

舒胸片血清药物化学

雷志丹, 黄莺, 雷志钧, 夏新华*
(湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

[摘要] **目的:**对舒胸片进行血清药物化学研究。**方法:**采用 SD 大鼠灌胃给药,于给药一定时间后取血,测定复方及各单味药提取液血样的 HPLC 色谱图。采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱,0.05% 酸水-乙腈梯度洗脱,波长 203 nm,流速 1 mL·min⁻¹。**结果:**舒胸片血清 HPLC 指纹图谱中可检出 15 个成分,其中血清本身具的成分 4 个,其余 11 个可能来自复方的原成分及其代谢产物。舒胸片中已知的 6 种主要成分(川芎嗪、羟基红花黄芩素 A、阿魏酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁)均可从血清中检出,表明为入血成分。在血清 HPLC 指纹图谱与复方 HPLC 指纹图谱的基础上,建立了舒胸片的表观血清指纹图谱。**结论:**所建立的舒胸片提取液 HPLC 指纹图谱测定方法操作简便,重复性好,可反映舒胸片药材中多成分的信息。

[关键词] 舒胸片; 血清药物化学; 指纹图谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0077-04

[doi] 10.11653/syfy2014010077

Serum Pharmacochimistry of Shuxiong Tablets

LEI Zhi-dan, HUANG Ying, LEI Zhi-jun, XIA Xin-hua*
(Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To conduct serum pharmacochimistry study on extract in Shuxiong Tablets. **Method:** HPLC research on the serum fingerprints chromatograms of Shuxiong tablet extract was based on blood serum chemical pharmacy: After SD rats were administrated by gavage, samples were taken respectively after certain periods and measures were made on serum chromatograms of both mixed extracts and each single extract, then analysis is made. An HPLC method was adopted with column Kromasil C₁₈ (4.60 mm × 200 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of 0.05% phosphoric acid-water-acetonitrile gradient elution. The flow velocity was 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was at 203 nm. **Result:** Fifteen components were detected in the fingerprint serum, 4 come from the original compound and their metabolites. The 6 known major components of Shuxiong tablet (ligustazine, hydroxysafflor yellow A, ferulic acid, notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁) which showed that they were elements in the blood. The serum chromatograms of Shuxiong tablet were established on the basis of serum HPLC fingerprint chromatograms and compound HPLC fingerprint chromatograms. **Conclusion:** The measure of HPLC fingerprint chromatograms is simple and reproducible, and the fingerprint chromatograms can reflect multi-ingredients in the Shuxiong tablet, therefore, this study provides a reliable method for the effective quality control of Shuxiong tablet, and prepares for in-depth study on the tablet.

[Key words] Shuxiong tablets; serum pharmacochimistry; fingerprint; HPLC

从内服药而言,不论中药复方多大、成分多少,只有进入血液的成分(即血中移行成分)才有可能

[收稿日期] 20130730(015)

[基金项目] 湖南省教育厅重点课题(07A049)湖南省科技厅科学研究项目(2008sk3068)

[第一作者] 雷志丹,在读博士生,从事中药新制剂工艺与质量标准的研究,E-mail:leizhidanqq@163.com

[通讯作者] *夏新华,博士,教授,博士生导师,从事中药新制剂、新剂型、新技术及制剂质量标准的研究,Tel:0731-88458305,E-mail:xiaxinhua001@163.com

成为有效成分。王喜军^[1-3]等于 1997 年正式提出了“中药血清药物化学”的概念及理论,血清药物化学主要是研究血清中的化学物质,观测血清中外源性活性物质及其作用和代谢规律。

舒胸片系《中国药典》2005 年版一部收载的复方中药制剂^[4],由三七、川芎、红花三味中药制备而成,各药味主要有效成分明确,并含有皂苷类、黄酮类、生物碱、有机酸等多种不同结构类型的有效成分。本实验拟建立了一种简单、可靠的 HPLC 方法,对舒胸片提取液的血清药物化学进行动态跟踪分析,建立舒胸片提取液指纹图谱以及给大鼠灌胃一定剂量的舒胸片提取液后所获得的血清药物化学动态指纹图谱,通过对舒胸片提取液的指纹图谱与血清药物化学动态图谱中峰的相关性研究,阐明其血中移行成分、代谢产物以及方剂的配伍意义,从而改善其生产工艺,达到提高临床疗效的目的,初步揭示出舒胸片提取液在大鼠体内的主要药效物质基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪,SK3300H 型超声仪(北京医用设备厂),RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),80-1 型离心沉淀机(江苏金坛市中大仪器厂)。

1.2 药品与试剂 乙腈为色谱纯(Tedi company,批号 811903),水为超纯水,磷酸(分析纯,湖南师大化学试剂厂),阿魏酸对照品(批号 110733-200611),羟基红花黄色素 A 对照品(批号 110615-200516),人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号 110703-200322),人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号 110704-200318),三七皂苷 R₁ 对照品(批号 110745-200415)均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用。

三七,川芎,红花均由湖南九芝堂药业有限公司提供。

1.3 实验动物 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 220 g,由湖南中医药大学动物中心提供。动物合格证号 SCXK(湘 2009-0004)。

2 方法与结果

2.1 提取液的制备

2.1.1 舒胸片混合提取液的制备 三七用 70% 乙醇回流提取 2 次,加醇量分别为 8,6 倍,提取时间分别为 2, 1.5 h,收集醇提液,浓缩至 0.5 g 生药·mL⁻¹;川芎加 10 倍量 95% 乙醇煎煮 2 h,滤过,药渣与红花加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 1 h,合并 3 次煎液,滤过,静置 24 h,取上清液滤过后浓缩至 0.5 g

生药·mL⁻¹,与上述三七浓缩液合并。取混合液 1 mL,加色谱甲醇稀释至 10 mL,过 0.45 μm 滤膜,即得给药样品供试液。

2.1.2 舒胸片各单味药提取液的制备 取三七、川芎、红花适量,按 2.1.1 项下方法制成各单味药提取液。取各单味药提取液 1 mL,加色谱甲醇稀释至 10 mL,过 0.45 μm 滤膜,即得各单味药样品供试液。

2.1.3 灌胃液的制备 川芎、三七浓缩液于 76 °C 干燥 24 h,得浸膏,取各浸膏的一半分别溶于 100 mL 水中得川芎、三七的单味药灌胃液,红花浓缩至 200 mL,取 100 mL 得红花单味药灌胃液,川芎、三七浸膏一半加入 100 mL 红花水提液中溶解,得舒胸片混合灌胃液。

2.2 血清样品的制备

2.2.1 给药方案 以舒胸片临床剂量折算成动物的等效剂量,1 天 1 次,每次 2 mL 连续灌胃给药 12 d,并设空白对照组(灌胃给予蒸馏水)。

2.2.2 空白血清及含药血清样品的制备^[5-8] 各组分别于末次给药后 0.5, 1 h,从大鼠眼眶取血,静置 24 h 待血凝块后,离心 20 min(3 000 r·min⁻¹),取上清液,即得。

2.3 血清指纹图谱的测定

2.3.1 供试品的制备^[9-10] 取上述各种血清样品,加入色谱甲醇,超声 20 min,沉淀除去蛋白,离心后取上清液,过 0.45 μm 微孔滤膜,供 HPLC 分析。

2.3.2 参照物的制备 分别取盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 与三七皂苷 R₁ 对照品适量,用甲醇溶解分别制成适当浓度的溶液(或混合溶液)。

2.3.3 色谱条件 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm);以 0.05% 磷酸水溶液为流动相 A,以乙腈为流动相 B,按表 1 中的规定进行梯度洗脱;检测波长 203 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,分析时间 70 min。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 8	95	5
8 ~ 45	95 ~ 62	5 ~ 38
45 ~ 70	62 ~ 60	38 ~ 40

2.3.4 供试品的测定 按上述色谱条件,取供试品溶液与参照物溶液适量,分别注入液相色谱仪,记录色谱图(图 1 ~ 10)。

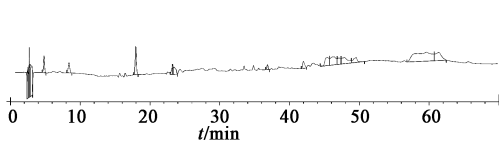


图1 空白血样 HPLC

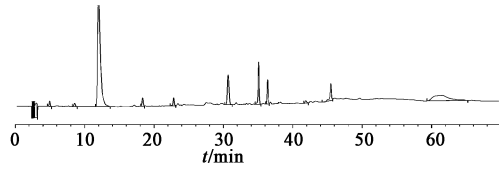


图2 空白血样 + 对照品 HPLC

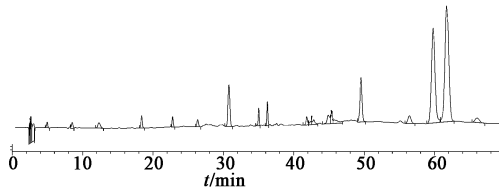


图3 30 min 取血复方提取液血样 HPLC

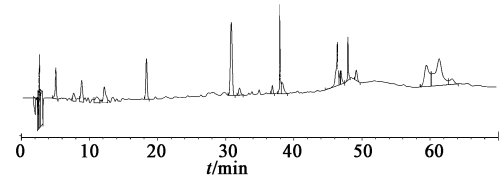


图4 30 min 取血的川芎血样 HPLC

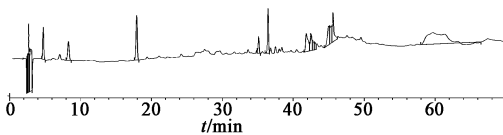


图5 30 min 取血的三七血样 HPLC

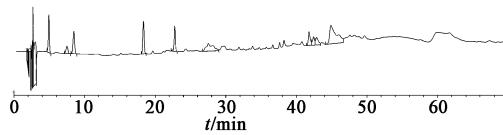


图6 30 min 取血的红花血样 HPLC

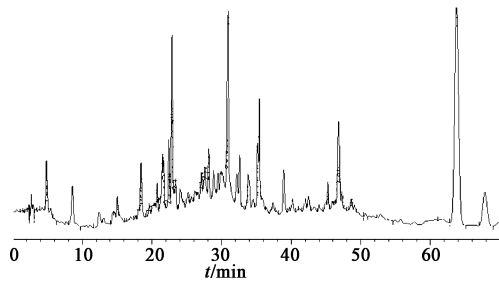


图7 复方混合提取液 HPLC

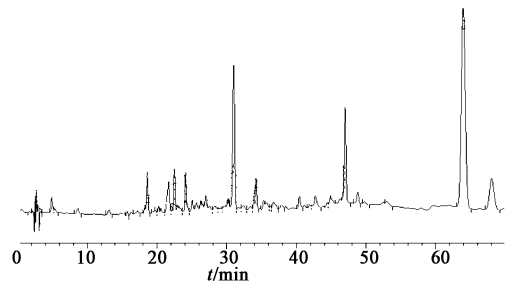


图8 川芎提取液 HPLC

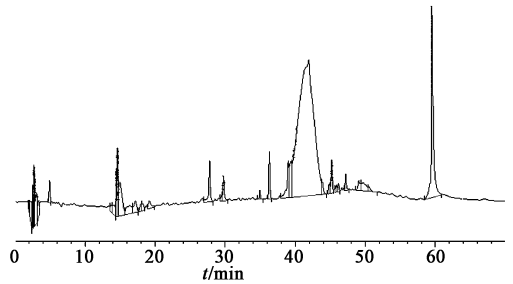


图9 三七提取液 HPLC

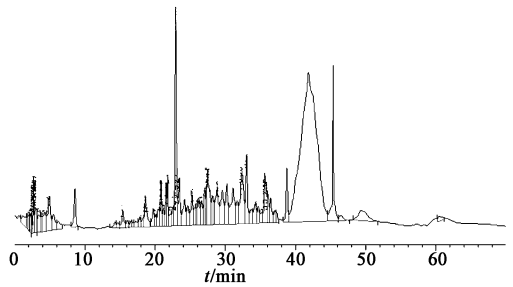


图10 红花提取液 HPLC

留时间的 RSD < 1%, 相对峰面积的 RSD < 3%, 表明供试品进样精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一批次混合血样, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 记录色谱图, 结果各共有特征色谱峰相对保留时间的 RSD < 1%, 相对峰面积的 RSD < 3%, 表明供试品在测定的 24 h 内稳定性良好。

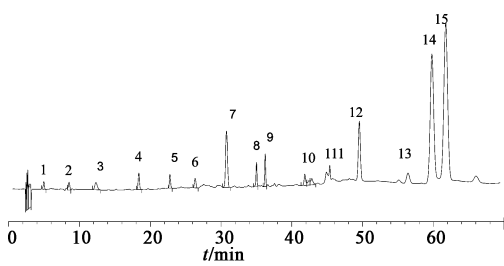
2.4.3 重复性试验 取同一批混合血样, 按上述方法制备 6 份供试液, 进样, 记录色谱图, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 1%, 相对峰面积的 RSD < 3%, 表明本测定方法重复性良好。

2.5 血清指纹图谱的建立 根据 10 批样品在多个测试条件下获得的测试结果, 确定共有指纹峰(相对保留时间、峰面积比值), 选取特征指纹峰群, 建立舒胸片的血清指纹图谱, 见图 11。

2.5.1 共有指纹峰的标定 舒胸片 HPLC 血清指纹图谱中, 共有指纹峰 15 个。以保留时间约为 (59.317 ± 0.028) min (12 号峰) 为参照峰(S 峰), 将各色谱峰保留时间与同一图谱中 S 峰的保留时间

2.4 测定的方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批次混合血样, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 结果各共有特征色谱峰相对保



3. 川芎嗪;5. 羟基红花黄烷素 A;7. 阿魏酸;8. 三七皂苷 R₁;
9. 人参皂苷 Rg₁;11. 人参皂苷 Rb₁

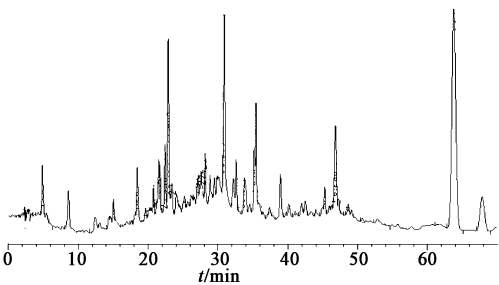
图 11 舒胸片 HPLC 血清指纹图谱

比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间。

2.5.2 共有指纹峰面积比 以参照物峰(S 峰)面积为 1,计算各共有指纹峰面积与 S 峰面积的比值。

2.6 血清指纹图谱的信息分析 从混合血样与空白血样、空白 + 对照品血样对比可见,混合血样中共分离有 16 个色谱峰,3,5,7,8,9,11 号共有指纹峰所对应的成分依次为舒胸片中 6 种主要成分川芎嗪、羟基红花黄烷素 A、阿魏酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁;与空白 + 对照品血样比较,混合血样中出现了 5 个新的色谱峰,即 12,13,14,15,16 号峰,比较川芎血样色谱图,推测 15,16 号峰所代表的入血成分可能来自川芎,而 12,13,14 号峰在空白血样、三七、川芎、红花提取液 HPLC 色谱图及其血样 HPLC 色谱图中均未有对应峰,故推测可能为复方的代谢产物。

2.7 表观血清指纹图谱的建立 基于上述血清指纹图谱的信息分析结果,对复方混合提取液 HPLC 指纹图谱中与血清移行成分相关的特征指纹峰(群)进行标定,即可获得能表达血中移行成分的血清指纹图谱。



箭头标注的峰为血中移行成分

图 12 舒胸片 HPLC 表观血清指纹图谱

3 小结与讨论

与 1 h 取血样品的 HPLC 色谱图比较,可知 30 min 血样色谱图中大多数成分的峰面积比 1 h 的大,故采集血样以末次给药后 30 min 为佳。

舒胸片血清 HPLC 指纹图中可检出 15 个成分,

其中血清本身具的成分 4 个,其余 11 个可能来自复方的原成分及其代谢产物。舒胸片中已知的 6 种主要成分(川芎嗪、羟基红花黄烷素 A、阿魏酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁)均可从血清中检出,表明为入血成分(或血中移行成分),故可作为舒胸片的药效物质用于工艺与质量标准研究的定量评价指标。

舒胸片的表观血清 HPLC 指纹图谱包含有较多该制剂血中移行成分的信息(可检出约 7~8 个),若将其作为质量控制的指标,与传统的单一成分指标相比,它无疑能更好地保留中药复方中的有效成分,从而提高中药复方制剂的疗效;同时也可避免直接用血清指纹图谱作为评价指标所带来的操作不便、费用高、耗时多等问题。

本文建立了适合舒胸片提取液及其体内分析的 HPLC 方法,并将方法应用到舒胸片的血清药物化学动态分析及药效物质基础研究中。研究初步表明:血中移行成分主要来源于川芎和三七。此外,由于受到检测手段的限制未能对未知组分进行定性分析,同时一些微量组分可能未被检测到。对于这些问题,有待于进一步采用 HPLC-MS 联用技术及现代分离技术从药材及血浆中分离未知组分并进行结构鉴定。

[参考文献]

- [1] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789.
- [2] 王喜军, 张宁, 孙晖. 六味地黄丸的血清药物化学研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(4): 219.
- [3] 曹洪欣, 王喜军, 于友华. 中药复方安替威血清药物化学和抗 SARS 病毒试验研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3): 281.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 103.
- [5] 张梅, 邱丰, 谢学军, 等. 葛根血中移行成分高效液相色谱分析[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 215.
- [6] 方建国, 彭静, 王文清, 等. 大青叶在大鼠中的血清药物化学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008(6): 434.
- [7] 邓翀, 吴怡, 孟宪丽, 等. 大黄抗内毒素有效组分血清药物化学研究[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 31.
- [8] 姜霞, 何在安, 刘焱文. 银翘散血清药物化学研究[J]. 湖北中医学院学报, 2007, 9(4): 15.
- [9] 宋金春, 曾俊芬, 胡传芹, 等. 生化汤的血清药物化学研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(13): 15.
- [10] 窦志华, 丁安伟, 王陆军, 等. 复方五仁醇胶囊血清药物化学研究[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1137.

[责任编辑 顾雪竹]