

川芎血清药物化学的初步研究

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

[摘要] 目的:对川芎进行血清药物化学研究。方法:建立川芎提取液及川芎提取液灌胃后大鼠血清的 HPLC 指纹图谱,分析川芎提取液给药后所得血清样品,鉴定川芎提取液灌胃后大鼠血中移行成分。结果:川芎提取液灌胃后从血中发现了 7 个人血成分,其中 4 个为代谢产物;3 个为原型成分。结论:川芎入血成分主要为川芎嗪和阿魏酸,其血清药物化学表征可以为阐明川芎药理作用及其质量控制提供依据。

[关键词] 川芎提取液;血清药物化学;指纹图谱;高效液相色谱

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0096-04

Preliminary Study on Serum Pharmacochimistry of Chuanxiong Extract

LEI Zhi-dan, LEI Zhi-jun, XIA Xin-hua*

(School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To have a serum pharmacochimistry study on chuanxiong extract. **Method:** HPLC fingerprints of chuanxiong extract and serum of rats after taking the extract were established with serum pharmacochimistry method. The serum samples taken after taking chuanxiong extract were compared, the constituents absorbed into the serum after taking chuanxiong extract was determined. **Result:** Seven constituents migrating to the blood were detected, of which 4 were metabolites, 3 were prototype constituents. **Conclusion:** After taking chuanxiong extract, the constituents absorbed into blood were ligustazine and ferulic acid whose serum pharmacochimistry signs could provide evidence for the pharmacological action and quality control of chuanxiong.

[Key words] chuanxiong extract; serum pharmacochimistry; fingerprint; HPLC

川芎是我国传统使用的中药材,始载于《神农本草经》,为伞形科植物 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,其活性成分有以川芎嗪为代表的含氮化合物类和以阿魏酸为代表的有机酸类。含氮化合物中的川芎嗪是川芎中主要有效成分之一,约占生药含量的 0.1% ~ 0.2%。酚(酸)性成分阿魏酸是川芎中另一主要有效成分,其化学名称为 4-羟基-5-甲

氧基苯丙酸^[1-4]。

中药血清药物化学是以药物化学的研究手段和方法为基础,多种现代技术综合运用,分析鉴定中药口服后血清中移行成分,研究其药效相关性,确定中药药效物质基础并研究其体内过程的应用学科。传统中药多为口服给药,其有效物质必须以血液为介质输送到靶点,从而产生作用。因而给药后的血清才是真正起作用的“制剂”,血清中含有的成分才是中药的体内直接作用物质^[5]。为进一步揭示川芎药材中的药效物质,作者研究了给大鼠灌胃一定剂量的川芎提取液后所获得的血清药物化学动态指纹图谱。通过对川芎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,初步探讨川芎提取液在大鼠体内的主要药效物质基础。

[收稿日期] 20110106(004)

[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,在读硕士,从事中药新制剂工艺与质量标准研究, Tel: 0731-88458237, E-mail: leizhidanqq@163.com

[通讯作者] *夏新华, Tel: 0731-88458305, E-mail: xiaxinhua001@163.com

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪:Agilent 1200 series,包括四元泵(G1311A)带真空脱气机(G1322A),自动进样器(G1329A),柱温箱(HT-230A),紫外检测器(G1314A),Kromasil C₁₈(4.6 mm × 200 mm, 5 μm)色谱柱,Agilent Technologies 色谱工作站(美国Agilent公司);AR140·C型电子天平(美国OHAUS仪器有限公司);KUDOS型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);DZF-6050型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药 川芎嗪(批号200305)、阿魏酸对照品(批号200611)均购于中国药品生物制品检定所,供含量测定用;乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水;川芎药材购自九芝堂药业有限公司,经湖南中医药大学药学院刘塔斯教授鉴定,符合2010年版《中国药典》规定。

1.3 动物 SD大鼠,雌雄不限,体重(200 ± 20)g,购于湖南中医药大学实验动物中心,动物合格证号SCXK(湘)2009-0004。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的配制 精确称量川芎嗪和阿魏酸对照品适量,分别用色谱甲醇定容至10 mL,超声10 min,即得川芎嗪和阿魏酸对照品溶液。

2.1.2 川芎灌胃液的制备 供试品溶液的制备:川芎加10倍量95%乙醇回流提取2 h,滤过,滤液浓缩至含生药0.5 g·mL⁻¹,取浓缩液1 mL加色谱甲醇稀释至10 mL,过0.45 μm滤膜,取续滤液,即得给药样品供试液。灌胃液的制备:川芎浓缩液置于76 °C干燥箱干燥24 h,得川芎浸膏,将浸膏溶于100 mL水中得川芎灌胃液。

2.2 血清样品的制备

2.2.1 给药方案 以川芎临床剂量折算成动物的等效剂量,每天灌胃1次,2 mL/次连续灌胃给药7 d,并设空白对照组(灌胃给予蒸馏水)。

2.2.2 采血时间的确定 各组分别于末次给药后0.5,1 h从大鼠眼眶取血,供分析用。

2.2.3 空白血清及含药血清样品的制备 采用上述方法取血后,37 °C水浴静置24 h,待血凝结后,离心20 min(3 000 r·min⁻¹),取上清液,即得。

2.2.4 供试品的制备 取血清样品,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 血清指纹图谱的测定

2.3.1 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,进样量为10 μL,分析时间为70 min。

表1 梯度洗脱程序

t/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

2.3.2 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1~5)。

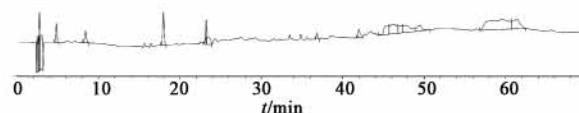
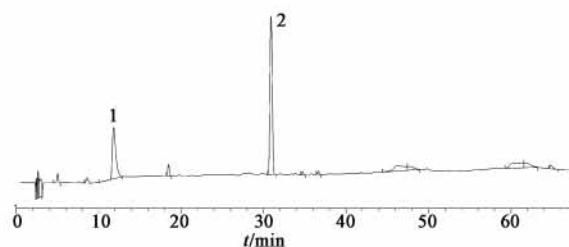


图1 空白血样 HPLC



1. 川芎嗪; 2. 阿魏酸(图3-5同)

图2 空白血样+对照品 HPLC

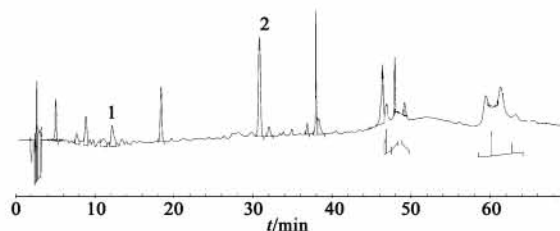


图3 30 min 取血的川芎血样 HPLC

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样6次,记录色谱图,结果各共有特征色谱峰相对保留时间的RSD均<1%,相对峰面积的RSD均<3%,表明供试品进样精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,24 h进样,结果各共有特征色谱峰相对

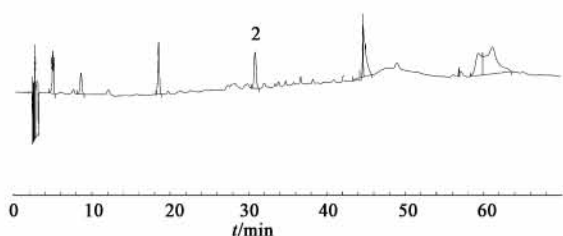


图 4 1 h 取血的川芎血样 HPLC

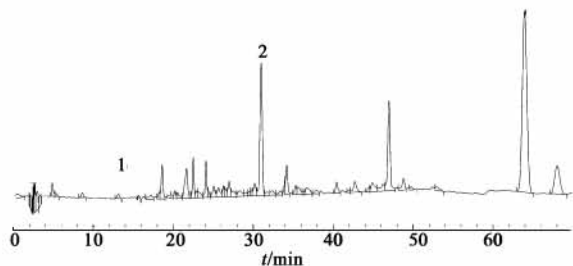


图 5 川芎提取液体外 HPLC

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 血清指纹图谱建立 根据 10 批样品在相同测试条件下获得的结果(即色谱中所给出的峰数、峰面积积分值、保留时间等相关参数)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(色谱峰组合), 建立川芎血清指纹图谱, 见图 6。

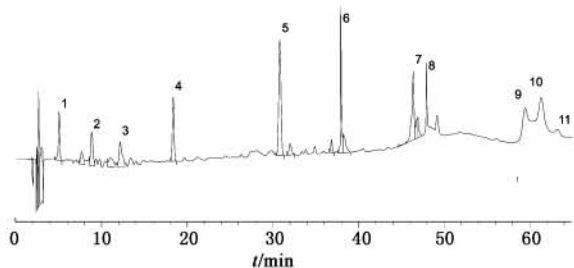


图 6 川芎的血清指纹图谱

2.6 血清指纹图谱的信息分析 从川芎血样与空白血样、空白 + 对照品血样对比可见, 川芎血样中共分离有 11 个色谱峰, 1, 2, 4 号峰为血清中组分, 3, 5 指纹峰所对应的成分依次为川芎中的主要成分川芎嗪与阿魏酸; 6 号峰为血清中未除净的蛋白峰, 7 号峰为川芎原型未知成分, 与空白 + 对照品血样比较, 川芎血样中出现了 4 个新的色谱峰, 即 8, 9, 10, 11

号峰, 比较川芎提取液色谱图, 推测而 8, 9, 10, 11 号峰在空白血样、川芎 HPLC 图及其血样 HPLC 图中均未有对应峰, 故推测可能为川芎的代谢产物。

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, 对川芎提取液 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, 见图 7。

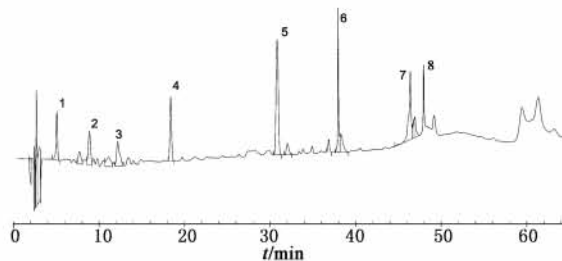


图 7 川芎 HPLC 表观血清指纹图谱
箭头标注的峰为血中移行成分

3 讨论

与 1 h 取血样品的 HPLC 进行比较, 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。

川芎血清 HPLC 指纹图中可检出 11 个成分, 其中血清本身的成分 4 个, 其余 6 个可能来自复方的原成分及其代谢产物。川芎中已知的 2 种主要成分(川芎嗪、阿魏酸)均可从血清中检出, 表明为入血成分(或血中移行成分), 故可作为川芎的药效物质用于工艺与质量标准研究的定量评价指标。

川芎的表观血清 HPLC 指纹图谱包含较多该药材血中移行成分的信息(可检出约 5~6 个), 若将其作为质量控制指标, 与传统的单一成分指标相比, 能更好地控制中药的质量, 从而提高中药制剂的疗效; 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。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:28.
- [2] 周江. 川芎有效成分及其药理作用研究概况[J]. 浙江中医杂志, 2007(10):616.
- [3] 邓翠娥. 川芎嗪的药理作用及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2001(12):656.
- [4] 叶景. 川芎有效成分的提取技术[J]. 中国新技术企业, 2009(15):126.
- [5] 房方, 李祥, 陈建伟. 中药血清药物化学的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(1)143.

[责任编辑 邹晓翠]

基于药效物质基础的肉桂和赤石脂相畏研究

姜超, 孟宪生*, 包永睿, 康廷国

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 测定肉桂单煎液和肉桂与赤石脂不同比例配伍合煎液的水提液和挥发油中肉桂酸和肉桂醛的含量, 从药效物质基础变化研究赤石脂对肉桂的相畏作用。方法: 取肉桂, 肉桂 1:1 配伍赤石脂和肉桂 1:3 配伍赤石脂 3 组药材, 采用加热回流提取和挥发油提取法同时提取, 同时收集水提液和挥发油两组成分, 对提取成分采用 HPLC 分析。采用 Phenomenex-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 流动相乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (B), 二元线性梯度洗脱 0~30 min, 90% B~65% B (10% A~35% A); 30~50 min, 65% B (35% A) 的条件, 测定水提液中肉桂酸和肉桂醛的含量。采用 Phenomenex-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 流动相乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (B), 0~30 min, 65% B (35% A) 的条件, 测定挥发油中肉桂醛的含量。结果: 肉桂 1:1 配伍赤石脂及肉桂 1:3 配伍赤石脂水提液中肉桂酸的含量照单煎肉桂药材分别下降 30.71%, 53.54%, 未检测到肉桂醛。挥发油中肉桂醛含量分别下降 7.21%, 75.89%。结论: 肉桂与赤石脂配伍后肉桂酸和肉桂醛含量均下降, 且下降程度与赤石脂比例有关。

[关键词] 相畏配伍; 肉桂; 赤石脂; 肉桂酸; 肉桂醛; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0099-03

Based on Pharmacodynamic Material Base of Cinnamon and Red Halloysite Phase Fear Research

JIANG Chao, MENG Xian-sheng*, BAO Yong-rui, KANG Ting-guo

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** Determined by HPLC method cinnamon single Fried fluid and cinnamon and red halloysite different proportion of gegenqinlian decoction of liquid water extraction fits the liquid and naphtha in cinnamic acid and cinnamaldehyde content, material basis from the pharmacodynamic changes of Chishizhi Wei on the role of the phase of cinnamon. **Method:** Take the cinnamon, cinnamon drew red halloysite and cinnamon compatibility of purified red halloysite three groups of compatibility of medicinal herbs, adopt heating reflux extraction and volatile oil extraction meanwhile extraction and collected water extraction liquid and naphtha two composition points, to extract use HPLC analysis. Adopt chromatographic column: Phenomenex-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), column temperature 30 °C, velocity was 1.0 mL·min⁻¹, detected wavelength was 254 nm, mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% phosphate (B), binary linear gradient elution 0-30 min, 90% B-65% B (10% A-35% A); 30-50 min, 65% B (35% A) conditions, determination of water extraction fluid cinnamic acid and cinnamaldehyde content. Adopt chromatographic column: Phenomenex-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), column temperature was 30 °C. Velocity was 1.0 mL·min⁻¹, detected wavelength was 280 nm, mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% phosphate (B), 0-30 min, 65% B (35% A) conditions, determination of cinnamaldehyde content of volatile oil. **Result:** Cinnamon drew compatibility red halloysite and cinnamon purified water extract-alcohol

[收稿日期] 20110120(013)

[第一作者] 姜超, 硕士, Tel: 0411-87406496, E-mail: jiangchao850106@sina.com

[通讯作者] * 孟宪生, 博士, 研究方向: 中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析, Tel: 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com