

# 渴络欣胶囊的血清药物化学研究\*

吴建明<sup>1,2</sup>, 张志荣<sup>1</sup>, 张鸿程<sup>2</sup>, 柯 潇<sup>2</sup>, 郝晓锋<sup>2</sup>, 高小平<sup>2\*\*</sup>

(1. 四川大学华西药学院 成都 610041; 2. 成都康弘药业集团 成都 610036)

**摘要:**目的:研究渴络欣胶囊吸收入血的主要物质基础及特征。方法:采用 HPLC-DAD 体系,建立渴络欣胶囊大鼠血清的 HPLC 指纹图谱;差示分析渴络欣胶囊、空白血清及含药血清指纹图谱,获得大鼠口服渴络欣胶囊后血液中移行成分概况。结果:所建大鼠血清指纹图谱方法具有良好的精密度、重复性和稳定性;基于该方法分析渴络欣胶囊大鼠含药血清,共检出移行成分 13 个,其中原型成分 9 个、代谢成分 4 个,原型成分中包括芦荟大黄素及大黄酸。结论:吸收入血的 13 种成分可能是渴络欣胶囊发挥药效的主要物质基础。

**关键词:**渴络欣胶囊 芦荟大黄素 反相高效液相色谱 血清药物化学

doi: 10.11842/wst.2014.08.017 中图分类号:R284.1 文献标识码:A

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,分析鉴定口服中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>。运用血清药物化学的方法研究中药复方,有助于揭示其作用机制<sup>[2]</sup>,加速中药现代化发展的步伐。渴络欣胶囊是成都康弘药业集团自主研发的国内首个用于糖尿病肾病治疗的复方中药制剂,为中药六类新药,由黄芪、女贞子、水蛭、大黄等 6 味中药组成,具有益气养阴,活血化瘀的功效,用于糖尿病肾病气阴两虚兼夹血瘀症。目前,对渴络欣胶囊药效及机制的研究颇为丰富,而对药效物质基础的研究相对缺乏。本研究以中药血清化学理论为指导,对渴络欣胶囊给药前后的血清进行系统的指纹图谱分析,旨在研究渴络欣胶囊吸收入血的主要成分及药效物质基础<sup>[3]</sup>,从而为药效作用机制研究、生产工艺的改进、质量控制的优化及临床运用提供更为全面的研究基础和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

渴络欣胶囊(成都康弘制药有限公司,批号:20090501),由黄芪、女贞子、枸杞子、大黄、太子参、枸杞子六味中药组成,每粒含提取物 0.5 g。大黄酸对照品(中国生物制品药品检定所,批号:0757-200206):纯度 $\geq 98\%$ ;芦荟大黄素对照品(中国生物制品药品检定所,批号:110795-200806):纯度 $\geq 98\%$ 。

### 1.2 色谱条件

Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m), C<sub>18</sub> 预柱,流动相甲醇(A)-1%乙酸水(B),梯度洗脱(5%-20% A, 0-20 min; 20%-90% A, 20-70 min; 90%-100% A, 70-75 min),流速 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,检测波长:190-400 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 40  $\mu$ L。

### 1.3 溶液的制备

#### 1.3.1 渴络欣胶囊灌胃样品的制备

称量渴络欣胶囊内容物,加入蒸馏水超声 10

收稿日期:2013-11-20

修回日期:2014-01-07

\* 四川省科技厅科技支撑计划项目(2010SZ0261) 治疗糖尿病肾病中药新复方制剂渴络欣胶囊成果转化 负责人 吴建明。

\*\* 通讯作者:高小平,研究员,主要研究方向:中药物质基础及分子药理学研究。

min,补加蒸馏水至溶液终浓度为  $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,混匀即得渴络欣胶囊灌胃样品。

### 1.3.2 渴络欣单味药材样品的制备

根据渴络欣制备工艺,分别制备各单味药材的浸膏粉,以蒸馏水配制成终浓度为  $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混悬液,即得各单味药材灌胃样品。

### 1.3.3 对照品溶液的配制

精确称量大黄酸及芦荟大黄素对照品适量,分别用色谱级甲醇溶解至  $10 \text{ mL}$  容量瓶,超声  $10 \text{ min}$ ,补加甲醇至量瓶刻度,即得大黄酸及芦荟大黄素对照品溶液。

### 1.3.4 渴络欣胶囊供试品的制备

精确称量渴络欣胶囊内容物适量,用甲醇溶解至  $10 \text{ mL}$  容量瓶,超声  $10 \text{ min}$ ,补加甲醇至量瓶刻度,即得渴络欣胶囊供试品溶液。

## 1.4 血清样品的制备

取 SD 大鼠 42 只,雌雄兼用,禁食  $12 \text{ h}$ ,随机分为 7 组,即渴络欣胶囊组及 6 个单味药材组(分别为黄芪、女贞子、枸杞子、大黄、太子参、水蛭),分别以上述“1.3”项下所述样品溶液灌胃给药,给药体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (渴络欣组相当于 5 倍临床等效剂量),分别于给药前和给药后 10、30、60、90、120、180、240、360、480 min 眼底静脉丛取血,  $3\ 000 \text{ rpm}$  离心  $10 \text{ min}$ ,收集血浆待用。

## 1.5 血清供试品的制备

取含药血清或空白血清  $200 \mu\text{L}$ ,加入 50%高氯酸—甲醇溶液(体积比 1:4)  $50 \mu\text{L}$ ,旋涡振荡  $30 \text{ s}$ ,静置  $5 \text{ min}$  后再次旋涡振荡  $30 \text{ s}$ ,混合液  $20\ 000 \text{ rpm}$  离心  $10 \text{ min}$ ,吸取上清液待用。

## 1.6 血清指纹图谱方法学研究<sup>[4]</sup>

### 1.6.1 精密度试验

取同一血清供试品溶液,连续进样 5 次,记录色谱图,计算主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 值及相对峰面积的 RSD 值。

### 1.6.2 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24 h 进样,计算主要色谱峰的相对保留时间 RSD 值及相对峰面积 RSD 值。

### 1.6.3 重复性试验

取同一批血清,按上述方面制备 5 份供试液,进样,记录色谱图,计算主要色谱峰的相对保留时间 RSD 值及相对峰面积 RSD 值。

## 1.7 渴络欣胶囊及其含药血清指纹图谱的建立与分析

### 1.7.1 移行成分筛查

参照文献<sup>[5]</sup>取渴络欣空白血清及含药血清供试品,按“1.2”项下所述色谱条件进行 HPLC 分析,建立 HPLC 指纹图谱,采用保留时间及光谱吸收筛查移行入血成分。

### 1.7.2 峰面积-时间变化趋势

取渴络欣空白血清及各时间点含药血清供试品,按“1.2”项下所述色谱条件分析,建立 HPLC 指纹图谱,计算各移行入血成分的峰面积,绘制峰面积-时间曲线,为血清化学成分变化趋势及血清药理学研究提供相关数据。

### 1.7.3 移行成分筛查药材归属

取渴络欣单味药材供试品及各药材血清供试品,按“1.2”项下所述色谱条件分析,建立 HPLC 指纹图谱,采用保留时间及光谱吸收特征对比分析各移行成分的药材归属。

## 2 结果与分析

### 2.1 含药血清指纹图谱方法学考察

取同一血清供试品溶液,连续进样 6 次,测定设备精密性,结果显示主要色谱峰的相对保留时间 RSD 均在 1% 以内,相对峰面积的 RSD 均在 3% 以内。而同一供试品溶液在 0、4、8、12、24 h 进样的稳定性试验显示,主要色谱峰的相对保留时间 RSD 值略有增大,但均在 3% 以内;相对峰面积 RSD 值在 5% 以内。重复性试验保留时间 RSD 值在 3% 以内,相对峰面积 RSD 值在 10% 以内。同一含药血清样品的重复性试验结果如图 1 所示。

### 2.2 渴络欣胶囊移行成分筛查

对渴络欣胶囊空白血清及含药血清指纹图谱进行差示分析,结合色谱峰的保留时间及二极管阵列检测器测定的全波长光谱扫描特征,筛查移行入血成分,共检出移行成分 13 个。如图 2 所示。

### 2.3 相对峰面积-时间变化趋势

据上述移行成分筛查结果,选取渴络欣胶囊移行成分中峰面积最大的 3 个(移行成分 1、移行成分 4、移行成分 11),分析其给药前、后各时间点的峰面积,并绘制峰面积-时间曲线,如图 3 所示。其中移行成分 1、移行成分 11 分别在 60、180 min 出现吸收峰值,提示这两个成分可能存在肠肝循环。而移行成分 4 在 180 min 出现吸收峰值。因此,用于血清

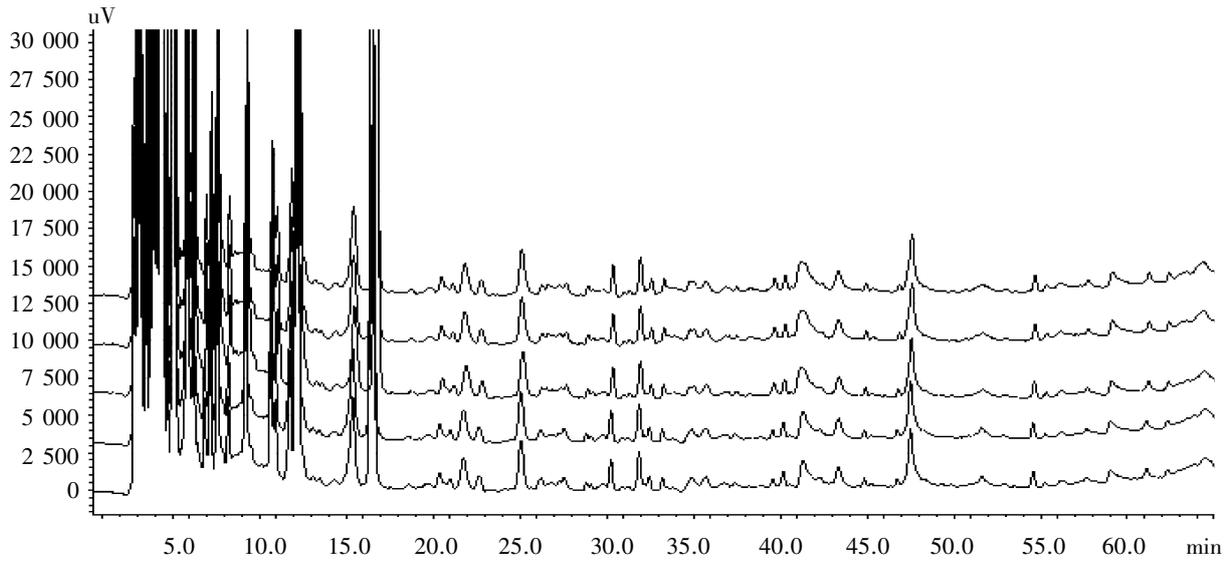


图1 渴络欣胶囊同一批次含药血清指纹图谱

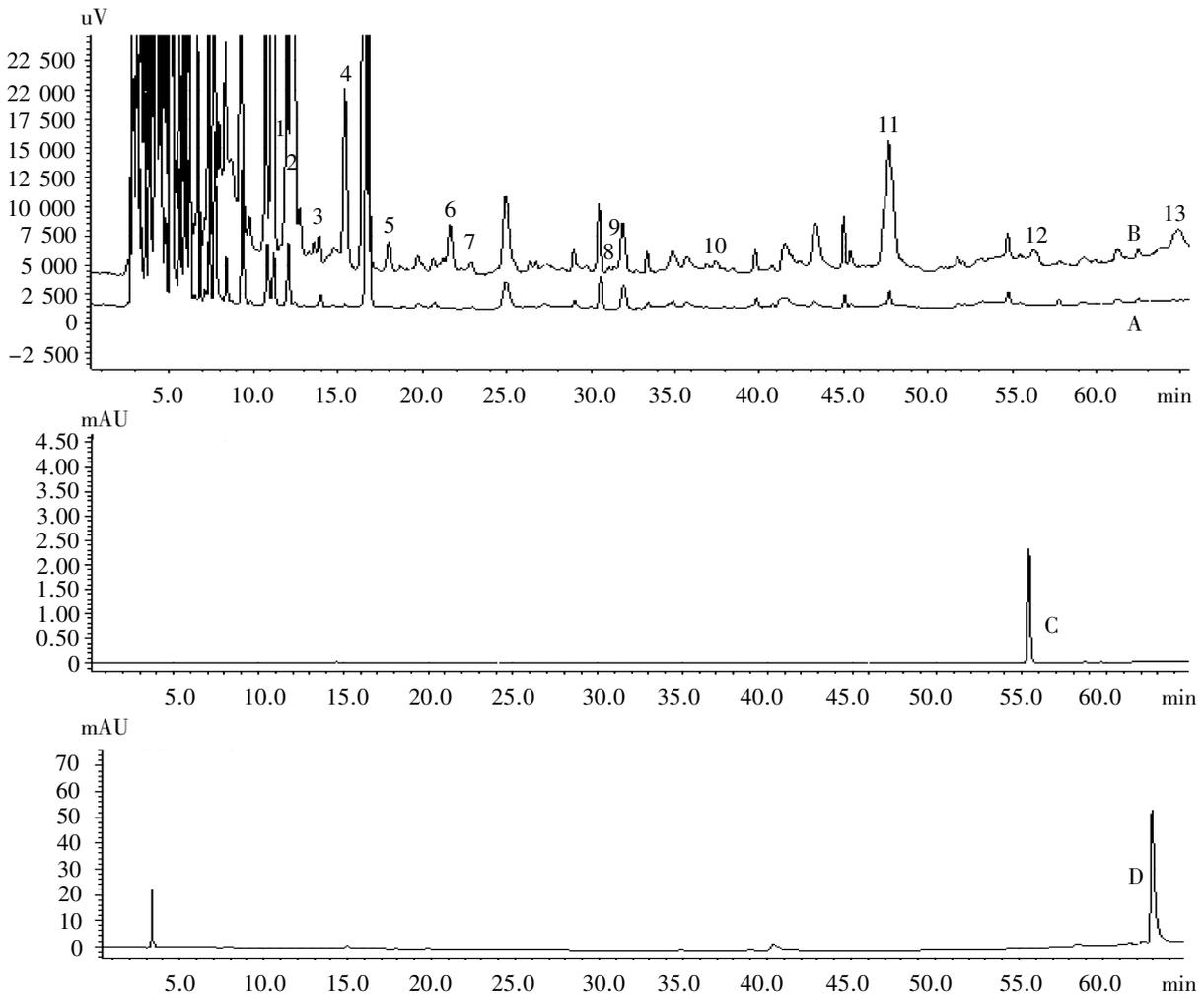


图2 渴络欣胶囊空白血清与含药血清指纹图谱  
注:A.空白血清 B.含药血清 C.芦荟大黄素 D.大黄酸。

化学研究及血清药理研究的相关含药血清的采集时间点选择应重点考虑 60、180 min。

2.4 渴络欣胶囊移行成分药材归属研究分析

上述渴络欣 13 个移行成分的归属研究显示, 移行成分 1、2、5、6、7、10、11、12、13 可在对应药材提取物及药材含药血清中检出, 而移行成分 3、4、8、9 仅能在黄芪、大黄、女贞子含药血清中检出; 由此可知前者为对应药材原型成分, 而后者为代谢成分; 如表 1 所示, 其中移行成分 1、3、9 来源于黄芪, 移行成分 2 来源于枸杞, 移行成分 5 来源于太子参, 移行成分 4、6、7、11、12、13 来源于大黄, 移行成分 8、10 来源于女贞子。而移行成分 12、13 保留时间及光谱图均与对照品芦荟大黄素、大黄酸一致(图 2C、D), 且与对应对照品混合进样, 色谱峰均能完全叠加, 由此确定移行成分 12 为芦荟大黄素, 移行成分 13 为大黄酸。

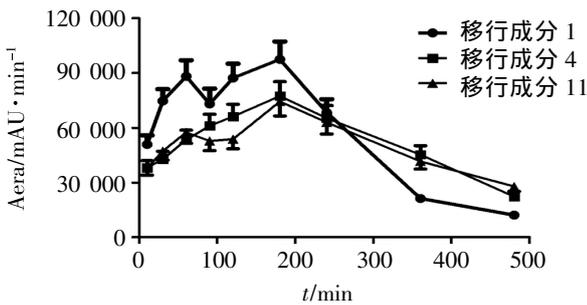


图 3 渴络欣胶囊移行成分 1、4、11 峰面积-时间曲线

表 1 渴络欣胶囊移行成分归属表

移行成分	名称	保留时间/min	来源
1	未知峰	11.1	黄芪
2	未知峰	12.3	枸杞
3	未知峰	13.6	黄芪代谢物
4	未知峰	15.4	大黄代谢物
5	未知峰	18.1	太子参
6	未知峰	21.2	大黄
7	未知峰	21.6	大黄
8	未知峰	31.0	女贞子代谢物
9	未知峰	31.3	黄芪代谢物
10	未知峰	37.3	女贞子
11	未知峰	47.7	大黄
12	芦荟大黄素	56.2	大黄
13	大黄酸	64.9	大黄

3 讨论

渴络欣胶囊为口服给药制剂, 给药后药物成分或经过消化道直接吸收入血; 或经消化液、消化酶及肠内菌群的作用分解成次生代谢产物吸收入血; 或经肝微粒体酶(P450)代谢成有活性的代谢产物。无论经过上述何种途径, 其有效物质大多通过血液输送到靶组织, 从而产生药理作用。因此, 研究血清药物化学对探明药效物质意义重大。目前, 血清移行成分研究常以 LC-MS 为研究手段开展, 但本研究预试验显示渴络欣胶囊中多个成分在同一 LC-MS 条件下无响应; 由此, 为获得渴络欣胶囊血清化学的概貌首先采用 LC-DAD 模式进行研究, 后期再结合 LC-MS 开展针对特定成分的深入研究。

目前已有大量文献对组成渴络欣胶囊的单味中药进行深入研究, 例如大黄提取物对肾脏的保护作用, 其主要成分为大黄素和大黄酸<sup>[6]</sup>。黄芪提取物具有降低蛋白尿, 改善肾小球结构异常的作用<sup>[7]</sup>, 主要物质基础为其总黄酮、总皂苷类成分。其余几味药物也有干预糖尿病肾病作用的相关报道。在移行入血成分的归属研究中, 移行成分 1、3、9 来源于黄芪, 移行成分 2 来源于枸杞, 移行成分 5 来源于太子参, 移行成分 4、6、7、11、12、13 来源于大黄, 移行成分 8、10 来源于女贞子; 其中移行成分 12 为芦荟大黄素、移行成分 13 为大黄酸, 由此提示各药材的移行入血成分与各药味的作用具有一定的相关性。然而本研究尚未对其它移行成分进行鉴定, 后续工作将进一步采用活性研究与成分分离相结合的方法对渴络欣胶囊的移行成分进行系统研究, 以进一步确定其药效物质基础, 从而为其作用机制的研究、生产工艺的改进、质量控制的优化及临床运用提供切实有效的依据与指导。

参考文献

- 王喜军, 张宁, 孙晖, 等. 六味地黄丸的血清药物化学研究. 中国天然药物, 2004, 2(4): 219-222.
- 杨奎, 蒲旭峰. 中药血清药化学与中药血清药理学协同研究方法初探. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 41-44.
- Wu K Y, Liang G Y, Jin F Y, et al. Thoughts and methods in study on material foundation of medicinal effectiveness of compound prescriptions of chinese medicine. World Sci Tech -Moder Tradit Chinese Med, 2003, 5(6): 13-15.
- 雷志丹, 雷志钧, 夏新华. 川芎血清药物化学的初步研究. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 96-99.

- 5 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2002, 4(2): 1-4, 7-8.
- 6 唐宗琼. 大黄及其复方治疗糖尿病肾病的研究进展. 四川生理科学杂志, 2004, 26(4): 157-159.
- 7 程晖, 贾汝汉, 刘红燕, 等. 黄芪对糖尿病大鼠肾脏的保护作用. 中国医师杂志, 2006, 8(10): 1349-1351.

### Study on Serum Pharmacochimistry of *Ke-Luo-Xin* Capsule

Wu Jianming<sup>1, 2</sup>, Zhang Zhirong<sup>1</sup>, Zhang Hongcheng<sup>2</sup>, Ke Xiao<sup>2</sup>, Hao Xiaofeng<sup>2</sup>, Gao Xiaoping<sup>2</sup>

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. KangHong Pharmaceutical Group, Chengdu 610036, China)

**Abstract:** This article was aimed to study the main effective substances and characteristics of *Ke-Luo-Xin* (KLX) capsule. HPLC-DAD system was applied in the establishment of HPLC finger prints of serum of rats after taking KLX capsule. And then, serum samples taken KLX capsule, blank blood serum, and single crude drugs were compared. Constituents absorbed into the serum were determined by HPLC-DAD system. The results showed that methods for serum HPLC fingerprinting had good precision, reproducibility and stability. A total of 13 constituents migrating to the blood were detected, of which 9 were prototype constituents, 4 were metabolites. Prototype constituents included aloemodin and chrysophanic acid. It was concluded that 13 constituents migrating to the blood may be the main effective substances of KLX capsule.

**Keywords:** *Ke-Luo-Xin* capsule, aloemodin, RP-HPLC, serum pharmacochimistry

(责任编辑:曹翠玲 张志华, 责任译审:王 晶)