

血府逐瘀汤中桔梗和牛膝对芍药苷组织分布的影响

黄巍¹, 熊伟², 唐灿^{2*}, 毛旭华², 张晓丹¹

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 成都岐黄康健生物科技有限公司, 成都 611130)

【摘要】 目的:比较桔梗和牛膝不同配伍对正常和血瘀小鼠体内芍药苷组织分布的影响,研究桔梗和牛膝的引经作用。

方法:正常和血瘀小鼠分别灌胃血府逐瘀汤全方、单缺桔梗方、单缺牛膝方、缺桔梗和牛膝方,30 min后处死,收集全血,取出脑、心、肝、脾、肺、肾。采用HPLC测定芍药苷含量,流动相乙腈-水(16:84),检测波长230 nm,栀子苷为内标物。**结果:**正常组小鼠分别灌胃血府逐瘀汤全方、单缺桔梗方、单缺牛膝方、缺桔梗和牛膝方后,脑、心、肝、脾中均未检测到芍药苷,肺中芍药苷质量分数分别为0.010 2,0.005 8,0.091 0,0.037 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,肾中芍药苷质量分数分别为0.122 2,0.052 0,0.144 0,0.065 0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。血瘀小鼠灌胃血府逐瘀汤全方和单缺桔梗方后,脑中均未检测到芍药苷,心、肝、脾中均能检测到芍药苷,肺中芍药苷质量分数分别为0.076 4,0.042 0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,肾中芍药苷质量分数分别为0.335,0.210 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;血瘀小鼠灌胃单缺牛膝方、缺桔梗和牛膝方后,脑、心、肝、脾中均几乎未检测到芍药苷,肺中芍药苷质量分数分别为0.274 7,0.019 7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,肾中芍药苷质量分数分别为0.467 1,0.149 0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。**结论:**基于缺桔梗和牛膝方比较,桔梗能增大肺、肾中芍药苷含量,对于血瘀小鼠,其增大肺中芍药苷含量的作用尤其显著;牛膝能减小正常小鼠肺、肾中芍药苷含量,能增大血瘀小鼠肺、肾中芍药苷含量,并使得芍药苷在心、肝、脾中分布。证实桔梗、牛膝载药至特定病所的引经作用,且发现桔梗、牛膝的引经部位并不单一。

【关键词】 血府逐瘀汤; 桔梗; 牛膝; 芍药苷; 引经作用

【中图分类号】 R969.1;R945;R284.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2015)18-0085-04

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180085

【网络出版地址】 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150807.1000.018.html>

【网络出版时间】 2015-08-07 10:00

Influence of Platycodonis Radix and Achyranthis Bidentatae Radix in Xuefu Zhuyu Tang on Tissue Distribution of Paeoniflorin HUANG Wei¹, XIONG Wei², TANG Can^{2*}, MAO Xu-hua², ZHANG Xiao-dan¹
(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Chengdu Qihuang Kangjian Bio-technology Co. Ltd., Chengdu 611130, China)

【Abstract】 Objective: To compare effect of different compatibility of Platycodonis Radix and Achyranthis Bidentatae Radix on tissue distribution of paeoniflorin in normal and blood stasis mice, preliminary study leading action of Platycodonis Radix and Achyranthis Bidentatae Radix. **Method:** Normal and blood stasis mice were gavaged with Xuefu Zhuyu Tang, lacked Platycodonis Radix or Achyranthis Bidentatae Radix parties. Mice were killed after 30 minutes, whole blood collected, the brain, heart, liver, spleen, lung and kidney were removed. HPLC was employed to determine the content of paeoniflorin with mobile phase of acetonitrile-water (16:84), detection wavelength at 230 nm and geniposide as internal standard. **Result:** After normal mice being gavaged with Xuefu Zhuyu Tang full party, single lacked Platycodonis Radix party, single lacked Achyranthis Bidentatae Radix party, lacked Platycodonis Radix and Achyranthis Bidentatae Radix party, the content of paeoniflorin in lung were 0.010 2, 0.005 8, 0.091 0, 0.037 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, those in kidney were 0.122 2, 0.052 0, 0.144 0, 0.065 0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, but paeoniflorin were unchecked in the brain, heart, liver and spleen. After blood stasis mice being gavaged with Xuefu Zhuyu Tang full party, single lacked Platycodonis Radix party, the content of paeoniflorin in lung were 0.076 4, 0.042 0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, those in kidney were 0.335, 0.210 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, but it was unchecked in the brain, heart, liver and spleen. After blood stasis mice being gavaged with Xuefu Zhuyu Tang

【收稿日期】 20150303(013)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81102554)

【第一作者】 黄巍,博士,副教授,从事中药方剂配伍理论研究,Tel:13088090962,E-mail:gracehw@126.com

【通讯作者】 *唐灿,博士,副教授,从事药理学研究,Tel:13880461058,E-mail:cancan74w@126.com

single lacked *Achyranthis Bidentatae Radix* party, lacked *Platycodonis Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* party, the content of paeoniflorin in lung were 0.274 7, 0.019 7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, those in kidney were 0.467 1, 0.149 0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, it almost were unchecked in the brain, heart, liver and spleen. **Conclusion:** Making comparison based on Xuefu Zhuyu Tang lacked *Platycodonis Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* party, *Platycodonis Radix* can increase the content of paeoniflorin in the lung and kidney in normal mice, *Platycodonis Radix* can more significantly increase the content of paeoniflorin in the lung than that in the kidney in blood stasis mice. *Achyranthis Bidentatae Radix* can decrease the content of paeoniflorin in the lung and kidney in normal mice, it can increase the content of paeoniflorin in the lung and kidney in blood stasis mice, it also can make distribution of paeoniflorin in the heart, liver, spleen in blood stasis mice. This study confirms *Platycodonis Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* have effect of leading action. Leading sites of *Platycodonis Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* are not single.

[**Key words**] Xuefu Zhuyu Tang; *Platycodonis Radix*; *Achyranthis Bidentatae Radix*; paeoniflorin; leading action

引经作用从药物归经理论发展而来,是指能够引导诸药直达病所,具有“舟楫”之效的药物^[1],改变其他药物的作用部位,或使其作用侧重于特定部位^[2]。引经作用具有鲜明的中医药特色,与靶向给药有一定的相似之处,但其研究仍待深入。报道了桔梗、牛膝对化学药物的药动学和脏器分布的影响,部分证实了桔梗的引经作用^[3],但尚未见基于中药复方的引经作用研究报道。在血府逐瘀汤中^[4],同时含有桔梗、牛膝 2 味引经药,桔梗能“载药上行、引药入肺”,牛膝能“引血下行”^[5-6];芍药苷作为方中有效成分,具有抑制血小板聚集、扩张血管等药理作用^[7],与全方功效一致。血府逐瘀汤主治胸中血瘀证,中医理论与证候密切相关,有必要建立小鼠血瘀证候模型。本实验采用小鼠静脉注射葡聚糖 T500 模拟血瘀证^[8],通过比较引经药桔梗、牛膝不同配伍对芍药苷在正常和血瘀小鼠组织分布的影响,为探讨药物的引经作用机制提供参考。

1 材料

SPD-10Avp 型紫外-可见光检测器和 LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津),FA1004 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。当归、生地黄、桃仁、红花、枳壳、赤芍、柴胡、甘草、桔梗、川芎及牛膝药材均购自四川本草堂药业,经成都中医药大学张廷模教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》的要求。芍药苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号 121207),栀子苷对照品(成都植标化纯生物技术有限公司,纯度 $> 98\%$,批号 130527),葡聚糖 T500(北京雅安达生物技术有限公司,批号 F0115),甲醇、乙腈为色谱纯。

SPF 级健康小鼠 48 只,体重(25 \pm 5) g,雌雄各

半,由成都生物制品研究所有限责任公司实验动物中心提供,许可证号 SCXK(川)2011-08。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相乙腈-水(16:84),流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 230 nm,栀子苷为内标物,进样量 20 μL 。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取芍药苷对照品 6.63 mg 于 50 mL 干燥棕色量瓶中,加甲醇溶解,摇匀,定容,得芍药苷储备液。精密量取该储备液 2 mL 置于 100 mL 量瓶中,用 90% 甲醇水溶液定容,得 2.60 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 芍药苷工作液 1。同法制得 0.26 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 芍药苷工作液 2 和 0.026 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 芍药苷工作液 3。

2.2.2 内标工作液 精密称取栀子苷对照品 1.82 mg 于 50 mL 干燥棕色量瓶中,加 90% 甲醇水溶液溶解定容,摇匀,得 35.67 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 内标储备液。取内标储备液适量,用 90% 甲醇水稀释 4 倍,得 8.92 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 内标工作液。

2.2.3 25% 葡聚糖 T500 溶液 精密称取葡聚糖 T500 1.0 g,加入 0.9% 氯化钠注射液 4.0 mL,水浴加热并搅拌使其完全溶解,溶液呈无色透明,0 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

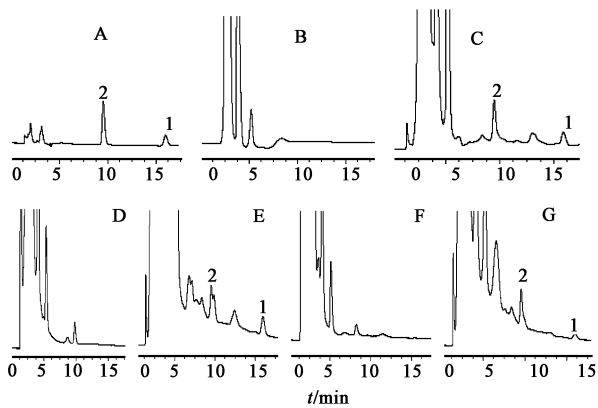
2.2.4 灌胃药液 按处方比例分别称取 45 倍处方量药材,加 10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 3 次,每次 30 min,合并并过滤煎液,滤液转移至旋转蒸发器浓缩 8 h,真空干燥箱干燥^[9-10],得血府逐瘀汤全方、单缺桔梗方、单缺牛膝方、缺桔梗和牛膝方提取物粉末 426,1 054,948,650 g,粉末中芍药苷质量分数分别为 2.290,2.620,3.366,3.120 mg $\cdot\text{g}^{-1}$ 。称取提取物

粉末各 4.0 g,依次加入 4.0,4.6,5.9,5.4 mL 水,搅拌使完全溶解,即得。

2.3 组织样品处理 灌胃后 30 min 处死小鼠,迅速取出大鼠脑、心、肝、脾、肺、肾,用生理盐水洗净血渍,吸干水分,称重后转移至玻璃匀浆器中。脑、肝、肺、肾按 $4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 加入 90% 甲醇水溶液,心、脾按 $8 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 加入 90% 甲醇水溶液,冰浴充分匀浆。取匀浆液 500 μL 置于 1.5 mL 离心管中,加入内标工作液 20 μL ,旋涡混匀,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,转移上清液,40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,通氮气吹干,加 100 μL 水复溶,即可。

2.4 血清样品处理 处死小鼠时取血,静置,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取血清 100 μL ,加入乙腈 250 μL ,旋涡,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,转移上清液,40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴通氮吹干,加 100 μL 水复溶。

2.5 专属性试验 取芍药苷对照品加内标物溶液、空白生物样品溶液、给药后生物样品溶液按 2.1 项下条件进样,记录色谱图,见图 1。结果显示芍药苷和样品中内源性杂质分离良好,分离度 1.8,芍药苷保留时间约 15.9 min,内标物保留时间约 9.5 min。生物样品中加入内标物,便于确定芍药苷保留时间。



A. 对照品;B. 空白血清;C. 血清;D. 空白肾;E. 肾;F. 空白肺;G. 肺;
1. 芍药苷;2. 内标物

图 1 血府逐瘀汤 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Xuefu Zhuyu Tang

2.6 仪器精密度 精密量取 $0.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芍药苷对照品溶液,按 2.1 项下条件连续进样 6 次,计算芍药苷峰面积的 RSD 0.4%,表明仪器精密度良好。

2.7 线性范围 取空白肺、肾匀浆液 500 μL ,精密加入芍药苷工作液适量,按 2.3 项下方法操作,制得含芍药苷质量浓度分别为 0.020 8,0.026,0.052,0.104,0.26,0.52,1.04,2.08,2.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列肺组织样品溶液,含芍药苷质量浓度分别为 0.026,

0.052,0.104,0.156,0.208,0.52,1.04,1.56,2.08 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列肾组织样品溶液;取空白血清 100 μL ,精密加入芍药苷工作液适量,按 2.4 项下方法操作,制得含芍药苷质量浓度分别为 0.026,0.052,0.104,0.156,0.208,0.52,1.04,1.56,2.08 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列血清样品溶液。按 2.1 项下条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得肺组织样品回归方程 $Y = 17\,663.323X - 300.424 (r = 0.9997)$,肾组织样品回归方程 $Y = 17\,721.875X - 291.167 (r = 0.9999)$,血清样品回归方程 $Y = 17\,748.848X - 200.472 (r = 0.9991)$ 。

2.8 日内、日间精密度试验 按 2.3 项下方法操作,制得含芍药苷质量浓度分别为 0.020 8,0.26,2.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肺组织样品溶液,含芍药苷质量浓度分别为 0.026,0.208,2.08 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肾组织样品溶液;按 2.4 项下方法操作,制得含芍药苷质量浓度分别为 0.026,0.208,2.08 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清样品溶液。每个质量浓度制备 5 份,连续测定 3 d。结果低、中、高质量浓度芍药苷的肺组织样品日内精密度 RSD 分别为 2.1%,2.0%,1.9%;日间精密度 RSD 分别为 2.2%,2.7%,2.0%。低、中、高质量浓度芍药苷的肾组织样品日内精密度 RSD 分别为 2.4%,2.0%,2.1%;日间精密度 RSD 分别为 2.4%,1.9%,2.1%。低、中、高质量浓度芍药苷的血清样品日内精密度 RSD 分别为 2.7%,2.0%,2.7%;日间精密度 RSD 分别为 2.6%,2.0%,3.0%。

2.9 回收率试验 取 2.8 项下肺组织样品溶液、肾组织样品溶液和血清样品溶液 ($n = 5$),按 2.1 项下条件测定,计算回收率。结果低、中、高质量浓度芍药苷的肺组织样品回收率分别为 99.8%,102.1%,102.8%;RSD 依次为 2.0%,0.9%,2.1%。低、中、高质量浓度芍药苷的肾组织样品回收率分别为 103.0%,94.6%,100.9%;RSD 依次为 1.2%,3.1%,3.4%。低、中、高质量浓度芍药苷的血清样品回收率分别为 96.4%,100.0%,97.1%;RSD 依次为 3.5%,3.5%,2.0%。

2.10 稳定性试验 取 2.8 项下肺组织样品溶液、肾组织样品溶液和血清样品溶液 ($n = 4$),置于 -20°C 冰箱中,分别于第 0,1,3,7 天分别检测 1 份,考察长期冷冻放置稳定性,结果各组织样品和血清样品均在 7 d 内稳定。

2.11 动物分组、造模及给药 小鼠禁食 12 h,自由饮水,随机分为正常组和血瘀模型组,每组 24 只,雌雄各半。血瘀模型组小鼠按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注

射25%葡聚糖T500溶液^[8]造模,10 min后给药。正常组和血瘀模型组小鼠,分别灌胃血府逐瘀汤全方、血府逐瘀汤单缺桔梗方、血府逐瘀汤单缺牛膝方、血府逐瘀汤缺桔梗和牛膝方,每方雌雄各3只。小鼠灌胃体积6 mL·kg⁻¹,灌胃剂量以芍药苷计

13.742 mg·kg⁻¹。

2.12 组织分布 小鼠处死后,按2.3和2.4项下方法操作,按2.1项下条件测定,根据峰面积计算各组织样品和血浆中芍药苷的含量,结果见表1。

表1 小鼠灌胃血府逐瘀汤30 min后芍药苷的组织分布(n=6)

Table 1 Tissue distribution of paeoniflorin in Xuefu Zhuyu Tang after mice were gavaged 30 minutes (n=6)

组别	处方	芍药苷									
		峰面积						质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		组织浓度-血药浓度/%	
		心	肝	脾	肺	肾	血清	肺	肾	肺	肾
正常	全方	0	0	0	125	2 464	1 568	0.010 2	0.122 2	8	154
	单缺桔梗方	0	0	0	27	860	1 120	0.005 8	0.052 0	12	86
	单缺牛膝方	0	0	0	1 709	2 898	6 587	0.091 0	0.144 0	39	86
	缺桔梗和牛膝方	0	0	0	573	1 148	3 168	0.037 3	0.065 0	28	51
血瘀模型	全方	150	384	138	1 386	7 131	4 410	0.076 4	0.335 0	39	177
	单缺桔梗方	112	81	117	627	4 361	4 001	0.042 0	0.210 0	20	140
	单缺牛膝方	22	0	0	5 765	10 056	7 860	0.274 7	0.467 1	69	144
	缺桔梗和牛膝方	0	0	21	222	3 010	2 469	0.019 7	0.149 0	13	125

注:脑中未检出芍药苷。

3 讨论

药物在组织脏器中的含量和血药浓度密切相关,由于动物个体差异等原因,仅仅根据组织中芍药苷的含量来判断桔梗和牛膝对该成分组织分布的影响,存在具有局限性。本文在测定组织中芍药苷质量浓度的同时,考察了血药浓度,并提出了“肺血浓度比=肺组织中芍药苷质量浓度/血药浓度,肾血浓度比=肾组织中芍药苷质量浓度/血药浓度”的概念;芍药苷在心、肝、脾中峰面积低,因此未进行相关计算。

血府逐瘀汤主治血府血瘀证,本文对正常动物和血瘀证中医证候模型动物组织分布都进行了研究,组内不同处方间比较(基于缺桔梗和牛膝方)结果为生理状态下,桔梗能“引药入肺、肾”,牛膝能“引药入肾”;血瘀状态下,桔梗能“引药入肺、肾”,牛膝能“引药入肺、肾、心、肝、脾”。同一处方,组间比较结果为血瘀证下,组织浓度几乎均增大,牛膝引经部位增加了肺、心、肝、脾。

本研究证实了引经药桔梗、牛膝能“引领方中药物直达病所”,还说明桔梗、牛膝的引经部位并不单一,在血瘀证下牛膝的引经部位更多。因此,关于桔梗、牛膝的引经作用应辩证看待,不能一味强调桔梗“引药入肺”、牛膝“引血下行”。《医林改错》中,血府相对气府提出,二者以隔膜分开,气府、血府均并非具体脏器^[4]。心、肺均位于胸中,肾位于腹中,“引药入心、肺”与主治胸中血瘀证相符,“引药入肾”则能“通肾中血脉,引瘀血下行”。总之,桔

梗、牛膝的引经作用与治疗胸中痹症密切关系,但这种引经作用对血液循环的影响仍有待进一步研究证实。

[参考文献]

[1] 刘敏,孙龙军,唐德才.引经药桔梗“载药上行”作用辨析[J].中国中医急症,2010,19(8):1331-1333.

[2] 赵瑞芝,刘少军.中药引经理论与靶向给药[J].中医杂志,2005,46(9):643-645.

[3] 卢胜明.桔梗对罗红霉素药代动力学和肺中药物浓度影响研究[D].雅安:四川农业大学,2004.

[4] 王清任.医林改错.上卷[M].天津:科学技术出版社,2011:1-16.

[5] 林彦君,章泽铭.新议桔梗“引经报使”理论研究思路与方法[J].四川省卫生管理干部学院学报,2011,2(2):50-52.

[6] 孙备,吕凌,陆忠祥,等.三妙丸中牛膝引药作用的机理研究[J].时珍国医国药,2009,20(4):859-861.

[7] 王君,戴丽,李鹏跃,等.芍药与甘草配伍协同增效作用的物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(11):83-86.

[8] 李仪奎.中药药理实验[M].上海:科学技术出版社,1991:141-146.

[9] 孙丽荣,严华成,曹雄,等.煎煮时间和煎煮次数对三种芍药汤剂中芍药苷含量的影响[J].中国药物与临床,2008,8(9):693-695.

[10] 晏星,袁小红,刘卓,等.不同干燥方法对附子提取物中双酯型生物碱的影响[J].中药材,2012,35(2):204-205.

[责任编辑 刘德文]