

基于 UPLC-PDA 法逍遥散乙醇提取物的石油醚萃取物血清药物化学初探

刘佳丽^{1,2}, 杨 岚^{1,2}, 崔 杰^{1,2}, 郭秉荣^{1,2}, 秦雪梅¹, 高晓霞^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 明确大鼠 ig 给予逍遥散乙醇提取物的石油醚萃取物 (XYP-A) 后血清中移行成分的归属与结构。方法 建立大鼠 ig 给予 XYP-A 后血清中移行成分的 UPLC-PDA 色谱分析方法。对全方石油醚萃取物及柴胡 (红柴胡)、当归、白术各单方石油醚萃取物分别 ig 给予大鼠后血清样品色谱图进行比较, 分析血清中移行成分的归属, 通过与对照品比对, 比较保留时间、UV 扫描图并结合文献数据对其定性。**结果** 大鼠 ig 给予 XYP-A 后, 血清中共检测到 20 个入血成分, 其中 12 个为原形成分, 分别来源于柴胡 9 个、当归 2 个、白术 1 个, 另外 8 个为代谢产物, 并指认了 4 个原形成分, 分别为藜本内酯、白术内酯 II、2, 8, 10-十五烷三烯-4, 6-二炔-1-醇和柴胡炔醇。**结论** 所建立的方法可行, 血中检测到的 20 个移行成分很可能是逍遥散体内直接作用物质, 为阐明该方药效物质基础提供了依据。

关键词: 逍遥散; 血清药物化学; 移行成分; 代谢物; UPLC-PDA

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)20-2816-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.006

Preliminary study on serum pharmacology of petroleum ether fraction in ethanol extract from Xiaoyao Powder based on UPLC-PDA

LIU Jia-li^{1,2}, YANG Lan^{1,2}, CUI Jie^{1,2}, GUO Bing-rong^{1,2}, QIN Xue-mei¹, GAO Xiao-xia¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To study the adsorption and identification of transitional constituents in serum of rats after ig administration of petroleum ether fraction in ethanol extract from Xiaoyao Powder (XYP-A). **Methods** A UPLC-PDA method was established to identify the active components in serum of rats after ig administration of XYP-A and the single preparations of *Bupleuri Radix* (BR), *Angelicae Sinensis Radix* (ASR), and *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (AMR). The transitional constituents were analyzed by comparing the fingerprints of the serum samples in formula, the single preparations and reference substances, referring literature, retention time, and UV scan spectra. **Results** Twenty components including 12 original components from XYP-A and eight metabolites were detected in serum of rats after ig administration of XYP-A. The original components consisted nine derived from BR, two from ASR, one from AMR, and the structures of ligustilide, atractylenolide II, 2, 8, 10-pentadecatriene-4, 6-diyne-1-ol (CH-1), and bupleurnol (CH-2) were identified. **Conclusion** The method is successfully applied for the serum pharmacology study in rats. Twenty transitional constituents are absorbed into serum of rats and their metabolites may be the effective constituents of XYP-A acting directly to the body, which could lay the foundation for the serum pharmacodynamic study.

Key words: petroleum ether fraction in ethanol extract from Xiaoyao Powder; serum pharmacology; transitional constituents; metabolites; UPLC-PDA

血清药物化学 (serum pharmacology, SPC) 的概念最早是由日本学者田代真一提出^[1], 在 1977 年, 国内学者王喜军完善了此概念, 称之为中药血清药物化学。中药血清药物化学的定义为以药物化学

的研究手段和方法为基础, 综合运用多种现代技术, 分析鉴定中药口服血清中移行成分, 研究其药效相关性, 确定中药药效物质基础并研究其体内过程的应用学科^[2]。现代药物基本上还是通过口服被吸收

收稿日期: 2013-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81001688); 国际科技合作项目 (2011DFA32630); “重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09103201-035); 山西省基础研究青年科技研究基金 (2011021007-1); 山西省高等学校中青年拔尖创新人才支持计划资助项目

作者简介: 刘佳丽, 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学研究。

*通信作者 高晓霞, 女, 副教授, 研究方向为中药药理学与药效动力学相关性研究和中医药代谢组学研究。

Tel: (0351)7011202 E-mail: gaomiaoxia@sxu.edu.cn

进入血液,再由血液进行运输到达各个器官组织等作用靶点,并且当药物达到一定血药浓度时,才能起到相应的作用^[3]。中药血清药物化学方法直接从被吸收到体内的成分入手,包括了药物在体内的代谢产物,而这些物质成分一定是有效物质基础或直接就是有效成分^[4]。进入血清中的移行成分最有可能成为有效成分,但中药成分组成复杂,有效成分量低,故建立血中移行成分的分析方法是基础。

逍遥散源自《太平惠民和剂局方》,由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、干姜、薄荷8味药组成,具有疏肝解郁、健脾养血之功效,临床及实验研究均显示该方有确切的抗抑郁作用^[5-8],是治疗抑郁症最常用的经典名方之一。本课题组前期对逍遥散有效部位进行了体外和体内药理活性研究,筛选出了石油醚活性部位,发现其在抗抑郁疗效方面明显优于原复方,甚至超过了西药的活性^[9]。但进入体内后哪些成分起作用,药物作用机制等还不清楚。本研究基于前期研究结果对逍遥散乙醇提取物石油醚萃取物(XYP-A)进行血清药物化学研究,对入血成分进行定性归属,为探讨其体内直接作用物质及其量效-时效、代谢过程研究奠定基础。

1 实验材料

1.1 仪器

超高效液相色谱仪(Acquity UPLC™ PDA,美国 Waters), Sartorius 电子分析天平(德国赛多利斯 Sartorius 有限公司),高速冷冻离心机(TGL—6,长沙湘仪离心机有限公司),真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂),微量移液器(Thermo),氮吹仪装置(实验室自制)。

1.2 试药与试剂

逍遥散组方中柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、薄荷和干姜等药材饮片均购于山西省华阳药业有限公司,所有药材经山西大学中医药现代研究中心主任秦雪梅教授鉴定为正品,且均留样于山西大学中医药现代研究中心。藁本内酯(质量分数≥98.0%,批号20111212)和白术内酯II(质量分数≥98.0%,批号20101012)对照品购自上海顺勃生物工程技术有限公司。2,8,10-十五烷三烯-4,6-二炔-1-醇(CH-1)和柴胡炔醇(CH-2)为实验室从柴胡中分离自制^[10],经UV及NMR进行结构鉴定质量分数在91%以上。

乌拉坦购自国药集团化学试剂有限公司。石油醚、95%乙醇、甲醇、乙腈、乙醚和异丙醇均为分

析纯,购自北京化工厂;纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司;HCl购自太原化兴化工运销有限公司;色谱级甲醇和乙腈购自Fisher Scientific(USA)。

1.3 实验动物

健康雄性SD大鼠16只,体质量(260±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京2006-0008)。将大鼠置于昼夜节律光照条件下,自由进食进水,饲养7d适应环境,每天触摸动物以适应实验人员的操作。

2 实验方法

2.1 逍遥散 XYP-A 的制备

逍遥散复方配比为柴胡30g,当归30g,白芍30g,白术30g,茯苓30g,炙甘草15g,薄荷10g,干姜10g。取各药均适量,混匀,加8倍量95%乙醇,回流提取3次,第1、2次每次2h,第3次1h,合并提取液,滤过,回收乙醇至无醇味,加水分散,浓缩至浸膏,然后加入等体积的石油醚,超声提取(每次30min,40kHz,500W),至萃取液近乎无色,合并石油醚提取液,回收溶剂,浓缩至浸膏,于真空干燥箱(60℃)中干燥,即得XYP-A。

分别制备单味药柴胡、当归、白术乙醇提取物的石油醚萃取物,同上述操作步骤。

2.2 对照品溶液的制备

各称取CH-1、CH-2、藁本内酯及白术内酯II对照品适量,精密称定,分别置于10mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得CH-1 0.67mg/mL、CH-2 0.55mg/mL、藁本内酯0.5mg/mL、白术内酯II 0.49mg/mL的对照品贮备液,分别精密量取各贮备液适量,配成混合对照品,进样前0.22μm微孔滤膜滤过。

2.3 灌胃液的制备

XYP-A用1,2-丙二醇-水(3:7)超声溶解制得灌胃液,质量浓度为46.3g/mL(按复方生药量计)。单味柴胡、当归、白术石油醚萃取物同法配制,质量浓度为22.5g/mL(按复方生药量计)。

2.4 血清样品的采集

SD大鼠16只,随机分成4组即复方组、柴胡组、当归组、白术组,每组4只。实验前大鼠禁食12h,自由饮水。称大鼠体质量,眼眶取血0.5mL后分别ig给予XYP-A灌胃液及单味药柴胡、白术、当归提取物的灌胃液。按照1mL/100g体质量,单次给药。给药后60min,ip 20%乌拉坦0.01mL/g

麻醉,经肝门静脉取血 5 mL,置于离心管中,4 ℃、13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-80 ℃冷藏备用。

2.5 血清样品的处理

精密吸取血清样品 500 μ L,置 10 mL EP 离心管中,依次加入 100 μ L 10% HCl 和乙醚-异丙醇(95:5)萃取剂 2 mL,涡旋混合 3 min,3 000 r/min 离心 10 min,分取上层溶液转移至另一个 10 mL EP 离心管中,下层再次加萃取剂 2 mL,涡旋 3 min,3 000 r/min 离心 10 min,合并 2 次萃取液,常温下温和的 N_2 流吹干,残渣加入 100 μ L 甲醇溶解,超声 3 min,涡旋 2 min,转移至 0.5 mL EP 离心管中,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液,进样分析。

2.6 色谱条件与洗脱程序

采用 UPLC-PDA 法。色谱柱:BEH C_{18} 色谱柱

(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相:水(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~2 min,30%~40% B;2~4 min,40%~50% B;4~6 min,50%~55% B;6~9 min,55%~65% B;9~11 min,65%~75% B;11~13 min,75%~95% B;13~15 min,95%~30% B;体积流量 0.5 mL/min;柱温 40 ℃;进样量 1 μ L;全波长扫描。

3 结果

3.1 3D 色谱图

大鼠 ig 给予 XYP-A,采用 UPLC-PDA 方法,全波长扫描。典型的 3D 色谱图见图 1。基于逍遥散复方成分复杂,本实验利用 UPLC-PDA 的优势,在全波长扫描模式的基础上,根据不同成分紫外吸收的差异,选择 254 nm 与 315 nm 共同作为 UPLC 色谱图的检测波长。

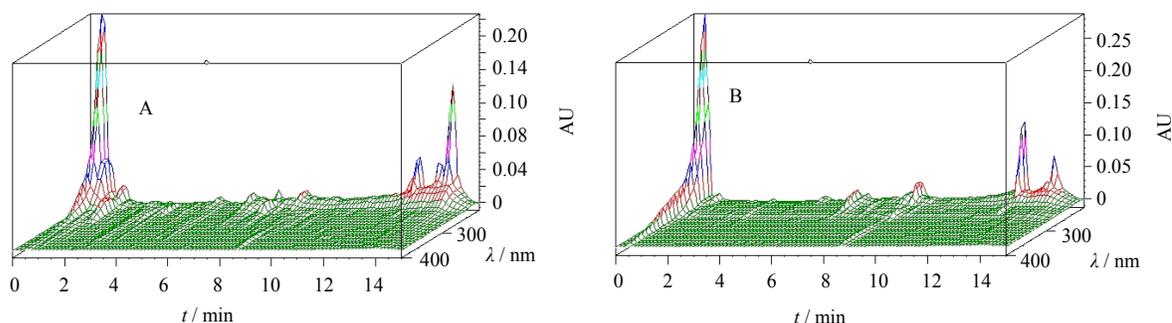


图 1 复方含药血清 (A) 和空白血清 (B) 3D 色谱图

Fig. 1 3D chromatograms of serum in rats after administration of full preparation (A) and blank serum (B)

3.2 色谱峰的归属

大鼠 ig 给予 XYP-A 后,通过比较空白血清与含药血清的色谱图,发现了 20 个移行成分。为了进一步确定 XYP-A ig 给药后血中移行成分的来源,依据课题组前期工作的结果^[11],对贡献比较大的柴胡、当归、白术给药后血清与复方进行对比,见图 2。发现 20 个移行成分中有 13 个源于君药柴胡,对应的色谱峰分别为 3、6、7、8、12、13、14、15、16、17、18、19 和 20 号峰;有 3 个源于当归,对应的色谱峰为 1、9、10 号峰;1 个源于白术,为 11 号色谱峰。其余的 4 号峰为当归和柴胡共同贡献,2 号峰和 5 号峰为白术、柴胡及当归共同贡献(表 1)。又将逍遥散、柴胡、白术和当归石油醚萃取物进行 UPLC 分析,并将色谱图进行比较(图 3),辅助 UV 扫描。可以看出其中 9~20 号峰为原形成分,其他 1~8 号峰为

代谢产物。

3.3 化合物指认及结构类型推测

大鼠 ig XYP-A 后,在血中发现的 20 个移行成分中,通过与对照品的色谱峰进行对照(图 4),鉴定了 12 个原形成分中的 9、11、14 及 18 号色谱峰分别为藜本内酯、白术内酯 II、CH-1 和 CH-2。

本研究观察分析血中移行成分 UV 扫描数据,发现 3、6、7、12、13、15、17 及 19 号峰的 UV 光谱图与 CH-1、CH-2 类似,查阅文献数据^[12]后,推测其具有相同的架构,这 10 个化合物可能均为多炔类化合物,但是具体结构还需要后续研究。8 号与 16 号峰的紫外扫描图类似,推测 8 号峰可能为 16 号峰的化合物或类似物的代谢物。4 号峰的扫描图通过与单味药扫描图谱比较发现,可能为来自柴胡和当归的 2 种物质的混合物,也有可能 2 种物质在复方中通过某种键合成为一种物质。

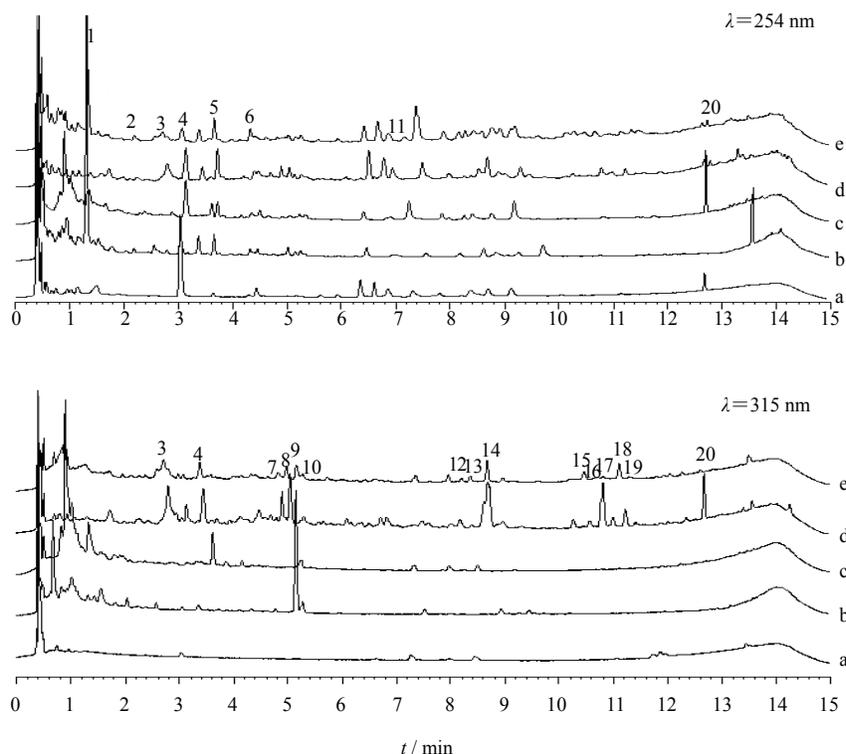


图2 空白血清 (a)、当归(b)、白术(c)、柴胡(d) 及 XYP-A (e) 含药血清的 UPLC 色谱图

Fig. 2 UPLC chromatograms of blank serum (a), serum after ig administration of ASR (b), serum after ig administration of AMR (c), serum after ig administration of BR (d), serum after ig administration of XYP-A (e)

表1 血中各移行成分归属与判断

Table 1 Assignment and identification of blood transitional constituents

峰号	t / min	归属药材	推测化合物	紫外吸收
1	1.322	当归	未知	258
2	2.193	柴胡、当归、白术	未知	251
3	2.749	柴胡	多炔类	254、323
4	3.371	当归、柴胡	未知	253、296、315、337
5	3.662	柴胡、当归、白术	未知	249
6	4.237	柴胡	多炔类	268、281、314、335
7	4.806	柴胡	多炔类	254、315、335
8	4.982	柴胡	未知	234、292
9	5.164	当归	藜本内酯	284、326
10	5.266	当归	未知	235、259、312
11	7.155	白术	白术内酯 II	278
12	8.116	柴胡	多炔类	254、316
13	8.222	柴胡	多炔类	253、297、316、337
14	8.524	柴胡	CH-1	251、296、315、336
15	10.421	柴胡	多炔类	252、295、316
16	10.656	柴胡	未知	235、254、295
17	10.772	柴胡	多炔类	253、318、337
18	11.086	柴胡	CH-2	251、316、336
19	11.283	柴胡	多炔类	249、314、343
20	12.583	柴胡	未知	283

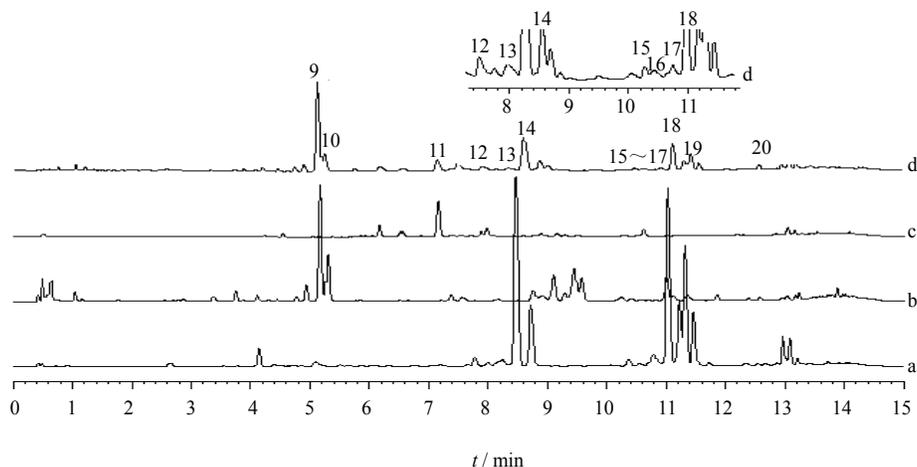
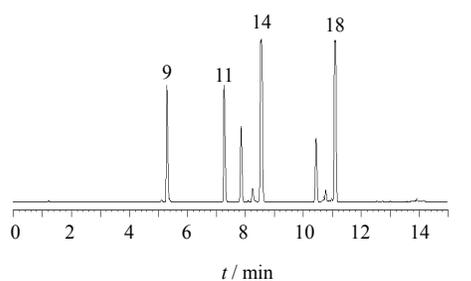


图3 柴胡 (a)、当归 (b)、白术 (c)、XYP-A (d) 石油醚萃取物的 UPLC 色谱图 ($\lambda=254\text{ nm}$)

Fig. 3 UPLC chromatograms of petroleum ether extract of BR (a), ASR (b), AMR (c), and XYP-A (d) ($\lambda=254\text{ nm}$)



9-藜本内酯 11-白术内酯 II 14-CH-1 18-CH-2
9-ligustilide 11-atractylenolide II 14-CH-1 18-CH-2

图4 混合对照品的 UPLC 色谱图 ($\lambda=254\text{ nm}$)

Fig. 4 UPLC chromatograms of mixed reference substances ($\lambda=254\text{ nm}$)

4 讨论与结论

4.1 移行成分的归属

只根据保留时间并不能准确地推断移行成分的归属, 还需进一步查看化合物的 UV 扫描图进行确

认。如给药后血清色谱图 (图 2) 中 7 号和 8 号峰的保留时间与逍遥散色谱图 (图 3-d) 的 4.818、4.987 min 处峰 (疑为 7 号和 8 号峰) 保留时间极接近, 但通过比对 7、8 号峰和样品 UV 扫描图 (图 5), 发现其并不是原形成分, 而是代谢产物。

4.2 血清样品预处理方法考察

本实验因考虑到样品中化合物的极性相对较小, 主要对液-液萃取法进行了详细的考察。筛选萃取剂的种类, 通过对体外样品的 19 个主要色谱峰的萃取率进行比较, 选择最适宜的萃取剂。平均回收率结果见表 2, 根据上述血清样品处理分析比较可以看出, 由乙醚-异丙醇 (95:5) -10% HCl 处理的含药血清对原有成分保留最多, 萃取率最高。另外, 考虑到样品中存在有机酸、长链炔醇等成分, 酸性环境可能对萃取效果有影响, 所以对酸的加入与否进行了考察。比较了 1%、5%、10% 和 15% HCl 的

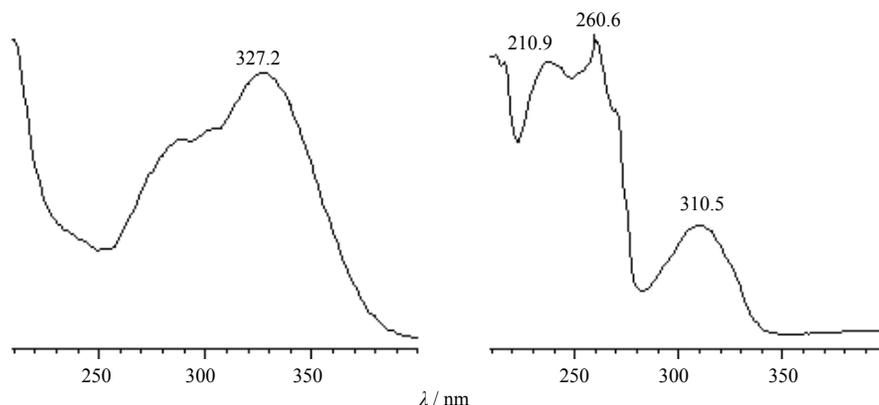


图5 XYP-A 体外疑为 7 和 8 号色谱峰的 UV 扫描图

Fig. 5 UV scan of XYP-A *in vitro* suspicious peaks to be No. 7 and 8

表2 各种萃取剂的平均回收率结果

Table 2 Average extraction results of each extractant

编号	萃取剂种类	平均回收率 / %
1	醋酸乙酯	2.77
2	乙醚	3.68
3	二氯甲烷	62.61
7	醋酸乙酯-异丙醇 (95:5)	23.53
8	乙醚-异丙醇 (95:5)	26.23
4	醋酸乙酯-10% HCl	46.21
5	乙醚-10% HCl	59.90
6	二氯甲烷-10% HCl	68.32
9	醋酸乙酯-异丙醇 (95:5) -10% HCl	68.37
10	乙醚-异丙醇 (95:5) -10% HCl	82.53

萃取效果,其中10% HCl 萃取效果最佳。最后确定用乙醚-异丙醇(95:5)-10% HCl 的液-液萃取法作为血清样品的预处理方法。

在确定最佳萃取剂后还对萃取次数以及萃取剂用量进行了考察。萃取次数共选择了1、2、3次进行摸索。结果表明,萃取次数为2次时即可萃取完全,萃取率最佳,为82.53%,而萃取1次和3次的萃取率分别为50.23%和82.36%。萃取剂的用量比较了1、2、3 mL 3个用量,结果发现,平均回收率分别为44.79%、81.22%和80.55%,综合各种因素选择了萃取次数为2次、萃取剂用量2 mL。

4.3 化合物活性与逍遥散抗抑郁作用的相关性

本实验研究结果表明,ig 给予大鼠 XYP-A 后20个血中移行成分大多都来自柴胡,这也佐证了其君药的地位。传统中医认为,柴胡具有疏肝解郁功效,而现代研究也多认为柴胡具有抗抑郁的作用。高萧枫等^[13]认为柴胡水提物可使肝郁模型大鼠脑组织中去甲肾上腺素(NE)与多巴胺(DA)的量有显著提高,作用类似于逍遥散复方,表明方中柴胡在肝郁证的治疗中发挥着重要的作用。Kwon 等^[14]指出柴胡甲醇提取物具有抗抑郁作用,并认为其可作为氟西汀的替代药物。但是到底是哪种成分在起作用还是未知,本实验检测到的多类化合物是否为抗抑郁的药效成分还有待药理学研究证实。当归在复方中为臣药,虽然只检测到3个入血成分来源于当归,但血液中藜本内酯的量较高,且当归中藜本内酯对中枢神经系统的作用也多有报道^[15-20]。

同时本课题组前期基于UPLC 谱效关系的研究思路,寻找到11个抗抑郁活性成分,指出3个成

分(欧前胡素、藜本内酯、白术内酯II),未知化合物8个^[21]。本实验与之前研究相结合发现,11个活性成分中有5个在血液中可以检测到,分别为藜本内酯、白术内酯II及13、19、20号色谱峰表征的化学成分,进一步对活性成分进行了验证,为阐明该方药效物质奠定了基础。除了一些原形成分,血液出现的代谢物也可能为活性物质,但单凭UPLC 无法定性,还有一些微量成分不易检测到,有待于通过更灵敏的分析手段,希望能通过GC-MS及LC-MS来进一步确定XYP-A的药效成分。

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—中医药现代化, 2002, 4(2): 1-4.
- [3] 谭玉柱, 黄君梅, 杨国政, 等. 血清药物化学应用于中药复方的研究现状 [J]. 中药与临床, 2011, 2(2): 53-55.
- [4] 常存库, 王喜军. 中药血清药物化学理论与方法的意义 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 4(12): 634-637.
- [5] 朱春山. 文拉法辛与逍遥丸联合治疗抑郁症的疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(2): 152-154.
- [6] 魏平. 逍遥散加味治疗抑郁症30例 [J]. 中医研究, 1999, 12(5): 54-55.
- [7] 张美增, 张秋英. 逍遥散治疗抑郁性神经症临床研究 [J]. 山东中医药大学学报, 1998, 22(1): 34-36.
- [8] 郭晓擎, 田俊生, 史碧云, 等. 南柴胡和北柴胡组成的逍遥散抗抑郁作用的¹H-NMR代谢组学研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2209-2216.
- [9] 任艳玲, 贾广臣, 马致洁, 等. 逍遥散抗抑郁活性部位筛选 [J]. 时珍国医国药, 2012, 11(23): 2689-2691.
- [10] 崔杰. 基于血清药物化学的逍遥散抗抑郁有效部位的药代动力学初探 [D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [11] 任艳玲, 周玉枝, 秦雪梅, 等. 逍遥散抗抑郁有效部位指纹图谱归属分析 [J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(8): 636-640.
- [12] Huang H Q, Su J, Zhang W D, et al. Qualitative and quantitative determination of polyacetylenes in different *Bupleurum* species by high performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(8): 1131-1138.
- [13] 高萧枫, 秦雪梅, 王明军. 逍遥散和柴胡对慢性束缚应激肝郁模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(2): 6-7.
- [14] Kwon S, Lee B, Kim M, et al. Antidepressant-like effect

- of the methanolic extract from *Bupleurum falcatum* in the tail suspension test [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010, 34(2): 265-270.
- [15] 谢发祥, 陶静仪. 当归成分藁本内酯的中枢抑制作用 [J]. 陕西新医药, 1985, 14(8): 59-62.
- [16] Cheng L L, Chen X N, Du J R, *et al.* Z-ligustilide isolated from *Radix Angelicae Sinensis* ameliorates the memory impairment induced by scopolamine in mice [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(7): 1128-1132.
- [17] Kuang X, Du J R, Liu Y X, *et al.* Postischemic administration of Z-ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 88(3): 213-221.
- [18] Peng H Y, Du J R, Zhang G Y, *et al.* Neuroprotective effect of Z-ligustilide against permanent focal ischemic damage in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(2): 309-312.
- [19] Kuang X, Yao Y, Du J R, *et al.* Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice [J]. *Brain Res*, 2006, 1102(1): 145-153.
- [20] 王雁南, 杜俊蓉. 藁本内酯对脑缺血再灌注大鼠的作用及其抗炎机制的研究 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(6): 685-687.
- [21] 贾广成. 逍遥散抗抑郁有效部位配伍的谱效关系研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012.