

血虚证与补血药白芍 辨证药物动力学关系研究*

□杨祖贻** 刘荣敏 程佳 (四川省肿瘤研究所 成都 610041)
裴瑾 万德光 胡荣 (成都中医药大学药学院 成都 610075)

摘要:目的:通过对补血药白芍主要效应成分芍药苷在血虚证和健康小鼠体内血药浓度比较,探讨血虚证与补血药的辨证药物动力学关系。方法:建立血虚证动物模型,将实验动物分为空白对照组,对照组(健康小鼠),实验组(血虚证动物模型),对照组和实验组均给予白芍提取物灌胃。采用高效液相色谱技术,比较两组小鼠灌胃后不同时间点血浆中芍药苷浓度的差异。结果:实验组小鼠平均血药浓度在60 min、90 min时明显高于对照组,实验组小鼠血浆中芍药苷平均血药浓度为 $116.52 \pm 5.28 \text{ ng}/\mu\text{l}$,而对照组为 $41.49 \pm 2.86 \text{ ng}/\mu\text{l}$,二者比较有显著差异($p < 0.001$)。结论:血虚证小鼠血浆中芍药苷浓度较健康小鼠高,说明血虚证与补血药白芍存在辨证药物动力学关系。

关键词:血虚证 补血药 辨证药动学

辨证论治是中医理论的精髓。中医“证”的生理病理状态与药物动力学的关系是很值得研究的课题。“证”的病理状态与药物动力学的关系对临床“证”与药物剂量的选择,“证”与药物毒副反应的关系等问题的深入探讨有重要的指导意义,对新药的

开发也具有重要意义。国内外学者根据中医辨证论治理论所建立的“辨证药物动力学”假说^[2]的目的就是探讨中医“证”的生理病理状态对药物动力学的作用规律。本研究将血虚证与补血药白芍主要效应成分芍药苷的药物动力学结合研究,其目的是从辨证药物动力学的角度阐明血虚证与补血药白芍主要效应成分芍药苷药物动力学的关系,从中探讨

收稿日期:2004-11-16

修回日期:2005-01-15

* 国家中医药管理局科研基金(02-03ZP50):活血温里复方中温里药提高活血药生物利用度的研究,负责人:杨祖贻。

四川省中医管理局科研基金(200217):加味四物复方中温里药对活血药增效机理研究,负责人:杨祖贻。

** 联系人:杨祖贻,副主任医师,研究方向:中药复方配伍研究,Tel:13881958939, E-mail:chianghm@163.com。

20 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

血虚证与补血药相联系的机制和规律,加深对血虚证本质和血虚证药物治疗的认识。

一、材料和方法

1. **实验动物** 健康小鼠,雌雄各半,体重 18~22g,由四川省中药研究所实验动物中心提供。

2. **药品和试剂** 白芍药材购自四川省中药材公司,经成都中医药大学万德光教授鉴定为 *Paeoniaveitchii* Lynch. 白芍提取物由四川省肿瘤研究所制备,白芍提取物中芍药苷含量为 6.79%。所用甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为重蒸水。芍药苷对照品购自中国药品生物制品检定所,批号 0736-200219。

3. **仪器** Agilent 1100 高效液相色谱仪,二极管阵列检测器,Agilent 色谱数据处理系统。

4. **色谱条件** 色谱柱:Kromasil C18(250 mm × 4.6 mm, 7 μ m);流动相:甲醇-水(38:62);流速:0.5 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:25℃;灵敏度:AUFS=0.01;进样量:10 μ l。

5. **标准溶液制备** 精密称取芍药苷对照品,加甲醇溶解,制成 0.50 mg/ml 的对照品溶液,置于 4℃ 冰箱备用。

6. **血虚证动物模型建立** 参考有关实验方法^[1],随机抽取 18~22 g 小鼠 10 只,雌雄各半。眼眶采血测定血常规,测得平均 HB 16.33g/dl,平均 RBC $10.69 \times 10^6/\mu$ l;眼眶放血 0.5 ml,失血后 24 h 再测得平均 HB 12.03 g/dl,平均 RBC $8.31 \times 10^6/\mu$ l。得到血虚小鼠模型即实验组。

7. **实验动物分组及给药方法和剂量** 将健康小鼠随机分为空白对照组和对照组,实验组为血虚模型小鼠,每组 10 只,雌雄各半,空腹 14 h 后,给予空白对照组水、对照组和实验

组白芍提取物 490 mg/kg 的剂量灌胃,两组中芍药苷浓度相同,均为 49 mg/ml。

8. **生物样品制备** 小鼠灌胃后于 30 min、60 min、90 min、120 min、150 min、180 min 6 个不同时间点眼眶取静脉血 0.5 ml,用肝素抗凝,离心取上清获得血浆。用微量加样器取 100 μ l 血浆,置于 0.5 ml 高速离心管中,加入 3 倍体积的乙醇,电动混匀器充分混匀后经 5000~10000 r/min 离心 15~20 min 取上清液置于 0.5 ml 试管中,置于 37℃ 水浴挥干,用 50 μ l 甲醇重溶,再次 5000~10000 r/min 离心 15~20 min,取上清液置微量进样管中。

9. **系统适用性实验** 取小鼠空白血浆加入对照品溶液,另取对照组血浆,各 5 份,按血样预处理方法处理,分别进样、测定,其峰面积 RSD 分别为 3.48%、4.03%。结果表明该方法重现性较好。

10. **方法专属性考察** 在上述色谱条件下,分别测定芍药苷对照品、白芍提取物、空白对照组、对照组、实验组血浆。可见芍药苷与血浆中蛋白杂峰、内源性物质、白芍提取物的其它成分以及这些成分的体内代谢物和结合性成分均能很好地分离。

二、结果

1. **色谱分离** 在上述色谱条件下,血样中的芍药苷与其它物质完全分离,空白血浆、白芍提取物的其他成分均无干扰,通过二维、三维色谱对其吸收峰定性,其保留时间均与对照品一致(图 1)。

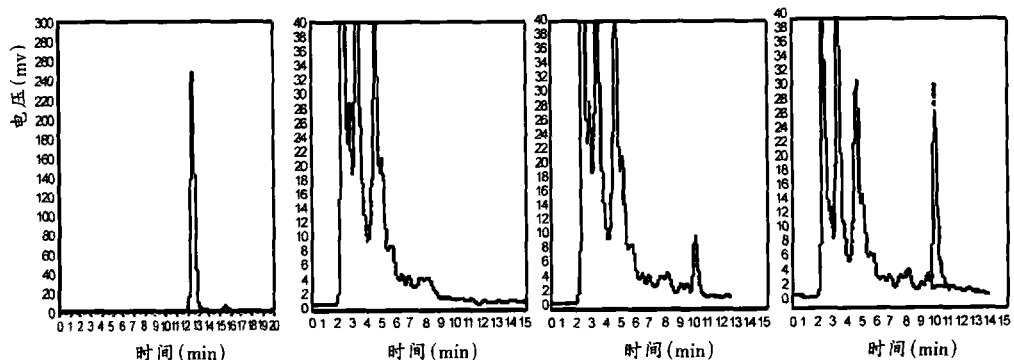


图 1 小鼠血浆样品 HPLC 图

A - 芍药苷对照品溶液 B - 空白血浆

C - 对照组(健康小鼠)血浆 D - 实验组(血虚模型小鼠)血浆 1 为芍药苷峰

2. **标准曲线及线性范围** 分别取芍药苷对照品溶液 1、5、10、50 μL , 室温下分别加入空白血浆 50 μL , 再加入甲醇定容 100 μL , 按色谱条件项下操作测定 ($n=5$), 以芍药苷峰面积与对应进样量进行直线回归, 得此条件下芍药苷的回归方程为 $c = 0.0004037A - 0.001098$, $r = 0.9999$ 。结果表明血浆中芍药苷在 5.0 ~ 250.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 范围内线性关系良好。

3. **最低检测浓度测定** 以信噪比 (S/N) 为 3 时的芍药苷标准品浓度为本 HPLC 分析方法的检测限, 取浓度为 0.050 mg/mL 的芍药苷标准液 0.5、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μL 分别加入到 50 μL 空白血浆中, 按血样预处理方法处理后进样分析。结果本方法的检测限为 1.49 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

4. **精密度的试验** 对照品溶液连续进样、测定 5 次, 其 RSD 为 1.02%; 按血浆及血样预处理方法处理, 分别取对照组、实验组样品各一份, 连续进样、测定 5 次, 其 RSD 分别为 2.36%、3.13%。结果表明该方法精密度较好, 符合体内药物浓度测定的要求。

5. **回收率试验** 精密量取芍药苷对照品溶液 5、10、20、40 μL , 室温下分别加入空白血浆 50 μL , 再加入甲醇定容, 制成一定浓度的芍药苷血浆标准液, 摇匀后按血样预处理项下处理、测定。由测定结果可见, 不同浓度下均有高而稳定的回收率。各浓度回收率符合体内药物浓度测定的要求, 变异系数小于 10%。(表 1)

6. **血药浓度测定** 对照组、实验组均给予小鼠白芍提取物 (PE) 灌胃, 灌胃后于 30、60、90、120、150、180 min 眼眶取静脉血, 按血浆及血样预处理方法处理, 测定, 由标准曲线计算出芍药苷的血药浓度。以不同取血时间为横坐标, 芍药苷血药浓度为纵坐标, 绘制出芍药苷药-时曲线, 见图 2。同时采用梯形面积法计算对照组 AUC 为 $4542.6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ min}$, 实验组 AUC 为 $10698.3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ min}$ 。对每一时间点进行比较, 结果表明对照组、实验组均在给药 30 ~ 120 min 内芍药苷血药浓度较高, 尤其是给药 60 min 后血药浓度达到峰值, 但到了 150 min 以后,

表 1 芍药苷回收率试验 ($n=3$)

对照液浓度 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	测得浓度 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
19.23	18.07 ± 6.89	93.96		4.78
38.46	35.96 ± 4.26	93.50		7.78
76.92	69.23 ± 7.44	90.00	95.52	9.23
153.85	160.94 ± 8.56	104.61		7.61

表 2 小鼠血浆中各时间点芍药苷质量浓度 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

采血时间 (min)	血药浓度 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s$)		
	空白对照组	对照组	实验组
30	—	28.36 ± 3.89	$65.32 \pm 10.54^{***}$
60	—	41.49 ± 2.86	$116.52 \pm 9.28^{***}$
90	—	33.05 ± 2.28	$87.86 \pm 10.57^{***}$
120	—	31.06 ± 4.74	$60.41 \pm 7.69^{***}$
150	—	10.89 ± 4.25	$18.79 \pm 5.54^*$
180	—	13.14 ± 5.59	15.42 ± 5.66

*** $P < 0.001$, * $P < 0.05$

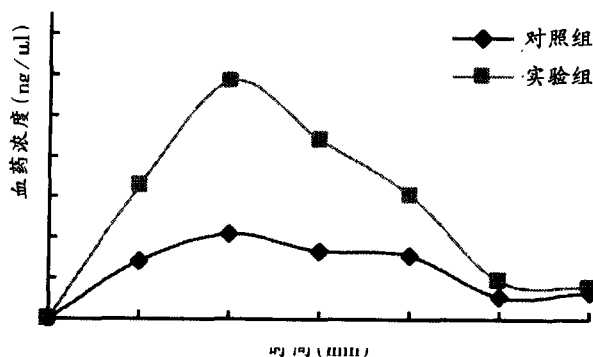


图 2 芍药苷药-时曲线

芍药苷在血中的浓度明显降低(表 2)。

三、讨论

在中医临床中,“辨证”占有极其重要的地位。但目前“证”的判断标准体系还未科学客观地建立。国内外有关学者的研究已表明:由于“证”的不同,很可能导致药物吸收和代谢的差异,以致形成药物有效成分血中浓度的差异,结果可能作为方剂的疗效和“证”的差别反映出来^[2-4]。

本研究以血药浓度法作为手段,采用高效液相色谱技术,将血虚证与补血药白芍效应成分芍药苷药物动力学研究联系起来。在参考有关文献^[5-7]的基础上建立了适合本研究的动物模型、色谱条件和生物样品制备方法。用该方法可将小鼠血浆中芍药苷与血浆中蛋白杂峰、内源性物质、白芍提取物的其他成分以及这些成分的体内代谢产物和结合性成分很好分离。方法重现性好,操作程序简便,样品损失率低,本法为“证”与药物效应成分血药浓度的相关性研究奠定了方法学基础。

用白芍制剂灌胃小鼠后,发现对照组、实验组均在给药 30~120 min 内芍药苷血药浓度较高,尤其是给药 60min 后血药浓度达到峰值,对照组平均芍药苷血药浓度为 $41.49 \pm 2.86 \text{ ng}/\mu\text{l}$,实验组为 $116.52 \pm 5.28 \text{ ng}/\mu\text{l}$,但到了 150 min 以后,芍药苷在血中的浓度明显降低;在 30~120 min 实验组与对照组比较,芍药苷血药浓度显著提高 ($P < 0.001$,对照组 AUC 为 $4542.6 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \text{ min}$,实验组 AUC 为 $10698.3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1} \text{ min}$ 。说明血虚证与补血药白芍有效成分芍药苷之间存在病理状态与药物动力学的辨证关系。

参考文献

- 1 陈奇. 中药药理实验方法. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 182, 183.
- 2 郭立玮. 中药药物动力学方法与应用. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 288.
- 3 文爱东. 阿魏酸在微循环障碍(血瘀证)兔体内的药代动力学. 中药药理与临床, 1995; (5): 18-21.
- 4 任平. 四君子汤对脾虚大鼠胃动素及川芎嗪药物动力学特征的影响. 中国中西医结合杂志, 1997; 17(1): 45-47.
- 5 韩国柱. 中草药药代动力学. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 167.
- 6 孙立华, 胡永明, 马建华. HPLC 法测定肝复康中芍药苷的含量. 中国新药杂志, 2002; 11(4): 296.
- 7 吕迁洲, 王新宏, 安睿等. 活血剂中阿魏酸和芍药苷的含量测定. 中成药, 2002; 24(9): 668.

(责任编辑: 刘维杰 张志华)

(上接第 77 页)

他人将该复方中的某些活性物质提取后, 由于已经有人在先将它以指纹谱的方式公开其存在和药用价值而使在后申请失去了新颖性, 由此来阻断他人的恶意开发。

2. 可以解决传统中药复方的新颖性问题。

按现行专利法的规定, 我国传统中药方剂已经处于公开的状态, 即已失去专利法要求的新颖性, 成为公有的现有技术, 任何人都可无偿地对其开发利用。将这一类方剂按传统的工艺或其他的现有技术进行混合, 使之成为该中药复方混合后的提取物, 该提取物由于配伍的相互作用而往往产生了新的化合物, 而并非原有组分的简单相加(这在色谱指纹谱中已得到印证)。这是, 我们以数字化色谱指纹谱来对该提取物进行技术特征的表征, 从而可尝试将已失去“新颖性”的传统中药复方获得现行专利法的保护。

运用指纹图谱来规范中药的质量标准已是国际制药界的一项共识, 美国 FDA 和欧共体对植物药(或草药)的质量检测要求制订指纹图谱检测标准。但如何把指纹图谱技术移植到专利申请文件的撰写中来, 也就是如何用数字化色谱指纹图谱的语言来描述一项发明的技术特征还尚未解决好, 如复方混合液的新颖性问题、充分公开的问题、侵权判定的问题等, 它决不是一个课题所能轻易解决的, 它涉及到专利法或者专利制度的修正和国家对一个行业的保护或是民族利益的保护。我们愿为中医药知识产权保护的理论研究提供一较新的思路。

参考文献

- 1 洪筱坤 王智华. 中药数字化色谱指纹谱. 上海: 上海科学技术出版社, 2003. 18~22, 78~79.
- 2 洪筱坤 王智华. 中药数字化色谱指纹谱. 上海: 上海科学技术出版社, 2003. 259.
- 3 国家食品药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行).
- 4 洪筱坤, 王智华. 中药数字化色谱指纹谱. 上海: 上海科学技术出版社, 2003. 80, 260~261.

(责任编辑: 刘维杰 张志华)

diseases of coronary heart disease. Conclusion: b13 and b23 in the differential genes lead to or participate in lipo – metabolism and the formation of high – viscosity, high polymeric and high – concentration states of blood from different ways and means and are involved in the formation of endothelial damage and arteriosclerosis due to the secretion of inflammatory cell factors and the regulation of cell apoptosis. They are closely related to the pathological change of the blood – stasis diseases of coronary heart disease.

Key Words: coronary heart disease, blood – stasis disease, linkage of symptoms and diseases, relevant genes, differential display, reverse Northern, sequence of clone

Study on Relationship of Dialectic Pharmaco – dynamics between Disease due to Deficiency of Blood and Blood – tonifying Drug Radix Paeoniae Alba

Yang Zuyi, Liu Rongmin and Cheng Jia (Institute of Tumours of Sichuan Province, Chengdu 610041)

Pei Jun, Wan Deguang and Hu Rong

(School of Materia Medica, Chengdu Univeristy of Trditional Chinese Medicine and Materia Medica, Chengdu 610075)

Objective: To explore the relationship of dialectic pharmaco – dynamics between the disease due to the deficiency of blood and blood – tonifying drugs via the comparison of blood concentration of paeoniflroin, the main component of Radix Paeoniae Alba for blood – tonifying drugs, in the body of mice which are healthy and suffer from the disease of blood deficiency respectively. **Method:** To establish models of animals suffering from the disease due to blood deficiency and divide experimental animals into blank control group, control group (healthy mice) and experimental group (model of animals contracting the disease due to blood deficiency), among which mice of control group and experimental group are forced to fill the extracts from Radix Paeoniae Alba into their stomach and then the technology of high performance liquid chromatography is used to test and compare the difference of concentration of paeoniflroin in the blood of the mice at different time. **Result:** The average concentration of paeoniflroin in the blood of the mice of experimental group is $116.52 \pm 5.28 \text{ ng}/\mu\text{l}$ while that of the mice of control group is $41.49 \pm 2.86 \text{ mg}/\mu\text{l}$, assuming remarkable difference between the two groups ($p < 0.001$) and that of the former is notably higher than that of the latter when at 60 min and 90 min. **Conclusion:** the concentration of paeoniflroin in the blood of the mice suffering from the disease due to blood deficiency proves higher than that of healthy mice and this shows that there exists the relationship of dialectic pharmaco – dynamics between the disease due to blood deficiency and blood – tonifying drug Radix Paeoniae Alba.

Key Words: disease due to blood deficiency, blood – tonifying drug, dialectic pharmaco – dynamics

Multi – centrally Clinical Trial of Fuzhenghuayu (Strengthening Healthy Qi to Solve Stagnation) Capsules on Liver Filbrosis Caused by Chronic Hepatitis B

Liu Ping, Hu Yiqang, Liu Cheng, Xu Leiming and Liu Chenghai (Shuguang Hospital, Institute of Liver disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Shanghai 201203)

[World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 135