

DOI:CNKI:11-3495/R.20110221.1133.005

地黄饮子血清药物化学研究

郭司群,朱魁元,谢宁*,姜媛媛,张宁
(黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:对经方地黄饮子的血清药物化学进行研究。方法:利用 UPLC-ESI-MS 对地黄饮子体外样品及灌胃给予地黄饮子或单味药后家兔血清样品进行分析,比较各样品分析结果,确认地黄饮子的血中移行成分、代谢产物及其生药来源。结果:灌胃给予地黄饮子后家兔血清中发现 9 个血中移行成分,其中 7 个为新产生的代谢产物,2 个为地黄饮子所含的原型成分,分别由五味子、远志、石菖蒲、巴戟天、山茶萸、肉苁蓉、附子、麦冬贡献产生。结论:初步确定了地黄饮子的血中移行成分及代谢产物,对其进行深入的研究,将有助于阐明地黄饮子的有效成分及作用机制。

[关键词] 地黄饮子;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(2011)08-0074-05

Serum Pharmacochemistry Study of Dihuang Yinzi

GUO Si-qun, ZHU Kui-yuan, XIE Ning*, JIANG Yuan-yuan, ZHANG Ning
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the parameters of serum pharmacochemistry of Dihuang Yinzi. **Method:** Using UPLC-ESI-MS method, the chromatograms of rabbit serum samples after oral administration of Dihuang Yinzi and crude drugs were analyzed and compared with control rabbit serum. **Result:** Nine constituents absorbed into the blood after administration of Dihuang Yinzi were detected, including seven metabolites and two original form compounds. **Conclusion:** The constituents absorbed into blood and their metabolites of Dihuang Yinzi were identified preliminary. This study is conducive to the exploration of bioactive constituents of Dihuang Yinzi.

[Key words] Dihuang Yinzi; serum pharmacochemistry; constituents absorbed into blood

中药血清药物化学是以传统药物化学方法为基础,综合应用多种现代技术,分析鉴定口服中药后血清中移行成分,研究其药效相关性,确定中药药效物质基础的应用学科^[1]。地黄饮子出自金元四大家之首刘完素的《黄帝素问宣明论方》,用于治疗下元虚衰,痰浊上泛,壅塞窍道的暗瘕证^[2]。目前地黄饮子的整体药效研究较为深入^[2],但针对有效成分的研究很少,地黄饮子在体内到底以何种成分、形式发挥

作用及机制如何,至今少有报道。因此,有必要从地黄饮子的体内成分入手,利用中药血清药物化学的方法对地黄饮子的血中移行成分进详细的分析,确定其血中移行成分及其代谢产物,并且在此基础上研究其有效成分、药效及作用机制,确定真正的药效物质基础,指导临床安全、合理地用药,并可以有的放矢地提高地黄饮子的制备水平。

1 材料

1.1 仪器 UPLC-MS 联用系统(Waters AC-QUITY UPLC 超高效液相色谱仪, Waters Quattro Premier XE 三重四级杆串联质谱仪, Mass Lynx 4.1 质谱工作站); Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm × 75 mm) 色谱柱 (SHIMADZU); TGL-16G-C 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); H66MC 型超声震荡仪(昆山市超声仪器有限公司); SK-1 型快速混匀器(金坛市医疗仪

[收稿日期] 20101206(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772719)

[第一作者] 郭司群,药物分析专业硕士研究生, E-mail: guosiqun33@yahoo.com.cn

[通讯作者] *谢宁,教授,博士生导师,从事中医药防治老年病研究, Tel: 0451-82117811, E-mail: xiening3794@163.com

[网络出版时间] 2011-02-21 11:33

器厂)。

1.2 药材和试剂 熟地黄、山茱萸、五味子、巴戟天、麦冬、薄荷、石菖蒲、石斛、远志、附子、肉苁蓉、茯苓、肉桂、大枣、姜(购于哈尔滨三棵树药材市场,经黑龙江中医药大学方剂教研室谢宁教授鉴定为正品);五味子醇甲(schizandrol A,中国药品生物制品药品检定所,批号110857-200709);乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯,美国迪马公司);甲酸胺(分析纯,天津科密欧试剂有限公司)。

1.3 动物 新西兰白兔,体重1.8~2.2 kg,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,生产许可证号SCXK(黑)2007003。

2 方法

2.1 体外样品制备

2.1.1 地黄饮子及单味药材样品制备 取地黄饮子组成15味药材各15 g,混匀粉碎,粉末放于烘箱中烘至恒重,取地黄饮子粉末1 g或单味药材粉末66 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇至刻度定容,浸泡20 min后超声30 min,上清液3 000 r·min⁻¹离心15 min,过0.45 μm滤膜,取续滤液作为样品溶液。

2.1.2 五味子醇甲对照品溶液制备 精密称取五味子醇甲对照品10 mg,置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度摇匀即得五味子醇甲对照品溶液。

2.2 血清样品制备

2.2.1 灌胃药液制备 分别称取地黄饮子组方药材各20 g,混合,加入70%乙醇1 500 mL浸泡过夜,超声30 min,用4层纱布过滤,滤液浓缩后加蒸馏水稀释至200 mL,作为复方灌胃药液。称取单味药20 g,加70%乙醇100 mL浸泡过夜,超声30 min,用4层纱布过滤,滤液浓缩后加蒸馏水稀释至200 mL,作为单味药灌胃药液。

2.2.2 样品采集 取家兔,灌胃前禁食12 h,自由饮水,连续灌胃3 d(空白组灌胃给予蒸馏水,其他组灌胃给予对应药液),每天1次,每次50 mL,末次灌

胃后45,60,90,120 min耳缘静脉取血5 mL,血液离心10 min(4℃,3 000 r·min⁻¹),取血清备用。

2.2.3 样品制备 取血清1 mL,加入5 mL甲醇,涡旋3 min,超声10 min,离心10 min(4℃,3 000 r·min⁻¹),取出上清液,35℃下氮气吹干,残渣用1 mL甲醇复溶,超声1 min,涡旋震荡30 s,离心10 min(4℃,1万r·min⁻¹),取上清液供UPLC-ESI-MS分析。

2.3 分析条件 Shim-pack XR-ODS II色谱柱(2.0 mm×75 mm);流动相A为乙腈,B为0.1%甲酸+10 mmol·L⁻¹甲酸胺;梯度洗脱程序为5.0%(0 min),5.0%~50% A(0~10 min),50%~80% A(10~15 min),80%~95% A(15~17 min);柱温30℃;流量0.3 mL·min⁻¹;电喷雾接口,正离子模式,毛细管电压3.00 kV,锥孔电压35.00 V,离子源温度110℃,脱溶剂温度350℃,脱溶剂气(N₂)600 L·h⁻¹,锥孔气(He)600 L·h⁻¹。

2.4 样品分析 取各样品在相同的分析条件下进行UPLC-MS分析,通过对比分析,确定血中移行成分及其生药来源。

3 结果与讨论

3.1 地黄饮子血中移行成分认定 通过对比地黄饮子复方血清样品和空白血清样品的UPLC-MS分析提取离子色谱图,分析各色谱峰保留时间和分子离子峰数据,发现地黄饮子复方血清样品中出现9个移行成分,即保留时间为5.58 min,相对分子质量为417的成分1(图1);保留时间为6.08 min,相对分子质量为195的成分2(图2);保留时间为7.06 min,相对分子质量为387的成分3(图3);保留时间为7.34 min,相对分子质量为431的成分4(图4);保留时间为7.83 min,相对分子质量为353的成分5(图5);保留时间为8.84 min,相对分子质量为415的成分6(图6);保留时间为9.28 min,相对分子质量为401的成分7(图7);保留时间为11.12 min,相对分子质量为385的成分8(图8);保留时间为14.15 min,相对分子质量为304的成分9(图9);在

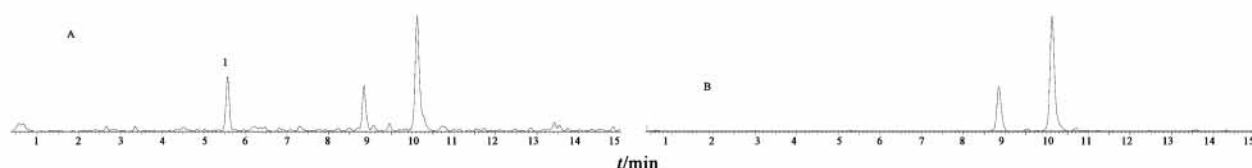


图1 地黄饮子复方灌胃血清与空白血清样品UPLC-MS分析提取离子色谱比较(ESI+, $m/z=417$)

A. 给药血清; B. 空白血清

空白血清样品中没有发现这9种成分。

3.2 地黄饮子血中移行成分来源归属 通过对地黄饮子复方、单味药材体外样品和血清样品的比对

分析,确认了地黄饮子血中移行成分的生药来源归属。

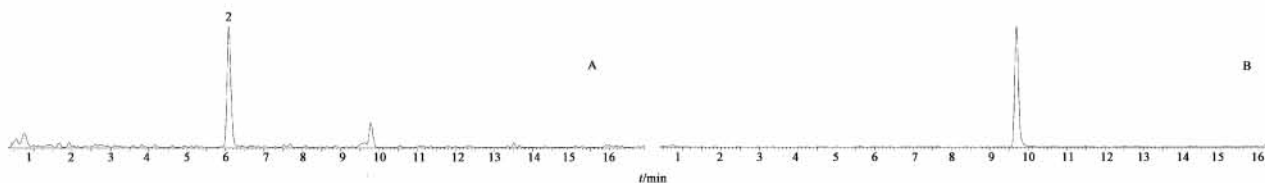


图2 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI + , $m/z = 195$)
A. 给药血清; B. 空白血清

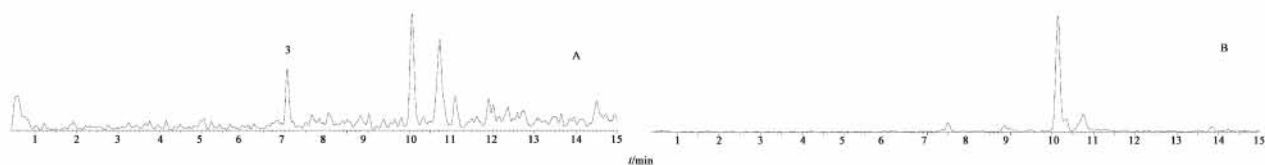


图3 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI + , $m/z = 387$)
A. 给药血清; B. 空白血清

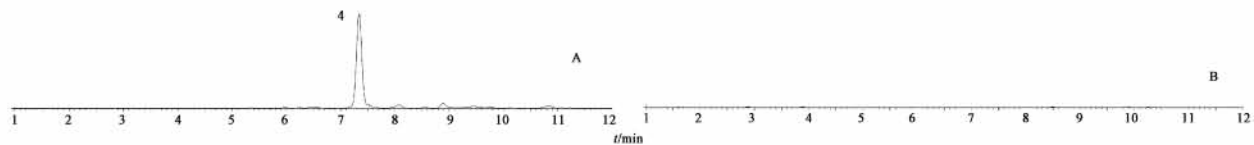


图4 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI + , $m/z = 431$)
A. 给药血清; B. 空白血清

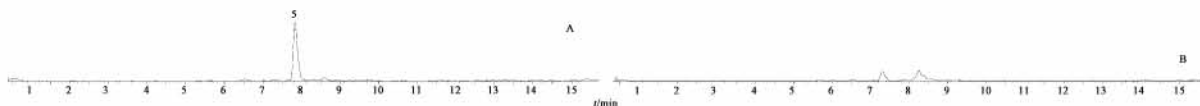


图5 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI + , $m/z = 353$)
A. 给药血清; B. 空白血清

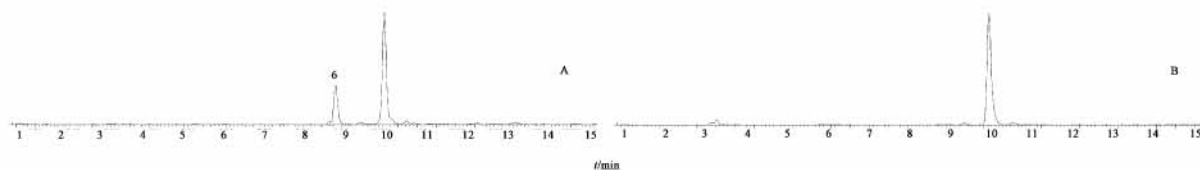


图6 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI + , $m/z = 415$)
A. 给药血清; B. 空白血清

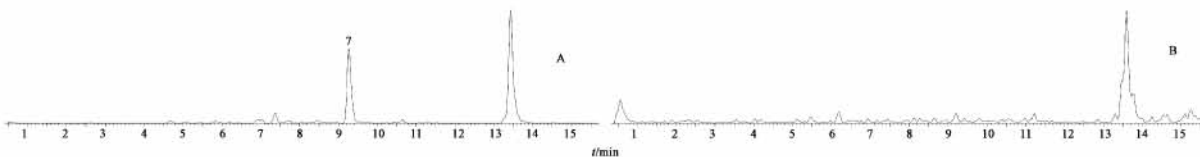


图7 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI + , $m/z = 401$)
A. 给药血清; B. 空白血清

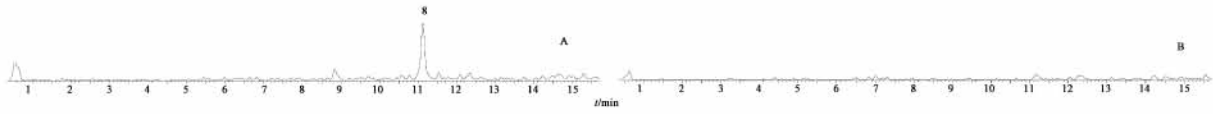


图8 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI^+ , $m/z = 385$)
A. 给药血清; B. 空白血清

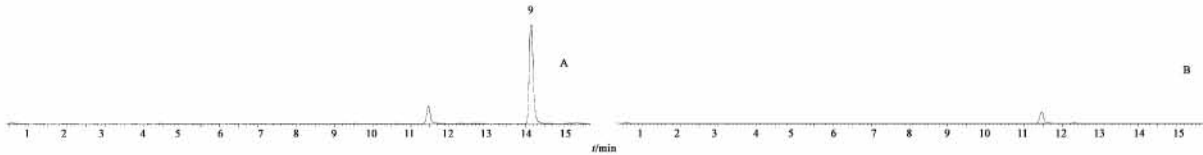


图9 地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI^+ , $m/z = 304$)
A. 给药血清; B. 空白血清

经复方血清样品、五味子血清样品、五味子体外样品和五味子醇甲对照品比对分析,发现 6 号成分

与五味子醇甲的保留时间、相对分子质量均相同,确定其为来源于五味子的五味子醇甲(图 10,11)。

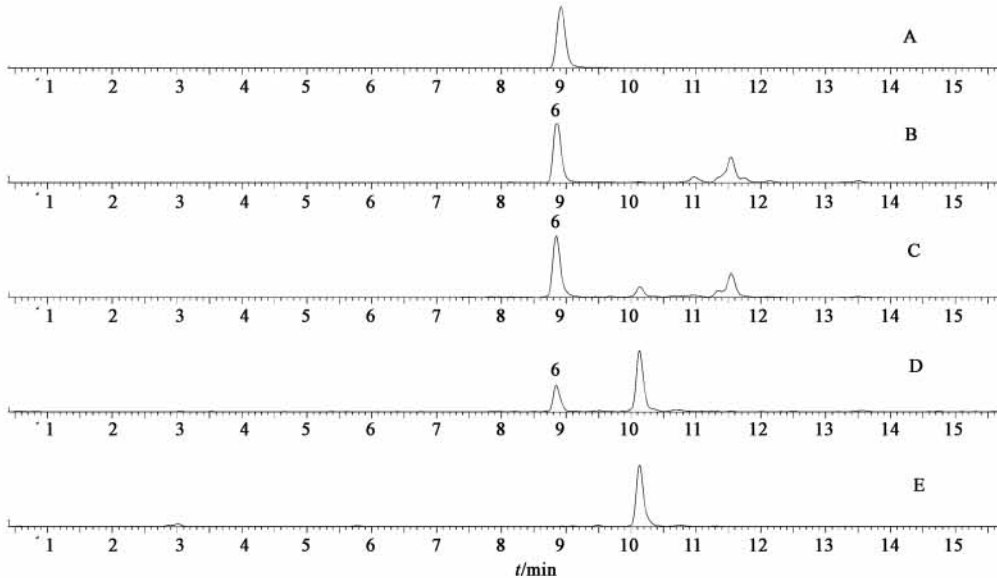


图10 五味子醇甲、五味子体外样品、五味子血清样品、地黄饮子复方给药血清与空白血清样品 UPLC-MS 分析提取离子色谱 (ESI^+ , $m/z = 415$)

A. 五味子醇甲; B. 五味子体外样品; C. 五味子血清样品; D. 复方给药血清; E. 空白血清

其余 8 个地黄饮子血中移行成分归属方法均与 6 号成分相同。1 号成分为五味子所含成分入血后产生的代谢产物;2 号成分为石菖蒲原型入血成分;3 号成分来源于远志;4 号成分来源于五味子和麦冬;5 号成分来源于远志和附子;7 号成分来源于五味子和巴戟天;8 号成分来源于远志和山茱萸;9 号成分来源于肉苁蓉。

五味子对 1,4,6,7 号成分有贡献;远志对 3,5,8 号成分有贡献;地黄饮子的血中移行成分主要来源于五味子和远志。

本研究初步进行了地黄饮子的血清药物化学研究,通过对地黄饮子血中移行成分的分析,发现五味子和远志为地黄饮子入血成分的主要来源药材。地黄饮子出自《黄帝内经·素问宣明论方》,具有滋肾阴,补肾阳,开窍化痰的功效,多用于冠心病、脑血栓、脑血管意外、中风、泛发性神经性皮炎、老年病等多种疾病的治疗^[3]。五味子具有敛肺,滋肾,生津,收汗,涩精等功效,它对中枢神经系统和心血管系统有着重要的作用,包括抗血栓、抗衰老、益智、镇静和催眠^[4]。远志有安神益智,开窍化痰,消肿的功效,对

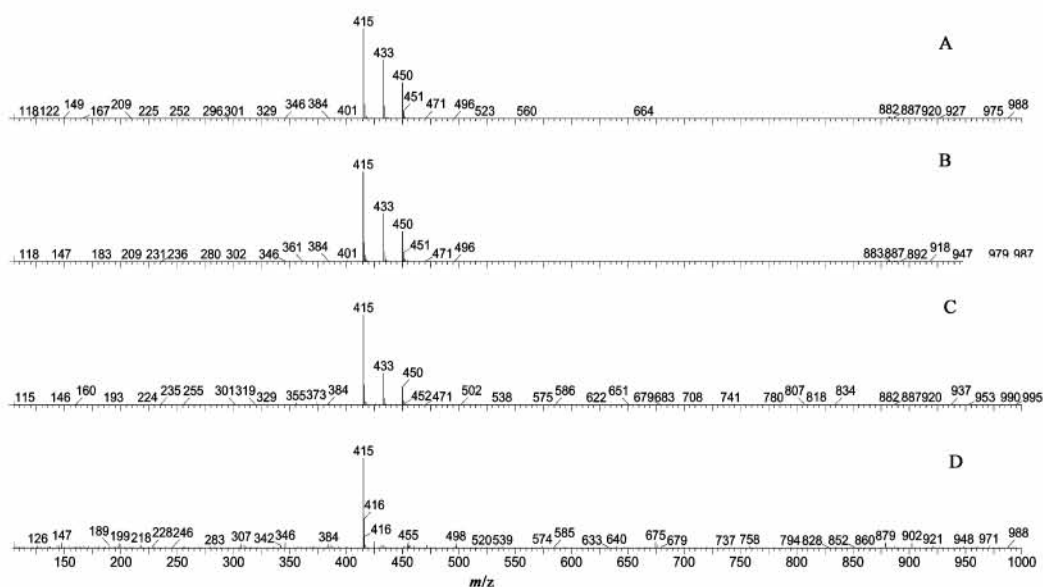


图 11 地黄饮子复方给药血清样品、五味子体外样品、五味子血清样品中 6 号成分与五味子醇甲的一级质谱
A. 五味子醇甲; B. 五味子体外样品中 6 号成分; C. 五味子血清样品中 6 号成分; D. 地黄饮子复方血清样品中 6 号成分

神经系统作用包括镇静、抗惊厥;促进体力和智力;抗痴呆和脑护活性等^[5]。通过文献研究,五味子和远志功效与地黄饮子的传统功效关联度较高,本实验研究结果同样也证实此结论,所以推测五味子和远志药材在地黄饮子治疗多种心脑血管疾病的过程中起到重要的作用。其结果在某种程度上揭示了地黄饮子的配伍机制,为明确其药效物质基础提供了科学依据,综合研究结果将对地黄饮子的深层次研究及开发提供有效支持。

经方地黄饮子临床研究已经表明其对老年性痴呆有着确切的疗效,老年性痴呆是一种中枢神经系统原发性退行性变性疾病,临床主要表现为进行性记忆、理解、判断、定向等认知功能障碍^[2]。那么可以推测地黄饮子在治疗老年性痴呆过程中一定有某种或几种成分通过血脑屏障进入并作用于脑部,但到底是地黄饮子原型成分还是其在体内产生的代谢

产物入脑发挥疗效,本课题将进行地黄饮子的脑脊液药物化学研究,明确地黄饮子在脑脊液中的移行成分,揭示地黄饮子药效物质基础。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 谢宁, 邹纯朴, 牛英才, 等. 地黄饮子对海马神经元 AD 模型细胞凋亡的控制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 29.
- [3] 周妍妍, 谢宁, 姚辛敏, 等. 地黄饮子对 β 淀粉样蛋白所致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中医学报, 2010, 38(2): 19.
- [4] 赵洪海, 王晓蕾, 李廷利, 等. 五味子的现代药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2010, 27(4): 123.
- [5] 马菁菁, 刘斌, 罗跃娥. 远志化学成分和药理活性的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(12): 161.

[责任编辑 邹晓翠]