

## 杜仲的血清药物化学研究

王永林<sup>1,3</sup>, 向文英<sup>1</sup>, 陆苑<sup>1,3</sup>, 曹旭<sup>1</sup>, 孙佳<sup>1,3</sup>, 巩仔鹏<sup>1,3</sup>, 王爱民<sup>2,3\*</sup>

1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004

2. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004

3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004

**摘要:** 目的 对杜仲 *Eucommia ulmoides* 进行血清药物化学研究。方法 采用 UHPLC-Q-TOF-MS 技术, 通过比较杜仲提取物、给药组及空白组大鼠血清的指纹图谱, 确定口服杜仲提取物后大鼠血中移行成分。结果 给药组大鼠血清指纹图谱与空白组血清指纹图谱对比有明显不同。含药血清中出现 7 个移行成分, 与杜仲提取物指纹图谱在相同保留时间出峰, 为原型成分。采用对照品对照, 确定 5 个色谱峰所表征的化学成分为原型吸收收入血成分, 依次为京尼平苷酸、原儿茶酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷。通过查阅文献, 推断了 2 个色谱峰所表征的化学成分可能为 1-羟基松脂醇二葡萄糖苷、杜仲醇。结论 血中移行成分可能为杜仲的体内直接作用物质, 为明确杜仲药效物质基础提供了科学依据。

**关键词:** 杜仲; 血清药物化学; 指纹图谱; 移行成分; 京尼平苷酸; 原儿茶酸; 杜仲醇

中图分类号: R284; R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1101-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.007

## Serum pharmacochemistry of stem bark of *Eucommia ulmoides*

WANG Yong-lin<sup>1,3</sup>, XIANG Wen-ying<sup>1</sup>, LU Yuan<sup>1,3</sup>, CAO Xu<sup>1</sup>, SUN Jia<sup>1,3</sup>, GONG Zi-peng<sup>1,3</sup>, WANG Ai-min<sup>2,3</sup>

1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

**Abstract: Objective** To investigate the bioactive constituents in the stem bark of *Eucommia ulmoides* and study on their serum pharmacchemistry. **Methods** The UHPLC-Q-TOF-MS was used to analyze the ingredients in the serum samples in rats, and the chromatogram was compared among the peaks of extracts in the stem bark of *E. ulmoides*, rat serum with drug and blank serum sample was used to determine them after the administration of extracts by comparing the finger-print. **Results** Seven compounds absorbed into blood were be detected, and had the same retention time with those in the finger-print of extracts, after repeated experiments, which were original constituents of the extracts. The extracts were identified by comparing the retention times with standard substance, five compounds were obtained and identified as geniposidic acid, protocatechuic acid, geniposide, pinosresinol diglucoside, and pinosresinol monoglucoside. Through review of the literature, two compounds may be 1-hydroxypinosresinol glucoside, and eucommiol. **Conclusion** The compounds are absorbed into the blood are the effective constituents, and the research provides a scientific fundament for material basis of effectiveness of *E. ulmoides*.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv.; serum pharmacchemistry; fingerprint; transitional constituents; geniposidic acid; protocatechuic acid; eucommiol

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, 分析鉴定口服给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<sup>[1]</sup>。通过中药血清药物化学

收稿日期: 2015-04-29

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81560683); 贵州省科技重大专项项目 (黔科合重大专项字[2012]6009 号); 贵州省中药现代化研究开发专项 (黔科合中药字[2013]5062 号, 黔科合重 G 字[2013]4001 号); 贵州省高等学校创新能力提升计划 (黔教合协同创新字[2013]04); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题 (QZYY-2015-079); 贵阳医学院博士启动基金 (院博合 J 字[2014]017 号)

**作者简介:** 王永林 (1954—), 男, 学士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与药物代谢动力学研究。

Tel: (0851)6908899 E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

**\*通信作者** 王爱民, 男, 学士, 教授, 研究生导师, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制研究。

Tel: (0851)6908468 E-mail: gywam100@gmail.com

研究, 确定中药在体内直接作用的物质, 为中药及其复方药效物质基础研究提供可靠有利的实验依据。杜仲为杜仲科 (*Eucommiaceae*) 植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥茎皮, 又名思仙、思仲、木棉, 特产于我国西部、西南部及长江中上游地区, 主要分布于贵州、四川、广西、广东、云南、湖南、河南、甘肃、陕西、江西、浙江等省区<sup>[2]</sup>。杜仲具有增强免疫、抗衰老、补肝肾、降低血糖、调节血脂、防治骨质疏松、抗肿瘤等药理作用<sup>[3-7]</sup>。目前国内外对杜仲的化学成分和药理作用的研究已取得很大的进展, 但其体内作用成分及代谢过程研究报道较少, 药效物质基础尚不明确<sup>[8]</sup>。本研究采用血清药物化学研究方法, 通过 UHPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱技术观察杜仲经口服后的体内动态过程, 确定杜仲血中移行成分, 为最终确定杜仲药效物质成分奠定基础。

## 1 仪器与材料

Agilent 1290 Infinity UHPLC-DAD-Bruker MicroTOF-QII (美国 Agilent, 德国-Bruker) 包括自动进样器、柱温箱、DAD 二极管阵列检测器、二元泵; ZH-2 涡旋混合器 (天津药典标准仪器厂); Allegra 64R 低温高速离心机 (美国 Beckman); DK-98-11 恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); MTN-2800D 氮吹浓缩装置 (奥特塞恩斯仪器公司); CQ250A-TS 超声波清洗机 (上海跃进医用光学器械厂); WP-UP-II-20 超纯水机 (四川沃特水处理设备有限公司); METTLER 电子分析天平 [EL204, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。

对照品京尼平苷酸、京尼平苷和原儿茶酸 (四川省维克奇生物科技有限公司, 批号分别为 120314、110722、110306, 质量分数 $\geq 98\%$ ); 对照品松脂醇二葡萄糖苷 (上海顺勃生物工程有限公司, 批号 201206, 质量分数 $\geq 98\%$ ); 对照品松脂醇单葡萄糖苷 (江苏弘惠医药有限公司, 批号 070801, 质量分数 $\geq 98\%$ )。杜仲提取物 (自制)。色谱纯甲醇 (天津市科密欧化学试剂有限公司)、乙腈 (德国 Merck 公司); 其余试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠, 体质量 (230 $\pm$ 20) g, 雌雄各半, 检疫合格, 购自重庆腾鑫生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (渝) 2012-0008。

杜仲药材来源于贵州, 由贵州医科大学药学院药用植物学与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树

皮。标本保存于贵阳医学院药学院植物标本馆。

## 2 方法

### 2.1 对照品溶液与杜仲提取物的制备

精密称取对照品京尼平苷酸、原儿茶酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷适量至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得京尼平苷酸 (1.350 g/L)、原儿茶酸 (0.974 g/L)、京尼平苷 (0.528 g/L)、松脂醇二葡萄糖苷 (1.004 g/L)、松脂醇单葡萄糖苷 (1.010 g/L) 的储备液。分别精密量取上述 5 种对照品储备液各 30  $\mu$ L, 混匀, 得混合对照品溶液。置冰箱 (-20  $^{\circ}$ C) 保存, 备用。

杜仲加 10 倍量水煎 2 h, 共 3 次, 浓缩, 加乙醇醇沉, 静置 12 h, 抽滤, 回收乙醇, 用水饱和的正丁醇 (1/2 倍量) 提取 4 次, 回收正丁醇, 上 D101 大孔树脂, 40%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 浓缩并真空干燥, 得杜仲提取物。

### 2.2 血清的制备

取清洁级 SD 大鼠, 雌雄各半。随机分为 2 组, 即空白组和给药组。禁食 12 h, 但自由饮水, 按每次 96 g/kg 剂量分 2 次 ig 给予杜仲提取物, 并连续 ig 给药 3 d, 空白组 ig 等体积的蒸馏水。并于末次给药 60 min 后股动脉采血, 取全血置于 37  $^{\circ}$ C 水浴保温至上层有淡黄色液体析出, 取出后离心 (15 000 r/min) 10 min。取上层血清, 将同一组各血清混合, 以消除个体差异, 置于 -20  $^{\circ}$ C 保存, 备用。

### 2.3 血清样品的处理

取含药血清和空白血清各 1 mL, 依次加入 0.2 mL 1%甲酸水溶液、4 mL 甲醇, 涡混 2 min 后, 超声机超声 10 min, 15 000 r/min 低温离心 10 min。随后取上清液置氮吹仪中, 37  $^{\circ}$ C 下吹干。再加入 1 mL 甲醇于吹干样品中, 按上述处理方法 2 次沉淀蛋白, 上清液于 37  $^{\circ}$ C 氮气吹干后, 残留物加入 200  $\mu$ L 甲醇复溶, 涡旋 2 min, 超声 10 min, 于冷冻高速离心机 15 000 r/min 低温离心 10 min, 取含药血清样品、空白血清样品, 供血清药物化学研究。

### 2.4 分析条件

**2.4.1 色谱条件** 色谱柱: Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m); 流动相: 0.1% 甲酸水 (A)-0.1%甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~25% A; 10~14 min, 25%~45% A; 14~17 min, 45%~100% A; 17~18 min, 100%~5% A。体积流量 0.30 mL/min, 柱温 40  $^{\circ}$ C, 进样体积 2  $\mu$ L。

**2.4.2 质谱条件** 电喷雾离子源, 扫描方式为正、

负离子扫描 (ESI<sup>-</sup>、ESI<sup>+</sup>,  $m/z$  100~1 000); 毛细管电压 4.5 kV; 锥孔电压 150 V; 离子源温度 110 °C; 雾化气 (N<sub>2</sub>) 压力 0.12 MPa; 温度 200 °C; 体积流量 8.0 mL/min。准确质量测定采用甲酸钠校正标准液; 校正模式选用 Enhanced Quadratic。数据分析 Data Analysis 软件、Metabolite Detect 软件。

### 3 结果

#### 3.1 杜仲提取物化学成分分析

按“2.1”项方法分别取杜仲提取物样品液和混合对照品溶液进 UHPLC-Q-TOF-MS 系统分析, 得到杜仲提取物样品液 (图 1-A) 和混合对照品溶液 (图 1-B) 的质谱总离子流色谱图。通过比较杜仲提

取物样品液和混合对照品溶液的保留时间 ( $t_R$ ), 以及分析二级碎片离子信息, 在杜仲提取物样品液中归属了 10 个色谱峰, 确定 1 号为京尼平苷酸、2 号为原儿茶酸、3 号为新绿原酸、4 号为绿原酸、5 号为隐绿原酸、6 号为京尼平苷、7 号为松脂醇二葡萄糖苷、9 号为松脂醇单葡萄糖苷; 另外通过参考文献报道<sup>[9]</sup>和分析质谱二级碎片离子信息, 推断 8 号可能为 1-羟基松脂醇单葡萄糖苷, 10 号可能为杜仲醇, 见表 1。

#### 3.2 杜仲含药血清成分分析

运用 Metabolite Detect 软件将空白血清色谱图 (图 2-C) 从给药血清色谱图 (图 2-B) 中扣除, 得

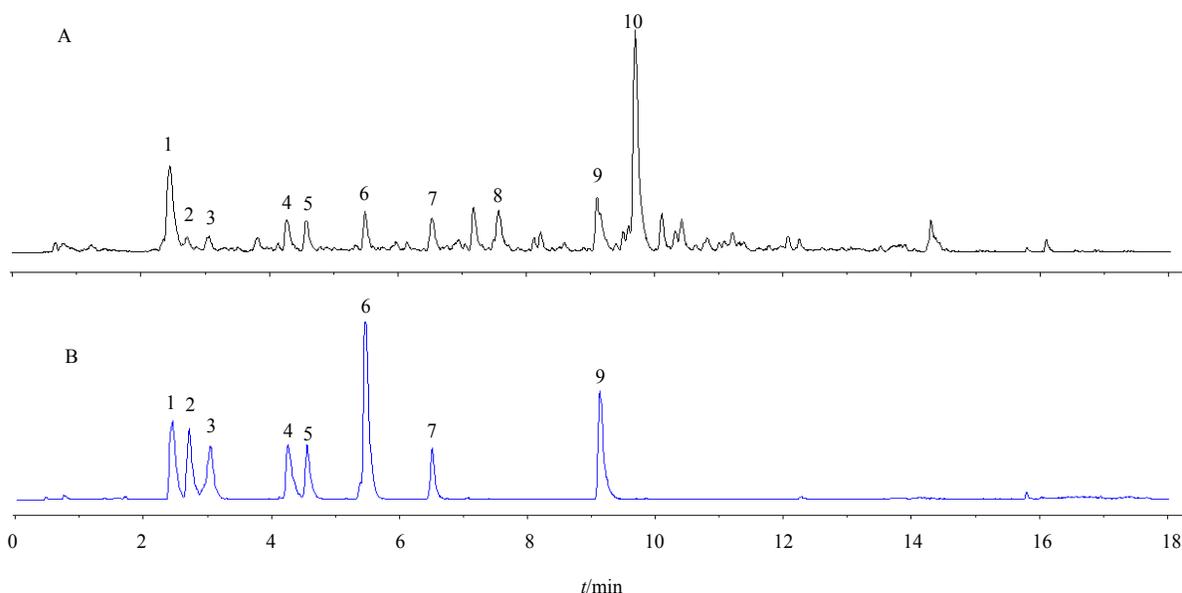


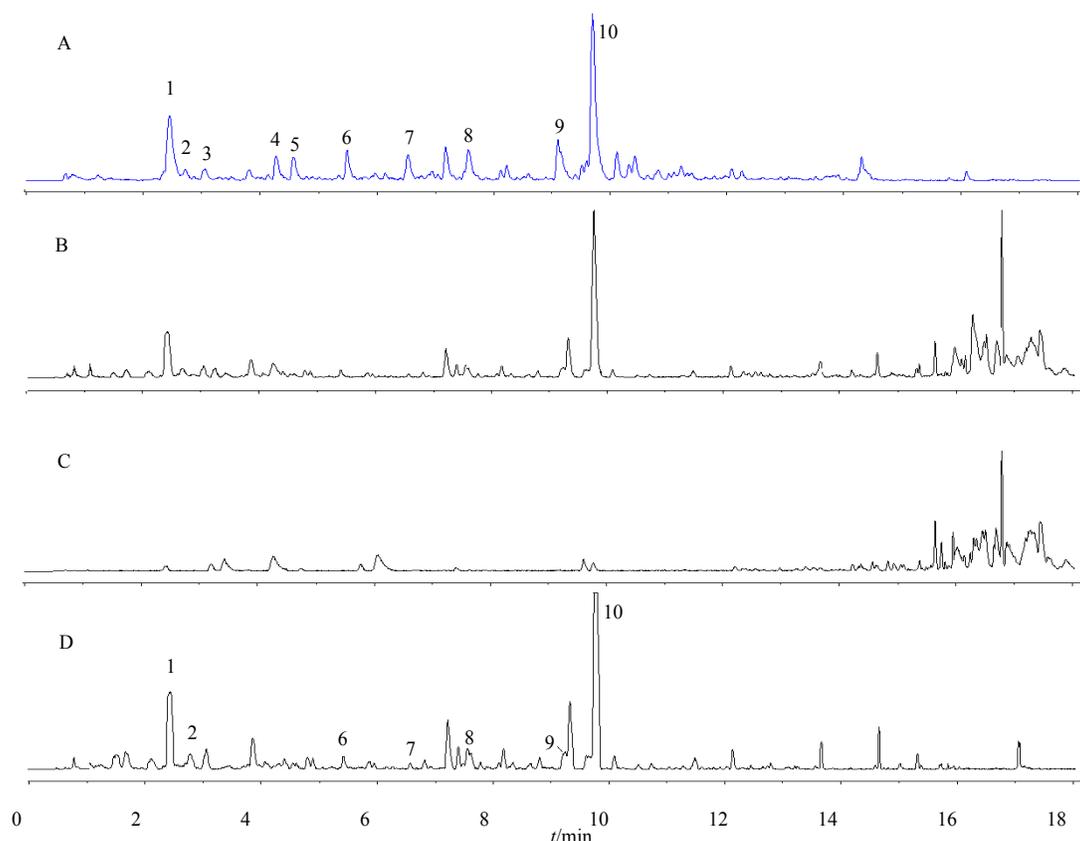
图 1 杜仲提取物样品液 (A) 和混合对照品溶液 (B) 的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of extraction of *E. ulmoides* (A) and mixed reference solution (B)

表 1 杜仲提取物总离子流色谱峰保留时间及归属

Table 1 Total ion chromatogram of peak retention time and attribution

峰号	$t_R$ /min	$[M-H]^-$	$[M+HCOO]^-$	质谱碎片信息	化合物
1	2.5	373.114 7	—	211 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	京尼平苷酸
2	2.7	153.019 9	—	109 $[M-H-CO_2]^-$	原儿茶酸
3	3.1	353.087 7	—	191 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	新绿原酸
4	4.3	353.089 4	—	1 913 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	绿原酸
5	4.6	353.088 4	—	191 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	隐绿原酸
6	5.4	387.129 4	433.136 8	225 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	京尼平苷
7	6.6	681.239 1	727.243 5	519 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	松脂醇二葡萄糖苷
8	7.5	535.183 6	—	373 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	1-羟基松脂醇单葡萄糖苷
9	9.1	519.187 8	—	357 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	松脂醇单葡萄糖苷
10	9.7	187.096 9	—	125 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$	杜仲醇



A-杜仲提取物 B-末次 ig 杜仲提取物 60 min 后含药血清 C-空白血清 D-含药血清与空白血清差异图

A-*E. ulmoides* extract; B-serum in 60 min after last ig administration of *E. ulmoides* extract C-blank serum; D-difference in serum with *E. ulmoides* extract and blank serum

图 2 杜仲含药血清总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram of serum containing drug in *E. ulmoides*

到差异图谱(图 2-D)。通过比较杜仲提取物样品液、杜仲提取物含药血清和空白血清差异色谱图发现,除去血清中的固有成分,杜仲含药血清中出现 7 个移行成分。采用对照品对照,确定其中 5 个色谱峰所表征的化学成分为原型吸收入血成分,依次为京尼平苷酸(1)、原儿茶酸(2)、京尼平苷(6)、松脂醇二葡萄糖苷(7)、松脂醇单葡萄糖苷(9),通过查阅文献,结合化合物相对分子质量和质谱碎片离子信息,推断了 2 个色谱峰所表征的化学成分可能为 1-羟基松脂醇二葡萄糖苷(8)、杜仲醇(10)。

#### 4 讨论

UHPLC-Q-TOF-MS 具有液相色谱强大的分离能力和质谱的高分辨能力等特点,目前已成为研究体内药物分析的首选方法。本实验采用 UHPLC-Q-TOF-MS 系统建立了生物样品中可靠的定性分析方法,能够较全面地反映杜仲口服后吸收入血的药物成分,为快速确定杜仲药效物质基础及代谢研究奠

定基础。为了获得分离度好、灵敏性高以及信息量丰富的色谱图,对色谱条件进行了优化,包括了流动相的组成、进样体积、运行时间的选择。并且实验中分别采用正、负离子扫描方式对混合对照品溶液及杜仲提取物样品液进行全扫描,结果发现在负离子模式下杜仲提取物样品液中的化合物响应相对较高,并且各色谱峰之间实现了较好的分离,因此实验选择了负离子模式为测试模式。

根据文献报道和前期预实验结果得出了给药剂量按每次 96 g/kg 剂量分 2 次 ig 给予杜仲提取物<sup>[10-11]</sup>。由于含药血清包括许多内源性杂质和蛋白类成分,直接进样检测可能会干扰实验结果,并且对仪器会造成污染。实验中对血清样品的处理方法进行考察,分别考察了有机溶剂沉淀蛋白、醋酸乙酯萃取法、热水浴法、HLB 固相小柱萃取 4 种方法对血清样品的影响,最终选择信息量最大的甲醇沉淀法对样品进行处理。但由于甲醇沉淀法不能有效去除所有的

内源性物质,为此运用 Metabolite Detect 软件将空白血清色谱图从含药血清色谱图扣除,得到差异图谱,进一步提高了定性分析的准确性以及工作效率。在考察确定了给药方案后,对含药血清进行制备,但只找到少量吸收入血的木脂素类和环烯醚萜类原型成分,未找到绿原酸及其同分异构体,可能是因为这些成分在大鼠体内发生了生物转化,因此有待进一步研究各个成分在大鼠体内的代谢过程。

#### 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—中医药现代化, 2002, 4(2): 1-4.
- [2] 程光丽. 杜仲有效成分分析及药理学研究进展 [J]. 中成药, 2006, 28(5): 723-725.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 罗丽芳, 吴卫华, 欧阳冬生, 等. 杜仲的降压成分及降压机制 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 150-152.
- [5] 盛军利, 孙桂菊. 杜仲的药效学研究现状及其应用前景 [J]. 医学综述, 2006, 12(16): 1022-1024.
- [6] 潘亚磊, 翟远坤, 武祥龙, 等. 杜仲活性成分的提取及分离纯化方法研究进展 [J]. 医学与生物工程, 2012, 29(2): 1-5.
- [7] 臧友维. 杜仲化学成分研究进展 [J]. 中草药, 1989, 20(4): 42-45.
- [8] Xie L H, Akao T, Hamasaki K, *et al.* Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(5): 508-515.
- [9] 何峰, 王永林, 郑林, 等. UPLC-PDA-ESI-MS 分析杜仲中化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 59-62.
- [10] 管淑玉, 苏薇薇. 杜仲化学成分与药理研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26(2): 124-129.
- [11] 柳娜. 杜仲中活性成分的分离及其药理活性研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2006.