

三黄汤的血清药物化学初步研究^Δ

李 强^{1*}, 朱晓红^{2#} (1. 辽宁医学院药理学系, 辽宁锦州 121000; 2. 解放军第202医院药剂科, 沈阳 110000)

中图分类号 R917; R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1332-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.12

摘要 目的: 研究三黄汤的血清药物化学。方法: 建立三黄汤及各单味药(茵陈、黄芩、黄柏、甘草、炙大黄)、缺味药水提取物与大鼠 ig 给药后血清成分的高效液相(HPLC)指纹色谱图; 分析三黄汤及各单味药、缺味药水提取物给药不同时间后的入血成分、相对含量、来源及其代谢产物。结果: 建立的三黄汤体外指纹图谱标记出44个主要成分; 大鼠 ig 给予三黄汤后血清指纹图谱标记出32个主要入血成分, 分别为源于茵陈的包括绿原酸在内的4个原型成分及1个绿原酸代谢产物, 源于黄芩的包括黄芩苷在内的16个原型成分及2个代谢产物, 源于黄柏的盐酸小檗碱, 源于甘草的4个原型成分, 源于大黄的大黄酸, 以及未知来源的3个代谢产物。随着给药时间的延长, 绿原酸和黄芩苷等原型成分的相对含量逐渐减少, 而其代谢产物逐渐增加。结论: 血中移行成分主要来源于茵陈和黄芩。

关键词 三黄汤; 血清药物化学; 高效液相指纹图谱

Preliminary Study on Serum Pharmacochimistry of Sanhuang Decoction

LI Qiang¹, ZHU Xiao-hong² (1. Dept. of Pharmacy, Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121000, China; 2. Dept. of Pharmacy, No.202 Hospital of PLA, Shenyang 110000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the serum pharmacochimistry of Shanhuang decoction (SHD). METHODS: HPLC fingerprints of serum components of rats which were ig given the water extracts from SHD, single herb medicines (*Artemisiae Scopariae Herba*, *Scutellaria baicalensis*, *Phellodendron chinense*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Rhei Radix et Rhizoma*) and the medicines without some herb were established. The components in blood, relative contents, sources and metabolites which were detected at different time after the administration of the above-mentioned water extracts were analyzed. RESULTS: 44 main components were marked in the fingerprint of SHD *in vitro*. After the ig administration of SHD, 32 main components into blood were marked in the serum fingerprint, such as 4 prototype components including chlorogenic acid and 1 metabolite from *Artemisiae Scopariae Herba*, 16 prototype components including baicalin and 2 metabolites from *S. baicalensis*, berberine hydrochloride from *P. chinense*, 4 prototype components from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, rhei from *Rhei Radix et Rhizoma*, and 3 metabolites of unknown origin. The contents of the prototype components such as chlorogenic acid and baicalin were gradually decreased by the increasing of administration time, and more and more metabolites would be produced. CONCLUSIONS: The transitional components in blood are mainly derived from *A. Thunb* and *S. baicalensis*.

KEYWORDS Sanhuang decoction; Serum pharmacochimistry; HPLC fingerprint

本研究结果表明, 倒心盾翅藤有显著的抗结石活性。结合本单位研究人员进行的倒心盾翅藤化学成分预实验^[9], 可推测其水提液和95%醇提液中均有可能存在抗结石的活性物质。在下一步的研究中, 将对倒心盾翅藤抑制结石形成的有效部位或有效组分作进一步研究。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 傣药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 29-30.
- [2] 杨鸿, 林艳芳, 赵应红. 傣药五淋化石胶囊治疗泌尿系结石41例临床疗效观察[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 6(6): 13.

- [3] 玉腊对, 胡建波. 傣药盾翅藤与五淋化石胶囊结合治疗肾结石[J]. 中国民族医药杂志, 2009, 10(10): 25.
- [4] 伍睿, 叶其, 陈能煜, 等. 倒心盾翅藤的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 14.
- [5] 蔡华芳. 草酸钙肾结石模型及其应用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(8): 750.
- [6] 赖海标, 刘朝晖, 吴松, 等. 实验性大鼠肾草酸钙结石造模方法筛选研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 135.
- [7] 赵玉霞. 中医药治疗泌尿结石近况[J]. 天津药学, 2010, 22(2): 60.
- [8] 吴国荣, 陈国千, 周德琪. 尿结石患者尿钙、磷、镁、尿酸检测的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(21): 4 044.
- [9] 李晓花, 牛迎风, 元超, 等. 傣药倒心盾翅藤化学成分预实验[J]. 中医药导报, 2014, 20(5): 17.

(收稿日期: 2014-09-26 修回日期: 2014-12-03)

(编辑: 邹丽娟)

Δ 基金项目: 辽宁省科技厅科学技术计划项目(No.2013225089)
* 硕士研究生。研究方向: 中药药效物质基础研究。电话: 024-28853846。E-mail: liqiang607@yeah.net
通信作者: 副主任药师, 硕士生导师。研究方向: 天然药物的提取与分离、临床药学。电话: 024-28853871。E-mail: zxh3688@sina.com

三黄汤是解放军第202医院课题组根据中华中医中药传统方茵陈蒿汤加减而成的中药复方,主要用于预防新生儿ABO溶血症。本品主要由茵陈、黄芩、黄柏、甘草、炙大黄5味中药组成,以上中药均为不同程度的清热利湿药^[1-6],大量药理临床研究证明,上述药物均有较强的抑制抗体产生的作用,并含有类血型物质,可中和抗体,降低效价^[7-9]。虽然三黄汤对新生儿ABO溶血症有良好的预防效果,但其药效物质基础及其作用机制尚不明确,有必要进行更深入的研究。本研究旨在通过比较大鼠ig给予三黄汤前后入血化学成分的变化,为阐明三黄汤体内药效物质基础、进一步优化三黄汤的处方提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱(HPLC)仪,包括二元泵、脱气装置、SPD-20A型紫外检测器、LC solution工作站(日本岛津公司);Milli-Q超纯水系统(法国Millipore公司);KDC-40型低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);KQ-400DB型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);N-1001S-WA型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);PHG-9076A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);FA 2004A型电子分析天平(上海垒固仪器有限公司)。

1.2 饮片

茵陈(批号:20121001)、黄芩(批号:20121001)、黄柏(批号:20121014)、甘草(批号:20121013)、炙大黄(批号:20121201)均购自安徽新兴中药材饮片有限公司,经解放军第202医院刘兰娣副主任中药师鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

绿原酸对照品(批号:110753-200413,纯度:≥98%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200609,纯度:≥98%)、甘草酸铵对照品(批号:110731-200614,纯度:≥98%)、黄芩苷对照品(批号:110715-200212,纯度:≥98%)、大黄酸对照品(批号:110757-200206,纯度:≥98%)、大黄素对照品(批号:110756-200110,纯度:≥98%)、大黄酚对照品(批号:110796-200615,纯度:≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、磷酸(分析纯)、二甲基亚砜(DMSO,分析纯)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;冰醋酸(分析纯,台山市新宁制药有限公司);甲酸(北京市红星化工厂)。

1.4 动物

SPF级SD大鼠,♀♂兼半,体质量220~250 g,由解放军第202医院动物中心提供[实验动物使用许可证号:SYXK(军)2012-0005]。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、甘草酸铵、大黄素、大黄酸、大黄酚对照品适量,加甲醇溶解并制备成上述对照品质量浓度分别为0.103、0.119、0.096、0.069、0.100、0.114、0.096 mg/ml的混合对照品溶液,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.2 三黄汤干粉、单味药材水提物与缺味药材水提物溶液的

制备

各单味药经适度粉碎后过筛,参考《伤寒论》中茵陈蒿汤与三黄颗粒的制备方法,折合成现代剂量,准确称取茵陈30 g、黄芩9 g、黄柏9 g、甘草6 g,加8倍量水,浸泡1 h,加热回流提取3 h,加入炙大黄3 g,再继续加热回流提取1 h;药液滤过,置容器内低温静置24 h,取上清液,浓缩至相对密度为1.28~1.30 g/ml(60~65℃)清膏,移至蒸发皿中,最后移至鼓风干燥箱中干燥至恒质量,刮下研成细粉即为三黄汤干粉。同法制备单味药材及缺味药材水提物。分别精密称取上述水提物适量,加甲醇分别制备成上述各样品质量浓度均为40 mg/ml的溶液,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.3 含药血清的制备与处理

取SD大鼠,禁食12 h(自由饮水),实验前称质量,分别给予三黄汤、各单味药水提物与缺味药水提物溶液(0.8 g/100 g)60 min后乙醚麻醉1~2 min,经大鼠腹主动脉取血。用加促凝剂的一次性真空采血管分别于给药后5、10、15、30、45、60、90、120、240、360、480、720 min取血5 ml,在离心半径为7.65 cm、4 200 r/min离心10 min,分取血清。加4倍量甲醇沉淀蛋白,摇晃均匀,涡旋2~3 min,在离心半径为7.65 cm、4 200 r/min离心10 min,取上清液,于45℃条件下氮气吹干,残渣加200 μl甲醇复溶,过0.45 μm微孔滤膜,备用。

2.4 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:以甲醇(A)-1%磷酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱;流速:1 ml/min;柱温:30℃;检测波长:277 nm;进样量:15 μl。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution table

时间, min	A, %	B, %
1	15	85
5	17	83
10	20	80
17	26	74
25	29	71
37	37	63
50	43	57
65	49	51
85	70	30
105	92	8
130	92	8

2.5 图谱分析

取对照品溶液、三黄汤、各单味药与缺味药材水提物溶液及含药血清样品在相同色谱条件下进行HPLC分析,建立HPLC色谱图,比较确定入血成分及其来源。

3 结果

三黄汤样品溶液HPLC图谱中可见45个主要成分,其中峰1~峰11来源于茵陈,峰12~峰32来源于黄芩,峰45来源于黄柏,峰34~峰41来源于甘草,峰42~峰44来源于炙大黄;经与对照品图谱比对,峰4为绿原酸,峰19为黄芩苷,峰45为盐酸小檗碱,峰41为甘草酸铵,峰42为大黄酸,峰43为大黄素,峰44为大黄酚;峰4为茵陈、黄芩、黄柏中所共有成分。三

黄汤体外 HPLC 指纹色谱见图 1; 三黄汤与单味药和缺味药水提物体外 HPLC 指纹色谱见图 2。

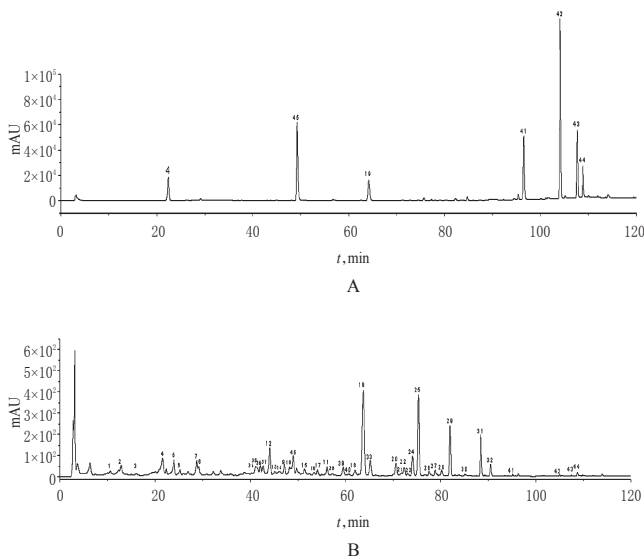


图 1 三黄汤体外 HPLC 指纹色谱图

A. 对照品; B. 三黄汤; 4. 绿原酸; 19. 黄芩苷; 41. 甘草酸铵; 42. 大黄酸; 43. 大黄素; 44. 大黄酚; 45. 盐酸小檗碱

Fig 1 HPLC chromatogram of Sanhuang decoction *in vitro*

A. reference substance; B. Sanhuang decoction; 4. chlorogenic acid; 19. baicalin; 41. ammonium glycyrrhizic; 42. rhein; 43. emodin; 44. chryso-phanol; 45. berberine hydrochloride

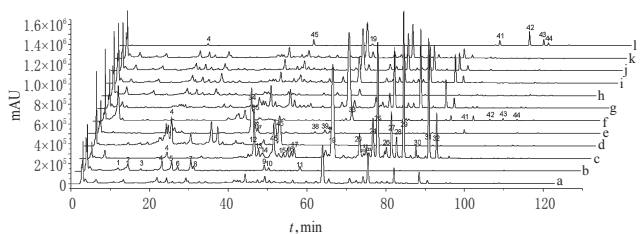


图 2 三黄汤、各单味药和缺味药水提物体外 HPLC 指纹色谱图

a. 三黄汤; b. 茵陈水提物; c. 黄芩水提物; d. 黄柏水提物; e. 甘草水提物; f. 炙大黄水提物; g. 茵陈药材水提物; h. 缺黄芩药材水提物; i. 缺黄柏药材水提物; j. 缺甘草药材水提物; k. 缺炙大黄药材水提物; l. 对照品

Fig 2 HPLC fingerprint chromatograms of Sanhuang decoction, single herb medicines and the medicine without some herb

a. Sanhuang decoction; b. *Artemisia Scopariae Herba* water extract; c. *Scutellaria baicalensis* water extract; d. *Phellodendron chinense* water extract; e. *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* water extract; f. *Rhei Radix et Rhizoma* water extract; g. medicinal herb water extract without *Artemisia Scopariae Herba*; h. medicinal herb water extract without *S. baicalensis*; i. medicinal herb water extract without *P. chinense*; j. medicinal herb water extract without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; k. medicinal herb water extract without *Rhei Radix et Rhizoma*; l. control

大鼠 ig 给予三黄汤 60 min 后, 血清 HPLC 指纹图谱中可见 32 个主要成分, 其中 26 个为三黄汤中原型成分直接入血。经与三黄汤体外图谱比对, 分别为 1、2、4、5 号峰来源于茵陈, 14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、26、27、29、30、31 号峰来源

于黄芩, 45 号峰来源于黄柏, 37、39、40、41 号峰来源于甘草, 42 号峰来源于炙大黄; 与各水提物、对照品体外图谱进行比对, 4 号峰为绿原酸, 45 号峰为盐酸小檗碱, 19 号峰为黄芩苷, 41 号峰为甘草酸铵, 31 号峰为大黄素; 与各水提物及缺味药材样品血清图谱比对, 推测 46 号峰为绿原酸代谢产物, 推测 47、48 号峰为黄芩苷代谢产物, 49、50、51 号峰为未知来源代谢产物; 经与空白血清比对, 25、29、30、39、40 号峰与血清自身内源性物质重合, 且相对峰面积明显增大。大鼠 ig 给予三黄汤后血清 HPLC 指纹色谱见图 3。

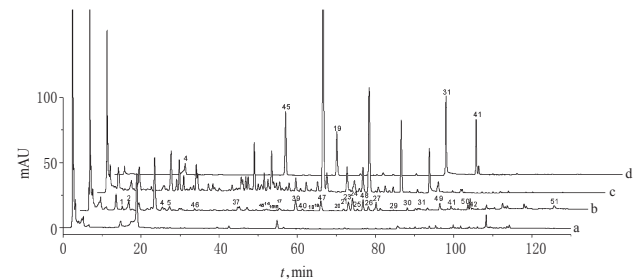


图 3 大鼠 ig 给予三黄汤后血清 HPLC 指纹色谱图

a. 空白血清; b. ig 给予三黄汤后大鼠血清; c. 三黄汤; d. 对照品

Fig 3 Serum HPLC fingerprint chromatograms of rats after ig administration of Sanhuang decoction

a. blank serum; b. serum after ig administration of Sanhuang decoction; c. Sanhuang decoction; d. control

三黄汤 ig 给药 5 min 后即可在大鼠血清中检测出绿原酸, 同时还出现了三黄汤复方中没有的新成分, 即 46 号峰, 疑为绿原酸代谢产物, 60 min 后未见绿原酸相对峰面积发生较大变化, 而 46 号峰的相对面积有增大趋势。ig 给药 15 min 后检测出黄芩苷, 45 min 其所属位置有双峰出现, 且相对峰面积随给药时间延长先增大后逐渐减小, 5 min 即检测出黄芩苷 2 个代谢产物, 即 47、48 号峰, 随给药时间延长相对峰面积逐渐增大, 48 号峰面积至 720 min 增至最大。大鼠 ig 给予三黄汤不同时间点血清 HPLC 指纹色谱见图 4。

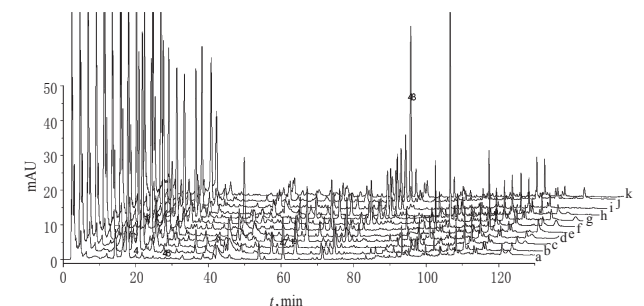


图 4 大鼠 ig 给予三黄汤不同时间点血清 HPLC 指纹色谱图

a. 5 min; b. 10 min; c. 15 min; d. 30 min; e. 45 min; f. 60 min; g. 90 min; h. 120 min; i. 240 min; j. 360 min; k. 720 min; 4. 绿原酸; 46. 绿原酸代谢产物; 19. 黄芩苷; 47、48. 黄芩苷代谢产物

Fig 4 HPLC fingerprint of serum of rats after administration of Sanhuang decoction at different time

a. 5 min; b. 10 min; c. 15 min; d. 30 min; e. 45 min; f. 60 min; g. 90 min; h. 120 min; i. 240 min; j. 360 min; k. 720 min; 4. chlorogenic acid; 46. metabolic products of chlorogenic acid; 19. baicalin; 47, 48. metabolites of baicalin

4 讨论

本研究发现大鼠 ig 给予三黄汤后在血清中仅检测出微量的黄芩苷,通过比较 ig 给予黄芩水提物与三黄汤发现黄芩苷在 ig 给予三黄汤后的降解速度大于黄芩水提物,这与狄斌等^[9]的研究结果相一致。说明该复方口服给药后黄芩苷快速代谢为代谢产物,且主要以代谢产物的形式吸收入血。ig 给药 45 min 时其所属位置出现双峰,且其后峰面积有增大趋势,可能与文献报道的黄芩苷吸收存在肝肠循环有关^[8]。据国外文献报道,大鼠 ig 给予绿原酸后体内吸收较差,生物利用度不足 1%。主要原因是绿原酸很容易受到肠道菌群和肠壁代谢酶的作用,其代谢产物主要为咖啡酸、奎尼酸,上述两种产物可继续代谢为马尿酸、安息香酸、阿魏酸和异阿魏酸,这些代谢物可通过肠道吸收进入血液循环^[10]。本研究发现茵陈、黄芩、黄柏在绿原酸相同位置都有出峰,推测绿原酸为三者共有成分,且复方图谱中其相对峰面积相对稳定,可能是由于该复方中其他药材存在相同成分吸收入血所致,具体情况有待进一步分析。笔者前期还对三黄汤单次与多次 ig 给药后的血清成分进行了研究,经比较三黄汤单次给药 60 min 与连续 5 d 给药后的血清指纹图谱,发现以来源于茵陈和黄芩的成分居多、出峰变化较大,且个别成分相对峰面积有明显增减。以上讨论结果提示,方剂配伍不同,其入血成分也存在差异,且有效入血成分可用于方剂配伍规律研究。

本研究初步表明,血中移行成分主要来源于茵陈和黄芩。此外,由于检测手段的限制未能对未知组分及相关代谢产物进行定性分析,同时一些微量组分可能未被检测到。对于这些问题,有待于进一步采用 HPLC-质谱串联(MS)技术及现代分离技术从药材及血清中分离未知组分并进行结构鉴定。

参考文献

- [1] 于虹.茵陈治黄辨析[J].天津中医学院学报,2003,22(1):21.
- [2] 李先端,顾雪竹,毛淑杰.黄芩饮片规格分级市场情况调查及有关古今文献论述[J].中药材,2014,37(1):150.
- [3] 周松,刘永刚,陈志良.黄柏化学成分及质量控制研究进展[J].中国药房,2012,23(39):3740.
- [4] 马春辉,强立新.清热利湿法治疗肛周湿疹的临床观察[J].中国煤炭工业医学杂志,2013,16(3):410.
- [5] 杨素琴.清肝利胆退黄汤治疗急性黄疸型肝炎临床研究[J].中医学报,2011,26(6):745.
- [6] 赵先明,李颖,王鄂明.清热利湿中药对梗阻性黄疸大鼠肝 PKC 及 TNF-R1 表达的影响[J].实用中医药杂志,2010,26(11):748.
- [7] 钱美伦,姜梅.预防治疗新生儿溶血病中药的实验研究[J].中华妇产科杂志,1984,19(4):207.
- [8] 周华友,于艳涛,石文.茵陈蒿汤对免疫小鼠 ABO 血型抗体产生的抑制作用研究[J].中国免疫学杂志,2011,27(7):607.
- [9] 狄斌,冯年平,刘文英.复方双黄连与黄芩提取物中黄芩苷代谢的比较研究[J].中国药学杂志,2005,40(2):127.
- [10] Gonthier MP, Verny MA, Besson C, et al. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats[J]. *J Nutr*, 2003, 133(3):1853.

(收稿日期:2014-06-30 修回日期:2014-08-27)

(编辑:张 静)

国家中医药管理局深化改革领导小组召开第四次次会议

本刊讯 2015年2月16日,国家卫生计生委副主任、国家中医药管理局局长王国强主持召开国家中医药管理局深化改革领导小组第四次次会议,研究局深化改革领导小组成员调整事宜,审议通过了2014年深化中医药改革工作总结报告和局深化改革领导小组2015年工作要点。

会议提出,加强组织领导,做好改革统筹谋划,以完善中医药发展政策和机制、进一步激发中医药发展活力和潜力、全面提升中医药服务能力和水平为总目标,立足实际,从六个方面聚焦主攻方向,全面推进和重点突破相结合,加强统筹谋划和借助智库相结合,理论与实践探索相结合,持续发力,开局良好,取得了初步成效。

会议指出,2015年是全面深化改革的关键之年,要认真贯彻落实中央全面深化改革决策部署,着眼于经济社会改革发展大局,总结经验、查找不足、探索规律,强化责任意识、问题意识、攻坚意识,加强组织领导,抓好深化中医药改革任务统筹协调,切实抓好落实,攻克改革难点,推动工作发展。

会议强调,要深入学习领会习近平总书记关于全面深化改革的重要论述,切实增强抓改革的意识。把抓改革作为重大任务、重大责任扛在肩上,加强深入细致的调查研究,做好

深化改革的统筹谋划,制订切实可行的改革工作方案,充分征求系统内外和基层群众意见,促进制约发展的关键问题解决,以深化改革为动力推动事业发展。要坚持速度服从质量,切实抓好改革方案设计。更加注重改革的系统性、整体性、协同性,站在经济社会和卫生计生改革发展的高度,科学分析相关改革的横向和纵向关系,理清重大改革的逻辑关系,重点提出一些起标志性、关联性作用的改革举措。做实做细调查研究,坚持问题导向,抓紧制订细化实施方案,尽快研究与之相关联的配套政策,提升改革方案的针对性、适应性、可操作性和实效性。加强中医药改革发展理论与实践研究,充分发挥中医药改革发展专家咨询委员会作用,推动形成一批研究基地和一支研究队伍,不断提高深化改革的战略把控和统筹谋划能力。要以钉钉子的精神,切实抓好改革任务落实。将抓落实作为一项硬任务,作为一项纪律,在抓落实上想办法、下功夫,建好改革工作台账,加强督促检查,坚决消除“中梗阻”“肠梗阻”。对已经出台的改革方案要排队督办,及时跟踪、及时检查、及时评估、及时整改,重在发现问题。加强与相关部门沟通和协调,加强对地方中医药改革工作指导和督促,推动改革形成横向协调、上下联动的良好格局。