

• 药剂与工艺 •

脂质体平衡透析与液质联用技术筛选脊痛宁片物质基础研究

高迪^{1,2,3}, 王保军^{2,3}, 裴玉^{2,3}, 白雪^{2,3}, 何毅^{2,3}, 宋兆辉^{2,3*}

1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心, 天津 300410

3. 天士力制药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

摘要: 目的 研究脊痛宁片有效成分与模拟生物膜的相互作用, 预测药物在体内的吸收情况。方法 将脂质体作为模拟生物膜, 采用脂质体平衡透析与液质联用技术筛选脊痛宁片中与脂质体有相互作用的成分, 并考察脂质体质量浓度和缓冲液 pH 值对脊痛宁片与脂质体互相作用的影响。结果 脊痛宁片中共有 11 个成分与脂质体作用明显, 包括 4 个黄酮类成分, 2 个萜类成分, 4 个香豆素类成分, 1 个苯丙酸类成分。脂质体的质量浓度和缓冲液 pH 值都对脊痛宁片与脂质体互相作用有一定的影响。结论 脂质体平衡透析与液质联用可预测脊痛宁片潜在的活性成分在体内的吸收情况, 为其药效物质基础的进一步研究提供依据。

关键词: 脊痛宁片; 模拟生物膜; 脂质体平衡透析; 液质联用; 活性成分

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)04-0668-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.009

Screening of active components of Jitongning Tablet by liposome equilibrium dialysis and LC-MS analysis

GAO Di^{1,2,3}, WANG Bao-jun^{2,3}, PEI Yu^{2,3}, BAI Xue^{2,3}, HE Yi^{2,3}, SONG Zhao-hui^{2,3}

1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. TCM Research Center, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** To explore the interaction between the effective components of Jitongning Tablet (JT) and liposome biomembrance, in order to predict *in vivo* absorption of the effective components. **Methods** Liposome as the model of biomembrance, active components were screened by liposome equilibrium dialysis and LC-MS; And the effect of experiment conditions on the interaction of the liposome concentration, and the pH value of buffer were also investigated. **Results** There were 11 compounds in JT with obvious interaction with liposome, including 4 flavonoids, 2 triterpenoid, 4 coumarins, and 1 phenylpropionic acid. The concentration of liposome and pH value of buffer remarkably affected the interaction between JT and liposome. **Conclusion** The established method contributes to predicting the multiple components absorption in body, indicating the potentially active compounds and providing reference for further research of pharmacodynamic substance basis.

Key words: Jitongning Tablet; biomembrane; liposome equilibrium dialysis; LC-MS; active components

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种以骶髂关节和脊柱的慢性炎症以及新骨形成为特征的慢性风湿病, 是血清阴性脊柱关节疾病最为

常见的一种, 在我国患病率 0.3% 左右^[1-3], 致残率较高。AS 属中医学“痹症”范畴, 主要病因病机为肾督亏虚, 风、寒、湿、热诸邪深侵肾督而致。

收稿日期: 2016-10-09

基金项目: 国家科技重大专项课题——面向国际的创新中药大平台建设 (2013ZX09402202)

作者简介: 高迪 (1991—), 女, 硕士在读, 研究方向中药新药开发。E-mail: gaodicpu@163.com

*通信作者 宋兆辉, 男, 高级工程师。E-mail: songzh@tasly.com

脊痛宁片由杜仲 *Eucommiae Cortex*、独活 *Angelicae Pubescentis Radix*、制川乌 *Aconiti Radix Cocta*、延胡索 *Corydalis Rhizoma*、甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*、赤芍 *Paeoniae Radix Rubra*、葛根 *Puerariae Lobatae Radix* 7味中药组成,是中国人民解放军总医院风湿科黄烽主任医师根据多年临床经验总结而成的临床经验方,经过提取并辅以制剂制成的纯中药制剂。脊痛宁处方在中国人民解放军总医院以胶囊剂的形式作为医院制剂长期使用。

根据 AS 常见病因病机肝肾亏虚、寒湿外侵、瘀血痹阻而立补益肝肾、祛风除湿、活血化瘀,临床应用效果显著^[4],王炎焱等^[5]利用巴豆油致小鼠耳肿胀和角叉菜胶致大鼠足肿胀、醋酸法造成小鼠疼痛模型,观察脊痛宁胶囊的抗炎镇痛作用,发现脊痛宁胶囊有显著的抗炎镇痛效果。Wang 等^[6]利用脊痛宁胶囊对患者进行治疗,并监测患者血液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4 (IL-4) 水平,发现脊痛宁治疗效果显著,并且疗效与柳氮磺吡啶相当。脊痛宁片具有明显的镇痛、抗炎作用,减少炎症介质的释放,减轻局部炎症,改善关节肿胀,对减轻组织损伤,修复骨质破坏,恢复机体生理功能有积极意义。

目前,针对脊痛宁片的物质基础研究鲜有报道。本研究采用固定化脂质体色谱研究药物与脂质体的相互作用,可反映药物穿透细胞膜的能力^[7-10],用于预测中药中有效成分^[11-13]。本实验采用脂质体平衡透析与液质联用技术筛选中药复杂体系中与脂质体有相互作用的成分,可用于预测脊痛宁片的体内可吸收成分,为下一步进行脊痛宁片的入血成分分析提供参考。该实验将活性检测、成分分析与化合物的结构鉴定进行集合,适合中药复杂组分的物质基础研究^[14-17],为中药活性成分的筛选提供了简便的模型。

1 仪器与材料

超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱仪 (UPLC/Q-TOF-MS),美国沃特世公司,包括 ESI 离子源,二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、数据采集与处理采用 Masslyn4.1 软件;KQ-500DV 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;XS205 电子天平,瑞士 Mettler Toled 公司;Q 超纯水处理系统,Millipore Bedford, MA, 美国。

脊痛宁片,批号 20140801B,天士力控股集团有限公司研究院现代中药开发中心提供;透析袋,

截留相对分子质量为 10 000,美国光谱公司;蛋黄卵磷脂, Solarbio 公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾,分析纯,天津威晨化学试剂科贸有限公司;氢氧化钠,天津化学试剂三厂;乙腈、甲酸,质谱纯,美国 Sigma 公司;超纯水经 Milli-Q 自制。

2 方法

2.1 脊痛宁片溶液制备

取脊痛宁片,粉碎成粉末,称取 2.5 g,置于 50 mL 量瓶中,加入 70%乙醇适量,超声提取 (功率 100 W,频率 40 kHz) 2 次,每次 30 min,再加入 70%乙醇定容,摇匀,4 900 r/min 离心 10 min,取上清液。

2.2 脂质体模拟生物膜的制备

用经典的乙醇注射法制备模拟生物膜:称取卵磷脂 0.3 g,用 3 mL 无水乙醇溶解。另取一个 50 mL 的烧杯,加入 10 mL 的 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液,置于 (60 $\pm$ 2) °C 的磁力搅拌器中。将卵磷脂缓慢地滴入磷酸盐缓冲液中,边滴边搅拌至无醇味。加 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液定容至 10 mL,即得质量浓度为 30 g/L pH 7.0 的脂质体溶液。按相同方法制得其他质量浓度和 pH 值的脂质体溶液。

2.3 脊痛宁片与脂质体的相互作用

取长约 10 cm 截留相对分子质量为 10 000 的透析袋,加入 1 mL 的脂质体溶液和 1 mL 的脊痛宁药液,两端用细线扎紧,放入盛有 15 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 5.4、7.0、7.4) 的试管中。另取 1 个透析袋,加入 1 mL 的脊痛宁药液做平行空白溶液,其余操作相同,置于 4 °C 环境中透析 24 h。使袋内外药物质量浓度达到平衡,提取透析袋外即试管内的溶液,用 0.22 μ m 的滤膜滤过,即得。

2.4 色谱条件

Waters Acquity UPLC HSS T3 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱,流量体积 0.4 mL/min,进样量 5 μ L,柱温 30 °C,波长 240 nm,流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱条件为 0~2 min, 10% 乙腈; 2~3 min, 10%~15% 乙腈; 3~6 min, 15%~26% 乙腈; 6~12 min, 26%~40% 乙腈; 12~14 min, 40%~45% 乙腈; 14~20 min, 45%~67% 乙腈; 20~22 min, 67%~99% 乙腈; 22~25 min, 99%~10% 乙腈。

2.5 质谱条件

采用电喷雾电离离子化源 (ESI),正负离子模式检测,扫描范围 m/z 100~1 200,以亮氨酸脑啡肽

(m/z 554.261 5) 进行质量实时校正, 雾化气为高纯度氮气, 碰撞气为氩气, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂气温度 280 °C, 脱溶剂气体流量为 600 L/h, 锥孔气流量 50 L/h, 毛细管电压负离子模式 3.0 kV, 毛细管电压正离子模式 3.5 kV, 样品锥孔电压 40 V, 低能量扫描时 trap 电压为 6 eV, 高能量扫描时 trap CE 电压为 30~60 eV。

3 UPLC/Q-TOF-MS 分析结果

3.1 透析时间考察

实验考察了透析时间为 8、12、16、20、24 h 的透析情况, 在第 20、24 小时这 2 个时间点的透析袋外液质量浓度没有明显变化, 说明药物的吸收和透析达到平衡, 为使平衡稳定, 故最终选择 24 h 为透析时间。

3.2 脊痛宁片中与脂质体相互作用的成分

脊痛宁片直接透析液和脊痛宁片与脂质体 (90 g/L, pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液系统制得) 结合后的透析液的色谱图如图 1 所示, 通过比较色谱峰峰面积, 发现有 11 个成分的峰面积明显减少, 分别是 1~11 号峰, 这 11 个峰可能是脊痛宁片中与脂质体相互作用的成分, 由于它们部分与脂质体结合后不能透过透析袋所致。因而这些峰为脊痛宁片中能透过脂质体模拟生物膜被吸收的潜在活性成分。不同成分与脂质体结合强度不同, 以峰面积减少比率表示各成分与脂质体的结合系数 (binding degree, BD^[18]), 由下列公式计算: $BD = (A_a - A_b) / A_a$, A_a 和 A_b 分别为脊痛宁药液直接透析液和与模拟生物膜作用后透析液相应成分的峰面积, 平行 3 次实验, 取 3 次结

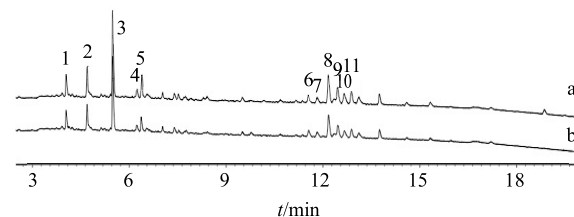


图 1 脊痛宁片直接透析液 (a) 和与模拟生物膜作用后透析液 (b) 的 UPLC

Fig. 1 UPLC of sample extracted from JT (a) and JT after interaction with biomembrane (b)

果平均值为各成分与脂质体作用的 BD, 复方成分的 BD 越大, 说明该成分与脂质体的相互作用越强, 即透过生物膜的能力可能也就越强。以峰 2 (葛根素) 为例, 在 pH 值一定条件下, 当脂质体质量浓度为 30、60、90 g/L 时 BD 分别为 9.8%、10.3%、11.8%, 其他峰也出现相同变化规律, 即随着脂质体质量浓度的增大, 脊痛宁片与脂质体作用越强; 在脂质体质量浓度一定的条件下, 当 pH 值为 5.4、7.0、7.4 时 BD 分别为 9.8%、2.4%、0.5%, 这与葛根素在酸性环境中较稳定, 更易与脂质体结合有关。

3.3 脊痛宁片与模拟生物膜有相互作用的成分鉴定

通过 UPLC/Q-TOF-MS 得到的质谱一级和二级碎片信息和参考文献共同推测了脊痛宁片与模拟生物膜有相互作用的 11 个成分^[19-21] (质谱数据见表 1), 其中黄酮类成分共有 4 个, 分别为葛根素 (2)、芹糖甘草苷 (4)、甘草苷 (5)、甘草素 (11); 苯丙酸类 1 个, 绿原酸 (1); 萜类成分 2 个, 分别为单

表 1 脊痛宁片中与脂质体有相互作用的成分鉴定

Table 1 Identification of compounds interacting with liposome in JT

峰号	t_R /min	质荷比 (m/z)	分子式	化合物	结构类型	碎片离子 (m/z)
1	4.05	353.087 0 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸	苯丙酸类	191.052 0, 179.034 9, 161.023 8
2	4.71	415.103 1 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	葛根素	黄酮类	277.047 1, 267.062 6, 253.046 4
3	5.53	525.160 3 [M+HCOO] ⁻	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药苷	单萜类	479.153 7, 449.144 3, 327.107 9
4	6.26	549.160 9 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	芹糖甘草苷	黄酮类	417.116 7, 255.065 6, 135.005 1
5	6.40	417.118 2 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	甘草苷	黄酮类	255.064 5, 135.007 6, 119.049 2
6	11.59	377.160 8 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	当归醇 B/D/M/G/K 异构体	香豆素类	359.146 5, 341.137 5, 161.060 6
7	11.85	219.066 7 [M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₀ O ₄	8-乙酰基-4-甲基伞形酮	香豆素类	191.073 4, 175.070 8, 147.048 6
8	12.21	377.162 3 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	当归醇 B/D/M/G/K 异构体	香豆素类	359.148 8, 341.138 4, 235.091 5
9	12.49	379.175 4 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₆ O ₇	当归醇 C/L/I 异构体	香豆素类	361.164 6, 343.156 4, 243.100 5
10	12.69	837.391 0 [M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	甘草皂苷 G2	三萜类	819.383 2, 661.360 0, 485.327 6
11	12.91	255.065 0 [M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	甘草素	黄酮类	135.003 6, 119.046 2

萜类芍药苷(3)、三萜类甘草皂苷 G2(10); 香豆素类成分 4 个, 分别为 8-乙酰基-4-甲基伞形酮(7), 当归醇 B、当归醇 D、当归醇 M、当归醇 G、当归醇 K 异构体(6、8), 当归醇 C、当归醇 L、当归醇 I 异构体(9)。当归醇类这些成分是同分异构体, 来自复方中的当归, 需进一步用核磁确认。

3.4 影响脊痛宁片与脂质体相互作用的各个因素考察

3.4.1 不同脂质体质量浓度对脊痛宁片与脂质体相互作用的影响 分别考察质量浓度为 30、60、90 g/L (均用 pH 7.0 磷酸盐缓冲系统制得) 的脂质体与脊痛宁药液的作用, 其中峰面积有变化的 11 个峰会随着脂质体质量浓度的增加, 色谱峰的面积也明显减少。表明随着脂质体质量浓度的增加, 脊痛宁片与模拟生物膜的相互作用增强。而其峰面积没有变化的色谱峰在不同的脂质体质量浓度中, 其色谱峰的峰面积也保持相对稳定。

3.4.2 不同 pH 值对脊痛宁药液与脂质体相互作用的影响 人体内环境是一个 pH 值相对稳定的缓冲体系, 血液及组织液的正常 pH 值约为 7.4, 细胞内液 pH 值约为 7.0, 人体主要吸收器官小肠肠道内的 pH 值约为 5.4^[15-16,18]。模拟 3 种 pH 值的缓冲环境下, 固定化脂质体对药物的吸收情况能更好地拟合小肠吸收, 具有更好的生物相关性。实验分别测定 pH 值为 5.4、7.0、7.4 的磷酸盐缓冲体系条件下脊痛宁药液与脂质体(30 g/L)的作用, 发现不同成分在不同的 pH 值条件下峰面积也不相同, 这可能与该成分的化学性质有关。

4 讨论

从脊痛宁片中鉴定了可与模拟生物膜相互作用的 11 个成分, 从而预测这 11 个成分能够透过细胞膜并被吸收入血, 其中黄酮类化合物具有活血化瘀、免疫调节、防止骨吸收及促进骨骼生长等作用; 生物碱类化合物具有显著的镇痛作用; 萜类化合物具有抗炎、免疫抑制等作用; 香豆素类化合物具有抗凝血、抗骨质疏松、抗炎等作用; 苯丙酸类化合物具有抗炎、抗菌、抗血小板凝聚作用, 以上多种成分互相协同, 共同发挥补益肝肾、祛风除湿、活血止痛的作用, 适用于 AS 等症的治疗。

从以上实验结果可以看出, 在 pH 值一定的条件下, 随着脂质体质量浓度的增大, 脊痛宁与脂质体的作用也增强, 结合系数越大; 不同的 pH 值对脊痛宁与脂质体的结合也有一定的影响, 与各成分

的化学结构有很大关系。绿原酸在酸性条件下十分稳定, 在中性和碱性条件下易水解, 故绿原酸在酸性条件下更易与脂质体结合^[22]; 黄酮类化合物分子中具有酚羟基, 呈酸性, 在酸性条件中以分子状态存在, 更易与脂质体结合; 香豆素类具有内酯结构, 酸性或碱性环境中内酯类成分与脂质体的相互作用都明显增强, 可能与内酯类成分在酸性或碱性环境中水解成小分子的化合物有关; 芍药苷在碱性条件下不稳定, 不易与脂质体结合^[23]。

本实验采用脂质体平衡透析与液质联用方法研究中药复杂体系中的可吸收成分, 以中药提取物不经分离直接与模拟生物膜的脂质体作用, 有助于阐明中药多成分协同作用的特点。

参考文献

- [1] 孔维萍, 陶庆文, 张英泽, 等. 补肾舒脊颗粒治疗强直性脊柱炎近期临床疗效及安全性评价 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(6): 673-677.
- [2] 付长龙, 郑春松, 刘献祥. 强直性脊柱炎药物治疗现状与思考 [J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(10): 72-76.
- [3] 于刚, 张江林. 强直性脊柱炎的治疗指南介绍 [J]. 中国骨与关节杂志, 2014, 3(10): 763-766.
- [4] 李闯, 刘维. 中药治疗强直性脊柱炎的临床研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2015(3): 656-658.
- [5] 王炎焱, 赵征, 黄烽, 等. 脊痛宁胶囊抗炎镇痛作用的实验研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(9): 28-29.
- [6] Wang Y Y, Lu H, Zhao Z, *et al.* The efficacy and safety of Jitongning Capsule, in patients with ankylosing spondylitis [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(2): 98-103.
- [7] Hinna A H, Hupfeld S, Kuntsche J, *et al.* Mechanism and kinetics of the loss of poorly soluble drugs from liposomal carriers studied by a novel flow field-flow fractionation-based drug release-/transfer-assay [J]. *J Controlled Release*, 2016, 232: 228-237.
- [8] Fugit K D, Xiang T X, Du H C, *et al.* Mechanistic model and analysis of doxorubicin release from liposomal formulations [J]. *J Controlled Release*, 2015, 217: 82-91.
- [9] Hinna A H, Hupfeld S, Kuntsche J, *et al.* The use of asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection in the study of drug retention within liposomal nanocarriers and drug transfer kinetics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 124: 157-163.
- [10] Fugit K D, Anderson B D. Dynamic, nonsink method for the simultaneous determination of drug permeability and binding coefficients in liposomes [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(4): 1314-1325.

- [11] Li P, Qi L W, Liu E H, *et al.* Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2008, 27(1): 66-77.
- [12] Wang S, Wang C, Zhao X, *et al.* Comprehensive two-dimensional high performance liquid chromatography system with immobilized liposome chromatography column and monolithic column for separation of the traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis* [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 713(3): 121-129.
- [13] Cong Z, Jian L, Li X, *et al.* Fast immobilized liposome chromatography based on penetrable silica microspheres for screening and analysis of permeable compounds [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1233(7): 78-84.
- [14] Sheng L H, Li S L, Kong L, *et al.* Separation of compounds interacting with liposome membrane in combined prescription of traditional Chinese medicines with immobilized liposome chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(2): 216-224.
- [15] 张海鸣, 闫 寒, 彭 娟, 等. 脂质体平衡透析-液质联用色谱法筛选四物汤药效物质的研究 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(12): 2107-2111.
- [16] 罗朵生, 黄利华, 陈媛媛, 等. 透析-高效液相色谱法筛选黄连药效物质的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(1): 45-48.
- [17] 赵小亮, 聂颖兰, 闫 寒, 等. 脂质体色谱及其在中药活性成分筛选和评价中的应用进展 [A] // 2014 年中国药学会暨第十四届中国药师周论文集 [C]. 北京: 中国中医科学院医学实验中心, 2014.
- [18] 周 鹏, 李 萍, 韦英杰. 复方丹参方与脂质体模拟生物膜的相互作用 [J]. *中国天然药物化学*, 2008, 6(4): 278-282.
- [19] Wang Y, Shan H, Cheng X, *et al.* UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting of traditional Chinese formula Si Jun Zi Tang [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 80(3): 24-33.
- [20] Villiers A D, Venter P, Pasch H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1430: 16-78.
- [21] Liu J H, Xu S X, Yao X S, *et al.* Angelol-type coumarins from *Angelica pubescence* f. *biserrata*, and their inhibitory effect on platelet aggregation [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(5): 1099-1101.
- [22] 朱 鹏, 苗潇磊, 陈 勇. 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性 pH 条件下的降解动力学 [J]. *药学报*, 2016(1): 122-126.
- [23] 解江纯, 刘志东, 田 慧, 等. 芍药苷稳定性研究 [J]. *天津中医药*, 2010, 27(4): 344-345.