

· 化学与分析 ·

基于定量指纹图谱分析与生物活性测定的 通天口服液质量评价

高夏¹, 沈岚^{1,2*}, 马诗瑜¹, 林晓^{1,2}, 冯怡^{2,3}

(1. 上海中医药大学 中药学院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学 中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203; 3. 上海张江中药现代制剂技术工程研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的:通过指纹图谱与生物活性测定相结合的方式科学评价通天口服液的质量。方法:采用 HPLC 建立通天口服液的指纹图谱,并对 10 批次通天口服液进行同步定量分析;以抗血小板聚集活性为生物活性指标,确定通天口服液中活性成分贡献度。结果:10 批次的通天口服液相似度均 >0.96,标示出 19 个共有峰,确认第 6,7,8,10,11 号峰分别为芍药苷,升麻素苷,甘草苷,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷,洋川芎内酯 I,同步定量分析结果显示,10 批通天口服液中以上 5 个成分含量差异较大;抗血小板聚集活性结果显示,洋川芎内酯 I >5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 >升麻素苷 >芍药苷,洋川芎内酯 I 为其主要活性成分($P < 0.001$)。结论:建立了与通天口服液药效相关的指纹图谱,确定了与抗血小板聚集活性相关的主要化学成分为洋川芎内酯 I,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷及升麻素苷,为通天口服液的质量评价提供一种更合理的手段。

[关键词] 通天口服液; 定量指纹图谱; 抗血小板聚集; 质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0044-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140044

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160523.1027.024.html>

[网络出版时间] 2016-05-23 10:27

Quality Assessment of Tongtian Oral Liquid Based on Full-quantified HPLC Fingerprint and Bioassay

GAO Xia¹, SHEN Lan^{1,2*}, MA Shi-yu¹, LIN Xiao^{1,2}, FENG Yi^{2,3}

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China; 2. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of TCM of Ministry of Education, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 3. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** Combining an HPLC fingerprint with bioassay to make a quality evaluation of Tongtian oral liquid. **Method:** Fingerprint of Tongtian oral liquid was established by the HPLC method, and quantitative analysis of ten batches of Tongtian oral liquid was performed. Anti-platelet aggregation activity as biological activity indicator was used to determine the contribution of the active ingredients in Tongtian oral liquid. **Result:** Similarity among ten batches was more than 0.96, nineteen common peaks were obtained in the fingerprint of ten batches of Tongtian oral liquid. Compared with reference substance, No. 6 peak was paeoniflorin, No. 7 was prim-*O*-glucosylcimifugin, No. 8 was liquiritin, No. 10 was 4'-*O*- β -*D*-glucosyl-5-*O*-meth-ylvisammioside and No. 11

[收稿日期] 20150805(010)

[基金项目] 上海市三年行动计划项目(ZY3-CCGX-3-5001);上海市科委平台项目(15DZ2292000);浦东新区科技发展基金项目(PKF-2013-003)

[第一作者] 高夏,在读硕士,从事中药制剂关键技术与新剂型研究,Tel:15021808767,E-mail:gaoxia0526@163.com

[通讯作者] * 沈岚,博士,教授,从事中药制剂关键技术与新剂型研究,Tel:021-51323030,E-mail:alansusu@sina.com

was senkyunolide I. Quantitative analysis showed that five ingredients had great differences among the ten batches of Tongtian oral liquid. Meanwhile, the anti-platelet aggregation activity showed that senkyunolide I > 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-meth-ylvisammioside > prim-O-glucosylcimifugin > paeoniflorin, and senkyunolide I was its main active ingredient ($P < 0.001$). **Conclusion:** Fingerprint of Tongtian oral liquid associated with its efficacy has been established. Senkyunolide I, 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-meth-ylvisammioside and prim-O-glucosylcimifugin are the main chemical ingredients of Tongtian oral liquid related to the anti-platelet aggregation activity, which would provide a more reasonable means for the quality assessment of Tongtian oral liquid.

[**Key words**] Tongtian oral liquid; full-quantified HPLC fingerprint; anti-platelet aggregation; quality assessment

通天口服液是常用治疗偏头痛的中药制剂之一,其以中医经典名方“川芎茶调散”为基础,由川芎、赤芍、天麻、羌活、白芷、细辛、菊花、薄荷、防风、茶叶和甘草 11 味中药组成,具有活血化瘀、祛风止痛之功效。目前,通天口服液在质量控制方面研究较薄弱,其指纹图谱尚未见有报道^[1-2],已有研究资料大多只控制其某一个指标成分,如用 HPLC 测定通天口服液中马兜铃酸的含量^[3],采用近红外光谱法同时测定通天口服液中天麻素和芍药苷的含量^[4]等。现行的通天口服液质量标准^[5],也仅对芍药苷单一成分进行 HPLC 含量测定。由于通天口服液组方较大,化学成分复杂,仅以单一或少数几个指标成分评价其质量,显然无法全面地反映其内在质量,且所定量的成分是否与制剂的生物活性相关,也缺乏系统研究。因此,本文应用 HPLC 对通天口服液进行指纹图谱研究,并对指标成分进行抗血小板聚集活性实验,阐明指标成分与药效之间的关系,为完善通天口服液的质量评价提供一种合理的手段。

1 材料

1.1 仪器 Technologies 1200 Series 系列高效液相色谱仪(包括 G1311A 四元梯度泵, G1322A 在线脱气机, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D DAD 检测器, Agilent Chem Station 化学工作站, 美国 Agilent), Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统(美国 Millipore), FA2104N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), TYXN-96 型多功能智能血液凝聚仪(上海通用机电技术研究所)。

1.2 试药 对照品芍药苷(批号 110736-201337), 甘草苷(批号 111610-201106), 5-O-甲基维斯阿米醇苷(批号 111523-201208)均购自中国食品药品检定研究院; 升麻素苷(批号 MUST-13052503, 纯度 ≥ 98%)购自上海经科化学科技有限公司, 洋川芎内酯 I 为实验室自制(纯度 ≥ 98%)。超纯水, 甲醇、乙腈均为色谱纯, 通天口服液[太极集团重庆培陵

制药厂有限公司, 批号 13090053 (S8), 13110078 (S9), 13090026 (S5), 14020007 (S1), 13110095 (S10), 13100029 (S7), 13080019 (S2), 13080023 (S3), 13100027 (S6), 13090025 (S4)], 5'-二磷酸腺苷钠盐(ADP, Sigma 公司), 枸橼酸钠(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 动物 雄性新西兰兔(2~2.5 kg), 购自上海市松江县车墩实验动物良种所, 饲养于上海中医药大学实验动物中心普通级兔饲养室。动物许可证号 SYXK(沪) 2009-0069, 常规饲养, 饲养环境指标控制在国标规定的范围内。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~20 min, 10%~13% A; 20~35 min, 13%~16% A; 35~45 min, 16%~17% A; 45~57 min, 17%~18% A; 57~67 min, 18%~20% A; 67~77 min, 20%~40% A; 77~87 min, 40%~60% A; 87~90 min, 60%~10% A; 90~95 min, 10% A), 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 220, 278 nm, 进样量 20 μL, 检测时间 95 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取芍药苷, 升麻素苷, 甘草苷, 5-O-甲基维斯阿米醇苷和洋川芎内酯 I 对照品适量, 精密称定, 加 30% 甲醇水制成每 1 mL 含芍药苷 0.986 2 mg, 升麻素苷 0.101 2 mg, 甘草苷 0.110 6 mg, 5-O-甲基维斯阿米醇苷 0.998 7 mg, 洋川芎内酯 I 0.490 0 mg 的混合对照品溶液。取混合对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mL 至 10 mL 量瓶, 分别加 30% 甲醇水溶液定容, 制备成一系列浓度的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取通天口服液 3 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度考察 精密吸取同一批次(批号 14020007)的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录色谱图。结果表明,各特征峰的相对保留时间 RSD 0.004% ~ 0.4%,相对峰面积 RSD 0.1% ~ 2.9%,表明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性考察 精密吸取同一批次(批号 14020007)的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样,记录色谱图。结果表明,各特征峰的相对保留时间 RSD 0.02% ~ 0.7%,相对峰面积 RSD 0.5% ~ 4.9%,表明供试品溶液在常温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性考察 取同一批次(批号 14020007)通天口服液 6 份,按 2.2.2 项下平行制备成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,记录色谱图。结果表明,各特征峰的相对保留时间 RSD 0.002% ~ 0.2%,相对峰面积的 RSD 0.5% ~ 4.6%,表明该方法重复性良好。

2.4 通天口服液指纹图谱的建立

2.4.1 各批通天口服液指纹图谱的采集 取 10 批

次通天口服液,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件依次进样,记录 10 批次通天口服液色谱图,各批次通天口服液 HPLC 指纹谱见图 1。采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件,对上述 HPLC 指纹图谱进行分析,根据匹配结果确定了 19 个特征峰,以芍药苷相对应色谱峰为参照峰,标号为 6(s),其他特征峰依次标号为 1 ~ 19,相对保留时间 RSD 0.06% ~ 0.4%;相似度分析结果显示,10 批供试品色谱与对照指纹图谱相似度 > 0.96,表明相似度较好。各批次通天口服液指纹图谱相对保留时间、出峰总数及特征峰峰面积占总峰面积比例见表 1。

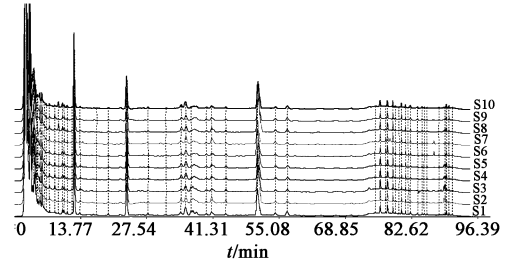


图 1 10 批次通天口服液 HPLC 指纹谱

Fig.1 HPLC fingerprint of ten batches of Tongtian oral liquid

表 1 各批次通天口服液指纹图谱特征峰相对保留时间、出峰总数及特征峰峰面积比

Table 1 Relative retention time, total number and peak area ratio of peaks of Tongtian oral liquid

No.	相对保留时间																			总出峰 数/个	峰面积比 /%
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
S1	0.431	0.443	0.471	0.531	0.583	1.189	1.524	1.881	2.164	2.215	2.321	2.427	3.256	3.369	3.446	3.481	3.834	3.846	91	12.290	
S2	0.428	0.443	0.471	0.532	0.585	1.189	1.526	1.882	2.167	2.213	2.322	2.428	3.254	3.367	3.444	3.48	3.831	3.844	86	18.309	
S3	0.428	0.443	0.471	0.532	0.585	1.189	1.523	1.881	2.166	2.213	2.322	2.428	3.252	3.365	3.442	3.477	3.829	3.841	92	17.337	
S4	0.428	0.443	0.471	0.533	0.585	1.190	1.525	1.881	2.166	2.214	2.322	2.429	3.252	3.365	3.441	3.477	3.828	3.840	91	17.337	
S5	0.428	0.444	0.471	0.533	0.585	1.190	1.522	1.881	2.163	2.214	2.321	2.427	3.254	3.367	3.443	3.479	3.831	3.843	84	18.720	
S6	0.426	0.442	0.470	0.532	0.584	1.189	1.523	1.878	2.158	2.210	2.316	2.422	3.248	3.361	3.437	3.473	3.824	3.836	91	17.085	
S7	0.427	0.444	0.472	0.533	0.585	1.188	1.528	1.882	2.164	2.216	2.322	2.429	3.257	3.370	3.446	3.482	3.835	3.847	95	13.822	
S8	0.428	0.443	0.471	0.532	0.584	1.189	1.527	1.881	2.165	2.213	2.321	2.427	3.252	3.365	3.442	3.478	3.829	3.841	90	19.419	
S9	0.430	0.443	0.471	0.532	0.584	1.189	1.526	1.881	2.168	2.213	2.322	2.428	3.254	3.368	3.444	3.48	3.832	3.844	89	16.992	
S10	0.430	0.443	0.471	0.532	0.585	1.189	1.523	1.882	2.169	2.214	2.324	2.43	3.255	3.369	3.445	3.481	3.833	3.845	92	18.000	

注:6 号峰相对保留时间为 1。

2.4.2 主要色谱峰的鉴定 取同一批次(批号 14020007)的供试品溶液及混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,通天口服液 HPLC 指纹图谱中 6 号峰为芍药苷,7 号峰为升麻素苷,8 号峰为甘草苷,10 号峰为 5-O-甲基维斯阿米醇苷,11 号峰为洋川芎内酯 I,结果见图 2。

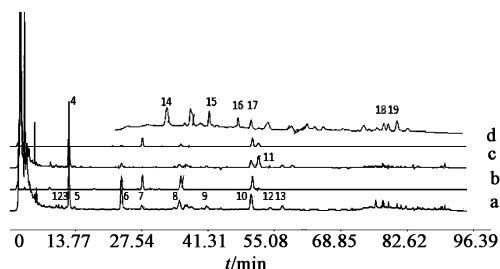
2.5 通天口服液中 5 个成分同步测定的定量分析

2.5.1 标准曲线的建立 将不同浓度混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,以峰

面积为纵坐标(Y),对照品溶定质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得到回归方程、相关系数和线性范围,结果见表 2。

2.5.2 精密度考察 精密吸取混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录色谱图。结果芍药苷,升麻素苷,甘草苷,5-O-甲基维斯阿米醇苷,洋川芎内酯 I 的峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 1.5%, 0.5%, 0.1%, 0.2%, 表明方法精密度良好。

2.5.3 稳定性考察 精密吸取同一批次(批号



a. 通天口服液 (220 nm); b. 混合对照品 (220 nm); c. 通天口服液 (278 nm); d. 混合对照品 (278 nm); 6. 芍药苷; 7. 升麻素苷; 8. 甘草苷; 10. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; 11. 洋川芎内酯 I

图 2 通天口服液和混合对照品不同波长下 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of Tongtian oral liquid and mixed reference standard in different wavelengths

表 2 芍药苷, 升麻素苷, 甘草苷, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和洋川芎内酯 I 线性关系测定

Table 2 Linearity of paeoniflorin, prim-*O*-glucosylcimifugin, liquiritin, 4'-*O*- β -*D*-glucosyl-5-*O*-meth-ylvisammioside and senkyunolide I

化合物	线性回归方程	线性范围/ $g \cdot L^{-1}$	相关系数
芍药苷	$Y = 14\ 133X + 20.59$	0.009 862 ~ 0.986 2	0.999 99
升麻素苷	$Y = 50\ 130X + 0.770$	0.001 012 ~ 0.101 2	0.999 99
甘草苷	$Y = 64\ 093X + 3.474$	0.001 106 ~ 0.110 6	0.999 99
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y = 48\ 931X + 81.36$	0.009 987 ~ 0.998 7	0.999 98
洋川芎内酯 I	$Y = 15\ 415X + 1.634$	0.004 900 ~ 0.490 0	0.999 99

RSD 分别为 0.6% , 3.4% , 0.9% , 4.1% , 1.6% , 表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 取同一批次通天口服液 3 mL, 平行 3 份, 制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定供试品溶液中芍药苷, 升麻素苷, 甘草苷, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷, 洋川芎内酯 I 的含量。

取芍药苷, 升麻素苷, 甘草苷, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和洋川芎内酯 I 对照品适量, 精密称定, 加 30% 甲醇水制成每 1 mL 含芍药苷 1.508 9 mg, 升麻素苷 0.018 9 mg, 甘草苷 0.152 7 mg, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 0.559 1 mg, 洋川芎内酯 I 0.735 0 mg 的混合对照品溶液, 分别取混合对照品溶液 1.6, 2.0, 2.4 mL, 平行 3 份, 分别加入已知 5 成分含量的同一批次通天口服液 3 mL, 超声溶解, 加 30% 甲醇水定容至 10 mL 量瓶中, 制成供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果见表 3。5 个成分平均回收率在 95.0% ~ 104.9% , 可以满足通天口服液 5 个成分测定要求。

2.5.6 通天口服液中 5 个成分的同时测定 取 10 批次通天口服液, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 计算样品中芍药苷, 升麻素苷, 甘草苷, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和洋川芎内酯 I 5 个成分含量, 结果见表 4。

14020007) 的供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样, 记录色谱图。结果芍药苷, 升麻素苷, 甘草苷, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷, 洋川芎内酯 I 峰面积的 RSD 分别为 0.8% , 2.2% , 2.7% , 4.9% , 1.8% , 表明混合对照品溶液在常温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批次 (批号 14020007) 通天口服液 6 份, 按 2.2.2 项下方法平行制备成供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果芍药苷, 升麻素苷, 甘草苷, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷, 洋川芎内酯 I 的质量分数分别为 0.946 5, 0.010 0, 0.099 6, 0.370 7, 0.463 8 $g \cdot L^{-1}$ 。峰面积

3 抗血小板聚集活性测定

3.1 样品的制备 不同浓度通天口服液 (批号 14020007) 的制备: 用生理盐水稀释通天口服液至质量浓度分别为 0.285 7, 0.333 3, 0.400 0, 0.500 0, 0.600 0, 0.666 7 $g \cdot L^{-1}$ (以通天口服液原液质量浓度为 1 $g \cdot L^{-1}$ 计)。

各有效成分单体溶液的制备: 分别取芍药苷, 升麻素苷, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷, 洋川芎内酯 I 对照品适量, 精密称定, 加生理盐水, 分别制备成每 1 mL 含芍药苷 6.453 2 mg, 升麻素苷 6.468 0 mg, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 6.458 8 mg, 洋川芎内酯 I 6.468 0 mg 的溶液。

4 个单体成分不同配比溶液的配制: 按通天口服液 (批号 14020007) 中 4 个单体成分的含量比例, 分别取对照品芍药苷 13.096 2 mg, 升麻素苷 0.1421 mg, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 5.205 6 mg, 洋川芎内酯 I 6.468 0 mg, 加生理盐水 1 mL, 涡旋, 溶解, 制备成 4 个成分的混合液, 即为溶液①; 取溶液①适量, 用生理盐水依次稀释配制溶液② (含洋川芎内酯 I 3.686 8 mg), 溶液③ (含洋川芎内酯 I 1.843 4 mg), 溶液④ (含洋川芎内酯 I 0.921 7 mg), 溶液⑤ (含洋川芎内酯 I 0.460 9 mg), 溶液⑥ (含洋川芎内酯 I 0.230 5 mg)。

表 3 通天口服液 3 中 5 种成分的加样回收率试验

Table 3 Results of recovery tests of five contents in ten batches of Tongtian oral liquid

成分	取样量 /mL	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	
芍药苷	1.6	2.818 5	2.414 2	5.215 0	99.3	99.2	0.2	
		2.818 5	2.414 2	5.216 3	99.3			
		2.818 5	2.414 2	5.208 2	99.0			
	2.0	2.818 5	3.017 8	5.899 2	102.1	101.9	0.2	
		2.818 5	3.017 8	5.890 1	101.8			
		2.818 5	3.017 8	5.887 8	101.7			
	2.4	2.818 5	3.621 4	6.242 1	94.5	95.0	0.5	
		2.818 5	3.621 4	6.262 1	95.1			
		2.818 5	3.621 4	6.274 3	95.4			
	升麻素苷	1.6	0.030 6	0.030 2	0.061 0	100.7	98.9	2.1
			0.030 6	0.030 2	0.059 8	96.7		
			0.030 6	0.030 2	0.060 6	99.3		
2.0		0.030 6	0.037 8	0.069 2	102.1	102.2	0.2	
		0.030 6	0.037 8	0.069 2	102.1			
		0.030 6	0.037 8	0.069 3	102.4			
2.4		0.030 6	0.045 4	0.078 0	104.4	104.8	1.0	
		0.030 6	0.045 4	0.078 7	105.9			
		0.030 6	0.045 4	0.077 8	104.0			
甘草苷		1.6	0.303 6	0.244 3	0.559 9	104.9	104.9	0.3
			0.303 6	0.244 3	0.560 5	105.2		
			0.303 6	0.244 3	0.558 9	104.5		
	2.0	0.303 6	0.305 4	0.620 3	103.7	103.7	0.1	
		0.303 6	0.305 4	0.620 0	103.6			
		0.303 6	0.305 4	0.620 3	103.7			
	2.4	0.303 6	0.366 5	0.653 6	95.5	96.0	0.6	
		0.303 6	0.366 5	0.654 9	95.9			
		0.303 6	0.366 5	0.657 7	96.6			
	5-O-甲基维斯阿米醇苷	1.6	1.122 6	0.894 6	2.035 6	102.1	104.8	2.5
			1.122 6	0.894 6	2.062 8	105.1		
			1.122 6	0.894 6	2.081 4	107.2		
2.0		1.122 6	1.118 2	2.260 1	101.7	102.1	0.6	
		1.122 6	1.118 2	2.272 3	102.8			
		1.122 6	1.118 2	2.261 7	101.9			
2.4		1.122 6	1.341 8	2.526 7	104.6	104.1	0.6	
		1.122 6	1.341 8	2.510 3	103.4			
		1.122 6	1.341 8	2.520 6	104.2			
洋川芎内酯 I		1.6	1.404 0	1.176 0	2.535 9	96.3	97.8	2.40
			1.404 0	1.176 0	2.539 8	96.6		
			1.404 0	1.176 0	2.585 6	100.5		
	2.0	1.404 0	1.470 0	2.835 7	97.4	98.4	1.6	
		1.404 0	1.470 0	2.838 7	97.6			
		1.404 0	1.470 0	2.876 4	100.2			
	2.4	1.404 0	1.764 0	3.142 9	98.6	99.5	0.8	
		1.404 0	1.764 0	3.164 4	99.8			
		1.404 0	1.764 0	3.168 3	100.0			

表 4 10 批通天口服液中 5 个成分的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Five contents in ten batches of Tongtian oral liquid ($\bar{x} \pm s, n=3$)

No.	芍药苷	升麻素苷	甘草苷	5-O-甲基维斯阿米醇苷	洋川芎内酯 I
S1	0.939 5	0.010 2	0.101 2	0.374 2	0.468 0
S2	1.188 6	0.010 8	0.095 8	0.551 9	0.389 5
S3	0.985 3	0.008 3	0.084 1	0.391 3	0.366 9
S4	0.993 1	0.009 5	0.093 7	0.361 9	0.377 5
S5	1.094 4	0.008 5	0.076 7	0.508 1	0.387 7
S6	0.877 5	0.008 0	0.080 2	0.400 2	0.433 4
S7	0.997 8	0.007 7	0.098 8	0.358 0	0.420 2
S8	1.140 3	0.009 9	0.081 4	0.706 5	0.440 6
S9	0.928 4	0.007 2	0.068 8	0.323 8	0.352 3
S10	0.948 4	0.009 4	0.094 9	0.393 8	0.374 7

3.2 抗血小板聚集实验方法的建立 选用健康新西兰兔取血 50 mL, 加质量分数为 3.8% 枸橼酸钠 (1:9) 抗凝, 900 r·min⁻¹, 离心 6 min。吸取上层米色血浆, 得到富血小板血浆 (Platelet-rich plasma, PRP), 剩余血液经 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液, 制备贫血小板血浆 (Platelet-poor plasma, PPP)。于测试杯内加入 PPP 200 μL, 进行仪器调零。再于另一测试杯内加入 PRP 200 μL, 然后加入药物或等体积空白对照液 20 μL, 在 37 ℃ 温育 5 min 后, 加入聚集诱导剂 ADP 15 μL, 在血液凝聚仪上测定血小板聚集率, 记录血小板 5 min 内最大聚集率。

3.3 标准曲线的建立 按 3.2 项下方法, 测定不同浓度通天口服液对家兔血小板聚集率的影响, 计算抑制率, 建立量效关系, 抑制率 = (生理盐水组最大聚集率 - 给药组最大聚集率) / 生理盐水组最大聚集率 × 100%, 以血小板抑制率为纵坐标 (Y), 通天口服液质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线。得到回归方程为 $Y = 105.2X - 2.480$ ($r = 0.993$), 线性范围 0.285 7 ~ 0.666 7 g·L⁻¹, 最低检测限为 0.019 6 g·L⁻¹, 定量限 0.047 6 g·L⁻¹。配制 0.5 g·L⁻¹ 的通天口服液, 按 3.2 项下方法测定抑制率, 平行 3 次, 精密度 RSD 7.1%。

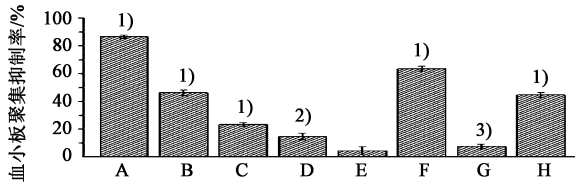
3.4 各有效成分单体及不同配比的抗血小板聚集活性测定

3.4.1 各有效成分单体的抗血小板聚集活性测定 按 3.2 项下方法, 测定芍药苷, 升麻素苷, 5-O-甲基维斯阿米醇苷, 洋川芎内酯 I 对家兔血小板聚集

率的影响,计算抑制率。测得芍药苷,升麻素苷,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷,洋川芎内酯 I 对家兔血小板聚集抑制率分别为 5.3%, 32.5%, 47.7%, 67.3%。其强弱顺序为洋川芎内酯 I > 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 > 升麻素苷 > 芍药苷,与生理盐水组相比,前三者均有显著性差异。但在抗血小板聚集生物指标中起主要作用的是洋川芎内酯 I ($P < 0.001$),芍药苷作用较弱。

3.4.2 有效成分单体不同配比的抗血小板聚集活性测定 按 3.2 项下方法,测定 4 个单体成分不同配比浓度对家兔血小板聚集率的影响,计算抑制率,建立量效关系,以血小板抑制率为纵坐标 (Y),4 个单体成分不同配比质量浓度为横坐标 (X),绘制标准曲线。得到回归方程为 $Y = 14.10X + 6.064$ ($r = 0.994$)。

3.4.3 通天口服液、各有效成分单体及其不同配比的抗血小板聚集作用比较 按 3.2 项下方法,测定通天口服液、各有效成分单体及其不同配比对家兔血小板聚集率的影响,计算抑制率,结果见图 3。洋川芎内酯 I ($6.468 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)与 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 通天口服液抗血小板聚集作用无显著性差异,溶液①的作用强于洋川芎内酯 I 单体 ($P < 0.001$),溶液⑥与 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 通天口服液含有等量的洋川芎内酯 I,抗血小板聚集作用却相差较大 ($P < 0.001$)。



A. 通天口服液; B. 洋川芎内酯 I; C. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; D. 升麻素苷; E. 芍药苷; F. 溶液①; G. 溶液⑥; H. $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 通天口服液; 与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$

图 3 通天口服液、有效成分单体及其不同配比的抗血小板聚集作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Anti-platelet aggregation of Tongtian oral liquid, active ingredients and different ratios of monomer ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4.4 不同批次通天口服液抗血小板聚集活性 按 3.2 项下方法,测定 10 批次通天口服液对家兔血小板聚集率的影响,计算抑制率,结果见表 5。除 S1 及 S2 批次外,洋川芎内酯 I 含量与抗血小板聚集活性呈正相关,洋川芎内酯 I 含量越高,其活性越强。分析其原因,由体外“各有效成分单体及其不同配比的抗血小板聚集活性”研究可知,3 种成分(洋川芎内酯 I, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷,升麻素苷)均有抗血小板聚集活性,以洋川芎内酯 I 活性最强。S1

中洋川芎内酯 I 含量略高于 S8,3 种成分总量却远低于 S8,故活性较弱; S2 中洋川芎内酯 I 含量虽低于 S7,但其 3 种成分总量较高,因此表现出较强的生物活性。

表 5 10 批通天口服液抗血小板聚集活性 ($n = 3$)

Table 5 Anti-platelet aggregation of 10 batches of Tongtian oral liquid ($n = 3$)

批次	洋川芎内酯 I / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	升麻素苷 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	总含量 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率 /%
S8	0.440 6	0.706 5	0.009 9	1.157 0	0.863 8
S1	0.468 0	0.374 2	0.010 2	0.852 4	0.814 0
S6	0.433 4	0.400 2	0.008 0	0.841 6	0.776 3
S2	0.389 5	0.551 9	0.010 8	0.952 2	0.765 2
S7	0.420 2	0.358 0	0.007 7	0.785 9	0.744 2
S5	0.387 7	0.508 1	0.008 5	0.904 3	0.736 4
S4	0.377 5	0.361 9	0.009 5	0.748 9	0.728 7
S10	0.374 7	0.393 8	0.009 4	0.777 9	0.677 7
S3	0.366 9	0.391 3	0.008 3	0.766 5	0.663 3
S9	0.352 3	0.323 8	0.007 2	0.683 3	0.609 1

4 讨论

通天口服液集活血祛风止痛药于一方。本课题组近年来利用现代血清药物化学及脑脊液药物化学手段对方中君药川芎进行了系统的研究,确定了川芎水煎液中主要成分之一洋川芎内酯 I 为其主要入血入脑成分^[6-8],且此成分在硝酸甘油造模后,脑脊液中相应色谱峰的响应值明显增大,提示此成分在偏头痛发作时更易通过血脑屏障。在此基础上,进一步系统地进行了洋川芎内酯 I 抗偏头痛作用的药效学实验^[9-10]及体内药代动力学研究,其结果证实,洋川芎内酯类化合物既是川芎脑靶向作用的物质基础,同时也是抗偏头痛的药效物质基础。此外,佐药防风中的升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为色原酮类化合物,具有解热、抗炎、镇痛作用^[11]。使药甘草中所含有的甘草苷具有缓急止痛的作用^[12]。较之 2010 年版《中国药典》一部“通天口服液”项下的仅以芍药苷作为质控指标,本文所建立的同步测定 5 种成分的化学定量指纹图谱的方法具有较为全面的视角,涵盖了君臣佐使药的化学定量信息,体现了整体性。

实验结果表明,对抗血小板聚集生物活性起主要作用的是君药川芎中的洋川芎内酯 I ($P < 0.001$),单体成分不同配比的抗血小板聚集活性呈

协同作用,其抗血小板聚集活性强度大于各单体的活性($P < 0.001$),小于通天口服液原液的活性($P < 0.001$)。不同批次通天口服液的抗血小板聚集活性受洋川芎内酯 I, 5-O-甲基维斯阿米醇苷以及升麻素苷 3 种成分含量的共同影响,3 种成分总量及洋川芎内酯 I 含量较高的批次,活性较强^[13-14]。目前,《中国药典》仅以芍药苷作为质控指标显然不尽合理。

采用化学定量指纹图谱对 10 批次通天口服液中 5 个指标成分进行检查,结果发现不同批次通天口服液中 5 成分含量不同。出现这种现象的原因可能有两个:一是药材质量差异大,川芎、赤芍、防风、甘草药材不同产地有效成分含量也不同^[15-18]。二是制备工艺标准化方面的原因,通天口服液采用双提法进行提取制备,洋川芎内酯 I 为藁本内酯类氧化衍生物,高温不稳定,因其含有内酯环结构,在碱性环境下容易发生分解反应^[19]。大生产过程中,温度,受热时间,pH 的改变等均有可能影响最终药品质量。由于不同批次通天口服液活性成分含量差异较大,其抗血小板聚集活性也显示出较大的差异。因此应当严控药材质量,对中药制剂的生产进行规范化控制,从而保证不同批次间药品的质量均一性。

此外,已有研究表明,洋川芎内酯 I,芍药苷,升麻素苷,5-O-甲基维斯阿米醇苷及甘草苷最佳吸收波长分别为 278, 230, 254, 254, 276 nm^[15-18]。利用 HPLC-DAD 对通天口服液样品进行紫外全波长扫描,结果显示,供试品在 220 nm 检测波长下出峰数最多,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好;而洋川芎内酯 I 在 220 nm 下吸收较低,在 278 nm 吸收最强。为了全面反映君臣佐使药的特性,故选择 220, 278 nm 共 2 个波长对通天口服液进行化学成分分析。

[参考文献]

[1] 李玉娇,李清,赫宇霏,等. 虎杖提取物指纹图谱与其体外抗氧化作用的灰关联度分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 76-80.

[2] 杨立芳,刘洪存,冯方权,等. 中药毛果鱼藤藤茎 HPLC 指纹图谱及不同极性部位抑制癌细胞增殖活性研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(12): 2112-2118.

[3] 彭涛,肖礼娥,余佳文,等. HPLC 法测定通天口服液中马兜铃酸 A 的含量[J]. 中国中医药咨讯, 2012, 4(5): 152.

[4] 蒙杰丹,刘冰,杨琼,等. 近红外光谱法同时测定通天

口服液中天麻素和芍药苷的含量[J]. 分析科学学报, 2012, 28(2): 197-201.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1049-1050.

[6] 王强,沈岚,房鑫,等. 大川芎方沿体外-血浆-脑脊液-脑组织的移行成分研究[J]. 中成药, 2013, 35(11): 2364-2371.

[7] 沈岚,林晓,洪燕龙,等. 大川芎方效应组分血浆及脑脊液 HPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 2017-2021.

[8] Wang Y H, Liang S, Xu D S, et al. Effect and mechanism of senkyunolide I as an anti-migraine compound from *Ligusticum chuanxiong* [J]. Pharm Pharmacol, 2011, 63(2): 261-266.

[9] 梁爽,冯怡,徐德生,等. 洋川芎内酯 I 在制备防治脑卒中及其康复期相关治疗用药物中的应用: 中国, CN201010107765. 7 [P]. 2010-02-09.

[10] 冯怡,徐德生,阮克锋,等. 洋川芎内酯 H 在制备抗抑郁症、偏头痛及其他 5-羟色胺能系统相关疾病药物中的应用: 中国, CN200910200688. 7 [P]. 2009-12-24.

[11] 窦红霞,高玉兰. 防风的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 15-17.

[12] 王敏. 甘草研究综述[J]. 齐鲁药事, 2005, 24(10): 614-616.

[13] Hibino T, Yuzurihara M, Terawaki K, et al. Goshuyuto, a traditional Japanese medicine for migraine, inhibits platelet aggregation in guinea-pig whole blood [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 108(1): 89-94.

[14] 罗崇彬. 通天口服液抗炎镇痛作用研究[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(4): 36-38.

[15] 马天成,贾英,罗洁,等. UPLC 同时测定不同产地川芎中 8 种活性成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(10): 902-906.

[16] 陈述. HPLC 法测定不同产地赤芍中芍药苷的含量及重金属和残留农药的分析[J]. 世界中医药, 2014, 9(9): 1224-1227.

[17] 邵留英,喻志斌,瞿发林. 不同产地防风饮片中有效成分含量比较[J]. 海峡药学, 2013, 25(2): 52-54.

[18] 张友波,徐崑,杨秀伟,等. RP-HPLC 法同时测定不同产地甘草中 9 个主要成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 214-229.

[19] 熊耀坤,梁爽,杜焰,等. HPLC 法测定洋川芎内酯 I 的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1644-1647.

[责任编辑 顾雪竹]