

· 实验研究 ·

川芎伍用丹参煎剂对川芎嗪
药物动力学的影响*

第四军医大学(西安 710032)

西京医院中医科 黄 熙 夏 天 任 平 马 援

西京医院药剂科 文爱东 蒋永培 宋 岭

基础部生理教研室 臧益民 牛国保 王跃民

内容提要 三维高效液相色谱(3 D-HPLC)测定川芎煎剂及其灌胃大鼠后血清中均含有多种组分,其中一种用 HPLC 提纯后经紫外、红外光谱,质谱和核磁共振谱鉴定为川芎嗪(TMP)。用 HPLC 法测定了大鼠灌胃川芎煎剂(I组,6只,30 g/kg)和川芎丹参煎剂(II组,6只,40 g/kg,川芎:丹参=3:1)后血清 TMP 浓度,并研究了两组的药代动力学(药动学)。TMP 药动学参数中的一级吸收速度常数(K_a)、与血药一时曲线下面积(AUC)等值表明:II组明显低于I组($P < 0.05 \sim 0.01$),说明伍用丹参后引起 TMP 吸收减慢和生物利用度降低。

关键词 药代动力学 川芎 丹参 高效液相色谱

为了探索中医方剂与机体的相互作用规律我们提出了“复方药代动力学”新假说⁽¹⁾,这一概念指的是方剂中的君臣佐使可严重影响彼此的药代动力学(药动学)参数。本实验旨在验证以上学说。

川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)为川芎的主要单体之一,在体内的药动学研究已见报道⁽²⁾。由于方剂的化学成分十分复杂且含量低,生药的血药浓度测定方法十分罕见,1985年,寺泽捷年⁽³⁾用 HPLC 法测定了甘草芍药汤剂给大鼠口饲后血中甘草次酸浓度;1989年,Kano⁽⁴⁾用二极管阵列技术的 HPLC 法测定了大鼠投予甘草附子汤后血中的多种化合物,但植物药合用的药动学与中医证结合的研究工作至今未见报道(国际联机检索)。

材料和方法

一、材料

1. 动物 42只 Wistar 大鼠,体重 260 ± 50 g,均为雄性。本实验室饲养7天,由第四军医大学实验动物中心供给。

2. 试药与试剂 磷酸川芎嗪(TMPP)购自广东利民制药厂(含量:101.0%,熔点:173.4~173.9℃),内标安眠酮由北京医科大学中国药物依

赖研究所赠送。三氯甲烷、甲醇、乙醇(AR)为西安化学试剂厂产品。丹参购自西安市药材公司,川芎购自四川都江堰市医药公司石羊镇批发站[经西北大学植物解剖学研究室胡正海教授鉴定为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)的干燥根茎]。

3. 仪器 岛津 LC-6 A 高效液相色谱(HPLC)系统,SPD-6 A 紫外检测器供药动学研究时使用;3 D-HPLC: Waters 990;检测器 Waters 991,光电二极管阵列检测器;7650型红外光谱仪;岛津 GCMS-QP 1000 气质联用仪;日立 RH-90 型 NMR 仪;以上四种仪器用于川芎汤剂在体内外化学成分分析与鉴定。

二、方法

1. HPLC 法 色谱条件: Shim-Pach CLC—ODS 柱 150×4.6 mm,粒度 5μ ,用于定量分析; C_{18} 半制备柱 250×10 mm,粒度 10μ ,用于制备提纯。Resolve C_{18} 柱 150×5.0 mm,量程 0.01 AUFs,用于 3 D-HPLC。流速 1 ml/min,纸速 3 mm/min,量程 0.04 AUFs(用于定量和提纯),柱温 38°C ,检测波长 280 nm。流动相: 甲醇:水 (72:28)。质谱(MS)的电离方式: 电子轰击(EI),电离电压 70 eV,离子源温度 250°C 。

2. 样品预处理 用蔡伟等的方法⁽²⁾加以改进,5 ml 尖底标准具塞试管内加无水乙醇 100 μ l,加内

*国家青年自然科学基金资助项目(39100139)

标安眠酮 428 ng, 在氮气(N_2)流下 48°C 水浴蒸干, 置空白血清 0.2 ml 及不同浓度的 TMPP 对照品和 0.05 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液 0.2 ml, 摇匀, 加三氯甲烷 2 ml, 液体混匀器上旋涡震荡 50 s, 3000 r/min 离心 10 min, 然后将三氯甲烷用 0.45 μ 的有机系微孔膜过滤后转移至一尖底具塞离心试管中, 加入 1 mol/L 盐酸甲醇溶液 100 μ l, 混匀, 置水浴中 48°C N_2 流下吹干, 残渣用甲醇 100 μ l 重新溶解, 取 10 或 20 μ l 进行 HPLC 测定。3 D-HPLC 测定所用的血清样品所取量为 1 ml。方法同上。

3. 灌胃汤剂的配制 川芎与丹参均经粉碎过 5 目和 10 目筛, 制成 2~4 mm 煮散, 将煮散 3000 g 分 3 次(每次 1000 g)置 5000 ml 烧杯中, 加双蒸水至 5000 ml 刻度处, 室温下浸泡 1 h, 煮沸 15 min, 用三层纱布过滤, 残渣重复以上过程 1 次, 合并两次过滤水煎液, 置 250 ml 输液瓶中 3000 r/min 离心 10 min, 上清部分滤纸过滤后的滤液在 80°C 水浴上 N_2 流吹干, 分别定容至川芎单煎液 3 g/ml 和 30 g/ml, 川芎丹参合剂(川丹合剂)4 g/ml(川芎:丹参=3:1)。以上灌胃液置 4°C 冰箱中备用。川芎煎剂稀释成含生药 20 mg/ml 浓度, 然后用 0.45 μ 的微孔滤膜过滤, 以进行 3 D-HPLC 测定。

4. 川芎煎剂及川丹合剂中川芎嗪含量 用 HPLC 法进行测定。该法与以上 TMP 血药浓度测定的 HPLC 法的色谱条件一致, 但建立标准曲线时各种浓度的 TMP 加在乙醇中。

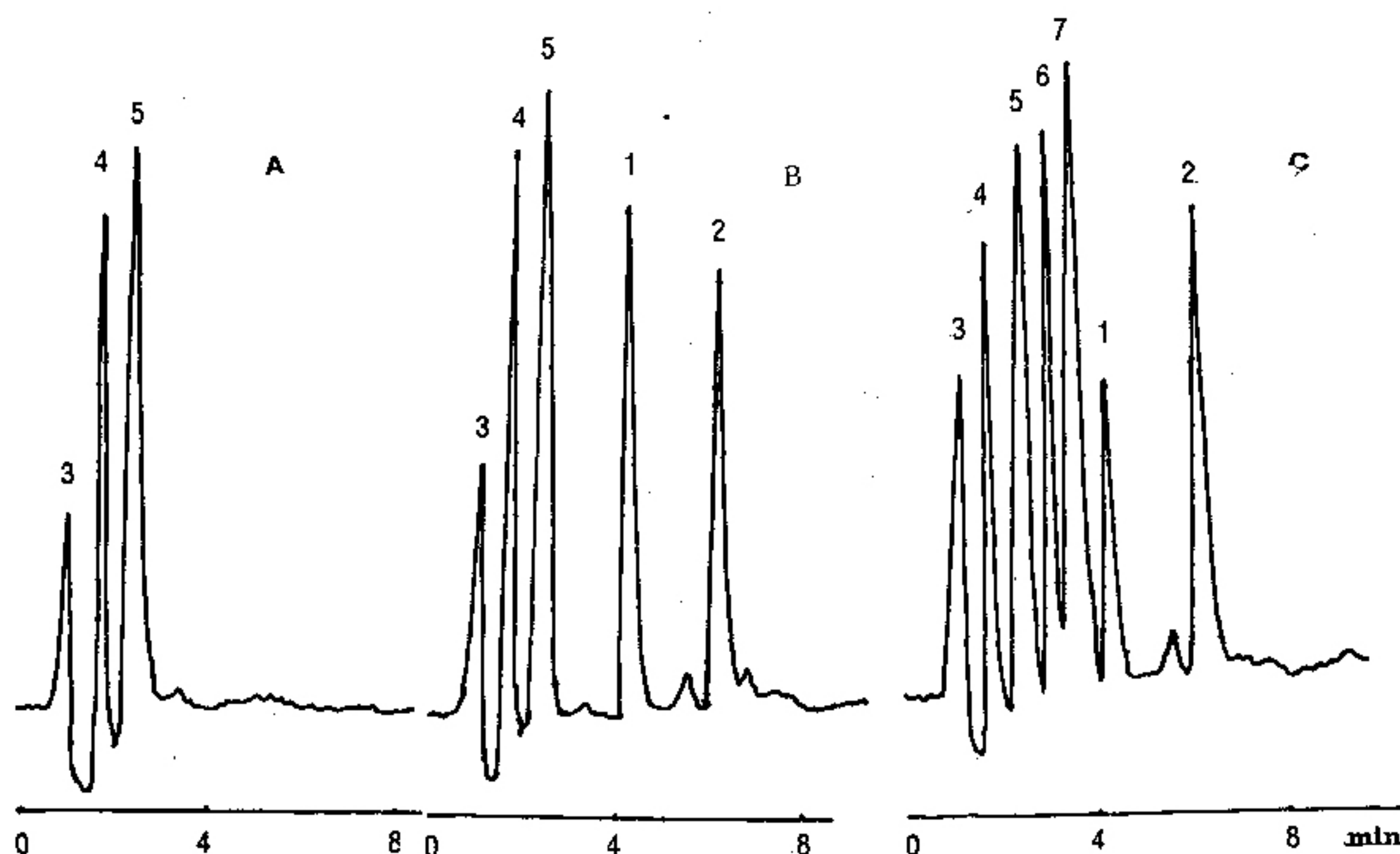
5. 四谱鉴定 以 300 g/kg 川芎煎剂 ig 大鼠, 0.5 h 后剪头取全部血清, 按上述样品预处理的方法处理血样, 将该血样及其加 TMP 对照品血样进行 HPLC 测定, 将增宽增高峰的洗脱液(定名为 I 号组分)反复收集, 30 只大鼠的血清样品所收集洗脱液经冷冻干燥后所得白色结晶, 分别进行四谱测定。

6. 药代动力学分析方法 大鼠以 3 g/ml 的川芎煎剂按 30 g/kg 和川丹合剂 40 g/kg 灌胃, 在灌胃前及后 5 min 和 0.25、0.50、0.75、1、1.5、2、3 和 5 h 自尾静脉取血清 0.2 或 0.1 ml(不加 NaOH), 制成样品待测。两组汤剂各灌胃 6 只大鼠。

用残数法、非线性最小二乘法(PKBP-N 1 程序包、IBM 电子计算机)处理数据, 分析房室模型及药代动力学参数, 梯形法计算 AUC 值。

结 果

一、TMP 和内标安眠酮的保留时间分别为 3.992 和 6.223 min, 色谱见附图, 空白血清色谱见



附图 川芎嗪和内标色谱图 A: 空白血清色谱图; B: 川芎煎剂和内标在血清内经萃取色谱图; C: 灌胃川芎煎剂后色谱图。1. TMP(3.992 min); 2. 内标; (6.223 min); 3. 甲醇峰(1.017 min); 4、5. 血清中杂峰(1.725 min 和 2.467 min); 6、7. 未知峰(3.000 min 和 3.492 min)

附图 A, 灌胃川芎煎剂后取血清经处理色谱见附图 C; 说明样品预处理去除蛋白效果好(见附图 A), 血清中 TMP 和内标没有杂峰干扰(见附图 B); 灌胃川芎煎剂后图中的 1 号峰为 TMP, 与未知的 6、7 峰较好分离(C); 灌胃川丹合剂后在 5 与 6 号峰之间增加一新的峰(未列图)。

使用四川道地药材川芎的川芎单煎剂与川丹合剂汤液中 TMP 含量分别为 $574.50 \mu\text{g} \cdot \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $463.02 \mu\text{g} \cdot \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

空白双蒸水与川芎煎剂的三维色谱图(体外)比较后表明: TMP 一个峰出现在保留时间(Rt)为 2.98 min、紫外吸收波长(UV)为 280 nm 处; 另一峰出现在 Rt 2.98 min、UV 210 nm 处并与杂峰重叠。另外在 Rt 0.6~2.2 min 内, UV 200~320 nm 处出现两种高大峰(A、B 峰); 在 Rt 4 min 与 UV 300 nm 处出现一低微峰(C 峰), 有待进一步鉴定。

空白血清、川芎煎剂(体外)与川芎煎剂(30 g/kg)灌胃大鼠后 1 ml 血清样品三维色谱图比较表明: TMP 峰 Rt 和 UV 一致, 但峰形较低; B 峰(Rt 1.8 min, UV 220 nm, 从图上分析该处至少有 2 个峰,

但难以分开)降低后另外出现一峰(Rt 2.2 min, UV 300 nm); A 与 C 峰则消失。

本方法在 $0.22 \sim 6.71 \mu\text{g}/\text{ml}$ 血清($0.044 \sim 1.342/0.2 \text{ ml}$)浓度范围内 $r=0.9990$, 回归方程 $y=0.1889+0.0440 C$, 最低检测限 $3 \text{ ng}(S/N=5)$, 平均回收率为 $99.87 \pm 8.02\%$, 日内精密度 $CV=1.34 \pm 0.13\%$, 日间精密度 $CV=6.75 \pm 1.41\%$ 。专属性好、灵敏、快速, 可满足本实验的要求。

二、四谱鉴定结果 紫外: $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 288 nm; 红外光谱 $\gamma_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$: 3000, 2970, 1455, 1420, 1370, 1240, 1210, 1195, 1005, 815 cm^{-1} 。核磁共振氢谱(90 MC、TMS 为内标准, CDCl_3 为溶剂)呈现甲基峰 δ 2.45(单峰); 质谱: (分子离子峰 136)主要碎片有 m/e 95 [$\text{CH}_3\text{C} \equiv \text{NCCH}_3 = \text{CCH}_3$], m/e 54 [$\text{CH}_3\text{C} \equiv \text{CCH}_3$] $^+$, m/e 42 [$\text{CH}_3\text{C} \equiv \text{NH}$] $^+$, m/e 39 [$\text{CH}_3\text{C} \equiv \text{C}$] $^+$ 。综合分析以上数据, 与文献报道的 TMP 基本符合^[5], 证明大鼠灌胃川芎煎剂后血清中所提取的 1 号组分即为 TMP, 其他组分还待进行解析。

三、健康 Wistar 大鼠灌胃川芎煎剂与川丹合剂

表 1 川芎煎剂和川丹合剂灌胃大鼠后不同时间血清药物含量比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	血清药物含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
	0.08 h	0.25 h	0.50 h	0.75 h	1.00 h	1.50 h	2.00 h	3.00 h	5.00 h
川芎煎剂	0.652	0.874	0.592	0.475	0.363	0.299	0.243	0.148	0.053
	± 0.487	± 0.180	± 0.271	± 0.248	± 0.262	± 0.103	± 0.112	± 0.079	± 0.031
川丹合剂	0.468	0.571	0.392	0.330	0.235	0.178	0.166	0.088	0.034
	± 0.081	$\pm 0.231^*$	± 0.184	± 0.178	± 0.125	$\pm 0.061^*$	± 0.083	± 0.061	± 0.013

注: 两组各 6 只大鼠; 与川芎煎剂比较 $^*P < 0.05$

表 2 健康大鼠一次川芎煎剂、川丹合剂灌胃后川芎嗪药代动力学参数比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	α	β	K_a	K_{10}	K_{12}	K_{21}	$t_{1/2}K_a$	$t_{1/2}\alpha$	$t_{1/2}\beta$	AUC	Vc/F
	(h $^{-1}$)						(h)			($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$)	(L/kg)
川芎煎剂	1.928	0.479	19.580	1.090	0.470	0.847	0.036	0.354	1.448	1.273	9.665
	± 0.719	± 0.205	± 4.139	± 0.502	± 0.160	± 0.247	± 0.024	± 0.101	± 0.880	± 0.255	± 1.810
川丹合剂	2.328	0.479	11.508	0.738	0.205	1.511	0.060	0.298	1.447	0.836	7.390
	± 0.719	± 0.289	$\pm 2.821^*$	± 0.255	± 0.092	$\pm 0.471^{**}$	± 0.020	± 0.223	± 0.901	$\pm 0.168^{**}$	$\pm 1.089^*$

注: 两组各 6 只大鼠; 与川芎煎剂比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

后不同时间血清药物浓度, 见表 1; 药代动力学参数[一级吸收速度常数(K_a), 半吸收期($t_{1/2}K_a$), 血药一时曲线下面积(AUC)等]见表 2。

讨 论

一、HPLC 法研究方剂药动学 该工作报道极少, 一般认为十分困难, 原因如下: (1)中草药中能被萃取的有效化合物含量极低且数量繁多; (2)共煎过程中产生挥发、分解、吸附、水解、取代、中和及

沉淀等一系列十分复杂的化学物理变化, 有可能使本来很低的有效成分不能全部溶出, 口服后不能被胃肠道全部吸收, 使进入血循环的待测样品所剩无几; (3)西方医学模式, 使用单体而不是复方, 从思路上没有想到研究方剂。

二、方法学 传统二维 HPLC 法研究单体化合物时, 仅以对照品与样品色谱峰是否保留时间一致及峰形重叠来定性, 是不严谨的, 因为一个峰也可能是分离不开的两个化合物; 川芎煎剂成分复杂, 更造成

定性错误。本实验采用二极管阵列的 3D-HPLC 和四谱方法鉴定, 是科学和精确的。

三、川芎汤剂体内外化学成分分析 3D-HPLC 测定时较 2D-HPLC 的测定结果多一个未知化合物, 说明三维多信息检测的优势, 且川芎汤剂的化学成分在体内外有所变化。在川芎煎剂给大鼠灌胃后血清样品的三维色谱图中少一种组分, 可能是由于三氯甲烷萃取时造成水溶性成分的丢失所致。所以仍需进一步完善样品预处理方法, 更真实反映血中川芎煎剂化学成分的变化。

四、川芎煎剂与川丹合剂比较 (1)0.25 h 血药浓度与 AUC 值分别是 1.53 和 1.52 倍 ($P < 0.05$), 说明川丹合剂生物利用度低, 是丹参干扰拮抗导致“相恶”效应。(2) K_a 、 $t_{1/2}K_a$ 值川芎煎剂 $>$ 川丹合剂组, 由于丹参伍用导致 TMP 吸收减慢。这可能有助于解释临床较少川芎单独伍用丹参的原因。为我们提出的“复方药代动力学”新假说提供了初步实验依据。这种伍用丹参“相恶”效应, 一方面是共煎时川丹合剂中 TMP 与川芎煎剂相比仅 81.52% 溶出, 即这种

“相恶”发生于体外; 另一方面则是由于增加丹参等于增加了多种化学成分在体内干扰, 其机制十分复杂, 有待进一步探讨。

参 考 文 献

1. 黄 熙, 等. “证治药动学”假说的科学依据及前景. 见: 陈可冀主编. 迈向 21 世纪的中西医结合. 第一版. 北京: 中国医药科技出版社, 1991: 207—216.
2. 蔡 伟, 等. 正常人口服磷酸川芎嗪的药代动力学研究. 药学学报 1989; 24(12): 881.
3. 寺泽捷年, 等. 甘草次酸体内代谢研究 II —— 大鼠体内代谢. 国外医学·中医中药分册 1987; 9(2): 31.
4. Kano Y, et al. Pharmacological properties of Galenical Preparation XII Chinese traditional prescription “KAN-ZOBUSITO” in rat portal blood after oral administration. Shoykugaku Zasshi 1989; 43(3): 199.
5. 北京制药工业研究所. 川芎 1 号生物碱的结构鉴定及其合成. 中草药通讯 1977; 4: 6.

宁宫饮治疗皮下埋植长效避孕剂所致月经紊乱 108 例

黑龙江省电力医院(哈尔滨 150030) 王卓然

哈尔滨市计划生育科学研究所·李淑娟 王凤仙 李新萍

我们于 1991 年 3 月~1992 年 3 月对皮下埋植长效避孕剂致月经紊乱 108 例应用宁宫饮治疗, 取得较满意疗效, 现报告于下。

临床资料 选择皮下埋植辽宁省计划生育科学研究所研制的长效避孕剂、6 个月内发生月经紊乱者 108 例, 年龄 22~34 岁, 平均 25.8 岁。月经紊乱类型: (1) 经期延长(月经期 ≥ 8 天)、月经量多(经血量比术前多 1 倍以上)32 例(29.6%)。(2) 月经频发(3 个月内出血次数 ≥ 5 次)17 例(15.7%)。(3) 经间滴血(连续微量出血)33 例(30.6%)。(4) 月经稀发(间隔不出血天数 ≥ 45 天)12 例(11.1%)。(5) 闭经(间隔不出血天数 ≥ 60 天)14 例(13%)。临床统计两种类型同时存在时, 以主证统计。经间点滴出血和经期延长发病最多, 闭经次之。

治疗方法 宁宫饮由刺五加 150 g 黄芪 150 g 白及 100 g 汉三七 50 g 等组成。水煎 3 次浓缩, 装 250 ml 瓶, 高压灭菌备用。每次服 15 ml, 每日 3 次, 10 天为 1 个疗程, 间隔 5~7 天服第 2 疗程。2

个疗程后评定疗效。

结 果 (1) 疗效评定标准: 治愈: 月经恢复正常; 显效: 用药后月经恢复正常, 停药后有复发者; 有效: 出血及点滴出血减少, 月经稀发间隔时间缩短; 无效: 治疗后无变化。(2) 结果: 治愈 25 例(23.15%), 显效 25 例(23.15%), 有效 34 例(31.48%), 无效 24 例(22.22%), 总有效率 77.78%。其中对经间点滴出血疗效较好(32/33 例, 96.97%), 闭经疗效较差(4/14 例, 28.57%)。

讨 论 皮下埋植长效避孕剂即单纯孕激素左旋 18-甲基炔诺酮(LNG), 其机理是抑制排卵, 改变宫颈粘液性状, 使子宫内膜产生抑制作用, 使子宫内环境的变化与卵发育不同步, 从而阻碍受精卵着床。由于 LNG 对子宫内膜产生上述作用, 使月经不规则或点滴出血。宁宫饮系以刺五加为君药等四味药组成, 益气调血, 活血止血, 以达阴平阳秘, 气血调和, 任脉通, 冲脉盛, 血海满盈, 月经以时下。

Clinical Analysis of 72 Epileptic Patients Treated with Alkaline Extract of *Euphorbia fisheriana*

Liu Yu-xi (刘玉玺), Wang Ming-zheng (王明正), Sun Xiao-fei (孙晓飞), et al
Dept. of Neurology, 1st Affiliated Hosp., Shanxi Med. College, Taiyuan (030001)

The effect of 72 epileptic patients treated with alkaline extract of *Euphorbia fisheriana* (EF) was reported. 22 of them with intractable epilepsy were compared with the treatment of both single-blind and placebo. The results showed that the total effective rate with EF was 78%, its marked effective rate was 42% and the effective rate 36%. The epileptic patients reduced their frequency of seizures significantly ($P < 0.05$), while the effective rate of 22 epileptic patients with single-blind treatment was 59%, and that with placebo was 32%. There was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). The active principle of *Euphorbia fisheriana* was *Euphorbia* alkaloid. There was no obvious adverse effect in clinical observation. It is considered that *Euphorbia fisheriana* is rich in resource, cheap, and with marked anticonvulsant effect.

Key words *Euphorbia fisheriana*, epilepsy, anticonvulsant, *Euphorbia* alkaloid

(Original article on page 282)

Investigation on TCM and WM Susceptible Factors on Senile Cataract

Lin Ying (林颖), Lin Qiu-cheng (林求诚)*, Jin Wei-er (金威尔)
Fujian People's Hospital, Fuzhou (350004)
* Fujian Academy of TCM and Pharmacology

In 743 cases, the TCM and WM susceptible factors of senile cataract (SC) was studied by the clinical epidemiological investigation. By single factor analysis, the result showed that in WM, the susceptible factors of SC mostly related to (1) case history: coronary heart disease, old ages, smoking, multiple offsprings; (2) physical sign: short build, with coronary sulcus, higher systolic pressure, pulse pressure and average arterial pressure; (3) cardiovascular function: abnormal EKG, higher heart beat index, short microcirculatory stasis time, lower carrier viscosity of blood; (4) dysfunction of brain; (5) deficiency of pulmonary function; (6) lower RBC ATPase, higher whole blood reduction viscosity. While in TCM, it was related to (1) old aged and general asthenia, (2) deficiency of Qi, Heart, Liver or Kidney, (3) Blood Stasis. By stepwise regression analysis, the result showed that SC occurred through the combination with 13 factors of TCM and WM, including Yin Deficiency, senility index, hemorheology index, brain function, pulmonary function, blood pressure, body height, character, optical fundus, etc.

Key words senile cataract, susceptible factors

(Original article on page 285)

Influence of Combined *Salvia Miltiorrhiza* and *Ligusticum Wallichii* on Pharmacokinetics of Tetramethylpyrazine in Rats

Huang Xi (黄熙), Xia Tian (夏天), Ren Ping (任平), et al
Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an (710032)

Influence of *Salvia miltiorrhiza* (SM) and/or *Ligusticum wallichii* (LW) on pharmacokinetics of tetramethylpyrazine (TMP) was observed in rats. The content of TMP in LW and LW-SM decoctions were 375.8 and 236.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. The rat serum components after oral administration of LW were analyzed by modified HPLC. One of 3 compounds was detected, which was identified