

酸枣仁汤含药脑脊液指纹图谱研究

孙志翠¹,刘西建¹,郭炜³,裴强伟¹,吕青涛²,韩涛¹,王欣^{1*}

(1. 山东中医药大学基础医学院,济南 250355; 2. 山东中医药大学药学院,济南 250355;
3. 山东中医药大学实验中心,济南 250355)

[摘要] 目的:通过对酸枣仁汤含药脑脊液指纹图谱的研究,为酸枣仁汤镇静催眠药效物质基础研究提供方法学基础。方法:采用反相高效液相色谱法,以梯度洗脱的方式,50 min 内在同一图谱中同时完成水溶性成分和脂溶性成分指纹图谱的建立,同时将含药脑脊液、空白脑脊液、酸枣仁汤及各单味药 HPLC 指纹图谱进行对比分析。结果:通过对脑脊液采集方法、前处理方法及洗脱梯度、检测波长等色谱条件的筛选,建立了可将酸枣仁汤含药脑脊液中化学成分完全分开的指纹图谱,并进行归属分析,初步鉴定出含药脑脊液中的固有成分、药源性物质及代谢产物。结论:方法可作为探索酸枣仁汤药效物质基础研究的有效手段。

[关键词] 酸枣仁汤; 化学成分; 高效液相色谱; 指纹图谱; 药效物质基础
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0171-03

Study on Fingerprint of Cerebrospinal Fluid Containing
Medicine of Suanzaoren Tang

SUN Zhi-cui¹, LIU Xi-jian¹, GUO Wei³, PEI Qiang-wei¹, LV Qing-tao², HAN Tao¹, WANG Xin^{1*}

(1. School of Basic Medical, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Ji'nan 250355, China; 2. College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China;
3. Experiment Center of Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] Objective: Through to the studies on fingerprint of cerebrospinal fluid containing medicine of Suanzaoren tang (SZRT), provides the methodology basis for research of efficacy material base of SZRT how to play calm hypnotic effect. Method: By HPLC, with the way of gradient elution, in 50 minutes, established the fingerprint containing water-soluble ingredients and fat soluble constituents. Result: Through screening the chromatographic conditions, such as the gradient of elution and detected wavelength, established the fingerprint that can separate from each other the chemical composition of cerebrospinal fluid containing medicine of SZRT. And through the belonging analysis, preliminary identified the inherent composition of cerebrospinal fluid containing medicine, the drug-induced composition and metabolic product. Conclusion: This method can be used as an effective means to research efficacy material base of SZRT.

[Key words] Suanzaoren tang (SZRT); chemical composition; HPLC; fingerprint; efficacy material base

酸枣仁汤出自东汉·张仲景《金匱要略》,为滋养安神之代表方^[1]。本方现代临床多用于治疗顽固性失眠及以情绪或神志障碍为主要表现的神经精神系统疾病^[2]。酸枣仁汤药效物质基础研究近年来取得了一定进展,但关于酸枣仁汤治疗中枢神经系统疾病的效用机制及其中枢物质基础研究尚处于

[收稿日期] 20120326(021)
[基金项目] 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011YY054)
[第一作者] 孙志翠,硕士,从事复方作用机制与药效物质基础研究,Tel:15098958202,E-mail:szc871001@126.com
[通讯作者] *王欣,博士,副教授,从事方剂效用机制及物质基础研究,Tel:15963125330,E-mail:xinw0422@126.com

起步阶段,特别是对于酸枣仁汤透血脑屏障的化学成分研究鲜有报道。本课题拟采用高效液相色谱法(HPLC)对酸枣仁汤含药脑脊液中化学成分的指纹图谱进行研究,并初步确定各色谱峰归属,为探索酸枣仁汤药效物质基础研究提供依据。

1 材料

1.1 药材 酸枣仁、茯苓、川芎、知母、甘草均购自山东中医药大学中鲁医院,经鉴定酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill var *spinosa* (Bunge) huex H. F chou 干燥成熟种子,茯苓为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,知母为百合科知母属多年生草本植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fiseh. 的干燥根及根茎,且均符合《中国药典》要求。

1.2 试剂与设备 乙腈、甲醇为色谱纯(天津四友精细化学品有限公司),戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司)。Agilent 1200 液相色谱系统,由二元泵和 DAD 检测器组成,工作站为 chemstation。

1.3 动物 新西兰大白兔,购自山东鲁抗医药股份有限公司,体质量 (2.8 ± 0.2) kg,动物合格证号为 SCXK(鲁)20080002。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

2.1.1 总煎液制备^[3] 将酸枣仁、茯苓、川芎、知母、甘草 5 味药材粉碎,过 20 目筛,取处方量^[4]的药材,分成酸枣仁汤组和各单味药组,分别以 6 倍量水煮提 2 h,滤过,残渣以 3 倍量水重复煮提 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,备用。

2.1.2 水煎液前处理 取出适量各组水煎液,加热浓缩成浸膏,加入甲醇溶解,超声萃取 30 min, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,以甲醇定容于 10 mL 量瓶中,备用(每个样品相当于 $0.75 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 复方的量),用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,进样 $20 \mu\text{L}$ 。

2.1.3 家兔脑脊液采集 家兔适应性喂养 3 d 后,以酸枣仁汤组水煎液 $5.4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,每天 2 次,连续 5 d;第 6 天,耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉;于枕外隆凸向下在颈部正中做一纵行切口(约 5 cm);在枕骨大孔处向两侧分离颈部肌肉,并用碘伏消毒周围组织;在第二颈椎棘突前方约 5 mm 处或枕外隆凸后方约 7 mm 垂直轻轻进针;有突破感轻轻回抽,得脑脊液 1 mL 左右, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。空白组每天以生理盐水灌

胃,同法制备空白脑脊液。

2.1.4 脑脊液前处理^[5] 取脑脊液 1 mL 置离心管中,加入甲醇 5 mL 快速混匀,密闭超声提取 10 min, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液氮吹至干,残渣以甲醇 1 mL 溶解,用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,进样 $20 \mu\text{L}$ 。

2.2 HPLC 色谱条件 ZorboxXDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, $5 \mu\text{m}$),柱温箱 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,检测波长 323 nm,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相 A 乙腈, B 0.1% 冰乙酸;梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% ~ 10% A; 5 ~ 7 min, 10% ~ 15% A; 7 ~ 20 min, 15% ~ 30% A; 20 ~ 30 min, 30% ~ 80% A; 30 ~ 40 min, 80% ~ 90% A);保留 10 min。

3 结果

3.1 酸枣仁汤含药脑脊液指纹图谱的建立 经过对不同检测波长、不同洗脱梯度等色谱条件所得出的指纹图谱对比分析,得出了峰数最多、分离度较好、可以代表酸枣仁汤的图谱(图 1A, B)。

3.2 含药脑脊液指纹图谱信息分析 经过含药脑脊液、空白脑脊液、酸枣仁汤及各单味药 HPLC 指纹图谱的对比分析(图 1C ~ H),在含药脑脊液指纹图谱中共鉴定出 16 个峰,其中 4, 5, 6, 7, 9, 11 号峰分别来自于酸枣仁汤及其各单味药,且 9 号峰为茯苓独有成分,10 号峰为脑脊液固有成分,其余成分均为代谢产物,但具体为何种化合物仍有待进一步研究。

4 讨论

在前期研究基础上,本课题采用 HPLC 对酸枣仁汤含药脑脊液中化学成分的指纹图谱进行了进一步研究。研究表明,含药脑脊液的采集与前处理、洗脱梯度及 HPLC 检测波长的选择是含药脑脊液化学成分指纹图谱研究的重要环节,只有使用科学的方法才能使含药脑脊液得到大量的富集并且使其中化学成分得到充分的提取和分离。

本实验首先采取的是直视下经椎间穿刺法进行脑脊液的采集,但最终发现该法耗时长,家兔会表现痛苦难耐,脑脊液采集量也非常小,且不易操作,故又尝试直视下经硬脊膜穿刺法^[6-7],发现该法耗时短,家兔始终处于睡眠状态,减轻了实验动物的痛苦,脑脊液采集量大,且易操作。故最终选择直视下经硬脊膜穿刺法进行脑脊液的采集。

在脑脊液的前处理时本实验分别采取了减压回收法^[5]和氮吹法^[8],实验证明,氮吹法耗时短、易操作,所得化合物种类也明显多于减压回收法,故本实

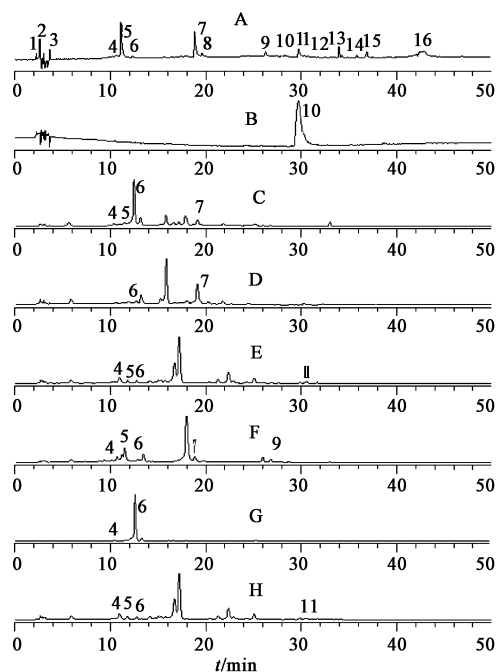


图1 酸枣仁汤含药脑脊液(A)、空白脑脊液(B)、
酸枣仁汤(C)、酸枣仁(D)、川芎(E)、茯苓(F)、
知母(G)、甘草(H) HPLC 色谱

验选择氮吹法进行脑脊液的前处理。

针对洗脱梯度,分别采取了①0~5 min,5%~10% A;5~7 min,10%~15% A;7~20 min,15%~30% A;20~30 min,30%~80% A;30~40 min,80%~90% A;保留10 min。②0~5 min,5%~10% A;5~7 min,10%~15% A;7~20 min,15%~30% A;20~30 min,30%~90% A;保留5 min。③0~5 min,5%~10% A;5~7 min,10%~15% A;7~30 min,15%~30% A;30~40 min,30%~90% A;保留5 min。④0~5 min,5%~15% A;5~20 min,15%~20% A;20~35 min,20%~30% A;35~40 min,30%~90% A;保留5 min。⑤0~5 min,5%~15% A;5~30 min,15%~30% A;30~40 min,30%~90% A。

⑥0~60 min,5%~90% A^[8]。最终发现第一种方法峰数最多,分离度最好,故采用第一种梯度洗脱方法。

本实验进行了全波长扫描,并根据所查文献详细对比分析了323,276,240,334,282 nm检测波长下获得的指纹谱图,发现在323 nm处检测的峰数目最多,分离度较好,故选择在323 nm处进行检测。

经过含药脑脊液、空白脑脊液、酸枣仁汤及各单味药 HPLC 指纹图谱的对比分析,在含药脑脊液指纹图谱中共鉴定出16个色谱峰,其中6个为药源性成分,1个为脑脊液固有成分,其余成分均为代谢产物,为探索酸枣仁汤药效物质基础研究提供了依据。

参考文献

- [1] 许济群,王绵之.方剂学[M].北京:人民卫生出版社,1995:306.
- [2] 王欣,王守勇.酸枣仁汤临床与实验研究评述[J].中成药,2003,25(5):414.
- [3] 李玉娟,王瑞,陈灵,等.不同提取工艺酸枣仁汤的药效学研究[J].中药材,2001,24(12):884.
- [4] 许济群.方剂学[M].上海:上海科学技术出版社,1995:118.
- [5] 李越峰,李廷利.四逆散冻干粉在大鼠脑脊液中主要活性成分的研究[J].中国临床药理学杂志,2010,26(8):619.
- [6] 马伟,马锋,田建英,等.一种简单实用的实验动物中药脑脊液采集方法[J].宁夏医学院学报,2007,29(4):436.
- [7] 杨子,赖关朝,王国彬,等.SD大鼠脑脊液采集方法改进[J].中国职业医学,2011,38(2):117.
- [8] 高博彦,孔令义.高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法初步鉴定复方酸枣仁汤中化学物质及血浆吸收成分[J].药学与临床研究,2010,18(3):250.

[责任编辑 邹晓翠]