



# 大川芎方效应组分血浆及脑脊液 HPLC 特征指纹图谱研究

沈岚<sup>1,2\*</sup>, 林晓<sup>1,2</sup>, 洪燕龙<sup>1</sup>, 梁爽<sup>1</sup>, 袁莹<sup>1</sup>, 冯怡<sup>1,2</sup>, 徐德生<sup>3</sup>, 阮克锋<sup>1</sup>

(1. 上海中医药大学 中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203;

2. 上海中医药大学 中药学院, 上海 201203; 3. 上海中医药大学 附属曙光医院, 上海 200021)

**[摘要]** 目的:通过大川芎方效应组分血浆及脑脊液 HPLC 指纹图谱的研究,建立准确、简便的体内定性分析方法,为大川芎方入血、入脑成分的研究奠定基础,对阐明其“引药上行”配伍规律提供依据。方法:建立大川芎方效应组分血浆及脑脊液 HPLC 指纹图谱。结果:各共有峰的相对保留时间的 RSD < 2.0%, 6 批血浆、脑脊液样品的指纹图谱的相似度均在 0.85 以上。结论:所建立的大川芎方效应组分血浆、脑脊液指纹图谱相对稳定、准确,可用于体内成分的定性分析。

**[关键词]** 大川芎方效应组分;指纹图谱;血浆;脑脊液

大川芎方源于金·刘完素《宣明论方》,由川芎、天麻组成,为治疗偏头痛的经典中药复方。方中川芎行气血、熄风止痛,偏行于外以治标,为“引药上行”之品<sup>[1]</sup>;天麻性甘缓,偏行于里以滋阴。川芎“引药上行”的作用以及现代药理学之脑靶向作用,与其治疗头痛之间必然存在紧密的关联。基于体内过程的大川芎方脑靶向作用的有效物质组群的整体特性表征将对进一步明确其抗偏头痛的药效物质基础、解析“引药上行”的配伍内涵有着重要的意义。

建立准确、简便的定性分析方法是中药复方体内研究的基础。本文在建立川芎、天麻效应组分指纹图谱的基础上,建立其相应的血浆指纹谱与脑脊液指纹图谱,从而为大川芎方入血、入脑成分的研究奠定基础,对阐明大川芎方的“引药上行”的配伍依据有着重要的意义,有利于进一步明确大川芎方抗偏头痛脑靶向作用的物质基础及作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), LCQ deca 型质谱仪(美国 Finnigan 公司), FA 2104 N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), TGL-16 B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

### 1.2 药品与材料

川芎效应组分(自制,批号 070827);天麻效应组分(自制,批号 070801);肝素钠(上海第一生化药业有限公司,批号 060101),用时配成 10% 浓度;戊巴比妥钠(上海医药集团有限公司,批号 060406),用时配成 4% 浓度;生理盐水(上海华源长富药业集团有限公司,批号 06011203);甲醇、乙腈(Sigma 公司,色谱纯);冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);高氯酸(中国医药生物上海化学试剂公司,分析纯);高效液相用水为超纯水(自制)。

### 1.3 动物

SD 大鼠,雄性,(250 ± 10) g,由上海中医药大学实验动物中心提供(许可证 071027)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

**2.1.1 川芎效应组分特征指纹图谱** Kromasile-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.5% 醋酸梯度洗脱,梯度程序见表 1;柱温 25 °C;流速 1 mL · min<sup>-1</sup>;检测波长 280 nm。

**2.1.2 天麻效应组分特征指纹图谱** Kromasile-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 55 μm);流动相乙腈-1% 醋酸梯度洗脱,梯度程序见表 2;柱温 25 °C;流速 1 mL · min<sup>-1</sup>;检测波长 270 nm。

**[稿件编号]** 20111130007

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金项目(30801548);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-009);国家教育部科学技术研究重点项目(211060);上海市教育委员会科研创新项目(12ZZ124, 11ZZ111);上海市自然科学基金项目(11ZR1434500);上海市教委重点学科项目(J50302)

**[通信作者]** \* 沈岚,副教授, Tel: (021) 51322211, Fax: (021) 51322491, E-mail: alansusu@sina.com

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Solvent gradient program of HPLC analysis

时间/min	甲醇/%	0.5% 冰醋酸/%
0.0	10.0	90.0
10.0	25.0	75.0
18.0	30.0	70.0
50.0	34.0	66.0
55.0	10.0	90.0

表 2 流动相梯度洗脱变化程序表

Table 2 Solvent gradient program of HPLC analysis

时间/min	乙腈/%	1% 冰醋酸/%
00.0	2.00	98.0
15.0	2.00	98.0
40.0	25.0	75.0

## 2.2 样品制备方法

**2.2.1 大川芎方效应组分溶液** 取川芎效应组分与天麻效应组分按重量比 4:3 混合,配成  $6.78 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液。

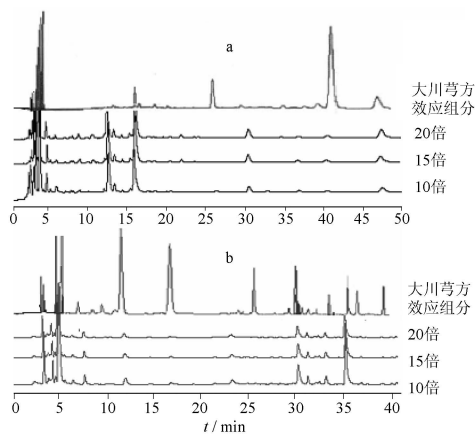
**2.2.2 血浆样品** 取 SD 大鼠,雄性,体重  $(250 \pm 10) \text{ g}$ ,受试前禁食 12 h,全程不禁水,于给药  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  后,眼眶取血,注入  $1 \text{ mL}$  离心管中,加入肝素钠,轻轻混匀,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取上清液,加入 0.2 倍量 70% 高氯酸溶液,涡旋 15 s,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,吸取上清液。

**2.2.3 脑脊液样品液** 取 SD 大鼠,雄性,体重  $(250 \pm 10) \text{ g}$ ,受试前禁食 12 h,全程不禁水,于给药  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  后 20 min,腹腔注射  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  戊巴比妥钠进行麻醉,用  $1 \text{ mL}$  注射器于枕骨大孔抽取脑脊液  $200 \mu\text{L}$ ,注入  $200 \mu\text{L}$  离心管中  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,吸取上清液。

## 2.3 最佳给药剂量考察

取 SD 大鼠,雄性,体重  $(250 \pm 10) \text{ g}$ ,受试前禁食 12 h,全程不禁水,分别灌胃 10 倍、15 倍、20 倍临床剂量的大川芎方效应组分溶液,给药 0.5 h 后,眼眶取血,按 2.2.2 项下方法制备血浆样品,按 2.1 项下色谱条件进行测定,见图 1。

与灌胃 10 倍临床剂量的大川芎方效应组分溶液的血浆样品相比,灌胃 15 倍的指纹图谱中色谱峰数目较多,响应值较高;但与灌胃 20 倍相比,其无明显变化,故选定灌胃 15 倍临床剂量为给药剂量。



a. 川芎色谱条件;b. 天麻色谱条件(图 2,3 同)。

图 1 最佳给药剂量 HPLC 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the best oral dosage

## 2.4 最佳采集时间考察

**2.4.1 采血时间考察** 取 SD 大鼠,雄性,体重  $(250 \pm 10) \text{ g}$ ,受试前禁食 12 h,全程不禁水,灌胃临床剂量 15 倍量的大川芎方效应组分溶液,分别在给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 h 进行眼眶取血,按 2.2.2 项下方法制备血浆样品,按 2.1 项下色谱条件进行测定,见图 2。

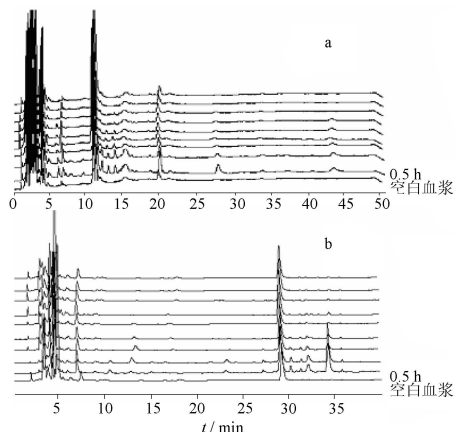


图 2 不同采血时间 HPLC 色谱图

Fig. 2 Chromatograms of different time of collecting blood

给药 0.5 h 后血浆指纹图谱中色谱峰的数目最多且响应值较高,故选定给药后 0.5 h 眼眶取血。

**2.4.2 脑脊液采集时间考察** 取 SD 大鼠,雄性,体重  $(250 \pm 10) \text{ g}$ ,受试前禁食 12 h,全程不禁水,灌胃 15 倍临床剂量的大川芎方效应组分溶液,给药后 20 min,腹腔注射  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  戊巴比妥钠进

行麻醉,分别在给药 0.5,1,2,3,4,5,6,8,10 h 后用 1 mL 注射器于枕骨大孔抽取脑脊液,按 2.2.3 项下方法制备脑脊液样品,按 2.1 项下色谱条件进行测定,见图 3。

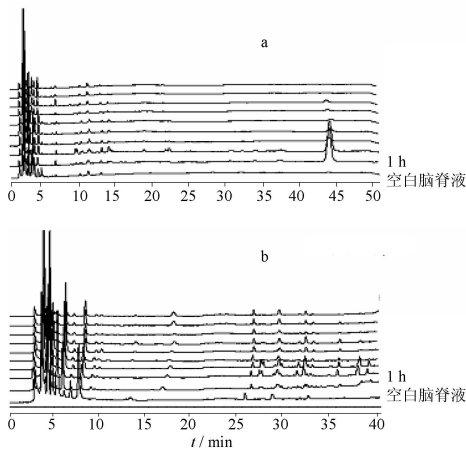


图 3 不同采集时间脑脊液 HPLC 色谱图  
Fig. 3 Chromatograms of different time of collecting cerebrospinal fluid

给药 1 h 后脑脊液指纹图谱中色谱峰的数目最多且响应值较高,故选定给药后 1 h 为采集时间。

### 2.5 大川芎方效应组分血浆特征指纹图谱研究

**2.5.1 大川芎方效应组分中川芎效应组分血浆特征指纹图谱研究** 经方法学考察,精密度试验结果显示,各共有色谱峰相对保留时间  $t_R$  的 RSD 均小于 1.0%,各共有色谱峰相对峰面积  $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;稳定性试验结果显示,24 h 内共有色谱峰基本没有明显变化, $t_R$  的 RSD 均小于 1.0%, $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;重现性试验结果显示, $t_R$  的 RSD 均小于 1.0%, $A_R$  的 RSD 均小于 20%。

以 6 批血浆样品的测定结果进行分析,选择稳定性和重现性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,标定 12 个共有峰,见图 4。8 号峰峰型对称,峰面积较大,出峰时间适中且稳定,故选择该峰为制定指纹图谱的参照峰。以参照峰保留时间和峰面积的积分值为 1,计算各共有峰的相对保留时间和峰面积比。将 6 批血浆样品的指纹图谱输入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 年 A 版)计算相似度,结果表明,川芎效应组分血浆特征指纹图谱的相似度均在 0.85 以上。

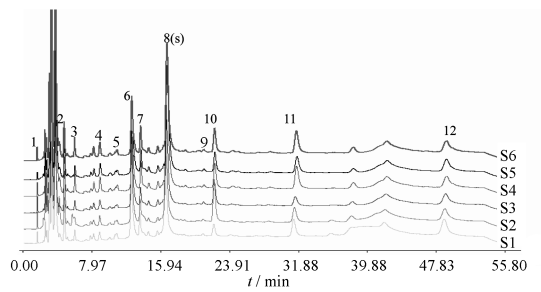


图 4 6 批血浆样品中川芎 HPLC 特征指纹图谱  
Fig. 4 Chromatograms of 6 batches of Chuankong Rhizoma in rat plasma HPLC characteristic fingerprints

**2.5.2 大川芎方效应组分中天麻效应组分血浆特征指纹图谱研究** 经方法学考察,精密度试验结果显示,各共有色谱峰相对保留时间  $t_R$  的 RSD 均小于 0.50%,各共有色谱峰相对峰面积  $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;稳定性试验结果显示,24 h 内共有色谱峰基本没有明显变化, $t_R$  的 RSD 均小于 0.50%, $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;重现性试验结果显示, $t_R$  的 RSD 均小于 0.50%, $A_R$  的 RSD 均小于 20%。

以 6 批血浆样品的测定结果进行分析,选择稳定性和重现性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,标定 15 个共有峰,见图 5,8 号峰峰型对称,峰面积较大,出峰时间适中且稳定,故选择该峰为制定指纹图谱的参照峰。以参照峰的保留时间和峰面积的积分值为 1,计算各共有峰的相对保留时间和峰面积比。将 6 批血浆样品的指纹图谱输入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 年 A 版)计算相似度,结果表明,天麻效应组分血浆特征指纹图谱的相似度均在 0.89 以上。

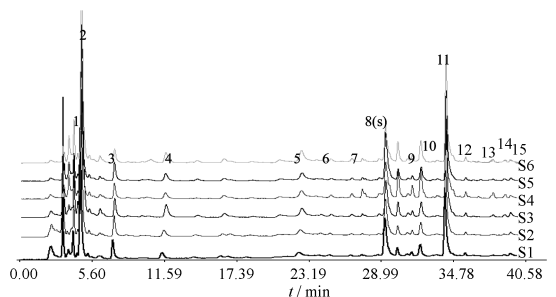


图 5 6 批血浆样品中天麻 HPLC 特征指纹图谱  
Fig. 5 Chromatograms of 6 batches of Gastrodiae Rhizoma in rat plasma HPLC characteristic fingerprints

## 2.6 大川芎方效应组分脑脊液特征指纹图谱研究

### 2.6.1 大川芎方效应组分中川芎效应组分脑脊液特征指纹图谱研究

经方法学考察,精密度试验结果显示,各共有色谱峰相对保留时间  $t_R$  的 RSD 均小于 1.5%,各共有色谱峰相对峰面积  $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;稳定性试验结果显示,24 h 内共有色谱峰基本没有明显变化, $t_R$  的 RSD 均小于 1.5%, $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;重现性试验结果显示, $t_R$  的 RSD 均小于 1.5%, $A_R$  的 RSD 均小于 20%。

以 6 批脑脊液样品的测定结果进行分析,选择稳定性和重现性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,标定 5 个共有峰,见图 6,5 号峰峰型对称,峰面积较大且稳定,故选择该峰为制定指纹图谱的参照峰。以参照峰的保留时间和峰面积的积分值为 1,计算各共有峰的相对保留时间和峰面积比。将 6 批脑脊液样品的指纹图谱输入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 年 A 版)计算相似度,结果表明,川芎效应组分脑脊液特征指纹图谱的相似度均在 0.85 以上。

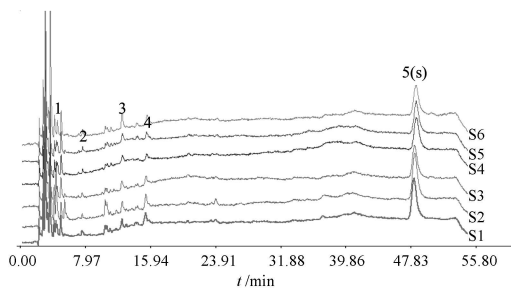


图 6 6 批脑脊液样品中川芎 HPLC 特征指纹图谱  
Fig. 6 Chromatograms of 6 batches of Chuansong Rhizoma in rat cerebrospinal fluid HPLC characteristic fingerprints

### 2.6.2 大川芎方效应组分中天麻脑脊液特征指纹图谱研究

经方法学考察,精密度试验结果显示,各共有色谱峰相对保留时间  $t_R$  的 RSD 均小于 1.5%,各共有色谱峰相对峰面积  $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;稳定性试验结果显示,24 h 内共有色谱峰基本没有明显变化, $t_R$  的 RSD 均小于 1.5%, $A_R$  的 RSD 均小于 5.0%;重现性试验结果显示, $t_R$  的 RSD 均小于 1.5%, $A_R$  的 RSD 均小于 20%。

以 6 批脑脊液样品的测定结果进行分析,选择稳定性和重现性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,标定 9 个共有峰,见图 7,3 号峰峰型对称,峰

面积较大且稳定,故选择该峰为制定指纹图谱的参照峰。以参照峰的保留时间和峰面积的积分值为 1,计算各共有峰的相对保留时间和峰面积比。将 6 批脑脊液样品的指纹图谱输入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 年 A 版)计算相似度,结果表明,天麻效应组分脑脊液特征指纹图谱的相似度均在 0.85 以上。

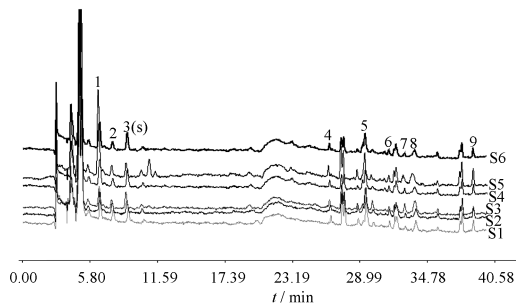


图 7 6 批脑脊液样品中天麻 HPLC 特征指纹图谱  
Fig. 7 Chromatograms of 6 batches of Gastrodiae Rhizoma in rat cerebrospinal fluid HPLC characteristic fingerprints

## 3 讨论

血清药理学认为药物进入机体后即与机体间发生一系列的相互作用而发生结构变化,一些药物经代谢失活,但也有一些药物通过代谢产生了药理活性或毒性的代谢物<sup>[2]</sup>。中药复方经口服给药后成分一部分被吸收,一部分被排泄。只有被吸收的成分才有可能作用于机体,发挥疗效。这种方法可以快速、有效的筛选、分析其活性成分,从而避免了以往“成分分离、药效追踪”费时费力的缺点。这种导向分离方法<sup>[3]</sup>,已成为研究中药及其复方药效物质基础,并从中筛选生物活性成分的有效途径。而实施的基础是建立稳定可靠的体内分析方法。本文建立了川芎、天麻效应组分血浆、脑脊液 HPLC 特征指纹图谱,其各共有峰的相对保留时间的 RSD < 2.0%,6 批血浆、脑脊液样品的特征指纹图谱的相似度均在 0.85 以上,说明特征指纹图谱相对稳定、准确,可以用于体内成分的定性分析。

川芎与天麻治疗偏头痛的起效途径不同,前者主要作用于血管,后者则主要作用于神经<sup>[4]</sup>。经大川芎方血中移行成分研究<sup>[5-6]</sup>发现,川芎效应组分中阿魏酸、洋川芎内酯 I 及天麻效应组分中天麻素、巴利森苷均为其入血成分。本文中大川芎方效应组分特征指纹谱中保留时间约为 48.3 min 的色谱峰,与



洋川芎内酯 I 对照品比对, 其为川芎效应组分中的洋川芎内酯 I, 为既入血又入脑的成分。此成分在硝酸甘油造模后, 相应色谱峰的响应值明显增大, 提示此成分在偏头痛发作时更容易通过血脑屏障, 具备“引药上行”的药动学特征。同时, 其相对分子质量仅 224, 采用摇瓶法测定在正辛醇/水系统中的表观分配系数, 其  $\lg P_{app}$  在 1.00 左右, 表明具有较好的油水分配系数及其在体内可能具有较好的膜渗透性。综上提示, 此成分很有可能是其治疗偏头痛的药效物质基础。

为了尽量减少血浆中内源性物质的干扰, 获取更多的入血成分信息, 采用在空白血浆中加入大川芎方效应组分制备含药血浆, 再对含药血浆和空白血浆同时进行处理的方法, 对血浆样品预处理方法进行考察。此外, 分别采用加有机溶剂法和加酸法

处理血浆, 结果表明加酸法优于加有机溶剂法, 且高氯酸法优于三氯乙酸法。

#### [参考文献]

- [1] 刘林, 方永奇. 醒脑开窍中药对血脑屏障影响的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1726.
- [2] 王喜军. 中药及中药复方的血浆药物化学研究[J]. 世界科学技术——中药现代化, 2002, 4(2): 1.
- [3] 王喜军. 中药血浆药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 36(10): 279.
- [4] 周明眉, 杨奎, 王一涛. 从血液流变学和血流速度评价大川芎丸方中川芎天麻治疗偏头痛的协同作用[J]. 中药药理与临床, 2008, 3(24): 6.
- [5] 袁莹, 林晓, 冯怡, 等. 川芎治疗偏头痛效应组分的体内移行研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(9): 694.
- [6] 林晓, 袁莹, 洪燕龙, 等. 大川芎方中天麻效应组分的体内移行研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1175.

## Study on HPLC characteristic fingerprint of active components of Dachuanxiong Fang in plasma and cerebrospinal fluid

SHEN Lan<sup>1,2\*</sup>, LIN Xiao<sup>1,2</sup>, HONG Yanlong<sup>1</sup>, LIANG Shuang<sup>1</sup>, YUAN Ying<sup>1</sup>, FENG Yi<sup>1</sup>, XU Desheng<sup>3</sup>, RUAN Kefeng<sup>1</sup>

(1. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. College of Chinese Material Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

3. Affiliated Shuguang Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an accurate and simple qualitative analytical method *in vivo* in the study on HPLC characteristic fingerprint of active components of Dachuanxiong Fang in plasma and cerebrospinal fluid, in order to lay a foundation for studies on components found in plasma and cerebrospinal fluid and provide basis for compatible regularity of initiators. **Method:** HPLC characteristic fingerprint of active components of Dachuanxiong Fang in plasma and cerebrospinal fluid was established. **Result:** The similarity of fingerprints of all of six batches of samples was above 0.85, RSD of their relative retention times in common peaks was less than 2.0%. **Conclusion:** The fingerprints of active components of Dachuanxiong Fang in plasma and cerebrospinal fluid were stable and accurate that they can be used in qualitative analysis on *in vivo* components.

[Key words] active component of Dachuanxiong Fang; fingerprint; plasma; cerebrospinal fluid

doi:10.4268/cjmm20121332

[责任编辑 陈玲]