

花旗泽仁主要活性成分在大鼠胰岛素抵抗脂肪组织的分布

李佳欣 朱 蕾 陈思琦 葛鹏玲

摘 要 **目的** 采用高效液相串联质谱(HPLC-MS/MS)方法,研究花旗泽仁在大鼠体内药代动力学特征,进行花旗泽仁药动学成药性研究。**方法** 用 HPLC-MS/MS 方法,完成各胰岛素抵抗脂肪组织 3 种活性成分浓度检测方法学考察。分别于花旗泽仁 3 种活性成分药时曲线上吸收相、分布相和消除相选取时间点,给予大鼠花旗泽仁水煎液 1 次灌胃后,检测 3 种活性成分于不同时间点脂肪组织浓度,观察这些成分在脂肪组织中的分布特点及浓度随时间变化的规律。**结果** 组织方法学考察结果显示,仪器的精密度良好,方法的专属性较强,各成分的回收率、重现性与稳定性均符合生物样品检测要求,适用于花旗泽仁 3 种活性成分脂肪组织的含量测定。人参皂苷 Rb₁ 在给药后在脂肪组织分部较少;泽泻醇 A-24-醋酸酯在脂肪、浓度相对较高;9-羟基(10E、12E)十八碳二烯酸(9-HODE)在脂肪中分布较多。**结论** 3 种活性成分在胰岛素抵抗脂肪组织中均有分布。

关键词 花旗泽仁 单味药 组织分布 高效液相色谱-串联质谱法 大鼠

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.05.011

Distribution of Main Active Components from Huaqizeren in Adipose Tissue of Insulin Resistance Rats. Li Jiaxin, Zhu Lei, Chen Siqui, et al. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang 150040, China

Abstract Objective To study the pharmacokinetic characteristics of huaqizeren in rats by HPLC-MS/MS, and to study the pharmacokinetic properties of huaqizeren. **Methods** HPLC-MS/MS method was used to investigate the concentration of three active components in adipose tissue of insulin resistance. The time points of absorption phase, distribution phase and elimination phase were selected on the drug time curve of huaqizeren, and the concentrations of three active components in adipose tissue at different time points were detected and observed. The distribution and concentration of fenofibrate in adipose tissue were studied. **Results** The results of tissue methodology study showed that the precision of the instrument was good, the specificity of the method was strong, and the recovery rate, reproducibility and stability of each component met the requirements of biological sample detection, and it was suitable for the content determination of three active components of huaqizeren adipose tissue. Ginsenoside Rb₁ was less in adipose tissue after administration. Alisol A-24-acetate was in fat and concentrated in fat 9-fold was more distributed in fat. **Conclusion** The three active components are distributed in insulin resistant adipose tissue.

Key words Huaqizeren; Single drug; Tissue distribution; HPLC-MS/MS; Rat

胰岛素抵抗(IR)是一种病理生理状态,在这种状态下,细胞对胰岛素降血糖活性的反应性降低。IR常与高胰岛素血症、腰围增加或内脏肥胖、高甘油三酯和低高密度脂蛋白的代谢性血脂异常以及脂肪变性有关,这些特征统称为代谢综合征,称之为“普通胰岛素抵抗”^[1]。

在过去的 20 年里,一致性观点认为脂肪组织是

肝脏和骨骼肌代谢和细胞信号的主要调节者^[2,3]。因此,高脂饮食(HFD)或肥胖条件下的脂肪组织功能障碍被认为通过循环、中枢神经系统或外显体的潜在释放,向其他代谢组织传递破坏性信号^[3-6]。可能存在 3 种机制来调节这种脂肪组织对其他组织的控制和全身葡萄糖稳态:①通过促进合成或限制脂解,在白色脂肪细胞库中进行脂质隔离,从而防止有毒脂质在肝脏和骨骼肌中积聚并受到损害在脂肪营养不良^[7,8];②特殊的米色和棕色脂肪细胞内葡萄糖和脂肪酸氧化率高,增加了能量消耗并减少了脂质负荷^[9,10];③生物活性因子的分泌,这些生物活性因子可以靶向大脑、肝脏、骨骼肌、胰岛或其他组织^[11,12]。

从 IR 肺胃热盛、津气两伤、肾气亏虚等病理特点

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273650);国家科技重大专项基金资助项目(2012ZX09103201);黑龙江省博士后落地科研启动金资助项目(LBH-Q15136)

作者单位:150000 哈尔滨,黑龙江中医药大学

通讯作者:葛鹏玲,教授,博士生导师,电子信箱:penglingge@126.

com

出发,故用西洋参补阴清热之功,补肺胃之阴,清肺胃之热;泽泻清热利湿,化浊降脂之利;薏苡仁渗湿止泻,除痹散结之功,组成花旗泽仁中药复方。但花旗泽仁治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗的主要活性成分被机体吸收后,能否被在靶组织或靶器官达到一定的分布浓度,是其发挥改善胰岛素抵抗的关键所在。实验对大鼠灌胃花旗泽仁水煎液后,测定人参皂苷 Rb_1 、泽泻醇 A-24-醋酸酯和 9-HODE 相于胰岛素抵抗相关组织——脂肪组织中的浓度,观察这些成分在脂肪组织中的分布特点及浓度随时间变化的规律。

材料与方法

1. 实验材料及动物:人参皂苷 Rb_1 标准品,泽泻醇 A-24-醋酸酯标准品由成都 MUST 生物技术有限公司提供。9-HODE 标准品由美国 Sigma 公司提供。地西洋标准品由中国药品生物鉴定所提供。西洋参、泽泻和薏苡仁由黑龙江省世一堂中药饮片厂提供。氮气由哈尔滨春霖气体有限公司提供。安捷伦 6460 三重四级杆串联质谱由美国 Agilent 公司提供。涡旋混合仪由美国 Scientific 公司提供。5810R 离心机由德国 Eppendorf AG 公司提供。由黑龙江中医药大学实验动物中心购买清洁级 Sprague-Dawley (SD) 3 月龄雄性大鼠 42 只,且体质量约为 200g,实验动物合格证号:SCXK(黑)2013-004。适应性喂养 1 周,房间温度在 20℃ 左右,相对湿度 50% 左右。

2. 花旗泽仁水煎液,储备液及工作液的制备:花旗泽仁水煎液按本课题组前期工作方法制备^[13]。于 25ml 容量瓶中放置地西洋 5mg,并甲醇进行溶解,所配得内标储备液的浓度为 200μg/ml。分别精密称取泽泻醇 A-24-醋酸酯、人参皂苷 Rb_1 与 9-HODE 0.4mg、4mg、2mg,继续用甲醇溶解,分别制得浓度为 40μg/ml、400μg/ml、200μg/ml 的储备液。用甲醇配制工作液:人参皂苷 Rb_1 :1、2、4、10、20、40、100、200μg/ml;泽泻醇 A-24-醋酸酯:0.02、0.04、0.1、0.2、0.4、1、2、4μg/ml;9-HODE:0.2、0.4、1、2、4、10、20、40μg/ml。

3. 标准曲线组织样品及质量控制样品的配制:工作溶液浓度为:人参皂苷 Rb_1 为 0.05~10.00μg/ml;泽泻醇 A-24-醋酸酯为 0.001~0.200μg/ml;9-HODE 为 0.01~2.00μg/ml。质量控制样品浓度为:人参皂苷 Rb_1 为 0.1、1.8μg/ml;泽泻醇 A-24-醋酸酯为 0.002、0.02、0.16μg/ml;9-HODE 为 0.02、0.2、1.6μg/ml。

4. 液相色谱及质谱检测条件:液相色谱柱为 C18 柱(1.8μm, 100.0mm × 3.0mm),其流速为 0.3ml/min,柱温为 40℃,进样体积为 10μl,自动进样器温度 4℃。流动相:A 相为水(含 0.1% 甲酸),B 相为乙腈。各个样品的分析周期为 12min,人参皂苷 Rb_1 与泽泻醇 A-24-醋酸酯洗脱方式为梯度洗脱详见表 1,各待测成分的质谱参数详见表 2。

表 1 流动相洗脱程序

时间 (min)	流速 (ml/min)	水 (%)	乙腈 (%)
0	0.3	80	20
1	0.3	80	20
2	0.3	50	50
3	0.3	20	80
6	0.3	20	80
8	0.3	80	20
12	0.3	80	20

表 2 待测成分的质谱检测参数

目标化合物	模式	质荷比
人参皂苷 Rb_1	负离子源	1107.5960
泽泻醇 A-24-醋酸酯	负离子源	577.3681
9-HODE	负离子源	295.2270

5. 人参皂苷 Rb_1 ,泽泻醇 A-24-醋酸酯及 9-HODE 组织样品处理方法:精密称取脂肪组织样品 0.5g,加入 0.9% 氯化钠注射液超声 10min 进行组织匀浆制备。将 100μl 组织匀浆准确加入 500μl 含内标(地西洋为 0.1μg/ml)的甲醇溶液,12000r/min 高速离心 10min,在 30℃ 氮气流下将上清液吹干,剩余残渣加入甲醇 100μl,高速离心 10min 复溶。

6. 组织样品方法学考察:(1)选择性:选取脂肪组织样品,加入混合标准样品制成浓度为 人参皂苷 Rb_1 :1μg/ml;泽泻醇 A-24-醋酸酯:0.2μg/ml 的标准添加组织样品。另取空白脂肪组织配制成 9-HODE 浓度为 0.02μg/ml 的标准添加组织样品,并与空白组织一同处理进样分析。(2)线性范围和定量下限:将人参皂苷 Rb_1 与泽泻醇 A-24-醋酸酯混合标准曲线组织样品及 9-HODE 标准曲线组织样品分别进样分析,获得待测组分与内标峰面积值。纵坐标(y):人参皂苷 Rb_1 、泽泻醇 A-24-醋酸酯峰面积与内标物地西洋峰面积做比,横坐标(x):标准组织样品浓度。另外,以纵坐标为 9-HODE 峰面积,以横坐标为 9-HODE 标准组织样品浓度。(3)基质效应和提取回收率:将配制好的质量控制脂肪组织样品

进行进样分析,待测成分与内标峰面积 A_3 。组织样品处理后,分别加入与质量控制样品同等浓度的人参皂苷 Rb_1 、泽泻醇 A-24-醋酸酯与内标混合标准溶液及 9-HODE 标准溶液,峰面积 A_2 。将上述混合标准溶液与 9-HODE 标准溶液直接进样分析,得到峰面积 A_1 。(4)精密度和准确度:将配制好的质量控制脂肪组织样品分别按照组织样品处理方法进行进样分析,得到 3 种待测组分及内标峰面积值,求算组织样品日内精密度和准确度。连续 3 天进样分析,求算组织样品日间精密度和准确度。(5)样品稳定性:反复冻融 3 次后进样分析;于 25℃ 室温下放置 4h 后进样分析;2 周后进行进样分析;于自动进样器 12h 后进样分析。

结 果

1. 方法学考察:选择性如图 1~图 2 为待测组分与内标色谱图结果,结果显示在待测组分和内标的出峰位置,空白各组织匀浆中的其他内源性成分对测定不造成干扰。待测组分和内标的保留时间如下:人参皂苷 Rb_1 保留时间为 6.2min,泽泻醇 A-24-醋酸酯保留时间为 9.4min,地西洋保留时间为 1.7min,9-HODE 的保留时间为 2.7min。

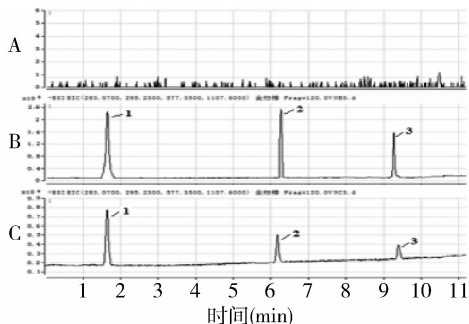


图 1 组织样品色谱图

A. 空白组织;B. 空白组织标准添加的待测组分和内标;
C. 给药 2h 后的组织样品。1. 地西洋;2. 人参皂苷 Rb_1 ;
3. 泽泻醇 A-24-醋酸酯

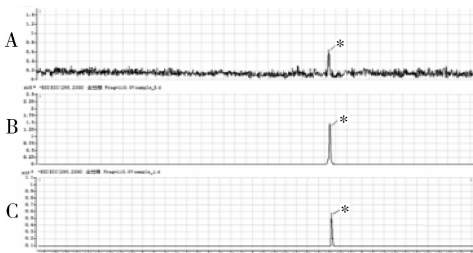


图 2 9-HODE 的组织样品色谱图

A. 空白组织;B. 空白组织标准添加的待测组分;
C. 给药 2h 后的组织样品。* 代表 9-HODE

2. 线性范围与定量下限:标准曲线在各浓度范围内均显示线性良好,人参皂苷浓度为 $Rb_1: 0.05 \sim 10.00 \mu\text{g/ml}$;泽泻醇 A-24-醋酸酯浓度为 $0.001 \sim 0.200 \mu\text{g/ml}$;9-HODE 浓度为 $0.01 \sim 2.00 \mu\text{g/ml}$ 。待测组分的平均回归方程详见表 3。

表 3 待测组分在脂肪组织中的平均回归方程、相关系数与定量下限 ($n=6$)

分析物	组织	回归方程	R^2	定量下限 ($\mu\text{g/ml}$)
人参皂苷 Rb_1	脂肪	$y = 3.4629x - 0.1306$	0.9977	0.050
泽泻醇 A-24-醋酸酯	脂肪	$y = 149.22x - 0.0155$	0.9969	0.001
9-HODE	脂肪	$y = 442022x - 3521.7$	0.9989	0.010

3. 基质效应和提取回收率:低、中、高 3 个浓度下,3 种活性成分均存在一定的基质效应,均为 85%~115%,且精密度相对标准偏差均 $< 20\%$,符合生物样品分析要求。提取回收率结果显示,3 种待测组分结果均在 80% 左右。组织处理方法对待测组分提取回收率良好,重现性均较好,均符合分析要求(表 4)。

表 4 待测组分在大鼠脂肪组织中的基质效应和提取回收率 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

分析物	峰值浓度 (ng/ml)	基质效应 (%)	提取回收率 (%)
人参皂苷 Rb_1	100	86.0 ± 5.5	81.7 ± 5.2
	1000	91.9 ± 2.9	86.1 ± 4.0
	8000	89.1 ± 3.3	82.7 ± 3.8
泽泻醇 A-24-醋酸酯	2	85.7 ± 9.8	86.7 ± 2.0
	20	89.5 ± 6.3	83.9 ± 4.1
	160	86.3 ± 2.1	80.8 ± 3.2
9-HODE	20	90.6 ± 4.5	87.2 ± 1.8
	200	93.7 ± 4.4	85.0 ± 4.8
	1600	88.6 ± 7.0	89.1 ± 3.3
地西洋	500	90.1 ± 2.7	88.4 ± 4.5

4. 精密度和准确度:3 种待测组分在脂肪组织中的日内与日间精密度均 $< 20\%$,日内与日间准确度为 $\pm 20\%$,数据表明待测组分在大鼠各组织中的精密度与准确度符合生物样品的分析要求(表 5)。

5. 样品稳定性:低、中、高 3 个浓度下,相对偏差均为 $\pm 20\%$,且相对标准偏差均 $< 20\%$,待测组分在大鼠脂肪组织中的稳定性符合生物样品的分析要求(表 6)。

6. 花旗泽仁主要活性成分在大鼠胰岛素抵抗脂肪组织中的分布结果与特点:大鼠灌胃给予花旗泽仁水煎液 0、0.25、0.5、1、2、6 和 8h 后,花旗泽仁 3 种主要活性成分在脂肪组织中的浓度详见表 7。人参皂

表 5 待测组分在大鼠脂肪组织中的精密度和准确度 (n = 6)

分析物	标准浓度 (ng/ml)	日内			日间		
		平均值 (ng/ml)	精密度 (%)	准确度 (%)	平均值 (ng/ml)	精密度 (%)	准确度 (%)
人参皂苷 Rb1	100	98.75	3.4	-1.2	101.10	3.6	1.1
	1000	1021.40	8.0	2.1	983.50	7.2	-1.6
	8000	7756.30	7.2	-3.0	7860.40	6.5	-1.7
泽泻醇 A-24-醋酸酯	2	2.12	3.5	6.1	2.05	5.0	2.4
	20	20.46	2.3	2.3	20.23	5.3	1.2
	160	155.50	6.3	-2.8	157.60	5.7	-1.5
9-HODE	20	21.51	8.6	7.6	20.37	9.1	1.8
	200	208.60	3.6	4.3	203.40	7.7	1.7
	1600	1634.20	2.2	2.1	1617.30	2.5	1.1

表 6 待测组分在大鼠脂肪组织中的稳定性 (n = 6)

分析物	峰值浓度 (ng/ml)	3 次冻融		短期 (室温 4h)		长期 (在 -80℃ 下 2 周)		处理后 (在 4℃ 12h)	
		相对偏差 (%)	标准偏差 (%)	相对偏差 (%)	标准偏差 (%)	相对偏差 (%)	标准偏差 (%)	相对偏差 (%)	标准偏差 (%)
人参皂苷 Rb ₁	100	6.3	3.9	4.8	5.0	-1.6	6.4	2.7	3.7
	1000	-4.7	8.9	3.6	7.4	1.2	5.9	4.6	8.9
	8000	5.4	3.8	3.9	9.4	-1.3	5.1	-1.2	3.7
泽泻醇 A-24-醋酸酯	2	3.0	4.7	-1.9	5.3	1.6	6.2	-2.3	7.0
	20	-5.2	5.3	2.5	3.8	1.9	6.0	3.0	3.4
	160	4.1	4.0	2.8	3.7	-1.3	2.1	-3.1	3.6
9-HODE	20	5.6	9.3	-2.7	11.2	1.7	13.1	-4.2	9.4
	200	8.1	3.7	2.7	9.1	-2.8	5.8	-6.2	6.0
	1600	4.1	2.8	-3.7	3.7	1.1	7.1	-1.6	2.6

表 7 大鼠口服花旗泽仁水煎液后待测组分在脂肪组织中的浓度 (μg/g)

时间 (h)	浓度					
	0.25	0.5	1	2	6	8
人参皂苷 Rb ₁	未检出	未检出	0.010 ± 0.002	0.160 ± 0.040	0.280 ± 0.090	0.100 ± 0.020
泽泻醇 A-24-醋酸酯	0.014 ± 0.004	0.020 ± 0.008	0.013 ± 0.005	0.021 ± 0.009	0.038 ± 0.010	0.086 ± 0.023
9-HODE	5.050 ± 1.810	5.200 ± 2.290	4.810 ± 2.180	6.240 ± 2.630	5.830 ± 2.120	3.710 ± 1.320

苷 Rb₁ 在给药后在脂肪组织中分布较慢, 给药后 1h 内脂肪中未发现分布或分布较少。人参皂苷 Rb₁ 在给药 6h 后, 于脂肪组织中浓度最高。泽泻醇 A-24-醋酸酯进入脂肪组织的速度较快, 给药 8h 后于在脂肪组织中检测浓度相对较高。9-HODE 脂肪组织中分布较多, 大鼠口服花旗泽仁水煎液后脂肪组织中 9-HODE 的含量均出现了不同程度的增加, 便于其在胰岛素抵抗相关组织中发挥作用, 同时随着体内代谢与排泄过程, 9-HODE 含量逐渐降低并趋于基础值 (图 3 ~ 图 5)。

讨 论

Xiong 等^[14] 研究发现, 小鼠腹腔注射人参皂苷 Rb₁ 后, 能显著降低高脂饮食大鼠的空腹血糖, 提高糖耐量, 表明人参皂苷 Rb₁ 能有效维持血糖稳态。Yu 等^[15] 报道人参皂苷 Rb₁ 通过上调肝脂蛋白的表

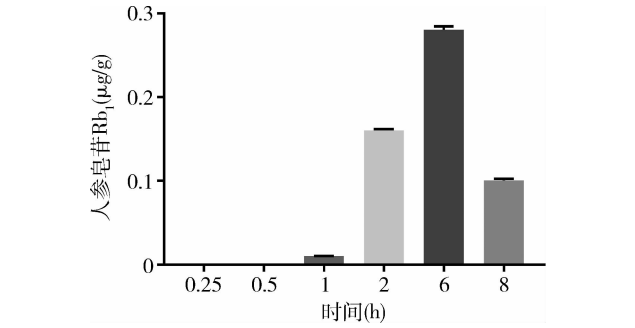


图 3 大鼠口服花旗泽仁水煎液后人参皂苷 Rb₁ 在脂肪组织的分布

达, 降低了 db/db 小鼠肝脏脂质外区的堆积。此外, 人参皂苷 Rb₁ 还可以有效降低血液中的游离脂肪酸, 提高胰岛素敏感度。本实验将花旗泽仁水煎液给与大鼠后, 发现人参皂苷 Rb₁ 分布速度略慢, 2h 后在脂

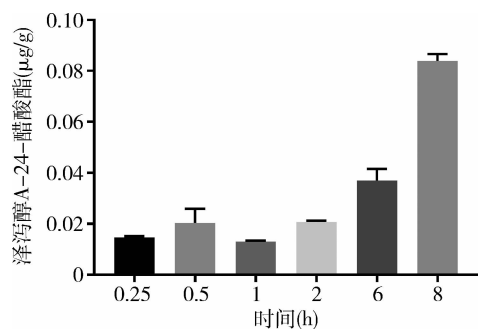


图4 大鼠口服花旗泽仁水煎液后泽泻醇A-24-醋酸酯在脂肪组织的分布

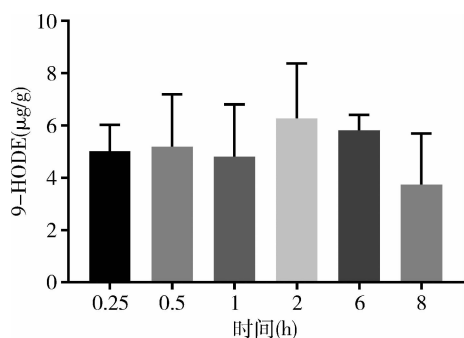


图5 大鼠口服花旗泽仁水煎液后9-HODE在脂肪组织的分布

脂肪组织上的分布增加,且6h后分布最多。

泽泻在我国医学中已被用于糖尿病的治疗。体外实验显示其降血糖活性。测定3T3-L1脂肪细胞培养液中葡萄糖和脂质水平,分析 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。与抗糖尿病药物噻唑烷二酮类比较,0.5g/kg剂量的泽泻乙醇提取物在3T3-L1脂肪细胞模型中增加了葡萄糖摄取而不是脂肪生成,同时在25 μ g/ml剂量下抑制了 α -葡萄糖苷酶活性。实验给予花旗泽仁后,泽泻醇A-24-醋酸酯进入脂肪组织速度较快,且1h后随着时间增加分布增多,给药8h后于在脂肪组织中检测浓度相对较高。

Liu等^[16]使用高脂肪饮食(HFD)诱导小鼠肥胖,并检测薏苡仁(CS)治疗对微生物组成和功能的调节。研究表明,CS引起的肠道菌群结构改变与抗肥胖和抗糖尿病作用有关。实验表明大鼠口服花旗泽仁水煎液后脂肪组织中9-HODE的含量均出现了不同程度的增加,同时随着体内代谢与排泄过程,9-HODE含量逐渐降低并趋于基础值。

综上所述,3种活性成分在胰岛素抵抗相关组

织——脂肪中均有分布,有利于其在治疗2型糖尿病胰岛素抵抗的过程中发挥药理作用。

参考文献

- Chen DL, Liess C, Poljak A, *et al.* Phenotypic characterization of insulin-resistant and insulin-sensitive obesity[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(11): 4082-4091
- Straub LG, Scherer PE. Metabolic messengers: adiponectin[J]. *Nat Metab*, 2019, 1(3): 334-339
- Funcke JB, Scherer PE. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication[J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(10): 1648-1684
- Perry RJ, Camproux JO, Kursawe R, *et al.* Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Cell Cambridge Ma*, 2015, 160(4): 745-758
- Paul M, Titchenell, William J, *et al.* Direct hepatocyte insulin signaling is required for lipogenesis but is dispensable for the suppression of glucose production[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(6): 1154-1166
- Guilherme A, Henriques F, Bedard AH, *et al.* Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(4): 207-225
- Mann JP, Savage DB. What lipodystrophies teach us about the metabolic syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(10): 4009-4021
- Montgomery MK, De Nardo W, Watt MJ. Impact of lipotoxicity on tissue "cross talk" and metabolic regulation[J]. *Physiology*, 2019, 34(2): 134-149
- Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 27-37
- Jan N, Yanling W, Barbara C. Cell proliferation and apoptosis inhibition: essential processes for recruitment of the full thermogenic capacity of brown adipose tissue[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mole Cell Biol Lipids*, 2018, 1864(1): 51-58
- Shapira SN, Seale P. Transcriptional control of brown and beige fat development and function[J]. *Obesity*, 2019, 27(1): 13-21
- Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, *et al.* Brown adipose tissue as a secretory organ[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 13(1): 26-35
- 陈思琦, 赵聪, 李璐, 等. 花旗泽仁主要活性成分在小鼠体内肠道菌群中的代谢研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(5): 46-51
- Xiong Y, Shen K, Liu J, *et al.* Antiobesity and antihyperglycemic effects of ginsenoside Rb₁ in rats[J]. *Diabetes*, 2010, 59: 2505-2512
- Yu X, Ye L, Zhang H, *et al.* Ginsenoside Rb₁ ameliorates liver fat accumulation by upregulating perilipin expression in adipose tissue of db/db obese mice[J]. *J Ginseng Res*, 2015, 39(3): 199-205
- Liu S, Li F, Zhang X. Structural modulation of gut microbiota reveals Coix seed contributes to weight loss in mice[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(13): 5311-5321

(收稿日期: 2020-11-19)

(修回日期: 2021-03-09)