

基于体内过程的关黄柏在知柏地黄丸等类方配伍环境下血中移行成分分析*

李先娜, 邹 迪, 李冰冰, 闫广利, 王美佳, 刘志东, 张爱华, 孙 晖**

(黑龙江中医药大学国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心 / 国家中医药管理局中药血清药物化学重点研究室 / 中美中医方证代谢组学技术合作中心 哈尔滨 150040)

摘 要:目的:本研究主要探讨了关黄柏在特定配伍环境下血中移行成分与功效取向的相关性。方法:研究应用 UPLC-HD-MS/MS 联用技术建立关黄柏及知柏地黄丸等类方口服给药后大鼠血中移行成分分析方法。采用主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)阐明不同的方剂配伍环境下关黄柏体内成分表达的差异,探索与关黄柏功效显著相关的潜在药效物质基础。结果:关黄柏在知柏地黄丸等类方中出现了 23 个共有血中移行成分,OPLS-DA 分析充分挖掘了 7 个与关黄柏退虚热功效显著相关的血中移行成分及 6 个与关黄柏清热燥湿功效显著相关的血中移行成分。结论:本研究首次建立关黄柏在知柏地黄丸等类方中体内成分分析方法,初步阐明了关黄柏在类方中的配伍规律及其发挥退虚热及清热燥湿功效的药效物质基础。

关键词:关黄柏 清热燥湿 退虚热 血中移行成分 药效物质基础 中药血清药物化学
doi:10.11842/wst.2016.10.012 中图分类号:R285 文献标识码:A

中药方剂配伍规律研究是中医药现代化研究的重要组成部分,研究表明中药的有效成分需要在特定的配伍环境下才能形成相对稳定的药效物质基础^[1-4]。黄柏为芸香科植物黄树皮 *Phellodendron chinense* Schneid 或 黄 檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮,前者习称“川黄柏”后者习称“关黄柏”,为临床常用中药材^[5]。历史上关黄柏在金元之后为黄柏的道地药材,其清热燥湿、泻火解毒、退虚热功效得到深入发挥。《本草衍义补遗》中记载:“(黄柏)得知母滋阴降火,得苍术除湿清热”。关黄柏配伍知母组成的疗本滋肾丸是关黄柏退虚热代表方剂之一,主治肾虚目眩。滋肾丸在疗本滋肾丸方剂组成基础上加以少量肉桂,主治肾虚蒸热、脚膝无力、阴痿阴汗等。大补阴丸由黄柏、知母、熟地黄、醋

龟板和猪脊髓配伍组成,主治水亏火炎、耳鸣耳聋、咳逆虚热。知柏地黄丸由知母、熟地黄、黄柏、山茱萸(制)、山药、牡丹皮、茯苓和泽泻配伍组成,主治阴虚火旺、口干咽痛等症。从疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸和知柏地黄丸的方剂组成可以看出,关黄柏与知母相互配伍后其退虚热功效才得以有效发挥。二妙丸由黄柏与苍术配伍组成,主治湿热下注、阴囊湿痒等症。三妙丸在二妙丸方剂组成基础上配伍牛膝,主治湿热下注所致的麻痹,症见下肢沉重、小便黄少等。四妙丸在三妙丸基础上配伍薏苡仁,侧重于治疗湿热下注所致的痹症,症见足膝红肿、筋骨疼痛等。关黄柏在二妙丸、三妙丸和四妙丸等类方中均发挥清热燥湿功效。

文献报道关黄柏中有效成分主要为生物碱类、柠檬苦素类、黄酮类、香豆素类等成分,如:小檗碱(Berberine)、药根碱(Jatrorrhizine)、黄柏内酯

收稿日期 2016-09-19

修回日期 2016-09-26

* 国家自然科学基金面上项目(81173500):基于知柏地黄丸配伍环境的关黄柏治疗肾阴虚相火亢盛的药效物质基础研究;负责人:孙晖。

** 通讯作者:孙晖,教授,博士生导师,主要研究方向:中药质量标准化研究、中药及天然药物体内过程的研究。

(Obaculactone)、黄柏酮(Obacunone)等^[6-10]。为了更好地阐释关黄柏系列类方配伍的科学内涵,本研究基于中药血清药物化学理论与研究方法,选取有关关黄柏发挥清热燥湿功效的代表类方二妙丸、三妙丸、四妙丸,选其退虚热功效的代表类方疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸和知柏地黄丸^[11-15]。通过对不同配伍环境下关黄柏血中移行成分的变化进行分析,探究关黄柏在类方中的配伍规律及其发挥不同功效的体内药效物质基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪(美国 Waters 公司);Waters Synapt™ High Definition MS (HDMS/MS) System 质谱仪(美国 Waters 公司),配备电喷雾离子源(ESI 源);MassLynx V4.1 工作站(美国 Waters 公司);Thermo Sorvall ST 16R 低温超高速离心机(美国 Thermo 公司);Nichipet EX 微量取样器(日本 NICHIRYO 公司);PB1501-N 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

雄性 Wistar 大鼠(清洁级),体质量 250 ± 10 g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK 黑 2013012。知母(盐炒) *Anemarrhena asphodeloides* Bge、熟地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch、山茱萸 *Corous officinalis* Sieb.et Zucc、牡丹皮 *Paeonia suffruticosa* Andr、山药 *Dioscorea opposita* Thunb、茯苓 *Poria cocos* Wolf、泽泻 *Alisma orientalis* Juzep、肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl、醋龟甲 *Chinemys reevesii* Gray、苍术 *Rhizoma Atractylodis*、牛膝 *Radix Achyranthis Bidentatae*、薏苡仁 *Semen Coicis* (北京同仁堂哈尔滨药店)、黄柏(盐炒) *Phellodendron amurense* Rupr. (哈尔滨世一堂药店),以上药材购自北京同仁堂药店哈尔滨分店及哈尔滨世一堂药店,经黑龙江中医药大学药学院生药学教研室王喜军教授鉴定为正品。乙腈(色谱级,德国 Merck 公司);甲酸(色谱级,天津科密欧化学试剂有限公司);甲醇(分析级,天津市富宇精细化工有限公司);蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司);亮氨酸脑啡肽(美国 Sigma 公司)。

1.2 实验动物分组与给药

雄性 Wistar 大鼠(清洁级)于实验前禁食 16 h(不禁水),置于饲养温度 $24 \pm 3^\circ\text{C}$,湿度 65%–75% 的环

境中,禁食前自由摄食饮水。按照体质量随机分为空白组、关黄柏组、疗本滋肾丸组、滋肾丸组、大补阴丸组、知柏地黄丸组、二妙丸组、三妙丸组、四妙丸组,每组各 3 只。称取关黄柏、疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸、二妙丸、三妙丸、四妙丸超微粉超微粉适量,加适量 0.5% 的 CMC-Na 溶液溶解,并超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,制成浓度分别为 0.081、0.162、0.165、0.567、0.162、0.243、0.243 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的灌胃溶液,含盐关黄柏的浓度均为 0.081 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。中药治疗各组大鼠以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予灌胃药液,空白组大鼠给予等体积 CMC-Na 溶液。给药后 60 min 用 3% 戊巴比妥钠 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉,经肝门静脉取血。

1.3 样品制备

1.3.1 体外供试品溶液制备

按原方配比精密称定关黄柏、疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸、知柏地黄丸、二妙丸、三妙丸、四妙丸超微粉适量置具塞锥形瓶中,各方剂关黄柏含量为 0.25 g,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,降至 $10\text{--}30^\circ\text{C}$,再称定质量,用甲醇补足减失的质量、摇匀,取上清液过 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜,取续滤液,即为负离子模式下的供试品溶液。另取滤液 10 mL,加甲醇稀释 16 倍,取上清液过 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜,取续滤液,即为正离子模式下的供试品溶液。

1.3.2 血清样品的制备

血液样品在 $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心 15 min。取上清液 2 mL,精密加入 40 μL 磷酸,超声处理 1 min,涡旋混匀 30 s 后上样到预先以 2 mL 甲醇、2 mL 水活化平衡好的 HLB 固相萃取小柱上,以 2 mL 水淋洗,淋洗液弃去,再以 2 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液, 40°C 下氮气流吹干,残渣以 150 μL 60% 甲醇溶解,在 4°C 、13 000 rpm 条件下离心 15 min,取上清液供 UPLC-HD-MS/MS 分析。

1.4 数据采集

血清样品预处理后经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,取上清液供 UPLC-HD-MS/MS 分析。色谱条件 Waters ACQUITY UPLC™ HSS T3 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$);流动相 0.1% 甲酸乙腈(A)–0.1% 甲酸水(B),梯度洗脱条件 0–1.5 min, 2%–16% A;1.5–8 min, 16%–20% A;8–11 min, 27%–30% A;11–15 min, 30%–70% A;15–20 min, 70%–99% A;流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 柱

温 30℃ 样品室温度 4℃ 进样量 5 μL 。质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子(ESI⁺、ESI⁻)两种模式采集数据。正离子模式质谱条件:毛细管电压:3 000 V;锥孔采样电压 30 V;锥孔提取电压 3.0 V;去溶剂气温度 350℃;去溶剂气流量 600 L·h⁻¹;锥孔气流量 50 L·h⁻¹;离子源温度 110℃。负离子模式质谱条件:毛细管电压 2 800 V;锥孔采样电压 40 V;锥孔提取电压 2.0 V;去溶剂气温度 350℃;去溶剂气流量 600 L·h⁻¹;锥孔气流量 50 L·h⁻¹;离子源温度 110℃。扫描方式为全扫描,质量数据采集范围 m/z 50–1 300 Da;亮氨酸-脑啡肽溶液(Leucine-Enkephalin)为质量锁定溶液。

1.5 血中移行成分鉴定

利用 Waters Masslynx 软件提供的 Strip 背景扣除工具,以空白血清图谱为对照,对含药血清 UPLC-HD-MS 图谱进行背景扣除,剔除大部分干扰峰,再进行直观的峰比对,通过与关黄柏药材体内成分色谱峰进行比对,确定关黄柏血中移行成分峰。采集 UPLC-HD-MS/MS 色谱图,对二级质谱数据的解析进行峰的鉴定,比较含药血清与体外样品的色谱图,筛选相同的化合物峰,即为吸收入血的原型成分,在体外样品色谱图中没有被检测的化合物色谱峰则为代谢产物,最后对关黄柏在各个类方中体内化学成分的数量与量的变化及其规律进行分析。

2 结果

2.1 UPLC-HDMS 图谱采集

空白组血清与关黄柏、疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸、知柏地黄丸、二妙丸、三妙丸、四妙丸含药血清总离子流典型图谱见图 1。

2.2 血中移行成分鉴定

采用 UPLC-HD-MS/MS 技术平台及 MassLynx 分析软件中背景扣除技术(Strip)对关黄柏及知柏地黄丸等类方血中移行成分进行分析,用含药血清总离子流图扣除空白血清总离子流图,减少干扰,扣除后的总离子流图再与空白血清总离子流图直观对比,鉴定关黄柏及知柏地黄丸等类方原型入血成分及体内代谢产物(见表 1)。

2.3 知柏地黄丸等方剂配伍环境下关黄柏血中移行成分变化分析

通过对比发现,关黄柏经过配伍后在不同方剂血中移行成分在体内情况各不相同(见表 2),其中

M13(三棱酸葡萄糖醛酸结合物)为关黄柏配伍知母后选择性吸收入血成分, γ -羟基丁烯酸内酯 II 和吴茱萸苦素仅在关黄柏退虚热功效方剂疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸和知柏地黄丸中选择性吸收入血,M14(黄柏内酯 A/B 葡萄糖醛酸结合物)为关黄柏通过配伍苍术组成清热燥湿功效方剂二妙丸、三妙丸、四妙丸后特有关黄柏体内代谢物。推测关黄柏发挥退虚热功效特有的药效物质基础为 γ -羟基丁烯酸内酯 II 和吴茱萸苦素,发挥清热燥湿功效特有的药效物质基础为 M14(黄柏内酯 A/B 葡萄糖醛酸结合物)。

2.4 知柏地黄丸等方剂配伍环境下关黄柏配伍规律研究

结果显示关黄柏血中移行成分多数都在知柏地黄丸等方剂配伍环境下存在,仅有 γ -羟基丁烯酸内酯 II、吴茱萸苦素、M13(三棱酸葡萄糖醛酸结合物)、M14(黄柏内酯 A/B 葡萄糖醛酸结合物)等成分在两类方剂中有选择性吸收,难以解析类方配伍对中药成分在体内直接作用物质的影响。为进一步发现其差异,利用多变量统计分析方法的主成分分析法(PCA)对血中移行成分在各方剂配伍环境下的表达水平进行了无歧视的聚类分析,观察在各方剂配伍环境下关黄柏化学成分在体内整体表达水平(见图 2)。结果显示各组样品能明显聚为滋肾丸组、疗本滋肾丸组、大补阴丸组、知柏地黄丸组、二妙丸组、三妙丸组、四妙丸组,表明关黄柏在不同方剂配伍环境下体内整体表达水平发生改变,同时可以看到二妙丸组、三妙丸组、四妙丸组又可以聚为一个大组,滋肾丸组、疗本滋肾丸组、大补阴丸组、知柏地黄丸组另可以聚为一个大组,表明关黄柏成分在发挥同一功效时会有相同的体内表达成分。

将二妙丸、三妙丸、四妙丸归为清热燥湿功效组,疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸、知柏地黄丸归为退虚热功效组,运用 OPLS-DA 分析两类方剂配伍环境下关黄柏血中移行成分表达水平的差异,寻找与关黄柏在类方中发挥清热燥湿和退虚热功效相关的血中移行成分。OPLS-DA 分析的得分图见图 3,图中两组样品明显分为两类,进一步在 S-plot 图的两侧选择对各组贡献较大的成分。筛选出关黄柏退虚热功效方剂 7 个高表达血中移行成分,包括 γ -羟基丁烯酸内酯 II、吴茱萸苦素、未知(C₂₉H₃₈NO₁₂)、蝙蝠葛碱、木兰碱、四氢巴马汀、黄柏碱,清热燥湿功

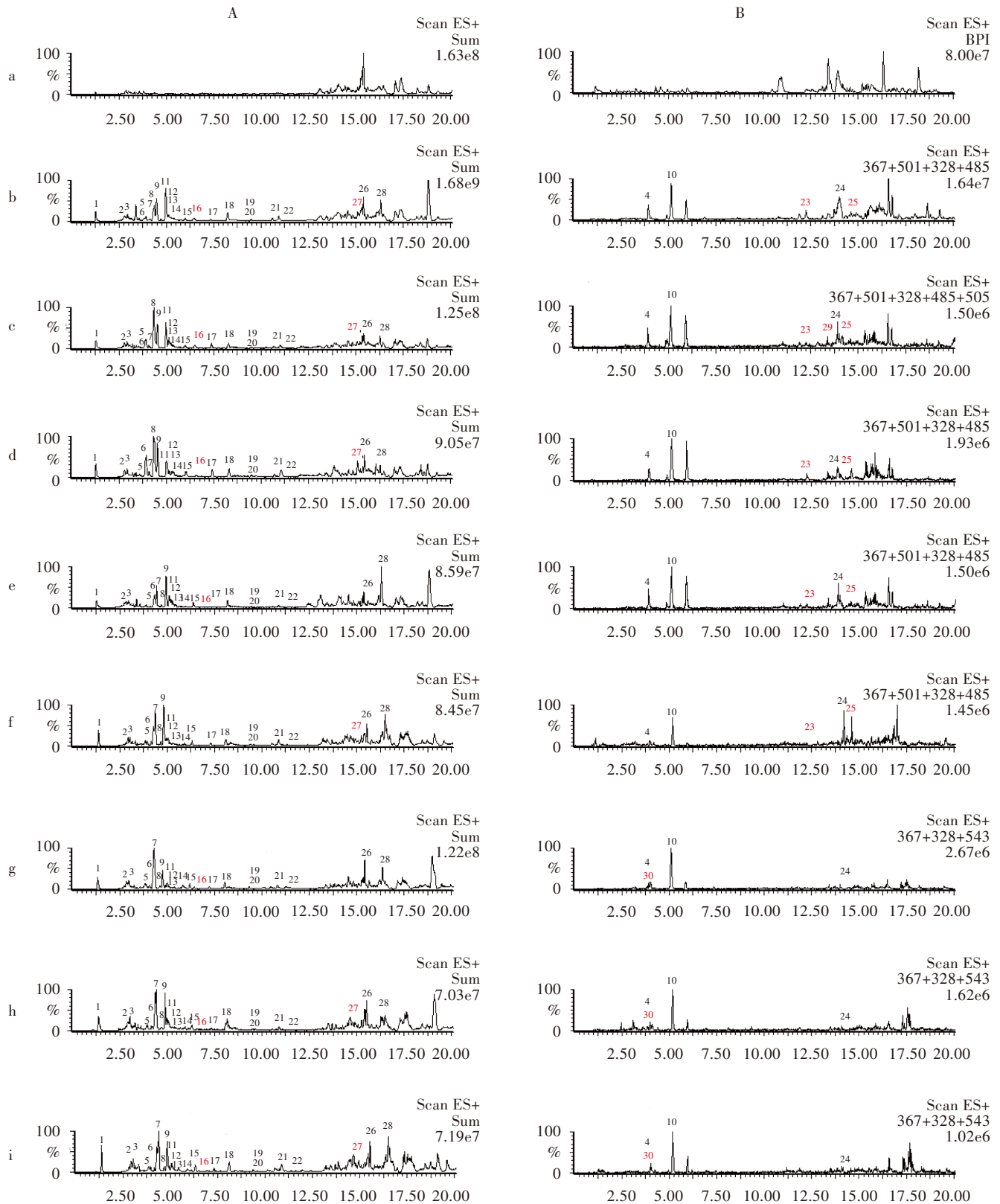


图1 空白血清与关黄柏、疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸、知柏地黄丸、二妙丸、三妙丸、四妙丸含药血清总离子流图

注：A. 正离子模式，B. 负离子模型，a. 空白血清，b. 关黄柏含药血清，c. 疗本滋肾丸含药血清，d. 滋肾丸含药血清，e. 大补阴丸含药血清，f. 知柏地黄丸含药血清，g. 二妙丸含药血清，h. 三妙丸含药血清，i. 四妙丸含药血清。

表 1 关黄柏在知柏地黄丸等类方配伍环境下血中移行成分鉴定

序号	保留时间	相对分子量	结构式	MS2	成分鉴定
1	1.30	474.174 3	C ₂₄ H ₂₈ NO ₉	298, 283, 237	M1 (去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)
2	2.79	474.174 3	C ₂₄ H ₂₈ NO ₉	298, 283, 237	M2 (去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)
3	2.91	518.202 6	C ₂₃ H ₃₂ NO ₁₀	518, 342, 192, 177	M3 (木兰碱葡萄糖醛酸结合物)
4	4.01	367.101 9	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	367, 193, 134	黄柏内酯 A/B
5	4.03	342.165 8	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	297, 265, 192, 177, 149	黄柏碱
6	4.05	592.092 0	C ₂₉ H ₃₈ NO ₁₂	592, 533	未知
7	4.11	384.127 8	C ₁₇ H ₂₂ NO ₉	384, 208, 151	M4 (罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)
8	4.44	342.165 7	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	342, 297, 265, 265, 192	木兰碱
9	4.50	532.180 5	C ₂₇ H ₃₃ NO ₁₀	532, 356	M5 (四氢巴马汀葡萄糖醛酸结合物)
10	5.10	367.204 5	C ₂₂ H ₁₈ N ₁₁ O ₄	191, 173, 134	3-O-阿魏酰奎宁酸
11	5.12	500.153 4	C ₂₂ H ₁₈ N ₁₁ O ₄	500, 324, 309	M6 (去亚甲基小檗碱葡萄糖醛酸结合物)
12	5.23	514.197 8	C ₂₆ H ₂₈ NO ₁₀	514, 338, 323, 322, 294	M7 (药根碱葡萄糖醛酸结合物)
13	5.27	314.024 7	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	314, 239, 107	牛角花素
14	5.47	497.961 7	C ₂₅ H ₂₃ NO ₁₀	498, 322, 307	M8 (去羟甲基巴马汀葡萄糖醛酸结合物)
15	5.89	497.992 1	C ₂₅ H ₂₃ NO ₁₀	498, 322, 307	M9 (去甲基小檗碱葡萄糖醛酸结合物)
16	6.31	356.186 7	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	311, 296, 279, 191, 178	蝙蝠葛碱
17	7.66	356.185 9	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄	192, 177	四氢巴马汀
18	8.91	370.203 1	C ₂₀ H ₂₀ NO ₆	370, 352, 336, 308	M10 (羟基巴马汀葡萄糖醛酸结合物)
19	9.35	338.138 1	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	338, 323, 279	非洲防己碱
20	9.48	354.089 8	C ₁₉ H ₁₆ NO ₆	354, 336, 320, 292	M11 (羟基小檗红碱葡萄糖醛酸结合物)
21	10.89	352.154 8	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	336, 320, 308, 294, 278	巴马汀
22	11.32	336.123 1	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	320, 306, 292, 278	小檗碱
23	12.25	501.069 6	C ₁₉ H ₃₄ O ₁₅	457, 413, 395, 371	γ-羟基丁烯酸内酯 II
24	14.21	328.864 3	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	229, 211, 171	三棱酸
25	14.65	485.207 3	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	485, 467, 432	吴茱萸苦素
26	15.22	471.201 4	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	453, 425, 367, 312	黄柏内酯
27	15.10	473.217 4	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	473, 455, 427	M12 (黄柏内酯还原产物)
28	16.23	455.207 8	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	437, 411, 409, 359	黄柏酮
29	13.66	505.267 7	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₁	505, 329, 311	M13 (三棱酸葡萄糖醛酸结合物)
30	4.00	543.136 0	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₅	543, 367	M14 (黄柏内酯 A/B 葡萄糖醛酸结合物)

表 2 关黄柏在知柏地黄丸配伍环境下血中移行成分变化

鉴定成分	关黄柏	疗本滋肾丸	滋肾丸	大补阴丸	知柏地黄丸	二妙丸	三妙丸	四妙丸
M1	★	★	★	★	★	★	★	★
M2	★	★	★	★	★	★	★	★
M3	★	★	★	★	★	★	★	★
黄柏内酯 A/B	★	★	★	★	★	★	★	★
黄柏碱	★	★	★	★	★	★	★	★
未知	★	★	★	★	★	★	★	★
M4	★	★	★	★	★	★	★	★
木兰碱	★	★	★	★	★	★	★	★
M5	★	★	★	★	★	★	★	★
M6	★	★	★	★	★	★	★	★
M7	★	★	★	★	★	★	★	★
牛角花素	★	★	★	★	★	★	★	★
M8	★	★	★	★	★	★	★	★
M9	★	★	★	★	★	★	★	★
四氢巴马汀	★	★	★	★	★	★	★	★
M10	★	★	★	★	★	★	★	★
非洲防己碱	★	★	★	★	★	★	★	★
M11	★	★	★	★	★	★	★	★
巴马汀	★	★	★	★	★	★	★	★
小檗碱	★	★	★	★	★	★	★	★
三棱酸	★	★	★	★	★	★	★	★
黄柏内酯	★	★	★	★	★	★	★	★
黄柏酮	★	★	★	★	★	★	★	★
3-O-阿魏酰奎宁酸	★	★	★	★	★	★	★	★
M12	★	★	★	-	★	★	★	★
蝙蝠葛碱	★	★	★	★	-	★	★	★
吴茱萸苦素	★	★	★	★	★	-	-	-
γ-羟基丁烯酸内酯 II	★	★	★	★	★	-	-	-
M13	-	★	-	-	-	-	-	-
M14	-	-	-	-	-	★	★	★

注：★表示共有成分；★表示特有成分。

效 6 个高表达血中移行成分,包括 M1 (去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)、M2 (去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)、M12 (黄柏内酯还原产物)、M14

(黄柏内酯 A/B 葡萄糖醛酸结合物)、三棱酸、3-O-阿魏酰奎宁酸, 差异性成分在各组中的表达水平见图 4。

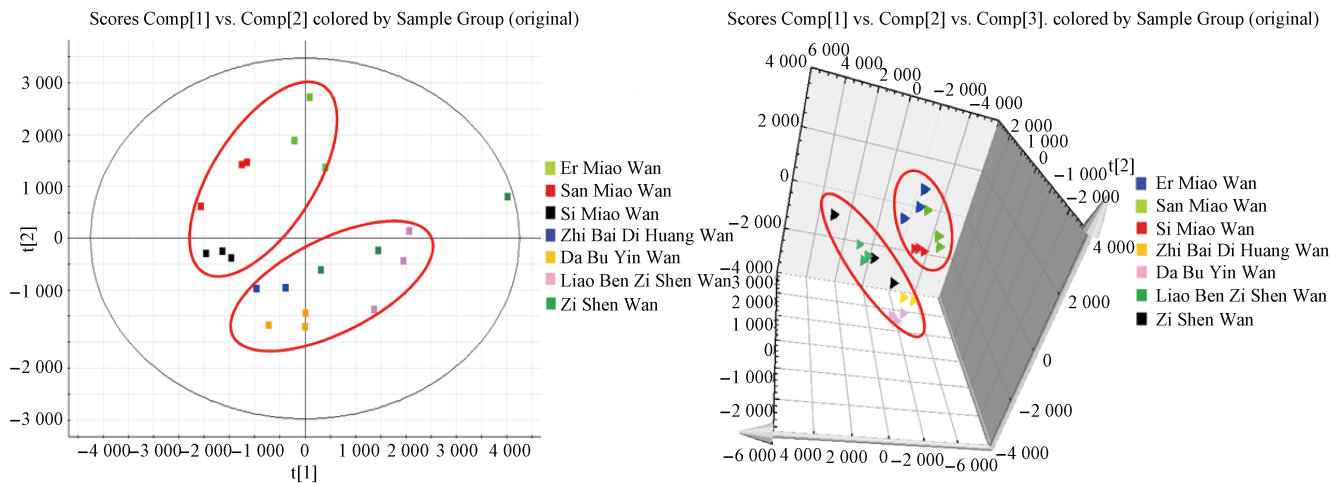


图2 方剂配伍环境下关黄柏血中移行成分的多变量数据分析

注:A:PCA得分图;B:3D得分图。

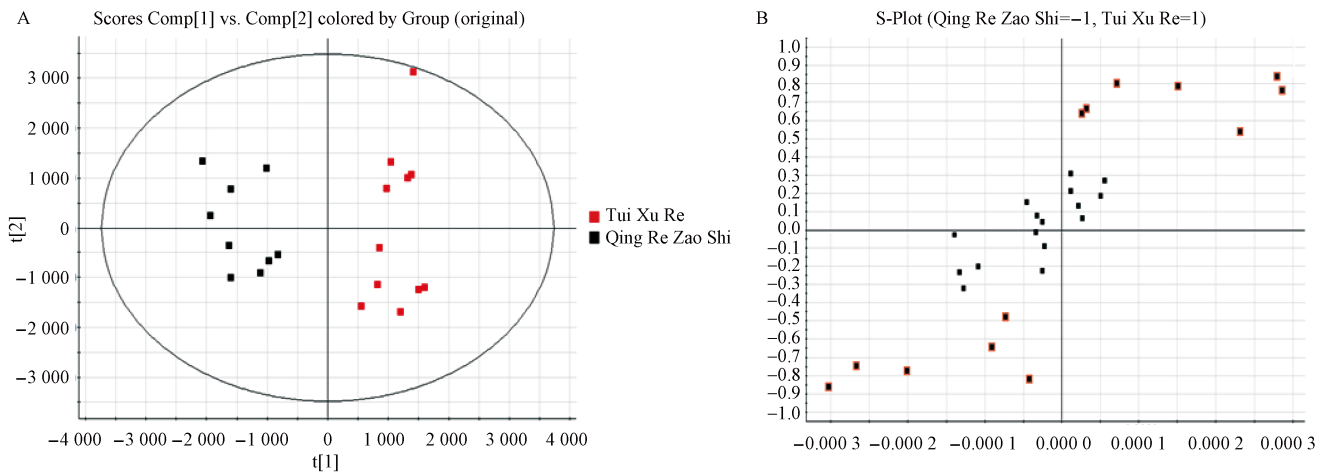


图3 知柏地黄丸等类方配伍环境下关黄柏血中移行成分体内表达水平 OPLS-DA 分析

注:A 图为 OPLS-DA 的得分图,B 图为 S-Plot 图 红框标出的点为对 Group 1 和 Group 2 两组分类功效较大的成分。

3 结论

中药的多重功效是在配伍成方的过程中和方剂运用的基础上逐步深化形成的,多味中药按照七情和合、君臣佐使的组方原则相互配伍组成方剂,可以调节其偏性、制其毒性、改变其原有功效^[16]。本研究基于中药血清药物化学理论与研究方法^[17-20],应用 UPLC-HD-MS/MS 技术及 Masslynx 数据处理技术,选用关黄柏退虚热代表类方——疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸、知柏地黄丸,及清热燥湿代表类方——二妙丸、三妙丸、四妙丸,通过对关黄柏在知

柏地黄丸等类方配伍环境下血中移行成分进行分析,初步阐明关黄柏发挥不同功效的体内药效物质基础。本研究首次建立了关黄柏及其知柏地黄丸等类方中体内成分分析方法,结果表明不同配伍环境下关黄柏 30 个血中移行成分在体内吸收各不相同,其中 M12、M13、M14、蝙蝠葛碱、吴茱萸苦素、 γ -羟基丁烯酸内酯 II、3-O-阿魏酰奎宁酸在不同方剂中选择性吸收。通过对口服关黄柏及大补阴丸等方剂后大鼠肝门静脉血液进行采集,在避免肝药酶等因素影响下全面考察关黄柏在不同方剂配伍

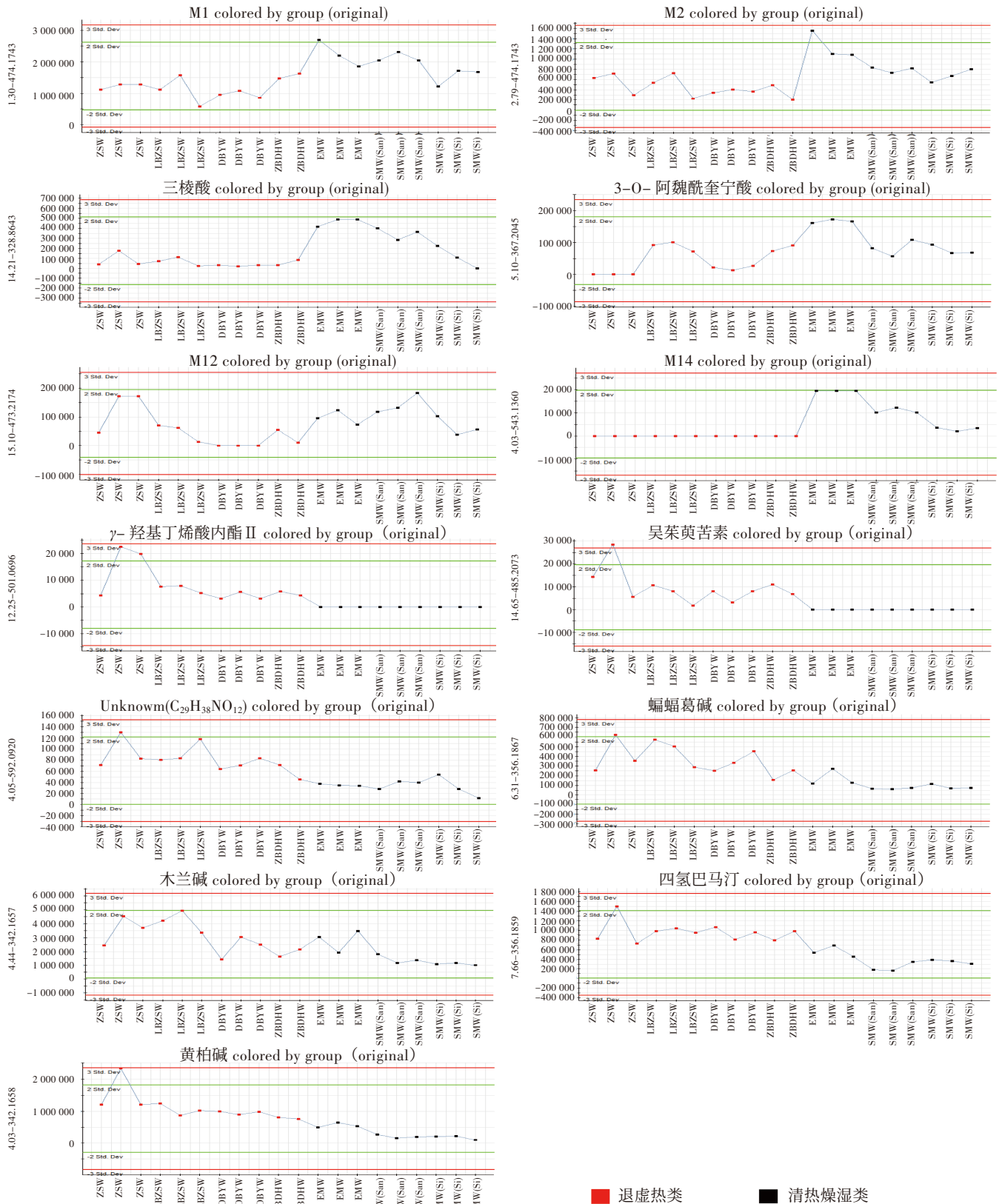


图4 OPLS-DA 分析筛选的差异血中移行成分趋势图

注 ZSW, 滋肾丸 LBZSW, 疗本滋肾丸 DBYW, 大补阴丸 ZBDHW, 知柏地黄丸 EMW, 二妙丸 SMW (San), 三妙丸 SMW (Si), 四妙丸。

环境下选择性吸收入血的原型成分及其代谢物。结果显示关黄柏在配伍知母和苍术所组成的类方中, 药物在体内相互作用产生特有代谢产物, 如: 小檗碱、木兰碱、药根碱、巴马汀、罂粟碱、黄柏内酯等成分在体内产生葡萄糖醛酸结合代谢物, 其中 M13(三棱酸葡萄糖醛酸结合物) 为关黄柏配伍知母后在体内选择性吸收的代谢产物, M14(黄柏内酯 A/B 葡萄糖醛酸结合物) 为关黄柏配伍苍术后所产生的特有代谢产物, M1(去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)、M2(去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物) 和 M12(黄柏内酯还原产物) 为关黄柏在清热燥湿类方中体内高表达药物代谢产物。PCA 结果显示关黄柏血中移行成分的整体表达水平与方剂配伍具有显著相关性。因此, 关黄柏在二妙丸、三妙丸、四妙丸中发挥清热燥湿功效, 而在疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸及知柏地黄丸中发挥退虚热功效, 功

效取向不同是关黄柏血中移行成分整体表达的结果, 而不是与特定某个成分产生药理作用的结果。OPLS-DA 分析充分挖掘了与关黄柏清热燥湿功效和退虚热功效显著相关的 13 个潜在药效物质基础, 即关黄柏发挥清热燥湿功效的 6 个潜在药效物质基础为 M1(去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)、M2(去羟甲基罂粟碱葡萄糖醛酸结合物)、M12(黄柏内酯还原产物)、M14(黄柏内酯 A/B 葡萄糖醛酸结合物)、三棱酸、3-O-阿魏酰奎宁酸, 及关黄柏发挥退虚热功效的 7 个潜在药效物质基础 γ -羟基丁烯酸内酯 II、吴茱萸苦素、未知($C_{29}H_{38}NO_{12}$)、蝙蝠葛碱、木兰碱、四氢巴马汀、黄柏碱。本部分实验阐明了关黄柏发挥退虚热和清热燥湿功效的体内潜在药效物质基础, 为关黄柏的深入研究提供了科学的实验数据, 同时为中药现代化研究提供新的研究思路与方法。

参考文献

- Jia L, Zhao Y, Wang J, *et al.* Study on the complex prescription compatibility law of the cold and hot nature of Mahuang Decoction and its categorized formulae based on the cold-hot pad differentiating assay. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(4):290-295.
- Zhang Y, Lin Z, Wang J, *et al.* Formula compatibility identification of Dachengqi Decoction based on the effects of absorbed components in cerulein-injured pancreatic AR42J cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016(3):1-8.
- 郝明芬, 范颖, 李新, 等. 黄芩葛根配伍对糖尿病大鼠胰腺组织脂联素及其受体的影响和交互效应. *中医药导报*, 2016, 22(5):7-9.
- Zhang A, Sun H, Wang X. Potentiating therapeutic effects by enhancing synergism based on active constituents from traditional medicine. *Phytother Res*, 2014, 28(4):526-533.
- Zhang Z, Zhang Y, Zhang Z, *et al.* Comparative analysis of DNA barcoding and HPLC fingerprint to trace species of Phellodendri Cortex, an important traditional Chinese Medicine from multiple sources. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(8):1325-1330.
- Shi H, Peng S, Sun J, *et al.* Selective extraction of berberine from Cortex Phellodendri using polydopamine-coated magnetic nanoparticles. *J Sep Sci*, 2014, 37(6):704-710.
- Yuan Y, Tao Z, Liu J, *et al.* Identification of Cortex Phellodendri by fourier-transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, 31(5):1258-1261.
- Wang W, Li Q, Liu Y, *et al.* Ionic liquid-aqueous solution ultrasonic-assisted extraction of three kinds of alkaloids from *Phellodendron amurense* Rupr., and optimize conditions use response surface. *Ultrason Sonochem*, 2014, 24(5):13-18.
- Sun H, Liu J, Zhang A, *et al.* Characterization of the multiple components of Acanthopanax Senticosus stem by ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2015, 39(3):496-502.
- Sun H, Wang H, Zhang A, *et al.* Chemical discrimination of cortex phellodendri amurensis and cortex phellodendri chinensis by multivariate analysis approach. *Pharmacogn Mag*, 2015, 12(45):1-9.
- Zhang Y, Zhang A, Zhang Y, *et al.* Application of ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for the rapid analysis of constituents and metabolites from the extracts of acanthopanax senticosus harms leaf. *Pharmacogn Mag*, 2015, 12(46):145-152.
- Yan G, Zou D, Zhang A, *et al.* UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting for rapid identification of the chemical constituents of Ermiao Wan. *Anal Methods*, 2015, 7:846-862.
- Zou D, Zhang A, Yan G, *et al.* UPLC/MS coupled with a dynamic multiple data processing method for comprehensive detection of chemical constituents of herbal San-Miao-Wan formula. *Analytical Methods*, 2014, 6(9):2848-2854.
- 李先娜. 关黄柏在大补阴丸等类方中体内成分分析. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学硕士学位论文, 2014:6-8.
- 邹迪. 二妙丸等含黄柏类方体内成分分析. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学硕士学位论文, 2014:7-11.
- 张爱华, 孙晖, 闫广利, 等. 中药有效性评价与药效物质基础研究. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18(5):719-723.
- 闫广利, 孙晖, 张爱华, 等. 中药血清药物化学研究概况及其理论和方法拓展. *中国中药杂志*, 2015, 40(17):3406-3412.

- 18 Wang X, Zhang A, Zhou X, *et al.* An integrated chinmedomics strategy for discovery of effective constituents from traditional herbal medicine. *Sci Rep*, 2016, 6:18997.
- 19 Wang X, Zhang A, Sun H, *et al.* Discovery and development of innovative drug from traditional medicine by integrated chinmedomics strategies in the post-genomic era. *Trac-Trend Anal Chem*, 2016, 76: 86–94.
- 20 Sun H, Liu J, Zhang A, *et al.* Characterization of the multiple components of *Acanthopanax Senticosus* stem by ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2016, 39(3): 496–502.

Serum Constituents Analysis of *Phellodendron Amurense* Rupr. Based on Zhi Bai Di Huang Wan and Its Formula Series

Li Xianna, Zou Di, Li Bingbing, Yan Guangli, Wang Meijia, Liu Zhidong, Zhang Aihua, Sun Hui

(Research Center of Chinmedomics–State Administration of TCM–Laboratory of Metabolomics / National TCM Key Laboratory of Serum Pharmacochemistry / Sino–US Chinmedomics Technology Cooperation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: This study aimed at comparing and analyzing the serum constituents of *Phellodendron amurense* Rupr. (GHB) in Zhi Bai Di Huang Wan (ZBDHW) and its formula series, and then investigating the correlation between serum constituents and effect trend of GHB. Based on the theory of serum pharmacochemistry in traditional Chinese medicine (TCM), UPLC–HD–MS/MS technique was adopted to analyze the serum components of GHB and their metabolites involved in ZBDHW and its formula series. Principal component analysis (PCA) was performed for the further comparative analysis of the contents of serum constituents of GHB from different formulas. Moreover, by means of orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS–DA), the research was carried out on potential efficacy substances which were significantly related to the curative effect of GHB in different compatibility laws. As a result, 28 serum constituents were in aggregate detected in GHB, ZBDHW and its formula series. 13 high expression serum constituents were found out using OPLS–DA analysis with the significant correlation of GHB playing the roles of clearing away heat and drying dampness and reducing asthenia heat, among which 7 serum constituents related to the reduction of asthenia heat, while 6 serum constituents concerned the functions of clearing away heat and drying dampness. It was concluded that the research was preliminarily expounded the compatibility law and the efficacy constituents in different formulas involving GHB.

Keywords: *Phellodendron amurense* Rupr., clear away heat and dry dampness, reduce asthenia heat, serum constituents, efficacy substance, serum pharmacochemistry of traditional Chinese medicine

(责任编辑 :朱黎婷, 责任译审 :朱黎婷)