

薯蓣皂苷元的制备及其抗甲亢活性研究

秦龙, 胡雪剑, 任建功, 焦海胜, 李平* (兰州大学第二医院, 兰州 730030)

摘要: 目的 考查薯蓣皂苷元对甲亢大鼠的活性。方法 穿山龙饮片用含 $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸的 75% 乙醇水溶液在沸水浴中回流提取 4.5 h, 再经柱层析法分离、精制纯化得薯蓣皂苷元提取物, 并进行结构表征。采用优甲乐灌胃法制作大鼠甲亢模型, 并将大鼠随机分成正常对照组、甲亢模型组、甲巯咪唑治疗组、薯蓣皂苷元治疗组(低、中、高剂量), 分别于给药 21 d 后测定大鼠血清中 T_3 、 T_4 及 TSH 值。结果 薯蓣皂苷元提取制备工艺正确适当, 所得薯蓣皂苷元提取物经氢谱、碳谱、质谱和高效液相色谱表征确定为薯蓣皂苷元。与甲亢模型组比较, 薯蓣皂苷元治疗组(低、中、高)血清中 T_3 、 T_4 和 TSH 值均有不同程度改善。结论 薯蓣皂苷元制备工艺合理可行, 得率较高。薯蓣皂苷元可使甲亢大鼠的各项甲状腺功能血清值恢复正常, 还可增加其体质量, 功效与甲巯咪唑相似, 值得进一步研究。

关键词: 穿山龙; 薯蓣皂苷元; 模型; 甲亢

中图分类号: R285.5; R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)06-0692-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.06.012

Preparation and Study on Anti-hyperthyroidism Activities of Diosgenin

QIN Long, HU Xuejian, REN Jianguo, JIAO Haisheng, LI Ping* (Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, 730030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effectiveness of diosgenin on hyperthyroid rats. **METHODS** Dioscoreae Nipponicae Rhizoma was refluxed for 4.5 h in 75% ethanol aqueous solution which containing sulfuric acid $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The crude product was purified by column chromatography on silica gel, and the structure of diosgenin was characterized. The model of hyperthyroid rats was prepared by intragastric administration of euthyrox, the rats were randomized into six groups: The normal rats group, the model group, the methimazole group, the diosgenin groups(low, medium and high dose). T_3 , T_4 and TSH in rats serum were examined separately after 21 days. **RESULTS** The diosgenin structures were elucidated by means of $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS and HPLC. Compared with the model rats, the diosgenin groups(low, medium and high dose) serum T_3 , T_4 and TSH were improved for varying degrees. **CONCLUSION** The Diosgenin extraction process shows good practicability and high yield. Diosgenin not only helps hyperthyroidism rats return to normal, but also can increase body weight, which has the similar effect with methimazole, further studies will be needed.

KEY WORDS: Dioscoreae Nipponicae Rhizoma; diosgenin; model; hyperthyroidism

甲状腺机能亢进症(hyperthyroidism, 甲亢), 系由多种病因导致甲状腺激素分泌增多所引起的内分泌系统疾病, 女性高发, 其发病机制尚未明确^[1]。甲亢的临床治疗方法主要有抗甲状腺药物治疗, 放射碘 ^{131}I 治疗和手术治疗^[2-3], 目前仍然以药物治疗为主。近年来中药治疗甲亢研究取得了良好的研究进展, 发现了许多具有抗甲亢作用的单味中药如夏枯草、雷公藤和穿山龙等^[4], 得到了医药研究者的普遍关注。薯蓣皂苷元(Diosgenin), 广泛存在于豆科和薯蓣科植物中, 是穿山龙活性成分甾体皂苷的水解产物, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等药理作用, 具有很高的药用价值^[5-6]。为

开发具有抗甲亢药理活性的中药有效成分, 本研究考察了薯蓣皂苷元对甲亢大鼠模型的作用。

1 材料

1.1 动物

健康 SD 大鼠, ♀, 清洁级, 体质量(180 ± 20)g, 合格证号: NO.62000800000023, 由兰州大学医学院实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(甘)2013-0002。

1.2 药物与试剂

穿山龙(Dioscoreae Nipponicae Rhizoma, 甘肃众友药业中药饮片加工有限公司, 批号: 100623), 经甘肃省药品检验研究院宋平顺主任药师鉴定为

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(145RJZA207); “兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金”自由探索项目(lzujbky-2013-216); 兰州大学第二医院院内中医药科研项目(YJzy2013-38)

作者简介: 秦龙, 男, 硕士, 药师 Tel: (0931)8942879 E-mail: qinl04@163.com *通信作者: 李平, 男, 博士, 硕导, 主任药师 Tel: (0931)8942043 E-mail: gsliping@163.com

薯蓣科植物穿山龙 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎；薯蓣皂苷元对照品(中国食品药品检定研究院, 含量: 99.9%, 批号: 111539-200001); 三碘甲状腺原氨酸(T₃)放免试剂盒、甲状腺素(T₄)放免试剂盒、促甲状腺激素(TSH)放免试剂盒均购自北京北方生物技术研究所, 批号均为 20131120; 优甲乐(德国默克公司, 批号: 160101)、甲巯咪唑(德国默克公司, 批号: 162633)分别用生理盐水配制成 100 μg·mL⁻¹、0.5 mg·mL⁻¹ 的混悬液, 置于 4 °C 冰箱中保存备用; 薄层层析板和硅胶 G(青岛海洋化工有限公司); 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(美国安捷伦公司, 4.6 mm×250 mm, 5 μm); ME215S 型电子分析天平(德国赛多利斯仪器有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); DPC-Gamma-C12 型放射免疫计数器(德国西门子公司); L600 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); KDC-2046 型低温大容量离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); Bruker Am 400 MHz 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司); APEX II 47e 型质谱仪(德国 Bruker 公司)。

2 方法与结果

2.1 薯蓣皂苷元的制备

参考文献方法^[7-9], 精确称取 20 g 穿山龙, 剪碎置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入含 1.5 mol·L⁻¹ 硫酸的 75% 乙醇水溶液 120 mL, 沸水浴中加热回流 4.5 h。冷却后过滤, 收集滤液, 用 3×100 mL 石油醚(沸点 60~90 °C)在磁力搅拌下进行液-液萃取, 每次萃取 0.5 h, TLC 检测(石油醚: 乙酸乙酯=7:3, 喷 10% H₂SO₄ 乙醇溶液, 105 °C 下烘干显色, R_f=0.59)萃取完全后, 合并萃取液, 先后用 4%~8% KOH 和饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋转蒸发干燥后得薯蓣皂苷元粗产物, 经柱层析法分离纯化(石油醚: 乙酸乙酯=7:3), 得白色晶体, 重结晶 3 次, 精制纯化, 干燥, 即得。本品经结构表征为薯蓣皂苷元(0.38 g, 得率为 1.9%, 纯度为 96%)。

2.2 薯蓣皂苷元的结构表征

2.2.1 薯蓣皂苷元氢谱和碳谱测定 精密称取于 105 °C 干燥至恒重的薯蓣皂苷元提取物各 50 mg,

置于样品管中, 加 1 mL CDCl₃ 溶解, 置于核磁共振仪上分别测定氢谱和碳谱, 结果解析如下: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.79(s, 6H), 0.96~0.98(d, 3H, J=6.8 Hz), 1.03(s, 3H), 1.09~1.21(m, 3H), 1.25~1.33(m, 1H), 1.41~1.54(m, 6H), 1.58~1.69(m, 6H), 1.72~1.80(m, 2H), 1.83~1.89(m, 3H), 1.96~2.02(m, 2H), 2.23~2.32(m, 2H), 3.35~3.40(m, 1H), 3.47~3.48(m, 2H), 4.38~4.44(m, 1H), 5.35~5.36(m, 1H)。¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ 14.50, 16.26, 17.11, 19.39, 20.85, 28.78, 30.30, 31.40, 31.60, 31.83, 32.03, 36.63, 37.21, 39.77, 40.25, 41.59, 42.25, 50.04, 56.49, 62.08, 66.83, 71.67, 80.80, 109.27, 121.39, 140.79。

2.2.2 薯蓣皂苷元质谱测定 精密称取于 105 °C 干燥至恒重的薯蓣皂苷元提取物 50 mg, 置于样品管中, 加 1 mL CDCl₃ 溶解, 置于质谱仪上测定质谱, 结果解析如下: HRMS(ESI⁺) m/z [C₂₇H₄₂O₃+H]: calcd. 415.313 4, found 415.320 7。

2.2.3 薯蓣皂苷元高效液相测定 精密称取薯蓣皂苷元对照品 5 mg, 加甲醇制成 1 mg·mL⁻¹ 的溶液作为对照品溶液。另取薯蓣皂苷元提取物 5 mg, 加甲醇制成每 1 mL 约含薯蓣皂苷元 1 mg 的供试品溶液。色谱条件: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-水(94:6)为流动相, 波长为 209 nm, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 理论板数按薯蓣皂苷元峰计算 ≥ 3 000。分别精密量取对照品溶液及供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1。

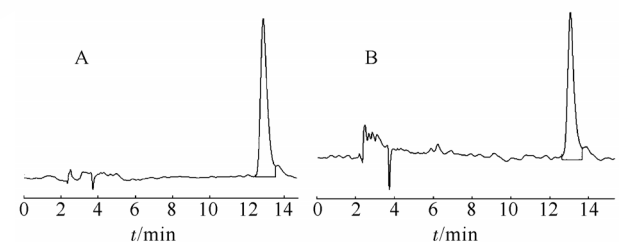


图 1 薯蓣皂苷元高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液。

Fig. 1 HPLC chromatograms of diosgenin

A-standard solution; B-sample solution.

由图 1 可知, 薯蓣皂苷元对照品和薯蓣皂苷元提取物均在 12.86 min 的保留时间处有相同色谱峰。

薯蓣皂苷元提取物经氢谱、碳谱、质谱和高效液相表征结果表明, 所得薯蓣皂苷元提取物为薯蓣皂苷元结构。

2.3 薯蓣皂苷元对甲亢模型大鼠的影响

2.3.1 甲亢大鼠模型制作与给药方法 采用优甲乐灌胃法造模^[10-11], 取 48 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 第 5 天起每只以 2 mL·d⁻¹ 生理盐水灌胃, 使习惯灌胃。后称重标记, 随机分为 2 组, 40 只 SD 大鼠造模, 每天以 600 μg·kg⁻¹ 优甲乐灌胃造模, 共计 28 d; 另外 8 只作为正常对照组, 继续每只以 2 mL·d⁻¹ 生理盐水灌胃。

从造模第 8 天起, 将造模的 48 只大鼠重新称重标记, 随机分为甲亢模型组、甲巯咪唑治疗组、薯蓣皂苷元低、中、高剂量组, 每组 8 只。每天继续以 600 μg·kg⁻¹ 优甲乐灌胃造模, 灌胃优甲乐造模 2 h 后, 甲巯咪唑治疗组每天以 2.5 mg·kg⁻¹ 甲巯咪唑灌胃给药; 薯蓣皂苷元治疗组(低、中、高剂量)每天分别以薯蓣皂苷元(1.5, 2.5, 3.5 mg·kg⁻¹)灌胃给药; 甲亢模型组每只以 2 mL·d⁻¹ 生理盐水灌胃。大鼠每周称重 1 次, 根据体质量调整药物剂量。实验结束后, 各组大鼠空腹称体质量, 腹主动脉取血 2 mL 注入真空抽血管

中, 以 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min。将分离的血清置于 -20 °C 冰箱内保存待测。

2.3.2 测定方法 取“2.3.1”项下制得的待测血清, 用放射免疫测定法分别测定大鼠血清中 T₃、T₄ 和 TSH。

2.3.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件, 全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较用方差分析, 组间均数的多重比较使用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.3.4 对大鼠外观行为及体质量的影响 甲亢模型组大鼠第 7 天出现躁动不安, 饮水量增多, 饲料消耗增大, 排泄物增多, 至饲养结束时, 表现为行动无力、烦躁、易激惹。其他各治疗组大鼠烦躁、易激惹等现象明显好转, 笼内排泄物较少。第 28 天时, 与正常对照组比较, 甲亢模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$); 与甲亢模型组比较, 甲巯咪唑治疗组和薯蓣皂苷元中剂量组大鼠体质量显著升高($P < 0.01$), 薯蓣皂苷元低剂量和高剂量组大鼠体质量明显升高($P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 薯蓣皂苷元对大鼠体质量的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of diosgenin on the weight of rats($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	初始体质量/g	给药前体质量/g	第 14 天/g	第 28 天/g
正常对照组	-	212.9±7.80	231.4±7.93	255.5±14.28	290.1±18.89
甲亢模型组	0.6	209.6±14.32	230.1±9.16	248.3±12.87	252.5±12.11 ¹⁾
甲巯咪唑治疗组	2.5	207.1±11.58	231.1±9.49	251.8±7.30	281.5±15.14 ²⁾
薯蓣皂苷元					
低剂量组	1.5	210.6±10.24	230.3±7.69	250.1±6.33	268.8±8.29 ³⁾
中剂量组	2.5	206.1±10.59	230.8±8.53	253.4±11.33	272.3±13.12 ²⁾
高剂量组	3.5	208.1±7.68	231.4±5.55	251.1±5.74	269.3±9.25 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与甲亢模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the normal rats group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

2.3.5 对甲亢大鼠血清 T₃、T₄、TSH 含量的影响

与正常对照组比较, 甲亢模型组血清 T₃、T₄ 值显著升高($P < 0.01$), 血清 TSH 值显著降低($P < 0.01$), 表明造模成功。与甲亢模型组比较, 甲巯咪唑治疗组和薯蓣皂苷元中剂量组血清 T₃ 值显著降低($P < 0.01$), TSH 值显著升高($P < 0.01$); 而薯蓣皂苷元低剂量组和薯蓣皂苷元高剂量组血清 T₃ 值明显降低($P < 0.05$); 低剂量 TSH 值明显升高($P < 0.05$), 高剂量组 TSH 值显著升高($P < 0.01$); 各治疗组血清 T₄ 值均显著降低($P < 0.01$)。结果见表 2。

3 讨论

本实验采用酸水解回流的方法从薯蓣科植物穿山龙中提取分离薯蓣皂苷元, 薯蓣皂苷元提取

表 2 薯蓣皂苷元对大鼠血清 T₃、T₄、TSH 含量的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of diosgenin on the rats serum T₃, T₄ and TSH ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	T ₃ /nmol·L ⁻¹	T ₄ /nmol·L ⁻¹	TSH/μIU·mL ⁻¹
正常对照组	-	1.46±0.10	49.17±4.71	1.03±0.16
甲亢模型组	0.6	1.72±0.10 ¹⁾	88.74±6.64 ¹⁾	0.59±0.06 ¹⁾
甲巯咪唑治疗组	2.5	1.52±0.11 ²⁾	57.84±6.81 ²⁾	0.87±0.11 ²⁾
薯蓣皂苷元				
低剂量组	1.5	1.63±0.07 ³⁾	64.71±6.30 ²⁾	0.76±0.13 ³⁾
中剂量组	2.5	1.60±0.06 ²⁾	60.87±3.63 ²⁾	0.82±0.10 ²⁾
高剂量组	3.5	1.62±0.10 ³⁾	66.21±7.97 ²⁾	0.80±0.16 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, 与甲亢模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

物经过萃取、柱层析分离纯化和重结晶精制处理,得到了纯度较高,收率较好的薯蓣皂苷元,且制备工艺简便易行。

以优甲乐灌胃制作的甲亢动物模型,其症状、体征与甲亢的临床表现基本吻合,与正常对照组比较,甲亢模型组血清 T_3 、 T_4 显著升高, TSH 显著降低,符合甲亢的临床诊断标准,表明甲亢大鼠模型造模成功。经薯蓣皂苷元给药治疗 21 d 后,与甲亢模型组比较,薯蓣皂苷元低、中、高剂量组大鼠体质量均增加,血清中 T_3 、 T_4 和 TSH 值均有不同程度改善,表明薯蓣皂苷元对甲亢大鼠有治疗作用,随着剂量的增加,薯蓣皂苷元的治疗作用也在增强,但高于中剂量($2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后,治疗活性不再明显变化。这可能与 TSH 的药理作用特点有关,在预实验中,我们选取了 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 8 个剂量组,做了 TSH 的药理曲线,发现该药作用范围较窄, $1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下剂量没有明显作用, $3.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以上剂量作用递减,且 $1.5\sim 3.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间 TSH 药理曲线非线性,如果按常规等比递增法设计剂量并不能准确反映其药效作用,故最终将实验剂量按等差递增法确定为 1.5, 2.5, $3.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个剂量组,以便能更好的表达该成分的药理活性范围。

本实验同时选用甲巯咪唑进行平行对照研究,从血清 T_3 、 T_4 、TSH 值进行比较,与薯蓣皂苷元中剂量组之间差异无统计学意义,研究表明薯蓣皂苷元对甲亢大鼠治疗作用与甲巯咪唑类似,值得进一步探索研究。

REFERENCES

- [1] 王深明. 甲状腺功能亢进的分类和病因[J]. 中国实用外科杂志, 2006, 26(7): 487-489.
- [2] CHEN B L. Evaluation of the effects of detection of serum thyroid peroxidase antibody and thyroid globulin antibody in Graves patients with hyperthyroidism treated with ^{131}I [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2013, 33(22): 1865-1867.
- [3] YE Y Q, ZOU J L, LIN Z D, et al. Effect of preoperative drugs prepared on thyroid hemodynamics [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(9): 857-859.
- [4] ZHOU Q, ZHEN Z, LIU C, et al. The mechanisms of single Chinese medicine in treatment of hyperthyroidism [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2010, 37(S1): 343-345.
- [5] WANG Q H, CHEN R Q, ZHANG S L. Screen study on Chinese herbs with antithyroid function [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2003, 30(7): 519-520.
- [6] HE Y, WANG J S, ZHANG P, et al. Research progress on pharmacological properties of diosgenin and its mechanism [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(19): 2759-2765.
- [7] WANG J, CHEN J, YANG K D, et al. Study on the production condition of extraction in combination hydrolysis in situ for isolating diosgenin [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2003, 28(10): 934-937.
- [8] LIU K J, ZHANG T, DENG D L. Research progress on chemical constituents and separation and purification of dioscorea nipponica makino [J]. Guangzhou Chem Indust(广州化工), 2013, 41(10): 21-22, 57.
- [9] ZHAO M, TAN D W, YU H S. Research progress in preparation of diosgenin [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(13): 1860-1866.
- [10] 朱传湘, 易法银, 阳春林. 内外合治对甲亢模型大鼠甲状腺激素水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 72-73.
- [11] LI B, CHEN J, SONG F. The model of hyperthyroidism in female rats [J]. J Baotou Med Coll(包头医学院学报), 2010, 26(6): 1-2.

收稿日期: 2014-10-30

五味子酯甲在大鼠体内代谢产物的鉴定

靳茂礼¹, 李淳瑞², 王玉峰², 苏红宁³, 李松², 刘敏彦^{2*} (1. 石家庄市食品药品检验所, 石家庄 050035; 2. 石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035; 3. 河北省石家庄市第四医院, 石家庄 050017)

摘要: 目的 考察五味子酯甲在大鼠体内的代谢转化。方法 采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS/MS)分析鉴定大鼠灌胃五味子酯甲后,其在尿样中的代谢产物。Phenomenex UPLC C_{18} 色谱柱,流动相为乙腈-1%甲酸水,梯度洗脱,质谱仪离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测。结果 经代谢物软件处理后,根据MS/MS给出质谱碎片信息对五味子酯甲代谢产物进行结构推测,共检测到5种代谢产物。结论 五味子酯甲在大鼠体内的代谢途径主要为氧化反应和还原反应。

关键词: 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱; 五味子酯甲; 代谢产物; 鉴定

作者简介: 靳茂礼,男,主任药师 Tel: (0311)85901712 E-mail: liuminyan@yiling.cn *通信作者: 刘敏彦,女,博士,副主任中药师 Tel: (0311)66703011 E-mail: liuminyan75@163.com