

大黄附子汤血清药物化学初步研究

郭 辉^{1,2,3}, 刘 晓^{1,2,3,4*}, 蔡 皓^{1,2,3}, 李 媛^{1,2,3}, 吴 丽^{1,2,3}, 蔡宝昌^{1,2,3,4*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210046

3. 南京中医药大学 国家中医药管理局中药炮制标准重点研究室, 江苏 南京 210046

4. 南京海昌中药集团有限公司, 江苏 南京 210061

摘要: 目的 对大黄附子汤进行血清药物化学初步研究, 通过分析入血成分探讨该复方发挥药效的物质基础。方法 采用血清药物化学的研究方法, 同时建立大黄附子汤及大鼠 ig 给予大黄附子汤后血清 HPLC 指纹图谱, 通过分析比较分别给予大黄附子汤、单味生药所得血清样品, 初步鉴定大黄附子汤在大鼠血清中的移行成分。结果 大鼠 ig 给予大黄附子汤后, 血清中发现 18 个入血成分, 其中 14 个为代谢产物; 4 个为原型成分。结论 大黄附子汤入血成分主要来自大黄和附子, 复方血清药物化学研究为深入阐述大黄附子汤药效物质基础提供依据。

关键词: 大黄附子汤; 血清药物化学; 入血成分; 指纹图谱; 物质基础

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)05-0528-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.005

Preliminary study on serum pharmacology of Dahuang Fuzi Decoction

GUO Hui^{1,2,3}, LIU Xiao^{1,2,3,4}, CAI Hao^{1,2,3}, LI Huan^{1,2,3}, WU Li^{1,2,3}, CAI Bao-chang^{1,2,3,4}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Engineering Center of Standardization of Chinese Medicine Processing, Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

3. Key Laboratory of Standardization of Traditional Chinese Medicine Processing, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

4. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Co., Ltd., Nanjing 210061, China

Abstract: Objective To carry out a preliminary study on serum pharmacology of Dahuang Fuzi Decoction (DFD) and to research the pharmacodynamic material basis through analyzing the constituents absorbed into blood. **Methods** HPLC fingerprints of DFD and serum of rats after DFD treatment were established with serum pharmacology method. The serum samples collected after DFD and single crude drug treatments were compared, the constituents absorbed into the serum after DFD ig administration was determined. **Results** After the rats were ig administered with DFD, 18 transitional constituents to blood were detected, among which 14 were metabolites and 4 were prototype constituents. **Conclusion** After DFD treatment, the constituents absorbed into blood are mainly from *Rhei Radix et Rhizoma* and *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, and the serum pharmacology signs could provide the evidence for the further research of the material basis of the decoction.

Key words: Dahuang Fuzi Decoction; serum pharmacology; transitional constituents to blood; fingerprint; material basis

日本学者田代真一于 1988 年提出血清药物化学的理论^[1], 从含有真正有效成分的血液中分取血清进行药物学研究, 这一理论认为能够吸收入血的成分, 才是真正发挥药效作用的“制剂”。国内学者王喜军对这一理论及应用进行了完善^[2-3], 提出中药血清药物化学的概念, 该方法以传统药物化学方

法为基础, 综合应用色谱、质谱等多种现代分析技术, 分析鉴定中药经吸收后的血清移行成分, 研究其与药效相关性, 最终确定中药药效物质基础; 王喜军等应用本方法对茵陈蒿汤的生物药理学^[4-5]及六味地黄丸的药效物质基础^[6]进行了研究并取得相关成果, 该方法得到了广泛认可和发展应用, 是目

收稿日期: 2012-11-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81073022)

作者简介: 郭 辉 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药复方药效物质基础。Tel: (025)86798281 E-mail: guohui2008no.1@163.com

*通信作者 刘 晓 Tel: (025)86798281 E-mail: liuxiao04_0@163.com

蔡宝昌 Tel: (025)86798281 E-mail: bccai@126.com

前研究中药物物质基础的主要方法之一。

大黄附子汤 (Dahuang Fuzi Decoction, DFD) 始载于《金匱要略》，为张仲景温下剂的代表方剂。全方由大黄 (*Rhei Radix et Rhizoma*, RRR)、附子 (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, ALRP)、细辛 (*Asari Radix et Rhizoma*, ARR) 3味药物组成，具有温里散寒、通便止痛的功效。中医临床应用广泛，常用于治疗寒积内结、阳气不运所致的便秘腹痛、胁下偏痛、发热、手足厥冷、舌苔白腻、脉弦紧等症^[7]。现代临床应用于治疗肾功能衰竭及尿毒症、阑尾炎、肠梗阻、慢性结肠炎、急性胰腺炎等症^[8-10]。目前，关于该方药效物质基础方面的研究还鲜有报道，本实验首次采用中药血清药物化学的相关理论和研究方法对大黄附子汤进行研究，旨在探求该方发挥药效的物质基础。

1 材料

1.1 实验仪器

Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国安捷伦公司)，配置四元梯度泵，在线真空脱气机，G1313A 自动进样系统，G1315B 二极管阵列检测器，柱温箱，Chemstation system 色谱数据工作站；大连依力特公司 Hypersil BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；KQ2200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；Mettler AG285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多集团)；Anke TGL80—16B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂)；WH—3 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司)；KY—II 微型空气压缩机(绍兴市卫生医疗设备制造有限公司)；QF—3800 氮气吹干仪(绍兴市卫生医疗设备制造有限公司)。

1.2 试剂与药品

乙腈为色谱纯(美国 Fisher 试剂公司)，水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)；其他试剂均为分析纯。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品(质量分数≥98%，中国药品生物制品检定所，批号分别为 110795-201007、110757-200206、110756-200110、0796-200005、0758-9402)，苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、细辛脂素对照品(质量分数≥98%，成都瑞芬思生物科技有限公司，批号分别为 RFS-B-101115-01、RFS-B-101210-01、RFS-B-10-07-13、RFS-X-110413-01)；大黄、附子饮片(南京海昌中药集团公司，批号分别为 110530、111009)，细辛饮片(北京同仁堂亳州饮片有限责任公司，批号为

101002533)，经南京中医药大学陈建伟教授鉴定大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥成熟根及根茎，附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根加工品，细辛为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根及根茎，均为《中国药典》收载品种，后依照《中国药典》2010年版项下要求检验，结果合格。

1.3 实验动物

雄性 SD 大鼠，清洁级，体质量(200±20) g，30 只，由南京中医药大学实验动物中心提供，实验动物生产许可证号：SCXK(沪)2007-0005。

2 方法

2.1 体外供试品溶液的制备

依照大黄附子汤处方大黄-附子-细辛 3:4:1 比例称取大黄 15 g、附子 20 g、细辛 5 g，用 8 倍量水浸泡 30 min 后，大火煎至沸腾后改用中火煎 20 min，用纱布滤过药液，药渣加 8 倍量水再煎 20 min，纱布滤过，合并 2 次滤液浓缩至 40 mL。取浓缩液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，振摇，超声(功率 100 W，频率 40 kHz) 3 min，3 500 r/min 离心 5 min，取上清液过 0.45 μm 滤膜，即得。另按上述方法分别制备大黄、附子、细辛的单煎液样品。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品各适量，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀即得含芦荟大黄素 107.3 μg/mL、大黄酸 100.4 μg/mL、大黄素 113.7 μg/mL、大黄酚 88.6 μg/mL、大黄素甲醚 95.2 μg/mL 的混合对照品溶液；精密称取苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱对照品适量，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，再从中精密量取适量稀释即得含苯甲酰乌头原碱 30.6 μg/mL、苯甲酰次乌头原碱 26.2 μg/mL、苯甲酰新乌头原碱 28.7 μg/mL 的混合对照品溶液；精密称取细辛脂素对照品适量，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀即得含细辛脂素 49.7 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 空白血清及含药血清的制备

取雄性 SD 大鼠 30 只，禁食 12 h(自由饮水)，称体质量，随机分为 5 组，每组 6 只。空白组 ig 给予蒸馏水，各给药组分别 ig 给予参照“2.1”项方法制得的大黄附子汤(15.0 g/kg)、大黄(5.6 g/kg)、

附子 (7.5 g/kg) 及细辛 (1.9 g/kg) 水煎液, 分别于给药后 5、15、30、45、60、90、120、180、240、360、480、720 min 眼眶静脉丛取血 0.5 mL, 室温下静置 30 min, 然后在 12 000 r/min 条件下离心 3 min, 取上清液血清 0.2 mL, 加入 5 倍量甲醇, 涡旋混匀 30 s, 同上条件离心 3 min, 取上清液, 于 40 °C 条件氮气吹干后用 100 μL 甲醇溶解, 同上条件离心 3 min, 取上清液, 备用, 供 HPLC 分析。

2.4 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1%甲酸水溶液+10 mmol/L 甲酸铵水溶液 (B), 梯度洗脱, 洗脱程序为 3%~20% A (0~25 min), 20%~35% A (25~45 min), 35%~50% A (45~50 min), 50%~55% A (50~60 min), 55%~65% A (60~70 min), 65%~70% A (70~80 min); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.5 大黄附子汤及其血清中成分的分析

取 3 批大黄附子汤体外供试品溶液, 以及 6 批大黄附子汤血清样品在相同的色谱条件下进行 HPLC 分析, 建立 HPLC 色谱图, 比较分析确定进入血液的成分。通过单味的大黄、附子、细辛饮片水煎液供试品及其血清样品的分析测定, 对相应的色谱图进行比较分析, 确定入血成分的来源。

3 结果与讨论

本实验通过单味饮片样品、复方样品、血清样品及对照品对照图谱的方法, 采用相同的色谱条件进行检测, 以保留时间作为鉴定标准, 对色谱峰进行分析指认。通过对多个采血时间点的血清样品进行分析, 大鼠 ig 给予大黄附子汤后 15 min 血清样品中成分多, 质量分数最高, ig 2 h 后血清样品中成分的数量和质量分数均有较明显的下降, 故采用 15 min 的血清样品进行分析。

在本实验色谱条件下, 经与大黄附子汤、单味饮片、含药血清、空白血清比较分析确定入血成分的来源。大鼠 ig 大黄附子汤的血清样本中共检测出 18 个移行成分 (图 1), 其中 13、14、16、17 号峰为体外生药中原型成分, 1~12、15、18 号峰推测为复方代谢产物。大黄附子汤中响应相对较高的原型成分 I、II、III、IV, 在血清中没有被检出, 推测可能是入血后质量分数太低或被机体代谢。

大黄水煎液及其血清样品色谱图见图 2, 经与对照品对照, 确证 13 号峰为芦荟大黄素, 14 号峰

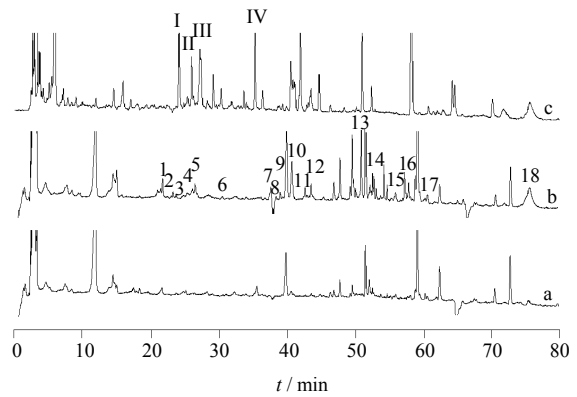
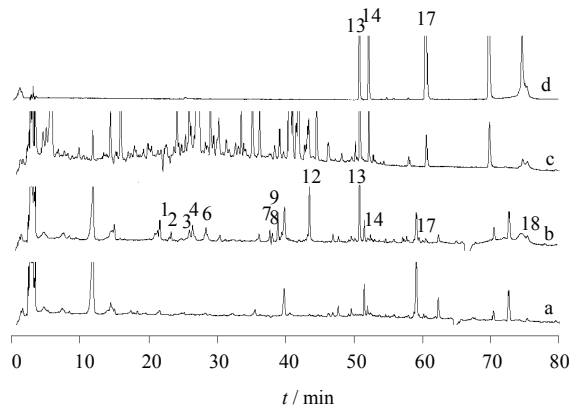


图 1 空白血清 (a)、大黄附子汤含药血清 (b) 和大黄附子汤 (c) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank serum (a), serum after DFD treatment (b), and DFD (c)



13-芦荟大黄素 14-大黄酸 17-大黄素
13-aloe-emodin 14-rhein 17-emodin

图 2 空白血清 (a)、大黄水煎液含药血清 (b)、大黄水煎液 (c) 和混合对照品 (d) 的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank serum (a), serum after RRR treatment (b), RRR decoction (c), and mixed reference substances (d)

为大黄酸, 17 号峰为大黄素, 均为大黄的原型成分, 1~4、6~9、12、18 号峰经分析为源于大黄的移行成分, 可能为大黄吸收入血后的代谢成分。

细辛水煎液及其血清样品色谱图见图 3, 第 5、16 号峰为源于细辛的入血成分, 与对照品对比可知, 16 号峰为细辛脂素, 为细辛的原型成分, 5 号峰可能为细辛的代谢产物。

近年来, 有学者运用色谱和质谱方法对单味药附子中多个成分及配伍不同药味后成分量的变化做了相关研究, 分析比较图 2 中大黄单煎液和图 1 中的大黄附子汤色谱图, 大黄单煎液出现的相关色谱峰经配伍后数目减少且强度降低, 可见配伍对成分

的溶出量具有影响。附子所含成分溶出率较低，配伍不同药味后对成分的量均有一定程度的影响^[11-14]，本实验中附子配伍大黄后，附子原型成分在色谱条件下响应较低，经分析可确定第10、11、15号峰均为源自附子的移行成分（图4）。

本实验首次运用HPLC法对大黄附子汤的血清药物化学进行研究，初步分析了复方的入血成分。大黄

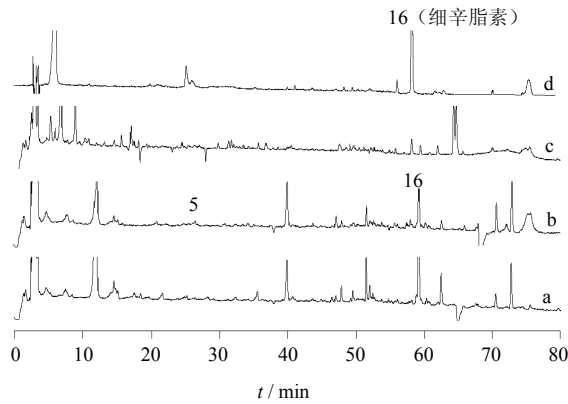
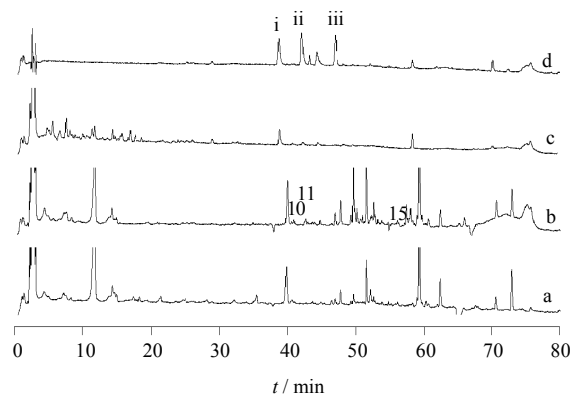


图3 空白血清 (a)、细辛水煎液含药血清 (b)、细辛水煎液 (c) 和对照品 (d) 的 HPLC 谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of blank serum (a), serum after ARR treatment (b), ARR decoction (c), and reference substance (d)



i-苯甲酰新乌头原碱 ii-苯甲酰乌头原碱 iii-苯甲酰次乌头原碱
i-benzoylmesaconine ii-benzoylaconine iii-benzoylhypaconine

图4 空白血清 (a)、附子水煎液含药血清 (b)、附子水煎液 (c) 和混合对照品 (d) 的 HPLC 谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of blank serum (a), serum after ALRP treatment (b), ALRP decoction (c), and mixed reference substances (d)

附子汤所含成分吸收入血后，血中移行成分主要来源于大黄和附子两味君药，复方中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、细辛脂素均以原型形式直接吸收入血，初步推测其为治疗寒积腹痛的药效物质基础。

参考文献

- [1] 贺玉琢. 日本汉方药“血清药理学”、“血清化学”的研究概况 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1998, 20(5): 3-7.
- [2] 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): 1-5.
- [3] 王喜军. 中药血清药物化学的研究现状及未来发展 [J]. 亚太传统医药, 2005(1): 59-63.
- [4] 王喜军. 茵陈蒿汤的生物药理学研究 [J]. 中国中西医结合肝病杂志, 1998, 8(增刊): 10-12.
- [5] 王喜军, 李廷利, 孙 晖. 茵陈蒿汤及其血中移行成分6, 7-二甲氧基香豆素的肝保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(2): 239-240.
- [6] 王喜军, 张 宁, 孙 晖, 等. 六味地黄丸的血清药物化学研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(4): 219-222.
- [7] 邓中甲. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.
- [8] 梁晓夏, 张保国, 刘庆芳. 大黄附子汤现代药效学研究与应用 [J]. 中成药, 2008, 30(11): 1670-1673.
- [9] 李燕敏, 占永立, 连凤梅, 等. 不同剂量大黄附子细辛汤治疗慢性肾功能衰竭疗效对比观察 [J]. 中医杂志, 2011, 52(24): 2016-2018.
- [10] 吴 丽, 刘 晓, 蔡 皓, 等. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠 STAT3 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 933-937.
- [11] 王 勇, 石 磊, 金东明, 等. 四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡[J]. 中草药, 2003, 34(4): 311-314.
- [12] 皮子凤, 越 皓, 宋凤瑞, 等. 附子与不同药味药材配伍后乌头类生物碱的电喷雾质谱研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1474-1477.
- [13] 越 皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 附子不同药对配伍中生物碱成分的电喷雾质谱分析[J]. 药学学报, 2007, 42(2): 201-205.
- [14] 许庆轩, 王 勇, 宋凤瑞, 等. 八味地黄汤各药味对附子生物碱影响的电喷雾质谱研究 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 519-522.