

· 药理 ·

2 种当归芍药散提取物的镇痛活性与化学成分差异分析

曹旦华, 高珍, 寇俊萍*, 朱丹妮

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

[摘要] 目的: 比较当归芍药散水提取物和 50% 乙醇提取物的镇痛活性与化学成分差异, 为其临床合理应用和进一步探讨其物质基础提供依据。方法: 采用水回流提取和 50% 乙醇超声提取方法, 制备 2 种当归芍药散提取物, 以醋酸致痛小鼠模型和缩宫素诱导的拟痛经小鼠模型评价二者的镇痛活性; 并采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 和硫酸-苯酚法分别对 2 种当归芍药散提取物中的化学成分进行分析归属和总糖含量测定。结果: 当归芍药散水提物 2.5, 10 g·kg⁻¹ 及醇提物 10 g·kg⁻¹ 可显著或非常显著减少醋酸和缩宫素诱导的小鼠扭体次数, 水提物 2.5 g·kg⁻¹ 抑制率高于醇提物 2.5 g·kg⁻¹; HPLC-DAD 法可检测到当归芍药散提取物的 20 个主要指纹峰, 水提物中来自于芍药的 4 个成分的色谱峰面积和总多糖含量高于相应的醇提物。结论: 当归芍药散水回流提取物的镇痛活性强于 50% 乙醇超声提取物, 与其所含大极性成分和多糖含量有关。

[关键词] 当归芍药散; 镇痛活性; 化学组成; 高效液相色谱; 硫酸-苯酚法

[中图分类号] R285.5; R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0089-05

Studies on Difference between Analgesic Effects and Chemical Compositions of Danggui Shaoyao San Extracted by Water and Ethanol

CAO Dan-hua, GAO Zhen, KOU Jun-ping*, ZHU Dan-ni

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] Objective: To compare the analgesic effects and chemical components for two kinds of extracts of Danggui Shaoyao San (DSS) by water and 50% ethanol accordingly, so as to provide some evidence for its clinical use and exploration of its material basis. **Method:** Two kinds of extracts of DSS were prepared by water reflux and ultrasonic wave-assisted extraction by 50% ethanol respectively, and their analgesic activities were evaluated in acetic acid-induced wringing and oxytocin-induced menorrhagia in mice. Meanwhile, chemical constituents and total sugar content of two kinds of extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) and phenol-sulfuric acid method, respectively. **Result:** Water reflux extract of DSS (2.5 g·kg⁻¹, 10 g·kg⁻¹) and ethanol extract of DSS (10 g·kg⁻¹) significantly decreased writhing times induced by acetic acid and oxytocin, while the inhibition rate of water extract was higher than that of ethanol extraction of DSS. Meanwhile, about 20 fingerprint peaks were found in ethanol extract of DSS. However, the chromatographic peak area of 4 compounds possibly come from *Paenonia lactiflora* Pall and total sugar contents in water extract of DSS were higher than that of ethanol extract. **Conclusion:** The analgesic effect of water reflux extraction of DSS was better than that of ultrasonic wave-assisted extraction by 50% ethanol, which might be partly due to the higher contents of the

[收稿日期] 20100510(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873322)

[第一作者] 曹旦华, 硕士研究生, 研究方向: 中药复方药效物质基础研究, Tel: 025-86185158, E-mail: caodanhua55@163.com

[通讯作者] * 寇俊萍, 博士, 教授, 主要研究方向: 中药复方药效物质基础与作用机理研究, Tel: 025-86185158, E-mail: junpingkou@163.com

polar compositions and polysaccharides.

[Key words] Dangui Shaoyao San; analgesic; chemical composition; HPLC; phenol-sulfuric acid assay

当归芍药散出自《金匱要略》，由当归、芍药、川芎、茯苓、白术和泽泻 6 味中药组成，具有活血化瘀，健脾利湿的功效。原方主治“妇人妊娠诸疾痛”以及“妇人杂病腹中诸疾痛”，临床广泛应用于痛经等疾病疗效确切。《金匱要略》中记载当归芍药散作为散剂以酒调服，然而在现代临床运用及药理研究中该方常以水煎剂入药^[1-3]，有学者在研究当归芍药散提取工艺时，通过溶剂对比考察也采用了水提取法^[4]，亦有学者采用水提液与醇提液合并进行药理学研究^[5]，但有关当归芍药散醇提物和水提物的活性与化学成分差异的研究则鲜见报道。因此，本研究基于原方镇痛的疗效，分别采用水回流提取与醇超声提取方式制备 2 种当归芍药散提取物，比较二者的镇痛活性和化学成分差异，为其临床合理应用和进一步探讨物质基础提供一定参考依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 当归芍药散的组成药材当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, 白芍 *Paenonia lactiflora* Pall 和川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort, 茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf, 白术 *Astractylodes macrocephala* Koid 和泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzé) 均购自南京传统中医门诊部，并经余伯阳教授鉴定；吲哚美辛购自山西云鹏制药有限公司，批号 A080703；缩宫素注射液购自上海禾丰制药有限公司，批号 081206；苯甲酸雌二醇注射液购自天津金耀氨基酸有限公司，批号 0906091；色谱纯乙腈 (ROE, USA)，其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物 雌性 ICR 小鼠，体重 20 ~ 22 g 6 ~ 7 周龄，购自扬州大学医学比较中心，许可证编号 SCXK (苏) 2007 - 0001。

1.3 仪器 Shimadzu LC-2010C 高效液相色谱仪 (包括在线脱气、四元泵、全自动进样器、柱温箱、SPD-M20A 二极管阵列检测器及 LC-Solution 色谱工作站)；Alltima C₁₈ 分析柱 (Alltech, USA)；TB-215D 型 1/10 万天平 (美国丹佛仪器有限公司)；KH-250DB 超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司)；旋转蒸发器 RE-52 (上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 当归芍药散 2 种提取物的制备

2.1.1 水提物的制备 将各味药材依次按配方 3 16 8 4 4 8 混匀，粉碎，8 倍量水浸泡 40 min 后，热回流提取 1 h，过滤，提取 2 次，合并前后滤液，浓缩，冷冻干燥，得率为 29%。

2.1.2 醇提物的制备 将各味药材按上述比例混匀，粉碎，过 60 目筛，10 倍量的 50% 乙醇浸泡 40 min 后，超声提取 30 min，过滤，提取 2 次，合并前后滤液，减压旋蒸浓缩到无醇味，冷冻干燥，得率为 19.1%，动物实验剂量均以生药量计算。

2.2 当归芍药散 2 种提取物的镇痛活性观察

2.2.1 小鼠醋酸扭体实验 雌性 ICR 实验小鼠 60 只，按体重随机分为空白组、DSS 水提物 2.5, 10 g·kg⁻¹ 组、DSS 醇提物组 2.5, 10 g·kg⁻¹ 组、吲哚美辛 19.5 mg·kg⁻¹ 组，ig 1 h 后 ip 0.6% 醋酸溶液，观察小鼠在出现第 1 次扭体反应后 15 min 内的扭体次数，并计算扭体抑制率 = (对照组扭体次数 - 给药组扭体次数) / 对照组扭体次数 × 100%。

2.2.2 缩宫素致痛经小鼠模型实验 取未孕雌性小鼠 (18 ~ 24 g) 60 只，按体重随机分组，实验前连续 4 d ip 苯甲酸雌二醇，4 d 的给药体积分别为：0.2, 0.1, 0.1, 0.2 mL/只，第 5 天 ip 缩宫素 (4 U/只)，观察小鼠在出现第一次扭体反应后 15 min 内的扭体次数，抑制率的计算同 2.2.1 项下。

2.3 当归芍药散 2 种提取物的化学成分初步分析

2.3.1 分析样品的制备 取相当于原药材当归芍药散 1.0 g 的冷冻干燥粉末，用色谱甲醇稀释至 25 mL，超声溶解 15 min，取 1 mL 过 0.45 μm 滤膜，续滤液用作 HPLC 分析；药材提取液：按处方中药材比例精密称取相当于 2.0 g 当归芍药散所含当归、芍药、白术、川芎、药材细粉，并按照醇提取、样品制备的方法制得色谱分析样品。

2.3.2 色谱条件^[6] Alltima C₁₈ 分析柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱，0 ~ 40 min: A5% ~ 30%；40 ~ 65 min: A30% ~ 55%；65 ~ 85 min: A55% ~ 100%；85 ~ 90 min: A100%；检测波长 275 nm，色谱峰光谱采集范围 190 ~ 400 nm，柱温 30 °C，流速 1.0 mL·min⁻¹，进样体积 20 μL。

2.4 当归芍药散 2 种提取物的总糖含量测定

2.4.1 葡萄糖对照品溶液制备 精密称取 105

干燥至恒重的无水葡萄糖标准品 5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得每毫升中含无水葡萄糖 0.1 mg 的溶液作为对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液制备 分别取相当于原药材 1 g

的水提物和醇提物干燥粉末, 蒸馏水稀释至 10 mL, 超声使溶解, 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 用蒸馏水稀释至 0.3 mg/mL 的溶液, 即得。

2.4.3 样品总糖含量测定 分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 并用蒸馏水补足至 1 mL, 精密加入 5% 苯酚 0.5 mL、浓硫酸 5.0 mL, 混匀, 沸水浴 5 min, 立即置于冷水冷却, 另以蒸馏水作为空白参比, 在 486 nm 处测吸光度, 以浓度 (C) 为横坐标, 以吸光度 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $A = 10.67C + 0.023$ ($r = 0.9995$)。分别精密吸取水提物与醇提物供试品溶液各 3 份, 每份 1 mL, 如上操作进行吸光度测定并计算其含量。

2.5 统计学分析 动物实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及组间 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 当归芍药散水提物和醇提物的镇痛作用

由表 1~2 可见, 当归芍药散水提物 2.5, 10 g·kg⁻¹ 组可明显减少醋酸和缩宫素所致小鼠扭体次数, 经统计, 与空白对照组比较具有显著或非常显著差异, 当归芍药散醇提物 10 g·kg⁻¹ 也具有显著抑制活性, 2.5 g·kg⁻¹ 呈现一定抑制趋势, 但抑制率均低于等剂量的水提物。

3.2 当归芍药散水提物和醇提物的 HPLC 分析

当归芍药散醇提物的 HPLC-DAD 图谱上色谱峰最丰富, 显示 20 个主要指纹峰 (图 1b), 经过与各单味药材的成分的对比分析, 发现这 20 个指纹峰分别归属白芍、当归、川芎和白术 (表 3); 当归芍药散水提物 HPLC-DAD 图谱上前 40 min 的成分峰, 基本与醇提物一致, 但 1, 2, 10 号来自于芍药的色谱峰的峰面积明显高于相应的醇提物, 未显示 65 min 以后的 14~20 号分别归属于当归、川芎、白术的色谱峰。

3.3 当归芍药散水提物和醇提物的总糖含量测定

结果由表 3 可见, 当归芍药散水提物的总糖含量为 17.56% ± 0.15%, 醇提物的总糖含量为 10.94%

± 0.34%, 水提物总糖的含量高于醇提物。

表 1 2 种 DSS 提取物对醋酸所致腹痛小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	扭体数 / 次	抑制率 / %
空白对照	-	20.9 ± 13.3	-
DSS(水提)	2.5	9.7 ± 8.7 ¹⁾	53.59
DSS(水提)	10.0	9.3 ± 6.6 ¹⁾	55.50
DSS(醇提)	2.5	17.2 ± 9.5	17.70
DSS(醇提)	10.0	11.9 ± 10.0	43.06
吲哚美辛	0.02	1.8 ± 3.2 ²⁾	91.39

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)

表 2 2 种 DSS 提取物对缩宫素所致痛经小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	扭体数 / 次	抑制率 / %
空白对照	-	11.7 ± 5.3	-
DSS(水提)	2.5	5.7 ± 4.5 ¹⁾	51.28
DSS(水提)	10.0	3.6 ± 4.0 ²⁾	69.23
DSS(醇提)	2.5	8.1 ± 6.5	30.77
DSS(醇提)	10.0	6.6 ± 3.5 ¹⁾	43.59
吲哚美辛	0.02	3.9 ± 4.3 ²⁾	66.67

表 3 当归芍药散水提物和醇提物的 HPLC-DAD 化合物归属

峰号	保留时间 / min	化合物归属
1	7.5	芍药
2	9.1	芍药
3	13.9	芍药
4	17.7	芍药
5	19.3	川芎
6	20.2	当归与川芎
7	22.5	芍药
8	24.2	芍药
9	30.3	当归与川芎
10	32.0	芍药
11	34.1	芍药
12	36.9	当归与川芎
13	38.7	当归与川芎
14	62.8	当归与川芎
15	66.0	当归与川芎
16	70.2	川芎
17	72.1	川芎
18	72.6	当归与川芎
19	74.0	白术
20	77.9	白术

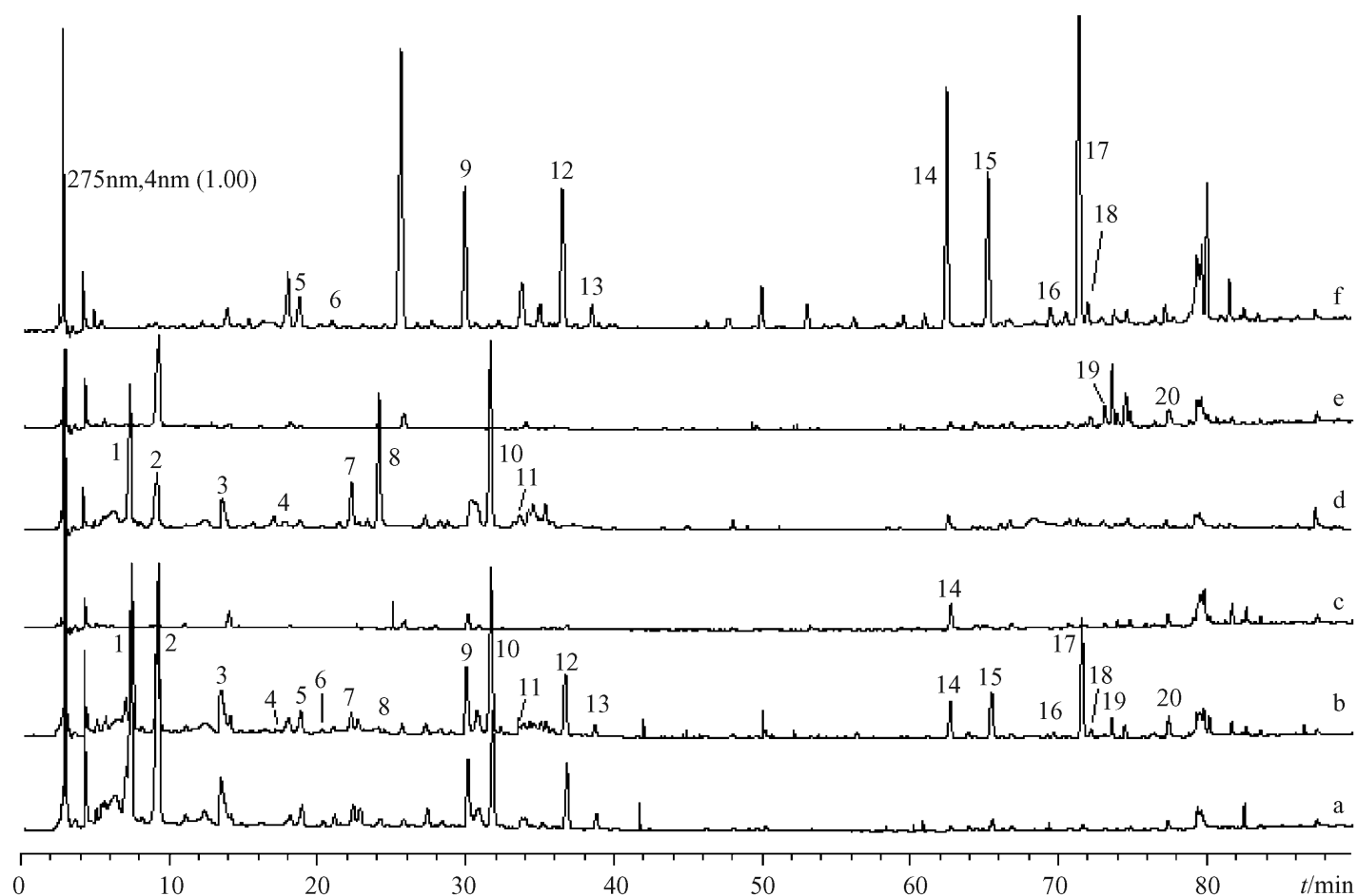


图 1 当归芍药散水提物和醇提物的 HPLC-DAD

a. 当归芍药散水提物; b. 当归芍药 50% 醇超声提取物; c. 当归; d. 芍药; e. 白术; f. 川芎

表 4 当归芍药散水提物和醇提物的总糖含量测定

No.	取样量	样品中总糖含量	平均含量	RSD
	/mg	/%	/%	
水提物 1	0.30	17.54		
水提物 2	0.30	17.55	17.56	0.15
水提物 3	0.30	17.59		
醇提物 1	0.30	10.91		
醇提物 2	0.30	10.99	10.94	0.34
醇提物 3	0.30	10.93		

4 讨论

当归芍药散为经典名方, 被广泛运用于与妇科相关的多种疾病, 偏重于止痛, 但究竟是其中何种成分以何种途径发挥镇痛活性尚不十分清楚, 国内学者近年来已开展相关研究, 如王言才等发现当归芍药散醇提物具有比水提物更强的抑制离体子宫收缩的效应, 因此提出该方抑制子宫收缩的效应物质为醇溶性成分的假设^[7]; 刘国云等以醋酸致小鼠扭体反应、缩宫素致痛经模型和离体子宫平滑肌收缩模型, 从当归芍药散 95% 醇和水合并提取液中筛选出治疗痛经的活性部位 DSS-A-N-30, 其中主要含有芍药中的单萜苷类化合物等, 提示当归芍药散中芍药所含成分可能为镇痛活性的主要物质基础^[8-9]。

本文比较考察了 2 种方法制备的当归芍药散提取物的镇痛活性和化学成分差异, 研究结果显示, 当

归芍药散水回流提取物对 2 种小鼠模型的镇痛活性均高于等剂量的醇超声提取物, 证实了临床多以水煎方式应用该方的合理性。而二者化学成分初步分析表明, 水提物中的大极性成分峰面积高于醇提物, 参考前期研究^[6], 并与单味药材对比, 提示 1, 2, 10 号峰可能为芍药中的没食子酸、5-甲基糠醛和 5-没食子酰葡萄糖, 上述成分是否也具有镇痛活性有待进一步考证。同时, 醇提物 65 min 以后的色谱峰比水提物多且丰度大, 参考实验室前期研究的指纹图谱 DAD 吸收值, 提示该类成分多为苯酞与倍半萜内酯类化合物, 且基本来自于当归与川芎。当归和川芎的成分相似, 但因方中当归用量较川芎少, 因此在图谱峰中的贡献远比川芎低; 另外, 课题组前期预实验中发现, 单味茯苓和泽泻药材在该色谱条件下未见明显吸收峰, 可能由于紫外检测器的局限性, 糖类、茯苓和泽泻中含有的三萜类成分未能在该色谱条件下的指纹图谱中体现, 因此, 本文主要归属并对比了当归芍药 2 种提取物中来自当归、芍药、川芎及白术中的 20 个成分。

鉴于近年来有关多糖类成分镇痛活性的报道^[10], 我们继而测定了 2 种提取物的总糖含量, 结果发现水回流提取物的多糖含量接近醇提取的 2 倍, 提示可能与其镇痛活性强有关。

综上所述, 当归芍药散水提物比醇提物的有效

镇痛剂量低,为临床作为汤剂入药多以水提方式提供一定依据;方中的大极性物质,如芍药所含成分和多糖类成分可能为发挥镇痛活性的主要物质基础,有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] 陈晓军,祝敬燕.经方用酒探幽[J].时珍国医国药,2001,12(11):981.

[2] 孙晓,寇俊萍,李丁鹃,等.当归芍药散对卵巢摘除小鼠行为学变化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):29.

[3] 马世平,刘红,曾宇,等.不同归芍比的当归芍药散主要成分变化与相关药效的比较研究[J].江苏药学与临床研究,2006,14(3):141.

[4] 汤明辉,寇俊萍,朱丹妮,等.正交设计-重复试验法优选当归芍药散的提取工艺[J].中国中药杂志,2000,25(11):668.

[5] 华永庆,谢海棠,段金廛,等.当归芍药散治疗痛经的方药量效关系研究[J].定量药理学,2009,14(5):

558.

[6] Chen L L, Qi J, Chang Y X, et al. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50(2) :127.

[7] 王言才,段金廛,华永庆,等.当归芍药散抑制小鼠离体子宫收缩效应与效应物质分析评价[J].中国天然药物,2008,6(3):196.

[8] 刘国云,迟晓丽,马渊,等.当归芍药散活性部位 DSS-A-N-30 对大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2007,21(5):427.

[9] 胡绪玮,乔善义,范海涛,等.当归芍药散活性部位 DSS-A-N-30 中 1 种新单萜苷 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12) : 1413.

[10] 乐江,彭仁琇,孔锐,等.当归粗多糖镇痛作用的实验研究 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(10) : 746.

[责任编辑 聂淑琴]

关于本刊变更为半月刊的重要通知

尊敬的作者、读者:

由于本刊近来投稿量不断增加,杂志影响力不断扩大,每月 1 刊的出版周期已无法满足广大科研工作者的投稿及发表需求。经过编辑部研究,主管单位国家中医药管理局及北京市新闻出版管理局的批准,本刊自 2010 年 7 月变更为半月刊。半月刊后本刊发文量将大大提高,发表周期将进一步缩短,为作者和读者的服务水平也将不断提升。欢迎广大作者、读者、审稿专家及编委会专家继续关注、支持本刊发展!

由于刊期变更,作者已被录用的待发表稿件的原定刊发“月份”维持不变,但是因每月分为 2 期,需要明确具体期号的作者请及时与各栏目责任编辑联系,联系方式见本刊网站“联系我们”,由此给您带来的不便请您谅解!

栏目/岗位	责任编辑	电话(010)	手机	邮箱	QQ
综述,专论,学术探讨;资源鉴定、代谢、药事管理	蓝海	84076882	13683362408	178562955@ qq. com	178562955
制剂	仝燕	84027721	13693506677	791489912@ qq. com	791489912
质量控制、化学成分	顾雪竹	84076882	13601383260	guxuezhu@ gmail. com	14182115
药理、毒理	聂淑琴		13520980068	nieshuqin@ sina. com	
临床	小安		13811016479	zou-ak48@ 163. com	65029229
费用查询,发票,稿费,杂志邮寄等	何希荣	84076882		syfjx_2010@ 188. com	840155934