

都梁丸的血清药物化学研究

朱春璐, 王静, 乔宇航, 谢鑫荣, 袁子民^{*}(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 目的 对都梁丸的入血成分进行分析研究, 探讨都梁丸的药效物质基础。方法 采用偏头痛模型小鼠, 灌胃给药制得含药血清和空白血清, 通过比较都梁丸、酒炖白芷和川芎体外供试品及含药血清样品和空白血清样品的 HPLC 色谱图, 根据保留时间及对照品, 明确都梁丸给药后血中移行成分。结果 都梁丸给药后, 在血清中共有 22 个移行成分, 其中 18 个成分为原形入血成分, 4 个成分为原型成分的代谢产物, 经对照品确认了 12 种原型成分。结论 这 22 个血中移行成分可能是都梁丸在体内直接作用的药效物质, 为深入研究其作用机制、质量控制标准及剂型改革提供了科学依据。

关键词: 都梁丸; 血清药物化学; 高效液相色谱法; 入血成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)04-0443-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.011

引用本文: 朱春璐, 王静, 乔宇航, 等. 都梁丸的血清药物化学研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 443-446.

Study on Serum Pharmacochemistry of Duliang Wan

ZHU Chunlu, WANG Jing, QIAO Yuhang, XIE Xinrong, YUAN Zimin^{*}(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the blood compounds in Duliang Wan and to further explore its pharmacodynamic basis. **METHODS** The drug-containing serum and blank serum were prepared by orally administration of migraine mice. Rapid identification of compounds absorbed into blood was carried out by HPLC, according to retention time and reference substances comparison, then preliminary determination of constituents absorbed into blood of mice after oral administration of Duliang Wan, Stewed *Angelica dahurica* and *Ligusticum chuanxiong* was investigated. **RESULTS** After the administration of Duliang Wan, totally 22 compounds absorbed into blood were detected in serum, 18 of them were prototype compounds and 4 components were metabolites of the prototype components. And 12 prototype components were confirmed by reference substance. **CONCLUSION** These 22 compounds absorbed into blood may be substances that act directly *in vivo* of Duliang Wan, and it is helpful to clarify mechanism of this herb, quality control standard and dosage form reform.

KEYWORDS: Duliang Wan; serum pharmacochemistry; HPLC; absorbed compounds in the blood

都梁丸收载于中国药典 2015 年版一部, 由白芷(酒炖)和川芎 2 味药组成, 具有祛风散寒, 活血通络之功效, 临床用于风寒淤血阻滞脉络所致的头痛, 为治疗偏头痛的常用中成药^[1], 但其药效物质基础与作用机制尚未完全阐明。由于中药具有多成分、多靶点、多通路的特点, 所以中药药效物质基础研究是中药现代化的关键^[2]。中药血清药物化学是以传统药物化学为基础, 分析鉴定口服中药后血清中移行成分, 确定中药药效物质基础的应用学科^[3]。本研究以中药血清药物化学为研究思路^[4-6], 通过偏头痛模型小鼠给药, 分析含药血清、空白血清、混合对照品及体外供试品的高效液相色谱图, 确定都梁丸入血成分及其来源, 从而为深入研究都梁丸的效应物质、质量标志物及

剂型改革研究提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent); SG3300H 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司); MTN-2800 氮吹浓缩仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); HC-2062 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

硝酸甘油注射液(北京益民药业有限公司, 批号: 20161118; 规格: 1 mL : 1 mg); 黄酒(镇江恒顺酒业有限公司, 批号: 20171102); 白芷、川芎均购自安国市光明饮片加工厂, 经辽宁中医药大

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划项目(2019-ZD-0440)

作者简介: 朱春璐, 女, 硕士生 Tel: (0411)85890159 E-mail: 1003481998@qq.com *通信作者: 袁子民, 男, 博士, 教授 Tel: (0411)85890145 E-mail: yuanzimin@163.com

学李峰教授鉴定为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica*(Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.的干燥根、川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根;酒炖白芷实验室自制^[7](批号:20180407);都梁丸按中国药典 2015 年版一部标准项下制法自制(批号:20180412,质量:每丸 9 g±5%);花椒毒酚(批号:K21M5C1;纯度≥98%)、水合氧化前胡素(批号:R25A6F2764;纯度≥98%)、白当归素(批号:P01028SA13;纯度≥98%)、佛手柑内酯(批号:RF0224FA14;纯度≥98%)、白当归脑(批号:P0103SA13;纯度≥98%)、氧化前胡素(批号:Y26A6S2757;纯度≥98%)和异欧前胡素(批号:ZM0531BB13;纯度≥98%)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司;欧前胡素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110826-200307;纯度≥98%);阿魏酸(批号:17092501;纯度≥98%)、洋川芎内酯I(批号:17121104;纯度≥98%)、洋川芎内酯 A(批号:17051901;纯度≥98%)、藁本内酯(批号:18010201;纯度≥98%)均购自成都普菲德生物技术有限公司。乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯;水为娃哈哈纯净水。

1.3 动物

SPF 级昆明小鼠,♀♂各半,体质量(20±2)g,8 周龄,由辽宁长生生物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001;动物批号:20180510。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;检测波长:300 nm。流动相:A 为乙腈,B 为 0.1%磷酸溶液;梯度程序:0~50 min,5%→65%A,50~70 min,65%→95%A;流速:1 mL·min⁻¹。供试品溶液进样量为 20 μL,混合对照品溶液进样量为 10 μL。

2.2 体外供试品溶液的制备

分别取酒炖白芷、川芎(过 80 目筛)各约 0.2 g,取都梁丸^[8],剪碎,混匀,取约 3 g,精密称定,精密加入等量的硅藻土,研匀,取约 2 g,精密称定,分别置 25 mL 量瓶中,加 70%甲醇至刻度,密塞,称定质量,超声处理 30 min(功率 180 W,频率 50 kHz),放冷,再称定质量,用 70%甲醇补至原质量,摇匀,滤过,分别取续滤液作为体外供试品溶液。

2.3 给药样品的制备

将都梁丸、酒炖白芷细粉、川芎细粉加入到 0.4%CMC-Na 溶液中,超声配制成混悬液,即得相当于含生药浓度为 0.312 5 g·mL⁻¹的都梁丸给药溶液、0.25 g·mL⁻¹的酒炖白芷给药溶液、0.1 g·mL⁻¹的川芎给药溶液。

2.4 混合对照品溶液的制备

取花椒毒酚、水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、白当归脑、氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、阿魏酸、洋川芎内酯I、洋川芎内酯 A、藁本内酯对照品适量,精密称定,分别加 70%甲醇至刻度,摇匀,得到各对照品储备液;精密量取各对照品储备液适量,置于 2 mL 离心管中,加 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,制成浓度分别为 8.75, 3.4, 6, 6.25, 8.25, 3.25, 8, 6.25, 5.8, 20.9, 84.4, 34.6 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.5 空白血清与含药血清的制备

取 SPF 级昆明小鼠 20 只,每组 5 只,分为 4 组,即空白组、都梁丸组、酒炖白芷组、川芎组,分别禁食 12 h,都梁丸组以 0.04 mL·g⁻¹灌胃都梁丸粉末混悬液,酒炖白芷组以 0.04 mL·g⁻¹灌胃酒炖白芷粉末混悬液,川芎组以 0.025 mL·g⁻¹灌胃川芎粉末混悬液,连续给药 3 d,每天 1 次,空白组按 0.04 mL·g⁻¹体质量灌胃 0.4%CMC-Na 溶液。于末次给药 1 h 后,空白组皮下注射无水乙醇(2.0 mL·kg⁻¹),其余各组均皮下注射硝酸甘油注射液(0.01 mL·g⁻¹),复制小鼠偏头痛模型,造模后出现双耳发红、爬笼次数增多、前肢频繁搔头、烦躁不安等行为症状,表明模型制作成功。各组分别于灌胃后 3 h 摘眼球取血,每只 0.5 mL,5 只合并摇匀,以消除个体差异,室温放置 1 h,离心 5 min(10 000 r·min⁻¹),分离血清,即为含药血清,-80 ℃冷藏备用。同法制备空白血清。

2.6 血清样品处理

分别取各组含药血清、空白血清 0.25 mL,置离心管中,加入甲醇 0.75 mL,涡旋 3 min,混匀,离心 5 min(13 000 r·min⁻¹),取上清液,于 36 ℃下氮气流吹干,残渣加 70%甲醇 100 μL 涡旋 3 min,超声 5 min,离心 5 min(13 000 r·min⁻¹),取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即为各组含药血清、空白血清供试品溶液。

2.7 方法学考察

2.7.1 仪器精密度试验 取同一份都梁丸含药血

清供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录各共有峰保留时间和面积,计算相对保留时间和峰面积的RSD,结果相对保留时间均<0.8%,相对峰面积均<2.5%,表明仪器精密度良好。

2.7.2 稳定性试验 取同一份都梁丸含药血清供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别于0,2,4,6,8,12 h进样分析,记录各共有峰保留时间和面积,计算相对保留时间和峰面积的RSD,结果相对保留时间均<0.9%,相对峰面积均<2.8%,表明含药血清供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.7.3 重复性试验 取同一批次的都梁丸血清样品,按“2.5”项下方法平行制备含药血清6份,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录各共有峰保留时间和面积,计算相对保留时间和峰面积的RSD,结果相对保留时间均<0.9%,相对峰面积均<3.1%,表明该方法重复性良好。

2.8 样品测定及分析

取体外供试品溶液以及含药血清样品,按“2.1”项下色谱条件进行分析,通过分析含药血清、空白血清、混合对照品及体外供试品的高效液相色谱图,确定各入血成分的生药来源,并以对照品色谱峰指认各指纹图谱中的色谱峰成分。

2.9 都梁丸血中移行成分分析

都梁丸含药血清中共含有22种血中移行成分,其4,5,7,9,10,11,12,13,19,21,22,23,24,25,26,27,28,29号峰为都梁丸中的原形成分入血;14,17,18,20号峰是体内代谢成分和应激产物;1,2,3,6,8,15,16号峰未在都梁丸含药血清中检测出。通过比对酒炖白芷给药后血清和川芎给药后血清的保留时间及各峰的紫外吸收,推测14号峰为川芎体内代谢产物,17,18,20号峰为酒炖白芷体内代谢产物,结果见图1,表1。

3 讨论

实验中对小鼠灌胃后眼眶采血时间进行了考察,分别于灌胃后0,2,3,4 h进行眼眶取血。结果灌胃后3 h的血清样品中,都梁丸血中移行成分较多,峰面积较大,因此,选定3 h为最佳采血时间。并分别使用甲醇和70%甲醇对血清样品的复溶溶剂进行考察,结果使用70%甲醇复溶血清样品的色谱峰较多,适用于制备含药血清供试品溶液。

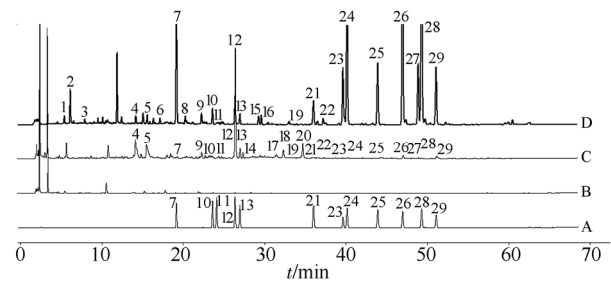


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-空白血清; C-都梁丸含药血清; D-都梁丸体外供试品; 7-阿魏酸; 10-洋川芎内酯I; 11-花椒毒酚; 12-水合氧化前胡素; 13-白当归素; 21-佛手柑内酯; 23-白当归脑; 24-氧化前胡素; 25-洋川芎内酯A; 26-欧前胡素; 28-藁本内酯; 29-异欧前胡素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference substances; B-blank serum; C-serum after administering Duliang Wan; D-Duliang Wan testing sample *in vitro*; 7-ferulic acid; 10-senkyunolide I; 11-xantholol; 12-oxypeucedanin hydrate; 13-byakangelicin; 21-5-methoxypsoralen; 23-byakangelicol; 24-oxypeucedanin; 25-senkyunolide A; 26-imperatorin; 28-ligustilide; 29-isoimperatorin.

表1 都梁丸血中移行成分归属与判断

Tab. 1 Attribution and judgment of migrating components in blood of Duliang Wan

成分归属	峰号	保留时间/min	入血成分
白芷	4	14.854	原型
	5	16.267	原型
	11	24.992	花椒毒酚
	12	27.220	水合氧化前胡素
	13	27.822	白当归素
	17	32.339	代谢物
	18	33.222	代谢物
	19	33.935	原型
	20	35.625	代谢物
	21	36.995	佛手柑内酯
	22	38.204	原型
	23	40.661	白当归脑
	24	41.174	氧化前胡素
川芎	26	48.097	欧前胡素
	27	50.032	原型
	29	52.269	异欧前胡素
	7	19.914	阿魏酸
	9	23.038	原型
	10	24.416	洋川芎内酯I
	14	28.185	代谢物
	25	44.993	洋川芎内酯A
	28	50.457	藁本内酯

由于都梁丸中化学成分复杂,本实验对色谱条件进行了优化,通过比较不同的测定波长下含药血清样品色谱图基线波动情况,分别选取了254,300 nm吸收波长,300 nm吸收波长下的色谱图基线稳定,故选择300 nm吸收波长。流动相系统的选择,分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液系统作为流动相,结果以乙腈-0.1%磷酸溶液

系统最佳, 目标化合物分离效果最好。

本实验通过对都梁丸血清药物化学的研究, 分析入血原型成分及其代谢成分, 可以为筛选都梁丸的质量标志物提供可行的依据^[9]。实验结果表明, 共有 22 个入血成分, 其中通过对照品鉴别出 12 个原型入血成分, 其他成分尚需通过超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱等联用技术进一步鉴定。其中水合氧化前胡素、白当归素、欧前胡素、异欧前胡素为君药酒炖白芷中的香豆素类成分, 有研究认为香豆素类成分有镇痛抗炎的作用^[10], 能明显降低血中和脑中一氧化氮水平, 说明香豆素类成分对偏头痛有一定的治疗作用^[11]。洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I、藁本内酯为臣药川芎中苯酚类成分, 药理研究发现苯酚类成分有扩血管、镇痛药理作用^[12], 如洋川芎内酯 I 可以通过降低一氧化氮和降钙素基因相关肽含量, 从而发挥偏头痛作用^[13]。另外, 阿魏酸也来源于臣药川芎, 具有良好的抗氧化活性^[11]。通过分析原型成分入血吸收强弱(生物利用度)、色谱峰分离度、饮片含量、稳定性及药理作用, 入血原型成分中的水合氧化前胡素、白当归素、欧前胡素、异欧前胡素、阿魏酸、洋川芎内酯 A 可作为都梁丸的质量标志物的重要参考。

后续研究工作中将基于吸收入血成分作为目标, 将血清药物化学和网络药理学相结合, 更有利于明确吸收入血成分和靶标成分的关系, 为都梁丸抗偏头痛的药效物质基础及作用机制研究提供科学依据。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 附录 1325.
[2] ZHANG W N, LI A P, LI K, et al. Progress on

pharmacodynamic material basic of traditional Chinese medicine [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2018, 53(10): 761-764.

- [3] 杨会锦, 尹华. 中药血清药物化学研究进展[J]. 中国医院药理学杂志, 2013, 33(5): 399-402.
[4] WANG Y L, XIANG W Y, LU Y, et al. Serum pharmacology of stem bark of *Eucommia ulmoides* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(7): 1101-1105.
[5] ZHENG S, LANG Y Y, WANG G Y, et al. Preliminary study on serum pharmacology of Compound Lotus Leaf Capsules [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2017, 37(11): 1056-1059.
[6] DOU Z H, XU B, CAI X M, et al. Fingerprint of serum containing R hubarb bound anthraquinones [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2018, 53(17): 1453-1456.
[7] YUAN Z M, ZHAO Q, JIA T Z, et al. Optimization of rice wine processing technology of sliced *Radix Angelicae Dahuricae* by orthogonal test [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2016, 18(9): 1189-1191.
[8] ZHANG Y Q, WANG J, YUAN Z M, et al. Determination of ferullic acid in *Dulian* Pills by HPLC [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2016, 25(15): 15-16.
[9] ZHANG L Y, TIAN C W, LIU S X, et al. Chemical components and pharmacological effects for *Guizhi Fuling* prescription and predictive analysis on quality marker (Q-marker) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(2): 265-272.
[10] LIU X Y, LAI Y. Preparation of drug-in adhesive patch of *Angelica dahurica* Coumarins and study its *in vitro* permeability through excised anthony pig skin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(3): 330-334.
[11] NI H X, WANG C M. Preventive effects of total coumarin and essential oil of *Angelicae Dahuricae Radix* on migraine rats and their mechanisms [J]. J Jilin Univ(Med Ed)(吉林大学学报: 医学版), 2018, 44(3): 487-492.
[12] HAN Y. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Ligusticum chuanxiong* [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2017, 19(9): 1341-1349.
[13] DUAN M Y, GU C C, DONG X W, et al. Pharmacodynamic action of senkyunolide I on cortical spreading depression in migraine rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2013, 24(3): 217-221.

收稿日期: 2019-03-06

(本文责编: 沈倩)