



脂溶性去痴灵药效物质基础的初步研究

翁文¹, 肖飞¹, 李晓光¹, 高勤¹, 罗焕敏^{2*}

(1. 暨南大学药学院神经药理研究室, 广东广州 510632;

2. 暨南大学医学院药理学系暨南大学-香港大学脑功能与健康联合实验室, 广东广州 510632)

[摘要] 目的:通过对脂溶性去痴灵入血、入脑化学成分的研究,从体内化学成分的角度准确地确定药效物质基础。方法:采用中药血清药物化学的方法,利用GC-MS技术分析进入血液以及进入脑组织的去痴灵化学成分。结果:初步确定进入血液的脂溶性去痴灵成分为11个;进入脑组织中的脂溶性去痴灵成分为6个。结论:进入血液的脂溶性去痴灵成分分别是 β -细辛醚、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酯丙、 δ -杜松烯、 δ -杜松醇、菖蒲二醇;进入脑组织中的脂溶性去痴灵成分分别是 β -细辛醚、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、菖蒲二醇。

[关键词] 脂溶性去痴灵;物质基础;气相色谱质谱

“去痴灵”是本课题组研制的新型的治疗老年性痴呆(AD)复方中药制剂,处方由广东海风藤、五味子、石菖蒲等组成。“去痴灵”血清药理学研究表明含药血清对体外培养的M146L细胞所分泌的 $A\beta_{42}$ 具有明显抑制作用^[1-2],对体外培养的大脑皮层神经元,可诱导突起生长、促进神经元生长发育、提高神经元的存活能力、减缓神经元衰老或受损过程^[3]。脂溶性去痴灵主要成分为木脂素和萜类挥发油^[4]。无论是木脂素类成分还是挥发油类成分,只有入血成分才可能发挥药效作用。本研究采用中药血清药物化学的方法,直接从中药给药后的入血成分入手来进行研究,在对口服后血中移行成分进行详细分析的基础上,分离、鉴定其入血的化学成分。并针对AD病的特点,进一步研究进入脑组织中的化学成分,从而从体内化学成分的角度准确地确定中药的药效物质。

1 材料

1.1 仪器 3K18 冷冻高速离心机, Sigma 公司。WH-1 微型旋涡混合仪, 上海沪西分析仪器厂。XS1050 精密电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司。Trace GC-MS 仪, 美国 Finigan 公司。

1.2 试剂 硫酸铵(分析纯, 天津市福晨化学试剂

厂)。环己烷(分析纯, 广州化学试剂厂)。DMSO (Sigma 公司)。正己烷(色谱纯, 美国 fisher 公司)。

1.3 药物 脂溶性去痴灵(暨南大学药学院神经药理研究室制备, 批号 070109)。超临界 CO_2 萃取法提取, 萃取压力 15 MPa, 萃取温度 45 $^{\circ}C$, CO_2 流量为 25 L \cdot h⁻¹。戊巴比妥钠(北京化学试剂公司, 批号 020919)。 β -细辛醚、 α -细辛醚(Sigma 公司, 批号 221074-1G)。五味子醇甲(批号 110857-200406)、五味子甲素(批号 0764-200107)、五味子乙素(批号 110765-200407)、五味子酯甲(批号 111529-200302)均购自中国药品生物制品检定所。

1.4 动物 SD 大鼠, SPF 级, 体重(300.8 \pm 15.6) g, 2~3 月龄雌雄各半, 广东省医学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(粤)2003-0002, 粤监证字 2007A003。

2 方法

2.1 对照品样品制备 分别称取对照品 β -细辛醚、 α -细辛醚、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲各 5 mg, 加 DMSO 定容至 1 mL, 终浓度为 5 g \cdot L⁻¹。取 20 μ L 在通风橱内挥干溶剂, 然后加入正己烷 100 μ L, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 滤液供 GC-MS 分析。

2.2 脂溶性去痴灵样品制备 另称取脂溶性去痴灵约 10 mg, 加 10 mL 正己烷, 超声波振荡 30 min 后过滤, 滤液供 GC-MS 分析。

2.3 脂溶性去痴灵给药后大鼠血清样品的制备 取 SD 大鼠, 禁食 12 h (自由饮水), 按照每 100 g 体重 0.5 mL 剂量, 分别灌胃给予蒸馏水、脂溶性去痴

[收稿日期] 2009-07-07

[基金项目] 广东省科技厅科技计划项目(2004B30101012); 广州市科技局科技计划项目(2005Z3-E5081)

[通信作者] * 罗焕敏, 教授, 主要从事药物对脑退行疾病的干预, Tel/Fax: (020)85220160, E-mail: tlhm@jnu.edu.cn

[作者简介] 翁文, 高级实验师, 主要从事新药研究开发和神经药理, Tel: (020)85220263, E-mail: qyk968150@office.jnu.edu.cn

灵,给药 60 min 后,用 0.8% 戊巴妥钠麻醉,经心脏取血,血液在室温放置 2 h 后,在 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,混浊上清再离心 10 min,合并, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

取上清 0.5 mL,分别加入 0.175 g 硫酸铵,旋涡振荡混匀 3 min,再加环己烷溶液 1.0 mL,旋涡振荡混匀 3 min,在 $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 1.0 mL,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜后,置于通风橱内挥干溶剂,再加正己烷 10 μL ,待测。

2.4 脂溶性去痴灵给药后大鼠脑组织样品的制备

取 SD 大鼠,禁食 12 h (自由饮水),按照每 100 g 体重 0.5 mL 剂量,分别灌胃给予蒸馏水、脂溶性去痴灵,给药 60 min 后,用 0.8% 戊巴妥钠麻醉,取出全脑,生理盐水洗净,再加入 2 mL 生理盐水匀浆,离心,取上清液 1 mL,加入 0.35 g 硫酸铵,旋涡振荡混匀 3 min,再加环己烷溶液 2.0 mL,旋涡振荡混匀 3 min,在 $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 2.0 mL,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜后,置于通风橱内挥干溶剂,再加正己烷 10 μL ,待测。

2.5 GC-MS 条件 气相色谱条件:色谱柱为 DB-17 石英毛细管柱($0.25\text{ mm}\times 30\text{ m}$);载气为氦气,流速为 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;初始温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 5 min 后以 $6\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 10 min。进样量 1 μL 。

质谱条件:EI 离子源,电子能量 70 eV,质量扫描范围 $m/z\ 30\sim 550$ 。

3 结果与讨论

3.1 脂溶性去痴灵成分分析 通过对照品和脂溶性去痴灵 GC-MS 总离子流图比较,并根据文献 [5-8] 以及各成分的分子式、相对分子质量、结构式和本实验质谱图裂解方式,已鉴定脂溶性去痴灵成分 12 个峰,占总峰面积的 43.9%,其中萜类挥发油 5 个,占总峰面积的 33.54%,含 β -细辛醚最高为 20.31%;木脂素 7 个,占总峰面积的 10.36%,结果见表 1,以面积归一化法确定各组分的质量分数。标准品和脂溶性去痴灵 GC-MS 总离子流图见图 1,2。

3.2 进入血液的脂溶性去痴灵成分分析 通过空白血清与含药血清 GC-MS 总离子流图的比较,发现 11 处明显不同。进一步与脂溶性去痴灵 GC-MS 总离子流图比较,初步确定进入血液的脂溶性去痴灵成分为 11 个,其中萜类挥发油 4 个(α -细辛醚未检出),木脂素 7 个见表 1。空白血清与含药血清 GC-

MS 总离子流图见图 3,4。

表 1 已鉴定的脂溶性去痴灵成分

No.	t_R /min	化合物 名称	分子式	相对分子 质量	相对含量 /%
1	7.48	β -细辛醚	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$	208.2	20.31
2	8.18	δ -杜松烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.3	3.76
3	8.50	δ -杜松醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	222.3	1.96
4	8.93	α -细辛醚	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$	208.2	3.43
5	10.73	菖蒲二醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$	238.3	4.08
6	30.28	五味子甲素	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$	416.4	3.27
7	31.72	五味子乙素	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6$	400.4	1.75
8	32.62	五味子醇甲	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$	432.4	1.94
9	34.17	五味子醇乙	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$	416.4	0.83
10	38.48	五味子酯乙	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$	514.4	0.54
11	39.21	五味子酯丙	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$	514.4	0.61
12	44.53	五味子酯甲	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_9$	536.4	1.42

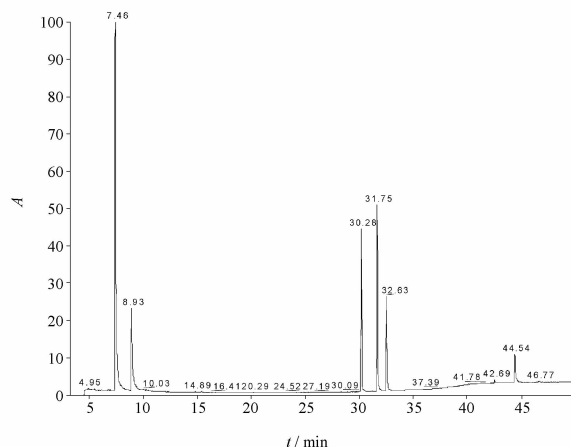


图 1 对照品的 GC-MS 总离子流图

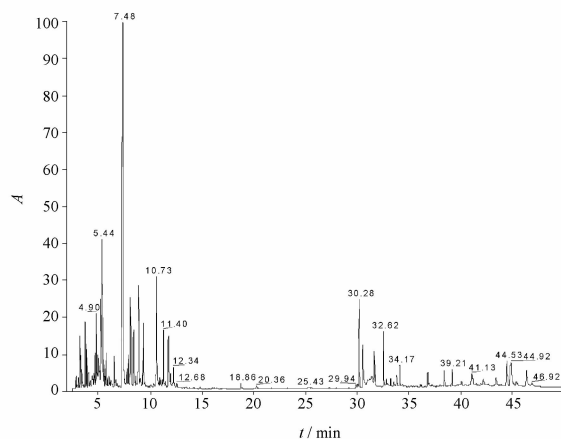


图 2 脂溶性去痴灵的 GC-MS 总离子流图

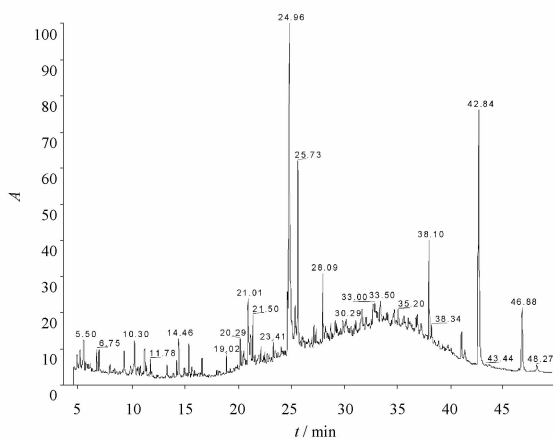


图 3 空白血清的 GC-MS 总离子流图

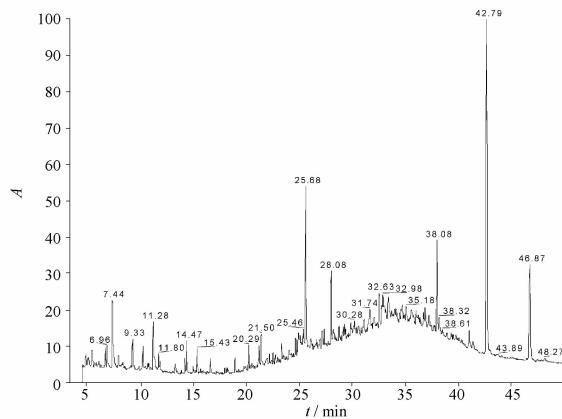


图 5 空白脑匀浆的 GC-MS 总离子流图

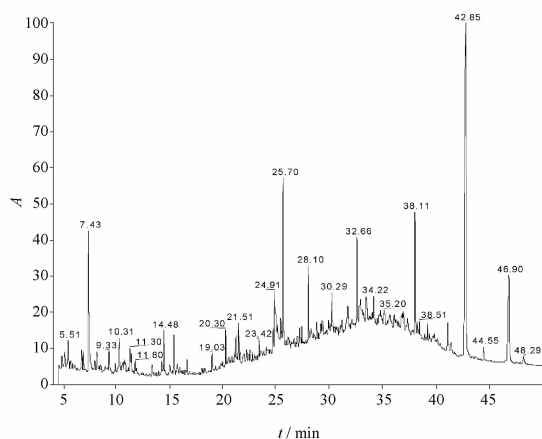


图 4 脂溶性去痴灵血清的 GC-MS 总离子流图

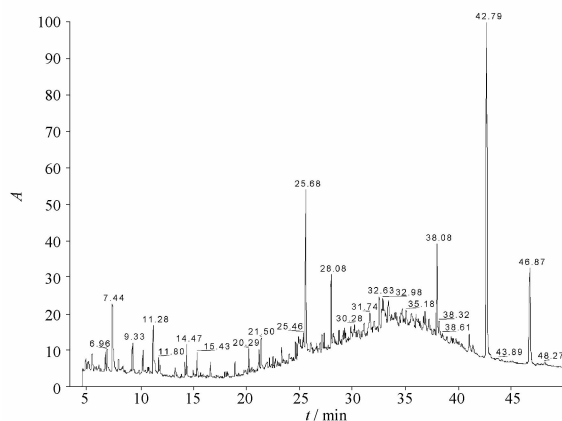


图 6 脂溶性去痴灵脑匀浆的 GC-MS 总离子流图

3.3 进入脑组织的脂溶性去痴灵成分分析 通过空白脑匀浆与含药脑匀浆 GC-MS 总离子流图的比较,发现 6 处不同。进一步与脂溶性去痴灵 GC-MS 总离子流图比较,初步确定进入脑组织的脂溶性去痴灵成分为 6 个,其中萜类挥发油 2 个,木脂素 4 个,结果见表 2。空白脑匀浆与含药脑匀浆 GC-MS 总离子流图见图 5,6。

表 2 已鉴定进入脑组织的脂溶性去痴灵成分

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	相对分子质量
1	7.44	β -细辛醚	$C_{12}H_{16}O_3$	208.2
2	10.77	菖蒲二醇	$C_{15}H_{26}O_2$	238.3
3	30.28	五味子甲素	$C_{24}H_{32}O_6$	416.4
4	31.74	五味子乙素	$C_{23}H_{28}O_6$	400.4
5	32.63	五味子醇甲	$C_{24}H_{32}O_7$	432.4
6	34.23	五味子醇乙	$C_{23}H_{28}O_7$	416.4

由于血液和脑组织均含有大量内源性杂质,故未采用面积归一化法确定进入血液和脑组织的脂溶性去痴灵成分的相对含量,而只通过 GC-MS 总离子流图进行定性分析。由 GC-MS 总离子流图可以看出,脂溶性去痴灵成分很复杂,有几十种之多,但进入血液的脂溶性去痴灵成分只有 11 个,而进入脑组织中的脂溶性去痴灵成分仅有 6 个。由此可以初步推断,进入血液的 11 个脂溶性去痴灵成分为其药效物质基础。而进入脑组织中的 6 个脂溶性去痴灵成分更有可能为其抗 AD 作用的药效物质基础。

在 GC-MS 分析中,一般多种成分的同时检测采用程序升温方法。在温度低时,极性小、相对分子质量小的成分先出峰,此时血清、脑匀浆中的极性成分干扰少,质谱采用选择离子检测较宜;当温度升高时,极性大、相对分子质量大的成分出峰的同时,血清、脑匀浆中的极性成分也出峰,易造成干扰,若采用多级质谱检测则可消除干扰。本实验受仪器限



制,质谱只选择了离子检测,且在同一图谱中分段扫描不同的碎片离子,由此导致了血清、脑匀浆 GC-MS 基线不稳。此外,由于受到检测手段的限制,一些微量组分可能未被检测到。关于进入血液和脑组织的脂溶性去痴灵成分的定量分析有待于进一步采用 HPLC-MS 联用技术解决。而有关脂溶性去痴灵单体成分抗 AD 作用的药效学研究已取得初步结果,将另文发表。

[参考文献]

- [1] 肖飞,罗焕敏,余锐,等. 含去痴灵水提物血清抑制 M146L 细胞分泌 A β [J]. 中药材,2005,28(6):497.
- [2] 余锐,肖飞,李晓光,等. 去痴灵脂溶性提取物血清抑制 M146L 细胞分泌 β 淀粉样蛋白[J]. 中国新药杂志,2006,15(13):1061.

- [3] 刘美英,肖飞,李晓光,等. 含去痴灵挥发油的大鼠血清对体外培养新生小鼠皮层神经元的营养作用[J]. 中国新药杂志,2007,16(11):849.
- [4] 李晓光,高勤,翁文,等. 超临界 CO₂ 萃取法提取去痴灵胶囊中脂溶性有效成分的研究[J]. 北京中医药大学学报,2007,30(2):124.
- [5] 李晓光,罗焕敏. 广东海风藤挥发油化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志,2004,12(2):89.
- [6] 向智敏,李会林,张骊. 五味子超临界 CO₂ 提取物的气相色谱-质谱分析[J]. 色谱,2003,21(6):568.
- [7] 杨晓燕,陈发奎. 菖蒲的化学成分研究概况[J]. 沈阳药科大学学报,1999,16(1):71.
- [8] Kuo Y H, Chyu C F, Lin H C. Cadinane-type sesquiterpenes from the roots of *Taiwania cryptomerioides* Hayata[J]. Chem Pharm Bull,2003,51(8):986.

Research on liposoluble ingredients of Quchiling

WENG Wen¹, XIAO Fei¹, LI Xiaoguang¹, GAO Qin¹, LUO Huanmin^{2*}

- (1. *Neuropharmacological Research Laboratory, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China;*
 2. *Department of Pharmacology, Medical College, Jinan University, Brain Function and Health United Laboratory, Jinan University-University of Hong Kong, Guangzhou 510632, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the liposoluble ingredients of Quchiling (LQ), which enter the blood and the brain, and to confirm the active ingredients of LQ *in vivo*. **Method:** Serum pharmacochimistry and gas chromatography mass spectroscopy were used to analyze ingredients of LQ entering the blood and the brain. **Result:** There were eleven ingredients of LQ to enter the blood and six ingredients of LQ to enter the brain. **Conclusion:** It is confirmed that eleven ingredients of LQ entered the blood, which are β -asarone, schisandrol A, schisandrol B, deoxyschisandrin, schisandrin B, schisantherrin A, schisantherrin B, schisantherrin C, δ -cadinene, δ -cadinol and calamendiol in the blood, and that six ingredients are β -asarone, schisandrol A, schisandrol B, deoxyschisandrin, schisandrin B and calamendiol in the brain.

[Key words] liposoluble Quchiling; ingredients; GC-MS

doi: 10.4268/cjcm2010013

[责任编辑 王亚君]