</sup>, 董红环<sup>2</sup>, 张雷<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学科研实验中心, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;  
3. 北京中医药大学研究生院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:** 研究五味降压方对自发性高血压大鼠 (SHR) 的降压作用, 并对五味降压方起效的血中暴露成分进行研究。**方法:** 五味降压方  $2.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  大鼠灌胃给药 (相当于人临床日用量的 12 倍), 每日 1 次, 连续 4 周, 每周测定大鼠血压 1 次; 末次测定血压后, 腹主动脉采血, 分离血浆, 反相高效液相色谱法建立五味降压方以及血中多成分指纹图谱, 探明降压疗效反应呈现下的暴露成分。**结果:** 五味降压方从第 2 周起表现出明显的降血压作用 ( $P < 0.01$ ); 对血中多成分指纹图谱进行分析, 发现五味降压方在降压疗效发生时, 有紫外吸收成分进入血液。**结论:** 五味降压方药效反应明显, 血中可见具有紫外吸收的暴露成分, 其暴露成分的确切性质有待于通过化学研究工作进一步阐明。

**[关键词]** 暴露-反应; 五味降压方; 降血压; 血中成分

**[中图分类号]** R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0258-04

## Evaluation of Wuwei Jiangya Fang on Its Antihypertensive Effect and Its Blood Exposure Components

ZHAO Bao-sheng<sup>1</sup>, YANG Wen-ning<sup>2</sup>, YU Li<sup>2</sup>, ZHANG Kai-lun<sup>2</sup>,

ZHAO Hui-hui<sup>1,3\*</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, GAO Xiao-yan<sup>1</sup>, ZHU Yin-di<sup>2</sup>,

GUI Hai-shui<sup>2</sup>, LIU Li-ying<sup>2</sup>, CAO Yan-fei<sup>2</sup>, DONG Hong-huan<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>2</sup>

(1. Center of Scientific Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

3. Graduated School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the hypotensive effect of Wuwei Jiangya Fang to spontaneous hypertensive rats (SHR), and analyze its blood exposure compositions which would be the effective components. **Method:** Wuwei Jiangya Fang was extracted with water and administrated to the SHR rats per oral, once a day; the dosage was  $2.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  per day. During the period of the experiment, the tail blood pressure was measured every week. SHR rats were anesthetized and the blood was taken from abdominal aorta. We established the fingerprints of Wuwei Jiangya Fang and its serum compounds with RP-HPLC method, and determined the exposed components which showed antihypertensive efficacy. **Result:** Wuwei Jiangya Fang showed obvious anti-hypertension effect ( $P < 0.01$ ) when the rats were administered for 2 weeks or longer. Through the analysis to blood multiple component fingerprint, we found that when Wuwei Jiangya Fang showed its antihypertensive effect, certain components which had UV absorption were found in the blood. **Conclusion:** Wuwei Jiangya Fang showed obvious anti-hypertension effect and certain exposure components of it which showed UV absorption were found in the blood. Further chemical research works were needed to clarify the character of the exposure components.

**[Key words]** exposure response; Wuwei Jiangya Fang; anti-hypertension; serum compounds

**[收稿日期]** 20120717(013)

**[基金项目]** 教育部新世纪人才项目 (NCET-11-0607); 北京市科技新星计划项目 (2011069)

**[第一作者]** 赵保胜, 博士, 副研究员, 从事中药药效与物质基础研究, Tel: 010-64286291, E-mail: zhaobs1973@163.com

**[通讯作者]** \* 赵慧辉, 博士, 副教授, 从事中医药治疗高血压药效与机理研究, Tel: 010-64286283, E-mail: hh686@126.com

中药药效产生的物质基础是其内含化学成分,但众多化学成分中,哪些以原型起到治疗作用,哪些以代谢转化型起到治疗作用,需要通过代谢分析的方法来获知;而将产生疗效的药效反应与成分在体内的充分暴露相结合的研究,是最理想的研究方案。2003年美国FDA发布“暴露-反应关系:研究设计、数据分析及管理应用”<sup>[1]</sup>以来,科研工作者已经从药代与药效的关联关系(PK-PD)扩展到更丰富的药效评价体系。中药研究从暴露-反应关系入手的研究思路,是值得探索的领域。本研究便尝试以五味降压方(由葛根、丹参、牛蒡、地骨皮、山楂五味药组成)开展研究,探索其良好的降压反应下的成分暴露特征。

## 1 材料

**1.1 仪器** Waters 高效液相色谱仪(美国沃特世公司);LG16-W 高速离心机(北京京立离心机有限公司);QL-901 涡旋混合器(其林贝尔仪器制造公司);BT100-1F 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);BP-98A 血压测定仪(日本软隆株式会社)。

**1.2 药材和试剂** 缬沙坦,诺华公司,批号 X1200;葛根、丹参、牛蒡、地骨皮、山楂饮片购于北京同仁堂药店,所有药材经北京中医药大学刘洋教授鉴定,分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi.,唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.,菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L.,茄科植物枸杞根皮和蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实<sup>[2]</sup>;甲醇、乙腈色谱分析纯, Fisher 公司,批号 20111010;其余试剂均为市售分析纯。

**1.3 动物** 清洁级 SD 大鼠,220~240 g,雄性,清洁级 SHR 大鼠,220~240 g,雄性;北京维通利华实验动物技术有限公司提供;许可证号 SCXK(京)2011-0011。饲养于符合国家标准的屏障环境中,室温 22~24℃,相对湿度 60%,常规饲料喂养,自由饮水。

## 2 方法与条件

### 2.1 供试品的制备

**2.1.1 五味降压方浸提液的制备** 称取葛根、丹参、牛蒡、地骨皮、山楂饮片各 75 g,混合,加 4 500 mL 沸腾蒸馏水煎煮 1 h,趁热过滤,药渣加入 3 750 mL 蒸馏水再煎煮 1 h,趁热过滤,合并 2 次滤液,滤液浓缩成 2 g·mL<sup>-1</sup> 的浓度,4℃ 保存备用。

**2.1.2 五味降压方供试品溶液的制备** 取适量五味降压方浸提液,用蒸馏水稀释 20 倍,稀释液过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液供 HPLC 分析。

**2.1.3 五味降压方入血成分供试品溶液的制备** 采用禁食不禁水 18 h 的健康 SHR 大鼠,称重,按 40 g·kg<sup>-1</sup> 灌胃给药,分成 2 组,每组 3 只。第一组于给药后 30 min,第二组与给药后 60 min 以水合氯醛麻醉,仰卧位固定,分离腹主动脉,用肝素抗凝的注射器取血。血液 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 分离血浆;血浆加入 3 倍体积乙腈后,漩涡震荡 1 min,9 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,上清液即为乙腈浸提液,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液供 HPLC 分析。

### 2.2 大鼠的血压测定

**2.2.1 血压测定方法**<sup>[3]</sup>:以尾动脉测压仪测定大鼠安静、清醒状态下尾动脉收缩压(SBP),将大鼠固定在 37℃ 恒温箱内,适应 8 min 后测定,每只鼠连续测量 SBP 3 次,间隔 60 s,取其平均值做为大鼠血压值。根据基础血压值水平随机分为模型组、五味降压方药组和缬沙坦组,每组 6 只,加设 6 只健康 SD 大鼠为正常对照组。缬沙坦给药剂量为 14 mg·kg<sup>-1</sup>,五味降压方给药剂量为 2.6 g·kg<sup>-1</sup>,均为人临床日用量的 12 倍,灌胃给药,正常组灌胃等量蒸馏水,每日 1 次;连续 4 周。每周测血压和体重各 1 次。

**2.2.2 统计学方法**:采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为有统计意义。

**2.3 高效液相色谱条件**<sup>[4]</sup> Thermo scientific ODS-2 Hypersil C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),带保护柱;柱温 30℃;流动相 A 为乙腈,B 为 0.1% 磷酸水,梯度洗脱;检测波长 270 nm;进样量 20 μL;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。洗脱梯度变化如表 1:

表 1 液相色谱洗脱梯度表

时间 /min	乙腈 /%	0.1% 磷酸水 0.2 / %
0	10	90
10	15	85
30	15	85
33	30	70
40	30	70
50	60	40

按上述色谱条件分别进行五味降压方内含成分及入血成分的 HPLC 分析,化学成分指纹图谱。

## 3 结果

### 3.1 五味降压方的降压药效反应

**3.1.1 大鼠一般表现及体重变化**:各组动物生长良

好,进食、活动正常,除正常组外的其余三组出现不同程度的暴躁情况,以模型组最为明显,五味降压组次之,缬沙坦组最轻。从体重来看,正常组和模型组

比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),受试药组、缬沙坦组和模型组比较,差异无统计学意义,表明五味降压方对大鼠体重影响不明显。见表 2。

表 2 五味降压方对 SHR 大鼠体重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	体重/g				
		0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
正常	-	275.67 ± 10.67	311.00 ± 18.02 <sup>2)</sup>	333.50 ± 22.07 <sup>2)</sup>	347.50 ± 36.32 <sup>2)</sup>	354.17 ± 40.09 <sup>2)</sup>
模型	-	212.50 ± 11.11	231.83 ± 15.75	239.17 ± 18.21	252.00 ± 18.71	259.83 ± 19.43
五味降压	2.6	214.50 ± 6.79	233.67 ± 5.78	238.50 ± 7.76	248.00 ± 7.42	255.67 ± 16.75
缬沙坦	0.014	215.50 ± 9.22	231.33 ± 12.65	241.50 ± 13.41	256.83 ± 15.87	266.17 ± 19.19

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2-3 同)。

3.1.2 五味降压方对大鼠血压的影响:模型组大鼠血压随着时间延长而持续增高(均  $P < 0.05$ ),五味

降压方与阳性药缬沙坦组大鼠从第 2 周起有明显下降,两药均表现出较好的降血压作用。见表 3。

表 3 五味降压方对 SHR 大鼠血压的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	血压/mmHg				
		0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
正常	-	108.39 ± 6.43 <sup>2)</sup>	113.44 ± 5.76 <sup>2)</sup>	119.33 ± 10.01 <sup>2)</sup>	113.66 ± 7.42 <sup>2)</sup>	107.28 ± 6.89 <sup>2)</sup>
模型	-	156.78 ± 17.40	163.39 ± 17.93	188.00 ± 7.62	186.66 ± 6.09	188.44 ± 7.14
五味降压	2.6	152.89 ± 10.13	169.33 ± 11.64	169.73 ± 9.56 <sup>2)</sup>	154.33 ± 16.30 <sup>2)</sup>	155.94 ± 9.13 <sup>2)</sup>
缬沙坦	0.014	153.00 ± 5.25	155.72 ± 11.37	157.83 ± 13.60 <sup>2)</sup>	148.83 ± 7.13 <sup>2)</sup>	144.89 ± 8.76 <sup>2)</sup>

3.1.3 大鼠心率的变化 五味降压组、缬沙坦组和模型组的心率几乎没有显著性差异,说明五味

降压方对 SHR 大鼠的心率几乎没有影响,见表 4。

表 4 五味降压方对 SHR 大鼠心率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	心率/次/min				
		0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
正常	-	417.06 ± 33.80 <sup>2)</sup>	403.78 ± 20.07 <sup>2)</sup>	393.78 ± 54.21	342.72 ± 20.92	396.11 ± 56.45
模型	-	373.89 ± 30.13	371.28 ± 27.45	377.94 ± 40.11	380.83 ± 46.83	382.11 ± 43.52
五味降压	2.6	384.83 ± 37.23	381.72 ± 54.16	366.27 ± 25.42	358.16 ± 32.53	392.39 ± 27.77 <sup>1)</sup>
缬沙坦	0.014	372.17 ± 41.62	370.89 ± 44.77	369.08 ± 33.30	360.33 ± 42.35	381.17 ± 38.39

### 3.2 五味降压方的血中暴露成分

3.2.1 五味降压方多成分指纹图谱:可见 14 个以色谱峰为代表的在 270 nm 下,具有紫外吸收的化学成分,见图 1。

3.2.2 五味降压方血中暴露成分谱:通过在 30 min 和 60 min 采血的大鼠血中暴露成分指纹图谱比较在 270 nm 下可见具有紫外吸收的化学成分,主要集中在 12 min 到 15 min 之间,见图 2。

### 4 讨论

高血压病是目前世界范围内最常见的心血管疾病之一,我国分别于 1959 年、1979 年和 1991 年对 15 岁以上人群高血压患病情况进行抽样调查,发现高血压患病率分别为 5.1%、7.7% 和 13.6%,表现为逐年升高的趋势<sup>[5]</sup>。另据调查发现,北京、上海两地 35 岁以上人群原发性高血压患病率分别为

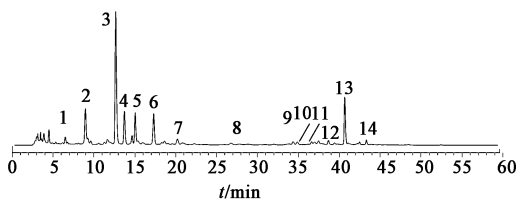
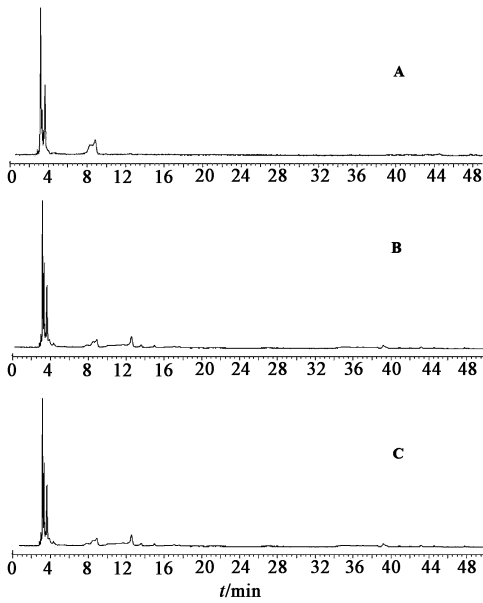


图 1 五味降压方 HPLC 多成分指纹图谱



A. 空白血浆; B. 30 min 采血浆; C. 60 min 采血浆

图2 五味降压方血中暴露成分谱

31.7%与32.9%,城市高血压的患病年龄明显高于农村<sup>[6]</sup>。2004年流行病学调查资料表明,全国约有1.6亿高血压患者,高血压病发病率在全球呈上升趋势,每10年上升25%,35~74岁的成年人高血压患病率约为27.2%<sup>[7]</sup>。2002年中国居民营养与健康状况调查结果显示,我国 $\geq 18$ 岁居民高血压患病率为11.8%,估计全国患病人数1.6亿以上。与1991年比较,高血压患病率上升31%,患病人数增加约7000多万人<sup>[8]</sup>。高血压并发症(脑卒中、心脏病及肾脏病等)严重危害我国居民健康,成为重大公共卫生问题。

估计全球有10亿高血压病患者,有62%的脑血管病和49%的冠心病都和血压升高相关<sup>[9]</sup>。高血压和心血管事件危险性之间的关系连续一致,持续存在,并独立于其它的危险因素。血压越高,患心肌梗死、心力衰竭、脑卒中、肾病的机会越多。年龄在40到70岁之间、血压在115/75~185/115 mm Hg的个体,收缩压每增加20 mmHg或舒张压每增加10 mmHg,其心血管事件的危险性增加一倍<sup>[10]</sup>。高血压及与高血压相关的心脑血管疾病,已成为危害大众健康的主要杀手之一,对其进行有效防治已成为世界范围内共同关注的公共卫生问题。

五味降压方为经多年临床验证的治疗高血压有效方剂,日常用法为饮片泡水代茶饮,为研究其治疗

高血压的药效学反应,本研究采用遗传性原发性高血压大鼠开展实验,实验结果与阳性对照药缬沙坦具有同等的降血压作用。该方所显现的高血压疗效特征从第二周显现,与临床上的降血压疗效反应一致,提示该方中的化学成分需要经过一段时间的体内效应积累才能起到降低血压的作用。在实验中,为保持与日常代茶饮一样的成分提取效果,采用水煎法提取成分,此法可以充分起到杀酶保苷的作用,防止饮片中与化学成分共存的酶类分解苷类化学成分。对此方产生疗效时的血中暴露成分研究初探,已发现血中具有紫外吸收的成分暴露,进一步的研究可以通过增加采血时间点、采用通用型检测器检测紫外不吸收的成分,并采用高灵敏度检测器检测低含量成分的方法深入研究在药效反应时,血中暴露成分的定性定量问题。

#### [参考文献]

- [1] Guidance for industry: exposure-response relationships-study design, data analysis, and regulatory applications [S]. Rockville, U. S. Food and Drug Administration. 2003, 06, 05.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010年;312, 70, 66, 115, 29.
- [3] 岳桂华, 卓少元. 益气活血解毒方对幼龄自发性高血压大鼠内皮功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8):154.
- [4] 闫小玉, 赵瑛博, 梁可, 等. 叶下珠高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12):108.
- [5] 全国血压抽样调查协作组. 中国人群高血压患病率及其变化趋势[J]. 高血压杂志, 1995, 3(增刊):7.
- [6] 胡永华, 李立明, 曹卫华, 等. 城乡社区原发性高血压患病情况的流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(3):177.
- [7] 刘力生, 刘国树, 华琦, 等. 2004年中国高血压防治指南[J]. 高血压杂志, 2004, 12(6):483.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 中国居民营养与健康状况[J]. 中国心血管病研究杂志, 2004, 2(12):919.
- [9] 方全, 严晓伟, 张抒扬. 心血管疾病治疗方案选择[M]. 第1版, 北京: 科学技术文献出版社, 2007. 10.
- [10] Staessen J A, Wang J, Bianchi G, et al. Essential hypertension[J]. Lancet, 2003, 361(9369):1629.

[责任编辑 何伟]