

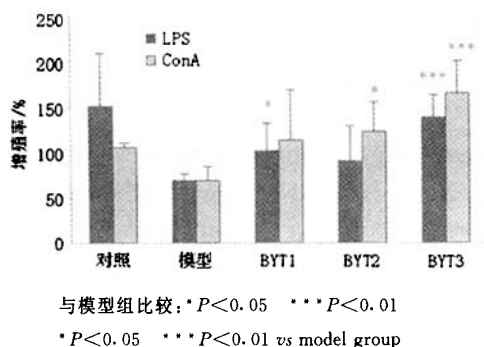


图 3 BYT 对环磷酰胺免疫抑制小鼠淋巴细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of BYT on proliferation of lymphocyte in immune-depressed mice treated by CY

淋巴细胞是在免疫应答过程中起核心作用的免疫活性细胞,按其功能可分为 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。T 和 B 淋巴细胞可分别在致有丝分裂原 ConA 和 LPS 的刺激下由静止期淋巴细胞转化为淋巴母细胞,发生有丝分裂而增殖;NK 细胞是机体维持免疫监视功能的主要细胞之一,在免疫调节方面起重要作用;淋巴细胞检测 NK 细胞活性水平,可以反映出整个机体免疫功能状态。

本研究根据已知 BYT 的各味药的成分报道,利用质谱技术对 BYT 的成分进行初步定性分析,并检测了其免疫调节作用。结果表明,在本实验的剂量范围内,BYT 基本能够显著提高环磷酰胺免疫抑制小鼠的 NK 细胞活性和 T、B 淋巴细胞增殖能力,说明提高机体免疫力可能是 BYT 抗肿瘤、抗感染等生物活性的机制之一;另外,通过 LC-MS 分析发现,BYT 除了含有多糖类成分,黄酮类和皂苷类也

是 BYT 的重要组成部分之一,可能在其免疫活性中发挥着重要作用。LC-MS 方法可以发展成为复方有效成分研究中一个有效手段,用来阐明复方药理作用的物质基础。

References:

- [1] Hu X W, Ye J C. RP-HPLC method determine the content of hesperidin in Buzhong Yiqi Pill [J]. *Chin Pharm* (中国药), 2003, 12(3): 54-55.
- [2] Wu Z Q, Xie J G. Summary of center-supplement Qi-boosting decoction to improve immunity [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(1): 62-64.
- [3] Xiao Q Y, Masakazu K, Masato M, et al. Antibacterial effect of kampo herbal formulation Huchu-Ekki-To (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on *Helicobacter pylori* infection in mice [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(7): 475-482.
- [4] Masahiro K, Takuya K, Yoshio K, et al. Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leucopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, Hochu-ekki-to [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 44: 223-231.
- [5] Shung T K, Chia C Y, Chang C H, et al. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G₀/G₁ arrest [J]. *Life Sci*, 2001, 69: 1485-1496.
- [6] Masahiro K, Kenji K, Takuya K, et al. Suppression of IgE production in mice treated with a traditional Chinese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to) [J]. *Immunopharmacology*, 1997, 36: 79-85.
- [7] Kazuya M, Toshitaka K, Haruyuki D, et al. Effect of Hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese herbal medicine on the survival of mice infected with influenza virus [J]. *Antivir Res*, 1999, 44: 103-111.
- [8] Fatima R D, Jose Alexandre M B, Maristela T, et al. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cell by MTT assay; differential inhibition by PGE₂ and DETA [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 241: 121-129.
- [9] Wang Y P, Li X Y, Song C Q, et al. Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, 23(3): 263-266.

复方五仁醇胶囊血清药化学研究

奚志华¹,丁安伟^{1*},王陆军²,罗琳³,张兵²,施忠²

(1. 南京中医药大学,江苏 南京 210029; 2. 南通市第三人民医院,江苏 南通 226006; 3. 南通大学,江苏 南通 226006)

摘要:目的 对复方五仁醇胶囊进行血清药化学研究,以便与该制剂血清药理学研究结果进行谱效关系分析,阐明其药效物质基础。方法 以已经建立的高效液相色谱指纹图谱分析方法,比较复方五仁醇胶囊含药血清色谱图和空白血清色谱图,分辨该制剂给药后血清中产生的药源性成分,进一步比较全方制剂及各缺味、单味制剂给药后的血清色谱图,分析血中药源性成分的来源,并通过对照品比对对部分成分进行鉴定。结果 ig 给药后血清中产生药源性成分 13 个,13 个成分全部来自君药五味子,其中 8 个为制剂原形成分,包括五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素,其余 5 个为代谢产物。结论 复方五仁醇胶囊体内直接作用物质很可能出自血清中的 13 个药源性成分,

收稿日期:2005-10-28

基金项目:江苏省中医药局中医药科学技术研究专项课题(编号 H05173),江苏省南通市社会发展科技计划项目(编号 S4006)

作者简介:奚志华(1966—),男,江苏南通人,副主任中药师,博士研究生,主要从事中药炮制与复方研究工作。

* 通讯作者 丁安伟 Tel: (025)51997178 E-mail: daw@njutcm.edu.cn

结合血清药理学对其作进一步研究有助于阐明该制剂药效物质基础。

关键词:复方五仁醇胶囊;血清药化学;含药血清

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)08-1137-04

Serum pharmacochemistry of Compound Wurenchun Capsules

DOU Zhi-hua¹, DING An-wei¹, WANG Lu-jun², LUO Lin³, ZHANG Bing², SHI Zhong²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Third People's Hospital of Nantong City, Nantong 226006, China; 3. Nantong University, Nantong 226006, China)

Key words: Compound Wurenchun Capsules; serum pharmacochemistry; serum containing drug

20 世纪 80 年代日本学者田代真一提出了“血清药理学”与“血清药化学”相结合研究中药药效成分的方法^[1],其基本思路是:中药虽成分众多,但只有那些被消化吸收进入血液的成分或其代谢产物(本研究将这些成分和代谢产物统称为药源性成分)才有产生药效的可能,中药药效成分研究应该以给动物或人服用药物后的血清(即含药血清)为入手点。血清药理学主要通过体外试验研究含药血清药效及作用机制,血清药化学主要是对进入血清的移行成分进行分析、分离、鉴定等。我国中药界对以上方法给予了高度评价和关注,相关研究也见报道,因为此法不但大大简化了中药复方这一复杂体系,而且对血清中所含复方化学成分进行进一步分析、鉴定,把得到的成分与复方再次进行药效学比较,就有可能揭示复方药效成分^[2,3]。复方五仁醇胶囊由五味子、三七、柴胡等 4 味中药组成,是一种治疗急性慢性肝炎的制剂^[4],不但具有组方简单的特点,而且临床疗效确切,所以本实验选定该制剂为研究对象,根据以上思路,进行含药血清谱(指纹图谱)效(药效)关系分析探寻中药复方药效物质基础的方法学探讨。

1 实验材料

1.1 仪器:Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(G1311A Quaternary Pump, G1379A Degasser, G1313A Autosampler, G1314A Variable Wavelength Detector), HP ChemStation 工作站(美国 Agilent 科技公司);AS20500A 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),100~1 000 μ L 芬兰可调式移液器(上海雷勃分析仪器有限公司),LIBROR AEL-40SM 电子分析天平(日本 SHIMADZU)。

1.2 试剂:甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),硫酸铵(分析纯,上海浦口化学

试剂有限公司)。

1.3 对照品与药品:五味子醇甲(批号 1171-040208)、五味子乙素(批号 1173-040110)对照品购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心(江西南昌),五味子酯甲(批号 1529-200001)、五味子甲素(批号 0764-2000107)购自中国药品生物制品检定所,复方五仁醇胶囊及其缺味制剂,单味制剂由南通市第三人民医院提供。

1.4 动物:SD 大鼠,SPF 级,体重(248.4 $\pm$ 16.3)g,雌雄各半,南通大学实验动物中心提供,许可证号 SYKX(苏)2002-0022。

2 实验方法

2.1 血清的制备:取复方五仁醇胶囊内容物,分别加甲醇 10 倍量、8 倍量回流提取 2 次,每次 1 h,回收甲醇,加 0.5% CMC-Na 研磨,制备成含内容物 0.9 g/mL 的混悬液。同法制备各缺味制剂、单味制剂混悬液。

取 SD 大鼠 40 只,随机分成 10 组(即全方制剂组,缺味、单味制剂各 4 组,空白组),每组 4 只。各制剂组禁食 12 h(自由饮水),称体重,每天按照全方制剂混悬液 0.45 mL/100 g(相当于成人临床等效剂量的 10 倍,缺味、单味制剂组按各成分在全方中等剂量折算)分 2 次 ig 给予各种制剂提取物混悬液,连续给药 3 d,末次给药后 1 h,3%戊巴比妥钠 0.15 mL/100 g ip 麻醉,颈总动脉取血,置冰箱 4 $^{\circ}$ C 冷藏过夜,分离血清,即为含药血清。空白组每天 ig 0.5% CMC-Na 0.45 mL/100 g,同法制备空白血清。各组每 2 只大鼠血清合并,分别分成两份,一份供本实验用,另一份-70 $^{\circ}$ C 低温保存,留作血清药理学研究用。

2.2 血清的预处理及其供试品溶液的制备:分别取各含药血清、空白血清 1 mL,置离心管中,加入硫酸铵 0.36 g,置微型旋涡混合仪快速溶解、混匀,分次加甲醇(每次 1 mL,总计 5 mL)同法充分混匀,

16 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为各含药血清、空白血清供试品溶液, 进样前 0.4 μ m 微孔滤膜滤过。

2.3 制剂供试品溶液的制备: 精密称取复方五仁醇胶囊内容物 0.5 g, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 浸泡 5 h, 超声处理 30 min, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液进样前 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。

2.4 对照品溶液的制备: 精密称取五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素及五味子乙素适量, 甲醇溶解并稀释, 配制分别含五味子醇甲 0.134 5 mg/mL、五味子酯甲 0.107 mg/mL、五味子甲素 0.123 mg/mL、五味子乙素 0.099 5 mg/mL 的混合溶液, 进样前 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。

2.5 色谱条件: Lichrosphere C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, Phenomenex^R Description C₁₈ 保护柱 (4.0 mm $\times$ 3.0 mm), 水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0~20 min, 15%~55% B; 20~40 min, 55%~60% B; 40~50 min, 60%~70% B; 50~60 min, 70%~90% B; 60~70 min, 90%~100% B), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 210 nm。

2.6 测定: 以上条件下分别吸取各制剂供试品溶液、对照品溶液 10 μ L 及各含药血清、空白血清供试品溶液 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录 70 min 色谱图。

3 结果与讨论

3.1 通过对空白血清与全方制剂含药血清色谱图的比较, 发现复方五仁醇胶囊全方制剂给药后血中出现了 13 个药源性成分, 进一步比较全方制剂含药血清与全方制剂的色谱图, 可以看出其中 6 至 13 号峰代表的 8 个成分为制剂原形成分入血, 1 至 5 号峰 5 个成分为制剂成分的代谢产物。相同条件测定对照品色谱图, 鉴定出 8 个原形成分中 6 号峰、10 号峰和 12 号峰分别为五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素。见图 1。比较全方制剂含药血清、缺五味子制剂含药血清以及单味五味子制剂含药血清的色谱图, 认定 13 个血中移行成分全部来自君药五味子, 其余 3 味药的缺味、单味制剂含药血清色谱图与全方制剂含药血清色谱图放在一起比较进一步证实了这一点。见图 2~5。

3.2 本实验前已经对 10 个批号的制剂及 10 组大鼠 ig 给药制备的含药血清分别进行了指纹图谱研究 (论文另发)。经比较, 以上全方制剂及其含药血清的色谱图与相应标准指纹图谱的相似度良好, 含药血清色谱图上标出的 13 个峰即为其指纹图谱的全

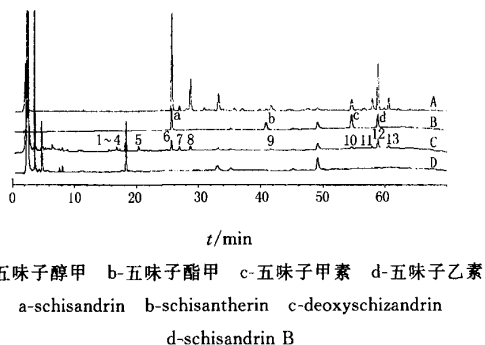


图 1 复方五仁醇胶囊 (A)、对照品 (B)、复方五仁醇胶囊含药血清 (C) 及空白血清 (D) HPLC 图谱比较

Fig. 1 HPLC Comparison of Compound Wurenchun Capsules (A), reference substance (B), serum containing Compound Wurenchun Capsules (C), and control serum (D)

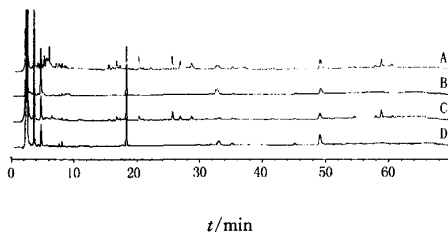


图 2 五味子单味含药血清 (A)、复方五仁醇胶囊缺五味子含药血清 (B)、复方五仁醇胶囊全方含药血清 (C) 及空白血清 (D) HPLC 图谱比较

Fig. 2 HPLC Comparison of serum containing *Fructus Schisandra* (A), serum containing Compound Wurenchun Capsules without *Fructus Schisandra* (B), serum containing Compound Wurenchun Capsules (C), and control serum (D)

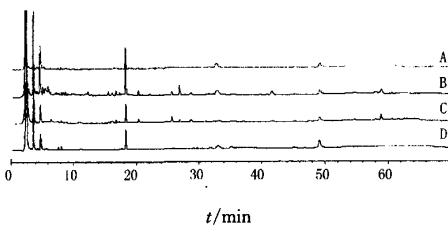


图 3 三七单味含药血清 (A)、复方五仁醇胶囊缺三七含药血清 (B)、复方五仁醇胶囊全方含药血清 (C) 及空白血清 (D) HPLC 图谱比较

Fig. 3 HPLC Comparison of serum containing *Radix Notoginseng* (A), serum containing Compound Wurenchun Capsules without *Radix Notoginseng* (B), serum containing Compound Wurenchun Capsules (C), and control serum (D)

部共有峰, 表明复方五仁醇胶囊给药后血中出现 13 个移行成分具有普遍性。

3.3 本次研究发现复方五仁醇胶囊大鼠含药血清

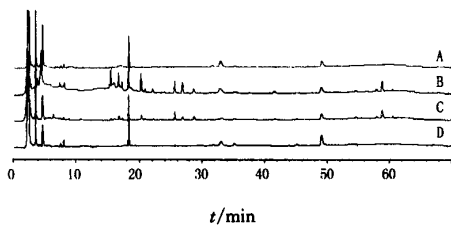


图4 柴胡单味含药血清(A)、复方五仁醇胶囊缺柴胡含药血清(B)、复方五仁醇胶囊全方含药血清(C)及空白血清(D)HPLC图谱比较

Fig. 4 HPLC Comparison of serum containing *Radix Bupleuri* (A), serum containing Compound Wurenchun Capsules without *Radix Bupleuri* (B), serum containing Compound Wurenchun Capsules (C), and control serum (D)

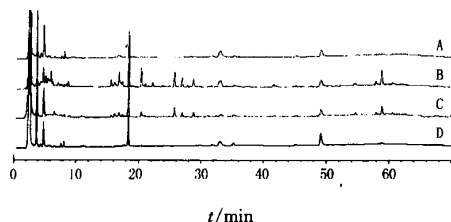


图5 叶下珠单味含药血清(A)、复方五仁醇胶囊缺叶下珠含药血清(B)、复方五仁醇胶囊全方含药血清(C)及空白血清(D)HPLC图谱比较

Fig. 5 HPLC Comparison of serum containing *Rhyllanthus Urinaria* (A), serum containing Compound Wurenchun Capsules without *Phyllanthus Urinaria* (B), serum containing Compound Wurenchun Capsules (C), and control serum (D)

中13个移行成分全部来自五味子,其主要原因可能是五味子以提取后的浸膏入药,而且在处方中的比例也最大(处方中各味药五味子浸膏、三七、柴胡、叶下珠的比例为3:3:2:2),制剂指纹图谱26个共有峰中也仅有2个来自三七,其余全部来自五味子。当然也不排除高效液相色谱法检测灵敏度不够的问题。五味子在处方中虽为君药,但是它到底能否发挥

全方的药效有待随后的血清药理学研究证实。

3.4 关于含药血清中与药物因素有关的成分目前还没有统一的定义,有学者将其统称为“血中移行成分(constituents migrating to blood 或 compounds absorbed to blood)”^[5,6],也有学者提出了“方剂体内/血清成分谱(方剂吸收或进入体内/血清内化学成分的结构、性质、分布与数目及其动态状态)”和“方剂体内/血清靶成分(‘谱’中与母方效应相关成分)”的概念^[7]。笔者认为,不管是消化吸收或称“移行”进入血液药物的原形成分,还是其代谢产物,都是因为药物因素而产生,将其统称为“血中药源性成分(drug-induced constituents in blood)”更加准确和直观。

References:

- [1] He Y Z. The general situation in study on serum pharmacology and serum pharmacchemistry of Chinese medicine in Japan [J]. *Foreign Med Sci; Tradit Chin Med* (国外医学:中医中药分册), 1998, 20(5): 3-7.
- [2] Zhou J. Chinese compound prescriptions-natural combinatorial chemical libraries and its mechanism of multitarget [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1998, 18(2): 67.
- [3] Zhao J R, Li X M. Status and advance in study on substance basis of Chinese compound prescription [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(11): 963-966.
- [4] Dou Z H, Shi Z, Li W H, et al. The study and prepreparation on Compound Wurenchun Capsules [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16(10): 953-957.
- [5] Wang X J, Zhang N, Sun H, et al. Preliminary study on serum pharmacchemistry of Liuwei Dihuang Wan [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2(4): 219-222.
- [6] Zhang N, Wang X J. Determination of constituents of Liuwei Dihuang Wan migrating to blood [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2004, 15(3): 174-176.
- [7] Huang X. The concepts of recipe-derived component spectrum and target compnent *in vivo*/serum and their significance [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 1999, 20(4): 277.

《中草药》杂志被评为“第四届中国百种杰出学术期刊”

2005年12月,中国科学技术信息研究所公布了“第四届中国百种杰出学术期刊”名单,《中草药》杂志获此殊荣——“第四届中国百种杰出学术期刊”。这个名单是按照期刊评价指标体系对重要指标(影响因子、总被引频次、他引总引比、基金论文比和即年指标)进行打分的结果,并在近几年来召开了20余场专家研讨会,对评价指标不断进行推敲和改进而评出的。

摘自中国科学技术信息研究所《2004年度中国科技论文统计与分析年度研究报告》