

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.24.009

五色培元固本方高效液相色谱指纹图谱及药效学研究*

段瑶,陈娟,沈洁[△]

(重庆市中医院药剂科,重庆 400021)

摘要:目的 研究五色培元固本方的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱及药物效应动力学。方法 采用HPLC法建立12批样品的HPLC图谱,利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)进行相似度评价,确定共有峰。取20只SD大鼠,随机分为假手术组(6只,等体积蒸馏水)、模型组(7只,等体积蒸馏水)、五色培元固本方组(7只,9g/kg);先切除大鼠2/3左肾,1周后切除右肾,然后连续8周喂饲4%酪蛋白饲料(5g/100g)以复制慢性肾脏病-蛋白质能量消耗(CKD-PEW)模型,假手术组仅作切口、剥离肾膜并喂饲常规饲料;建模同时灌胃相应药物或蒸馏水,每日1次,连续8周。称定大鼠体质量;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠血清肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)水平;检测24h尿蛋白(Upr)水平;苏木素-伊红(HE)染色,观察大鼠肾脏、胫骨前肌病理组织形态变化;计算胫骨前肌横截面积。结果 12批样品的HPLC图谱有10个共有峰,相似度均大于0.95。与模型组比较,五色培元固本方组大鼠毛发光泽度较好,体质量增长速度较快,大小便频率较小,笼内洁净度较好,肾小管炎症减轻,细胞碎片及间质水肿减少;且BUN,SCr,24h Upr水平均明显降低,胫骨前肌横截面积明显增大($P < 0.05$)。结论 五色培元固本方能有效改善CKD模型大鼠的蛋白质能量消耗。所建方法操作便捷,结果准确,重复性好,可用于五色培元固本方的质量控制和药效评价。

关键词:五色培元固本方;慢性肾脏病;大鼠;蛋白质能量消耗;药物效应动力学

中图分类号:R932;R285

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)24-0039-05

HPLC Fingerprints and Pharmacodynamics of Wuse Peiyuan Guben Formula

DUAN Yao, CHEN Juan, SHEN Jie

(Department of Pharmacy, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, China 400021)

Abstract: Objective To study high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and pharmacokinetics of Wuse Peiyuan Guben Formula. **Methods** HPLC method was adopted to establish the HPLC chromatograms of 12 batches of samples, and the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012A) was used to evaluate the similarity and determine the common peaks. Twenty SD rats were randomly divided into the sham operation group (six rats, equal volume of distilled water), operation group (seven rats, equal volume of distilled water) and Wuse Peiyuan Guben Formula group (seven rats, 9 g/kg). Two-thirds of the left kidney of rats were resected first, then the right kidney was resected one week later, and then the rats were fed with 4% casein (5 g/100 g) for eight weeks to replicate the chronic kidney disease-protein energy wasting (CKD-PEW) model. However, the rats in the sham operation group were incised and their renal membrane was stripped, and fed with conventional diet. At the same time of modeling, the rats were administered with corresponding drugs or distilled water by gastric gavage once a day for eight consecutive weeks. The body mass of rats was weighed. The levels of serum creatinine (SCR) and blood urea nitrogen (BUN) were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of 24 h urinary protein (Upr) was detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of kidney and tibialis anterior muscle. The cross-sectional area of tibialis anterior muscle was calculated. **Results** There were 10 common peaks in the HPLC chromatograms of 12 batches of samples with similarity > 0.95. Compared with those in the model group, the luster hair of rats was better, the growth rate of body weight was faster, the frequency of urination and defecation was less, the cleanliness of cage was better, the inflammation of renal tubule alleviated, the cell fragments and interstitial edema reduced, and the levels of BUN, SCr and 24 h Upr were significantly lower, and the cross-sectional area of tibialis anterior muscle were significantly larger in the Wuse Peiyuan Guben Formula group ($P < 0.05$). **Conclusion** Wuse Peiyuan Guben Formula can effectively improve the PEW of CKD model rats. The established method is convenient, accurate and reproducible, which can be used for the quality control and efficacy evaluation of Wuse Peiyuan Guben Formula.

Key words: Wuse Peiyuan Guben Formula; chronic kidney disease; rats; protein energy wasting; pharmacokinetics

五色培元固本方临床主要用于改善慢性肾脏疾病(CKD)患者血液透析后蛋白质能量消耗(PEW)并发症。该方对脾肾气虚型CKD疗效较好,特别是能有效减

少长期维持性血液透析患者的并发症,提高其生活质量。本研究中建立了五色培元固本方基准样品高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并结合动物模型评价其对

* 基金项目:重庆市自然科学基金面上项目[cstc2021jcjy-msxmX0886];重庆市科研机构绩效激励引导专项项目[jxyn2020-10];成都中医药大学“杏林学者”医院专项[YYZX2021062]。

第一作者:段瑶,女,大学本科,主管中药师,研究方向为中药学,(电子信箱)1140426424@qq.com。

[△]通信作者:沈洁,女,硕士研究生,药师,研究方向为中药化学、中药物质基础,(电子信箱)shenjiefamily@sina.com。

CKD - PEW 的药效作用,为全面控制和评价五色培元固本方的质量奠定基础,并为研究该方治疗疾病的作用机制提供参考。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪,包含DAD检测器(美国Agilent公司);JA3003J型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);R500型气体麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);Donatello型脱水机(意大利Diapath公司);JB - P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);Nikon Eclipse E100型光学显微镜及DS - U3成像系统(日本Nikon公司);GFL - 230型烤箱(天津市莱玻瑞仪器设备有限公司);AS10200AT型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试药

苏木素 - 伊红染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号为G1003);中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,批号为96949 - 21 - 2);酪蛋白(广东环凯生物科技有限公司,批号为3209090);4%酪蛋白(北京科澳协力饲料有限公司以酪蛋白加工);尿素氮(BUN)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号为JL21202);肌酐(Cr)、尿素(Upr)比色法试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为E - BC - K188 - M, E - BC - K183 - M);无水乙醇、二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为20190707, 20190522);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号为20220101);乙腈、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。五色培元固本方原料药材饮片产地、生产厂家及批号见表1,均经重庆市中医研究院制剂研究所杨敏主任中药师鉴定为正品,且符合2020年版《中国药典》中各饮片标准。

表1 药材饮片来源信息

Tab. 1 Source information of medicinal materials

饮片	产地	生产厂家	批号
白术	四川	四川新荷花中药饮片股份有限公司	2009098
当归	甘肃	重庆中药饮片厂	201110673
地黄	河南	重庆希美制药有限公司	201201
防风	辽宁	四川新荷花中药饮片股份有限公司	200901
红景天	西藏	重庆中药饮片厂	200810342
黄芪	甘肃	重庆希美制药有限公司	201101
灵芝	四川	重庆中药饮片厂	200310103
麸炒枳壳	四川	四川新荷花中药饮片股份有限公司	2011055

1.3 动物

SPF级SD大鼠40只,8周龄,雌雄各半,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证

号SCXK(湘)2019 - 0004,动物伦理审查号2022 - DWSY - SJ。置昼夜光照规律条件下,自由进食进水,适应性饲养1周。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱建立与评价

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min时1%A, 10 ~ 20 min时1%A → 10%A, 20 ~ 25 min时10%A → 15%A, 25 ~ 30 min时15%A → 20%A, 30 ~ 45 min时20%A → 30%A, 45 ~ 50 min时30%A → 60%A, 50 ~ 60 min时60%A, 60 ~ 65 min时60%A → 85%A, 65 ~ 67 min时85%A);流速:1 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μL。

2.1.2 供试品溶液制备

按五色培元固本方处方比例称取8种组方药材,混合,加8倍量水煎煮2次,每次60 min,滤过,合并滤液,减压浓缩至100 mL;精密量取2 mL,置锥形瓶中,加入甲醇20 mL,称定质量,超声(功率300 W,频率40 kHz)处理60 min,放冷,再次称定质量;用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 方法学考察

精密度、稳定性、重复性试验:取2.1.2项下供试品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件,连续进样测定6次;室温下放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时进样测定;以及制备供试品溶液6份,进样测定。计算共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间的RSD分别小于0.54%, 0.81%, 3.72% (n = 6), 相对峰面积的RSD分别小于2.23%, 3.42%, 4.76% (n = 6), 表明方法精密度良好,供试品溶液室温放置24 h内基本稳定,方法重复性良好。

2.1.4 指纹图谱建立及相似度评价

取样品(S1 ~ S12)各适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,并按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,将色谱图依次导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版),以S1样品的特征图谱为参照图谱,采用中位数法,进行多点校正和色谱峰匹配,得到12批样品HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱,确定了10个共有峰,见图1和图2。以对照指纹图谱为参照图谱,设其相似度为1.000,计算12批样品的相似度,结果S1 ~ S11样品均为1.000, S12样品为0.993,均大于0.950,相似度良好,表明样品的稳定性、均一性较好。

2.2 药效学分析

2.2.1 分组与建模

取SD大鼠20只,随机分为假手术组(6只,等体积蒸馏水)、模型组(7只,等体积蒸馏水)、五色培元固本

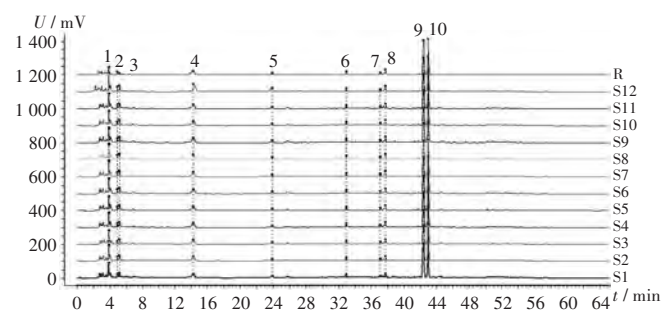


图1 12批样品HPLC叠加指纹图谱

Fig. 1 Superimposed HPLC fingerprint of 12 batches of samples

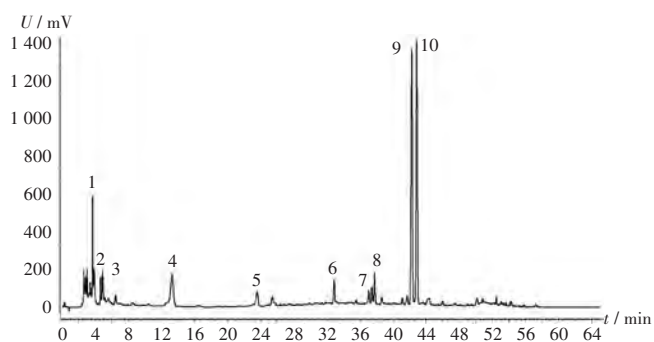


图2 样品高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC reference fingerprint of the samples

方组(7只, 9 g/kg);先切除大鼠2/3左肾, 1周后切除右肾, 然后连续8周喂饲4%酪蛋白饲料^[1](5 g/100 g)以复制CKD-PEW模型, 假手术组仅作切口、剥离肾膜并喂饲常规饲料;建模同时灌胃相应药物或蒸馏水, 每日1次, 连续8周。大鼠存活率为82.5%。

2.2.2 药效指标

从适应期开始至第11周, 每周测定大鼠体质量1次。末次给药后, 提前24 h将大鼠放入代谢笼, 禁食不禁饮, 收集尿液与粪便, 记录体质量, 检测24 h Upr水平。末次给药后眼眶取血, 分离血清, 采用ELISA法检测血清肌酐(SCr)、BUN水平。眼眶取血后, 处死大鼠, 取大鼠的肾脏、胫骨前肌, 浸泡于4%多聚甲醛中, HE染色, 显微镜下观察病理组织形态, 计算胫骨前肌横截面积。

2.2.3 结果

一般情况:与假手术组比较, 模型组大鼠精神状况较萎靡, 毛发光泽度较暗淡, 大小便频率较高, 笼内垫料更换频率较高, 体质量增长较慢;与模型组比较, 五色培元固本方组大鼠毛发光泽度较好, 体质量增长速度稍快, 大小便频率稍低, 相同时间段内笼内洁净度较好。详见图3和表2。

血清生化指标:与假手术组比较, 模型组大鼠的BUN, SCr及24 h Upr水平均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较, 五色培元固本方组上述指标水平均明显降低($P < 0.05$)。详见表2。

病理组织形态检查:1)肌肉萎缩。假手术组大鼠正

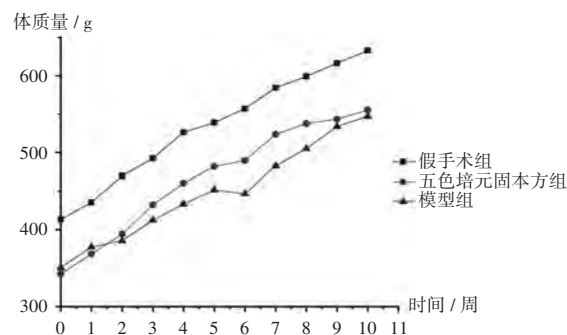


图3 大鼠体质量变化情况

Fig. 3 Changes in body mass of rats

表2 各组大鼠相关指标比较($\bar{X} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Comparison of relevant indexes of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 6$)

组别	BUN (mmol/L)	SCr ($\mu\text{mol/L}$)	24 h Upr (mg)	体质量 (g)	胫骨前肌横截 面积(μm^2)
假手术组	2.93 ± 0.66	29.37 ± 1.04	20.35 ± 1.46	632.80 ± 54.54	2496.78 ± 24.89
模型组	$13.67 \pm 0.66^\Delta$	$63.27 \pm 0.76^\Delta$	$36.98 \pm 1.14^\Delta$	547.12 ± 23.22	$1626.00 \pm 22.69^\Delta$
五色培元固本方组	$11.73 \pm 1.37^\#$	$43.20 \pm 0.94^\#$	$26.91 \pm 0.98^\#$	555.04 ± 59.66	$2205.23 \pm 30.55^\#$

注:与假手术组比较, $^\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $^\# P < 0.05$ 。

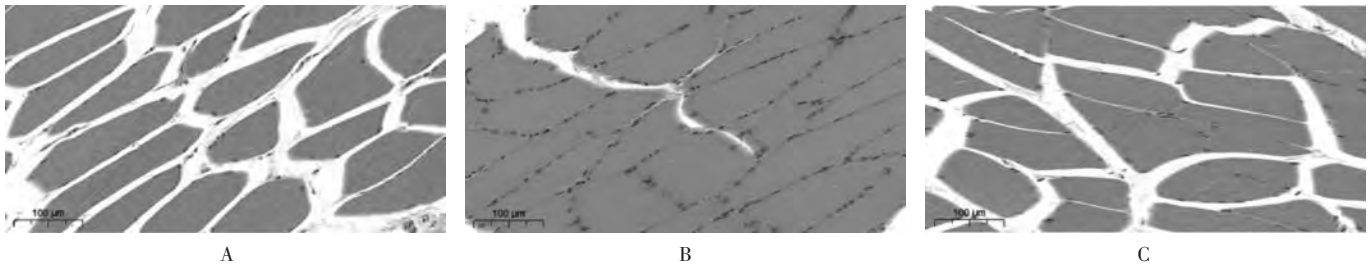
Note: Compared with those in the sham operation group, $^\Delta P < 0.05$; Compared with those in the model group, $^\# P < 0.05$.

常肌细胞大小程度不等,呈多边形排列,肌膜下每个肌细胞有数个肌细胞核;模型组大鼠肌细胞存在慢性淋巴细胞浸润现象,且肌细胞面积缩减早于间质空间缩减;五色培元固本方组大鼠相比模型组间质空间增大及肌细胞面积增大。详见表2和图4。2)肾脏病理。肉眼可见模型组及五色培元固本方组大鼠肾脏代偿性肿大。显微镜下观察,模型组大鼠肾小管中存在脱落细胞碎片,管状基底膜区域被相邻细胞的细胞质薄层覆盖;肾脏毛细血管中存在间质水肿和炎性细胞;灶性肾小管上皮细胞凝固性坏死,肾小管腔内可见细胞碎片,且肾小管边缘不清晰或破裂。与模型组比较,五色培元固本方组大鼠肾小管炎症减轻,细胞碎片及间质水肿减少,但肾小球损伤改善不明显。详见图5。

3 讨论

CKD已成为全球关注的健康问题,其发病率以每年约8%的速度增长,成为全球第12大死亡原因^[2]。20%~25% CKD患者会发生PEW,后者被认为是死亡和加速动脉粥样硬化心血管疾病的危险因素之一。PEW常见于中后期CKD患者,透析患者尤甚,病情因CKD的分期和透析技术的不同而有所不同,18%~75%成年维持性透析患者存在消耗证据^[3]。因此,需重点处理好CKD进展与纠正PEW之间的平衡。

中医认为,PEW是由于外感六淫邪气,内因脏腑虚

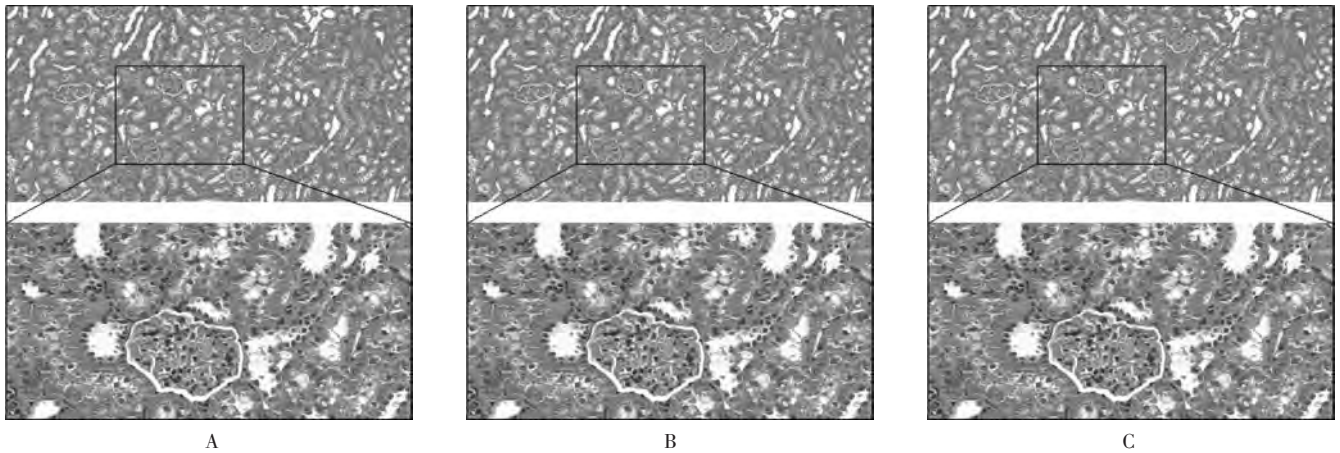


A. 假手术组 B. 模型组 C. 五色培元固本方组

图4 大鼠胫骨前肌形态(HE, × 10)

A. Sham operation group B. Model group C. Wuse Peiyuan Guben Formula group

Fig. 4 Morphology of tibialis anterior muscle of rats (HE, × 10)



A. 假手术组 B. 模型组 C. 五色培元固本方组

图5 大鼠肾脏病理组织形态(HE, × 10 或 × 40)

A. Sham operation group B. Model group C. Wuse Peiyuan Guben Formula group

Fig. 5 Pathological histomorphology of kidney of rats (HE, × 10 or × 40)

衰,脾肾亏虚,先后天生化乏源,导致气血衰败,五脏六腑失养,脉络瘀滞,痰、湿、瘀内停,积聚于肾,促进炎症发展,蛋白代谢失衡的状态,故以扶正祛邪、培脾补肾为主要疗法^[4-6]。脾为后天之本,气血生化之源;肾为先天之本,主先天之精气。气虚日久,阳为之不足,肾阳衰败,脾土失于温煦,无力运化水谷精微,脾肾二脏衰惫,饮食不进,化源不足,必导致机体失于濡养^[7-8]。故中医宜围绕本(脾肾亏虚)虚标(湿浊瘀毒)实展开治疗,以健脾益肾、益气养阴、祛湿泄浊、活血和络为主要治则,并善于补气养血,填精助阳,调养脏腑,充养机体^[9-10]。

五色培元固本方有补脾益肾、益气活血功效,能改善患者脾肾亏虚、气血不足所致肢体倦怠、腰膝酸软、气短声低、汗多懒言、脘腹痞闷、纳差食少等症。方中生地性寒、味甘苦、滋阴益肾、为君药;白术性温、味甘苦、健脾益气,黄芪性温、味甘、善入脾胃、益气固表,两药均能补气健脾,共为臣药;防风性温、味辛甘、祛风解表、益卫固表、祛邪而不伤正、固表而不留邪,当归性温、味甘、质润、补血活血行滞,枳壳理气宽中,共为佐药;灵芝性平、味甘、补气安神,红景天益气活血,两药

为使药,既可助白术、黄芪补气之力,又兼具安神、活血之效。全方脾肾同补,气血并调,动静结合,补而不滞,最终实现扶正祛邪。

预试验中分别考察了不同提取方法(超声法与回流法),不同提取溶剂(50%甲醇、70%甲醇、甲醇、50%乙醇、70%乙醇、乙醇)对五色培元固本方提取的影响,不同梯度及全波长扫描对峰分离的影响。结果表明,使用甲醇为溶剂进行超声提取,且以2.1.1项下条件梯度洗脱,可获得更多和含量更高的成分,使得分离的各峰峰形更好,峰响应值更高。并通过HPLC法建立了12批五色培元固本方样品的指纹图谱,共筛选出10个共有峰,基准样品相似度较好,表明样品稳定、均一性较好,主要物质群差异较小。还通过二次5/6肾切术搭配低蛋白饲料复制CKD-PEW模型大鼠,根据预试验结果结合实验效率及给药影响综合分析,选择模型复制时间为8周。大鼠的“蛋白质库”主要集中在腿部肌肉群,蛋白质消耗的临床表现为肌肉萎缩。而本研究结果表明,五色培元固本方能通过改善肌间质空间及肌细胞面积缩减,有效改善CKD-PEW模型大鼠的肾脏损伤及肌