

通塞脉微丸血清药物化学的初步研究 (I)

陶金华¹, 狄留庆², 濮雪莲¹, 赵晓莉², 金慧臻²

1. 南通大学医学院, 江苏 南通 226001

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 研究通塞脉微丸复方大鼠给药后血清中移行成分的归属。**方法** 建立通塞脉微丸及大鼠 ig 通塞脉微丸后血清的 HPLC 色谱分析方法; 比较全方制剂、金银花、当归、甘草、玄参、黄芪和石斛各单方制剂分别给药后所得的血清样品, 分析口服通塞脉微丸后大鼠血中移行成分、来源生药及其代谢产物。**结果** 大鼠 ig 通塞脉微丸后从血清中发现了 15 种入血成分, 其中 10 种成分为复方所含成分的原型, 其中绿原酸、阿魏酸、甘草素和肉桂酸为已知确定结构的化合物, 另外 5 种成分分别来源于金银花、当归、甘草、玄参和石斛, 其具体结构还有待进一步检测分析; 1 种为复方给药后新产生的代谢物质; 3 种为给药后产生的未知化合物。**结论** 血中移行成分及其代谢产物是通塞脉微丸的体内直接作用物质, 对其深入研究将有助于阐明复方效应的物质基础。

关键词: 通塞脉微丸; 入血成分; 代谢产物; 血清药物化学; 移行成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1267-04

Serum pharmacochemistry of Tongsaimai Tiny Pill (I)

TAO Jin-hua¹, DI Liu-qing², PU Xue-lian¹, ZHAO Xiao-li², JIN Hui-zhen²

1. Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China

2. Pharmaceutical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To study the adscription of transitional elements in serum of rats after ig administration of Tongsaimai Tiny Pill.

Methods This study was performed by using HPLC to identify the chemical constituents of rat serum samples obtained after ig administration of the whole and individual herbs of Tongsaimai Tiny Pill. The serum samples of full preparation and the single preparations of *Lonicerae Japonicae Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Scrophulariae Radix*, and *Dendrobii Caulis* were distinguished, and the migration components of blood, source of crude drug, and its metabolites were analyzed.

Results The chromatographic analysis of the rat serum obtained after ig administration of Tongsaimai Tiny Pill showed 15 compounds, 10 of which were the original constituents contained in Tongsaimai Tiny Pill, and the structures of chlorogenic acid, ferulic acid, liquiritigenin, and cinnamic acid were known. Other six components were derived from *Lonicerae Japonicae Flos*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Scrophulariae Radix*, and *Dendrobii Caulis*, and their specific structures have yet to be further analyzed; one of which was metabolite, and three were unknown compounds after ig administration of compound preparation. **Conclusion** The compounds absorbed into blood and their metabolites are the possible effective constituents of Tongsaimai Tiny Pill because they interact directly within the body. The results obtained in this investigation may provide useful information in the further understanding of the action mechanism of the individual and whole herbs in Tongsaimai Tiny Pill.

Key words: Tongsaimai Tiny Pill; serum constituent; metabolites; serum pharmacochemistry; transitional elements

中药成分复杂, 经口服给药后在体内经过一系列生物转化, 其原有成分有的转化为活性成分, 有的代谢失活, 有的借助机体的神经体液调节系统发挥其疗效, 所以中药口服后化学成分在体内的变化

过程是中药有效物质基础的重要组成部分^[1]。基于中药成分进入血液才有可能成为有效成分, 给药后的血清才是真正起作用的“制剂”, 日本学者提出了“血清药物化学”的概念, 主要研究血清中的化

收稿日期: 2010-11-07

基金项目: 国家科技部“863”计划(2003AA2Z3247); 国家自然科学基金资助项目(30873401); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2005150); 江苏省“青蓝工程”科技创新团队支持计划

作者简介: 陶金华, 女, 硕士, 主要从事药物分析及药物生物技术研究。E-mail: taojinhua2000@163.com

学物质, 观测血清中外源性活性物质及其作用和代谢规律^[2]。

通塞脉微丸由金银花、当归、黄芪、玄参、甘草等 6 味中药组成, 具有培补气血、养阴清热、活血化痰、通调脉络等功能。近年来研究表明, 通塞脉微丸具有治疗缺血性脑中风的功效。目前, 对通塞脉微丸的成分及药效研究较多, 但大多数只限于成分的定性、定量分析^[3-4], 对通塞脉微丸体内的血清药物化学报道较少。本研究通过对通塞脉微丸入血成分的研究分析, 初步确定其入血成分、代谢产物的归属, 对大鼠 ig 通塞脉微丸的血清药物化学进行了初步探索, 为进一步研究通塞脉微丸的效应物质奠定了基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器; BP211D 型电子分析天平 (德国 Satorius 公司); 移液枪 (美国 LabSystem 公司); KQ—250 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); TGL—18C-C 型高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); WH—90A 涡旋混合器 (上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品和试剂

绿原酸 (批号 110753-200413)、肉桂酸 (批号 0786-9802) 和阿魏酸 (批号 0773-9910) 对照品购自中国药品生物制品检定所; 甘草素对照品 (质量分数 >99.5%) 自制。通塞脉微丸由南通大学医学院自制。乙腈为色谱纯; 乙醇、磷酸、甲醇均为分析纯。

1.3 实验动物

健康清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (250±20) g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2007-0005。

2 方法

2.1 通脉微塞丸供试品溶液的制备

取通塞脉微丸, 研细, 混匀, 取 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液 40 mL, 超声 25 min (工作频率 40 kHz, 功率 500 W), 冷却至室温, 摇匀并定容至 50 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、肉桂酸、甘草素、阿魏酸对照品各适量, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释

至刻度, 摇匀, 即得含绿原酸 212.3 μg/mL、阿魏酸 160.2 μg/mL、肉桂酸 71.2 μg/mL、甘草素 61.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 空白血清和含药血清供试品溶液的制备

2.3.1 含药血清 取 SD 大鼠, 雌雄不限, 禁食 12 h, 全程不饮水, 按照 60 g/kg ig 给药 3 d, 每天 3 次。于末次给药 (给药前禁食 12 h) 后 1 h, 眼眶静脉采血, 静置 1 h, 6 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血清, 置具塞离心管中, 密塞, 置 -20 °C 冷冻贮藏。

2.3.2 空白血清 以同体积蒸馏水代替药物, 同法制得空白血清样品溶液。

2.4 血清样品预处理方法考察

制备一定质量浓度的通塞脉微丸水溶液, 加入到等体积大鼠空白血清中涡旋混合 1 min, 制成模拟含药血清供试品溶液, 备用。

2.4.1 甲醇沉淀法 精密吸取上述模拟含药血清样品 300 μL 于 5 mL 具塞离心管中, 加入 0.5 mol/L 盐酸溶液 100 μL 涡旋混合 30 s, 混合液分别用 2 倍体积甲醇涡旋萃取 3 次, 合并萃取液, 于 40 °C 水浴中通氮气流挥干, 残渣用 150 μL 乙腈-0.5% 甲酸 (50:50) 溶解, 再以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液供 HPLC 分析。

2.4.2 醋酸乙酯沉淀法 精密吸取上述模拟含药血清样品 300 μL 于 5 mL 具塞离心管中, 加入 0.5 mol/L 盐酸溶液 100 μL 涡旋混合 30 s, 混合液分别用 2 倍体积醋酸乙酯涡旋萃取 3 次, 合并萃取液, 于 40 °C 水浴中通氮气流挥干, 残渣用 150 μL 乙腈-0.5% 甲酸 (50:50) 溶解, 再以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液供 HPLC 分析。

2.4.3 沸水浴法 精密吸取上述模拟含药血清样品 300 μL, 置 5 mL 具塞离心管中, 加入重蒸水 100 μL, 涡旋混合 30 s, 密塞, 沸水浴 3 min, 用实心毛细管捣碎, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液供 HPLC 分析。

根据图 1 分析比较可以看出, 模拟含药血清由甲醇沉淀对原有成分保留最多, 醋酸乙酯沉淀其次, 沸水浴最差。因此, 本实验确定采用甲醇沉淀法作为血清样品的处理方法。

2.5 色谱条件与洗脱程序

色谱柱: Packing Material Hedera ODS2 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长 276 nm, 进样量 10 μL, 体积流量 1.0 mL/min, 流动相乙腈 (A)-1.0% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序 0~17 min, 10% A;

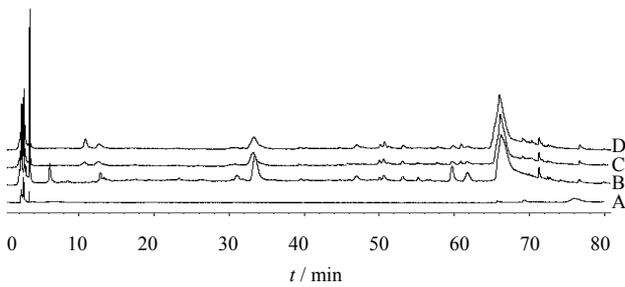


图 1 空白 (A)、甲醇沉淀 (B)、沸水浴 (C)、醋酸乙酯沉淀 (D) 血清的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank (A), methanol precipitation (B), boiling water bath (C), and ethyl acetate sedimentation (D) serum

18~59 min, 10%~15% A; 60~69 min, 15%~30% A; 70~79 min, 30%~60% A; 80 min, 10% A.

2.6 通塞脉微丸入血成分的确证

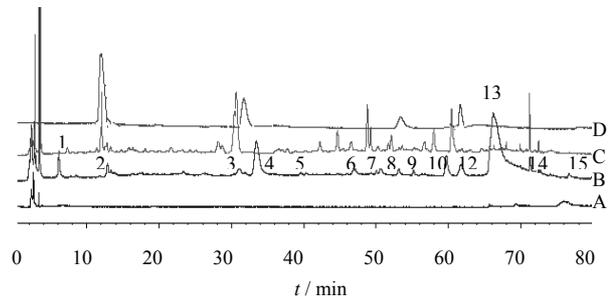
精密吸取含药血清供试品溶液 300 μ L 于 5 mL 具塞离心管中, 加入 0.5 mol/L 盐酸溶液 100 μ L 涡旋混合 30 s, 混合液用 2 倍体积甲醇萃取 3 次, 每次涡旋混合 2 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 分取上层甲醇至 7 mL 离心管中, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中通氮气挥发, 残渣用 100 μ L 乙腈-0.5%甲酸 (50:50) 溶解, 再以 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液供 HPLC 分析。

3 结果与讨论

大鼠 ig 给予通塞脉微丸后血中出现了 15 种移行成分 (图 2), 与体外样品比较, 其中 10 种为体外成分直接吸收入血, 即 1、2、3、8、9、10、11、12、14 和 15 号峰所对应的为通塞脉微丸中所含的原型成分, 由混合对照品溶液色谱图可知, 2、3、9 和 12 号峰所对应的成分分别为绿原酸、阿魏酸、甘草素和肉桂酸。

为了弄清含药血清 HPLC-UV 图谱中各成分的来源, 按“2.3.1”方法 ig 给予各单味药材溶液, 各单味药材的含药血清处理方法同全方制剂, HPLC 分析图见图 3。

通过混合对照品溶液、通塞脉微丸供试品溶液、含药血清、空白血清的 HPLC 色谱图对比研究发现, 大鼠 ig 给予通塞脉微丸以后有 15 种入血成分, 经过与组方的各单味药材的含药血清对比, 追溯了血中移行的 15 种成分来源的药材, 其中有 4 种成分来源于金银花, 3 种成分来源于当归, 4 种成分来源于甘草, 1 种成分来源于玄参, 1 种成分来源于石斛, 而 6 号峰在金银花和当归中均有检测

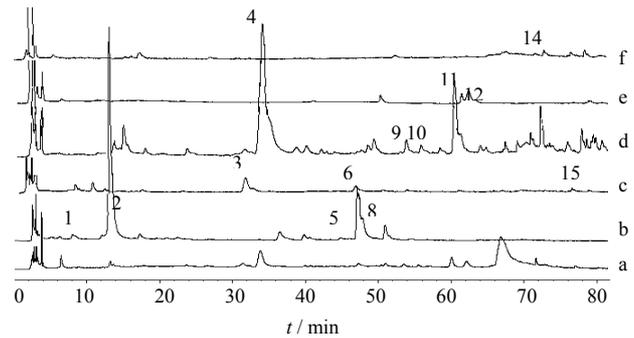


2-绿原酸 3-阿魏酸 9-甘草素 12-肉桂酸

2-chlorogenic acid 3-ferulic acid 9-liquiritigenin 12-cinnamic acid

图 2 空白血清 (A)、含药血清 (B)、通塞脉微丸 (C)、混合对照品 (D) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank serum (A), rats serum after administration (B), Tongsaimai Tiny Pills (C), and mixed reference substances (D)



a-全方制剂含药血清 b-金银花单味药材含药血清

c-当归单味药材含药血清 d-甘草单味药材含药血清

e-玄参单味药材含药血清 f-石斛单味药材含药血清

a-serum of full preparation b-serum of *Lonicerae Japonicae Flos*

c-serum of *Angelicae Sinensis Radix* d-serum of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

e-serum of *Scrophulariae Radix* f-serum of *Dendrobii Caulis*

图 3 全方制剂和各单味药制剂含药血清的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of full preparation and serum with each single medicinal material

到, 尚有 3 种成分来源未知, 见表 1。

采用相对保留时间和在线 UV 光谱图相结合, 对 15 种血中移行成分分析发现 4 号峰在甘草单味药材含药血清和通塞脉微丸含药血清中均有检测到, 但在通塞脉微丸体外供试品中并没有检测到, 初步确认 4 号峰为代谢产物吸收入血, 并且来源于甘草。另外, 6 号峰在当归和金银花中均有检测到, 其结构还有待进一步确认。

含药血清中尚有 3 种入血成分归属不明确, 分别为 5、7 和 13 号峰所对应成分, 可能为药物相互作用形成的代谢产物, 也可能为通塞脉微丸复方给药后大鼠机体产生的生理性应激物质。

表 1 血中移行成分的特色谱峰的药材归属与推断
Table 1 Medicinal material assignment and inference of each peak in blood transitional elements

峰号	归属药材	化合物推断
1	金银花	未知
2	金银花	绿原酸
3	当归	阿魏酸
4	甘草	甘草黄酮类化合物
5	未知	未知
6	当归/金银花	未知
7	未知	未知
8	金银花	未知
9	甘草	甘草素
10	甘草	甘草黄酮类化合物
11	甘草	甘草黄酮类化合物
12	玄参	肉桂酸
13	未知	未知
14	石斛	未知
15	当归	未知

本实验通过对体外模拟含药血清样品 3 种不同预处理方法进行考察, 分别为甲醇沉淀法、醋酸乙酯沉淀法和沸水浴法, 结果以甲醇沉淀处理血清样品对色谱峰保留最多, 且对内源性杂质去除的较好, 故本实验采用甲醇沉淀法处理血清样品。

本实验曾对单次与多次两种给药方案进行对比研究, 考虑到某些成分的消除速率较快, 单次给药不一定能最大限度地检测到更多的成分, 而发现连续给药 3 d 后, 含药血清图谱出峰数目多而且稳定, 这与通常中药服用 3~5 d 达到稳态血药浓度有关, 故本研究确定动物给药方案为连续给药 3 d,

每天 3 次。

药物血清成分分析存在着含量低、组分多、分离难的特点, 特别是生物体存在较大的个体差异, 入血成分在体内定量测定具有较大的偏差。笔者仅报道血清中有紫外吸收成分的情况, 某些微量的活性成分需要在合适的分离分析条件下才能检测到。体外某些成分不一定能在体内出现, 而灌胃给药后的血清中产生原药液中未出现的新物质, 且量还较大, 此为处方配伍后产生的代谢产物, 但光凭 HPLC 无法定性, 该种代谢产物也许正是复方产生药效的成分。目前正采用多种分析手段, 希望结合 LC-PDA-MS 进一步探索通塞脉微丸复方的物质基础。本研究结果也说明确定中药的药效物质基础的关键, 不仅是在体外研究药物的成分, 其根本在于要明确中药复方以何种形式进入体内, 进入体内后如何变化, 药物配伍对血中成分的影响, 只有这样才能把握中药复方的内在实质, 实现经方的科学化、现代化。

参考文献

- [1] 丁安伟, 窦志华, 罗琳, 等. 复方五仁醇胶囊中血清药化学研究 (II) [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1285-1288.
- [2] 魏元峰, 张宁, 冯怡, 等. 中药血清药物化学在中药药效物质基础研究中的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1489-1492.
- [3] 池玉梅, 崔小兵, 陈维, 等. HPLC 双波长梯度洗脱同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷含量 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(17): 1348-1350.
- [4] 王爱云, 陆茵, 严令耕, 等. 通塞脉微丸改善缺血性中风大鼠血液流变状态的实验研究 [J]. 中国血液流变学杂志, 2007, 17(1): 52-54.