

枳术丸口服给药后血中移行成分 分析及其定量研究^{*}

王喜军^{**} 陈曦 杨舸 樱井澈朗 (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)
曹洪欣 (中国中医科学院 北京 100700)

摘要:目的:确认枳术丸中有效成分并建立其含量测定方法。方法:应用血清药物化学的方法,对口服枳术丸后血清中移行成分进行分析,并对主要血清中成分在相应的最大吸收波长进行含量测定。结果:口服给药后,大鼠血清中检测到 13 个化合物,其中 6 个为枳术丸中原型成分,7 个为代谢产物;并建立了枳术丸中入血成分柚皮苷、橙皮苷的含量测定方法,其二个成分的加样回收率分别为 101.13%、98.56%。结论:柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷等为枳术丸主要体内直接作用物质,所建立枳术丸中有效成分测定方法能够全面、准确地控制枳术丸的内在质量。

关键词:高效液相色谱法 血清药化学方法 枳术丸 橙皮苷 柚皮苷

枳术丸系张元素根据仲景《金匱要略》治水饮的枳术汤演化而成,方中白术用量倍于枳实,二药为细末,荷叶煎水泛为丸,主治腹胀、心下痞、胃脘痛等症,应用历史悠久^[1]。现代临床主要用于治疗脾胃虚弱,食少不化,脘腹痞满等症,疗效确切,该药已被《中华人民共和国药典(2005版)》收载。基于其良好的临床疗效,作者采用血清药物化学的方法追踪体内直接作用物质,并以其中主要成分作为指标,建立含量测定方法,对枳术丸进行内在质量控制。

一、实验材料

1. 药品与试剂

橙皮苷(批号:110721-200010)、柚皮苷(批号:110722-200309)由中国药品生物制品检定所提供,纯度均在 99%以上;新橙皮苷(批号:9536E)由美国西格玛公司提供;枳术丸由中国中医研究院试验药厂提供;乙腈为色谱纯级,由美国迪马公司提供;其余均为分析纯级。

2 动物

健康 Wistar 大鼠,体重为 200 ±20 g,6 周龄,雌雄

收稿日期:2006-03-07

修回日期:2007-03-21

* 科技部 973 计划基础性工作专项(2001DEA20010):中药材标准及中医临床疗效评价标准,负责人:王永炎。

** 联系人:王喜军,教授,本刊编委,博导,研究方向:中药及复方的血清药物化学研究。Tel:0451-82193010, E-mail:wxj@hljucm.net

不限,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

3. 仪器及色谱条件

Waters高效液相色谱仪,配以 Waters 996 Photodiode Array Detector检测器及 Waters色谱工作站, H66MC型超声波提取器(无锡超声电子设备厂), KDC-40低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

色谱条件:色谱柱:symmetry C18 (5 μ m, 250mm \times 4.6mm, waters公司);流动相:0.095% (v/v)磷酸乙腈溶液(A)-0.095%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,洗脱条件见表-1;流速:1.0mL \cdot min⁻¹;检测波长:200~400nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;柱效以柚皮苷计,理论踏板数应不低于3000。

二、实验方法和结果

1. 枳术丸给药后大鼠血清中成分分析

(1)给药样品制备。取枳术丸粉末,用8倍量甲醇

表 1 洗脱程序表

时间 (min)	A	B
0	0	100
15	10	90
60	25	75
110	80	20

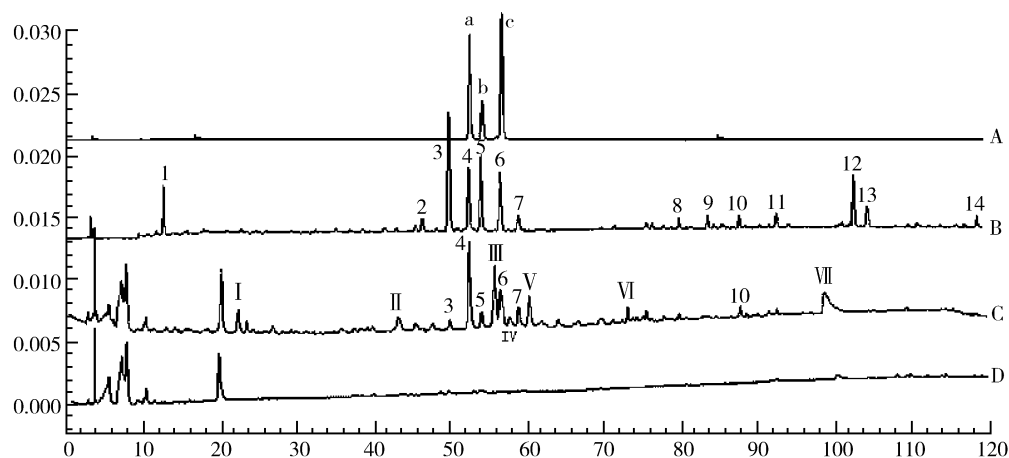


图 1 枳术丸给药后血清样品及相关对照品的高效液相色谱图 (283nm 检测)

A 对照品溶液 B 枳术丸体外对照样品溶液 C 枳术丸给药血清样品溶液 D 空白血清样品溶液

a 柚皮苷 (Naringin) b 橙皮苷 (Hesperidin) c 新橙皮苷 (Neohesperidin)

提取 3 次,提取液减压回收甲醇至干,提取物用 0.2% CMC-Na 水溶液研磨混匀,浓度为 0.24g/mL,备用。

(2)含药血清样品溶液制备。取 Waster 大鼠,禁食 12h (自由饮水),称重,按 20mL/kg 体重灌胃给药,灌胃后 90min,自大鼠肝门静脉取血,血液于 3000rpm 离心 10min,取血清 2mL,用 5 倍量甲醇振荡 2min 沉淀蛋白,甲醇液于 3000rpm 离心 10min,上清液浓缩,残渣加 0.5mL 甲醇溶解,过 0.45 μ m 滤膜,滤液备用。

(3)空白血清样品溶液制备。另取 Wister 大鼠,禁食 12h (自由饮水),称重,按 20mL/kg 体重灌胃 0.2% CMC-Na 水溶液,按含药血清样品溶液制备项下方法操作,制得空白血清样品溶液。

(4)体外对照样品溶液制备。精密称取枳术丸粉末约 100mg,置于锥形瓶中,20mL 甲醇超声提取二次,每次 20min,过滤,合并滤液,减压浓缩,然后用甲醇定容于 10mL 容量瓶内,即得。用时过 0.45 μ m 滤膜。

(5)血清样品及体外样品分析。取含药血清样品溶液、空白血清样品溶液、体外对照样品溶液各 20 μ L 进样分析,枳术丸体外对照样品溶液色谱图中,可检测到 14 个峰 (图 1 B);含药血清经与空白血清溶液比较,入血成分共有 13 个 (图 1 C),通过与体外对照样

品溶液色谱图的 R_t 及紫外光谱比较,认定其中 3、4、5、6、7、10 号峰以原形进入血液,经与对照品色谱图的 R_t 及紫外光谱比较,4、5、6 号峰分别为柚皮苷 (a)、橙皮苷 (b) 和新橙皮苷 (c),上述三种成分将有可能为枳术丸的主体体内直接作用物质。其他峰 (、 、 、 、 、) 疑为枳术丸所含

成分在体内的代谢成分,有待进一步研究证实。

2 枳术丸中体内主要移行成分的含量测定

(1)对照品溶液的制备。精密称取橙皮苷、柚皮苷对照品适量,加入甲醇配成 0.15及 0.4mg/mL的混合对照品溶液。

(2)线性关系考察。精密吸取两种对照品混合溶液 5mL,用甲醇定容于 10mL容量瓶内;并取此对照品溶液进行等倍稀释,配制成不同浓度的对照品混合溶液。取各浓度对照溶液 10 μ l进样分析,以峰面积积分为纵坐标,对照品进样质量为横坐标绘制标准曲线,并进行线性回归,分别得两种对照品的回归方程为:柚皮苷 $Y = 1.7227 \times 10^6 X - 3.6099 \times 10^4$ ($r = 0.9994$),线性范围 0.2543 - 4.0710 μ g;橙皮苷 $Y = 1.7665 \times 10^6 X - 2.3212 \times 10^4$ ($r = 0.9994$),线性范围 0.0918 - 1.4700 μ g。最低检测限按信噪比(S/N)为 3:1时的最低检测量计算,得橙皮苷、柚皮苷的最低检测限分别为 14ng/mL及 15ng/mL。

(3)精密度试验。取对照品混合溶液连续进样 5次,每次进样 10 μ l,测得柚皮苷、橙皮苷含量的 RSD分别为 0.33%及 0.53%。

(4)稳定性试验。取枳术丸样品溶液,分别于 0、3、6、9和 12h进行测定,结果柚皮苷和橙皮苷两个成分峰面积的 RSD分别为 1.74%及 1.72%,表明橙皮苷、柚皮苷两种成分在 12h内稳定。

(5)重现性试验。取 5份样品溶液,分别进样 5次,柚皮苷和橙皮苷含量的 RSD分别为 1.24%及 0.54%。

(6)回收率试验。精密称取同一批枳术丸样品粉末各 0.25g左右,精密加入一定量的橙皮苷和柚皮苷对照品溶液,共制备 6份样品溶液,进行回收率测定。结果柚皮苷和橙皮苷的回收率分别为 101.13%及 98.56%,RSD分别为 1.67%及 1.91%。

(7)样品测定。取样品溶液,按确定的色谱条件进行分析,在拟定的条件下各被测成分与共存成分实现良好分离(图 1A)。在此基础上,以标准曲线法计算样品中成分含量(表 2)。

表 2 枳术丸中两种血中移行成分的测定结果

(mg · g⁻¹, mean \pm SD, n = 5)

批号	柚皮苷	橙皮苷
20040912	11.05 \pm 0.1906	1.23 \pm 0.0201
20050101	12.09 \pm 0.1705	1.10 \pm 0.0230
20041117	11.50 \pm 0.1732	1.28 \pm 0.0214

三、讨论

目前中药质量评价,大多以中药中的主要成分或可测成分来进行,但这些被评价的成分是否是有效成分,能否在体内产生药物活性,往往缺乏科学根据。中药传统的口服给药形式决定了那些被吸收入血的物质才能产生活性,且由于中药的成分复杂,有些成分只有经体内代谢转化方能产生活性^[2]。基于中药成分复杂,体内作用靶点多,单一成分的测定难以真实反映其内在质量。

本研究通过对给药大鼠血清样品的 HPLC分析,发现柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷为主要入血成分,即可能为主要体内直接作用物质。相关研究表明枳术丸中含有的橙皮苷对离体肠管有先兴奋后抑制作用,能降低毛细血管通透性。另外橙皮苷、柚皮苷有抗炎作用,可降低小鼠甲醛性足踝浮肿等作用^[3];说明此两种成分为枳术丸治疗腹胀、心下痞、胃脘痛等的药效物质基础。在血清药物化学的研究也证明橙皮苷和柚皮苷为血中主要移行成分,为此,我们建立了主要体内直接作用物质柚皮苷及橙皮苷的含量测定方法,实现了枳术丸中与药效直接相关的两种主要有效成分的同时检出及含量测定,提高了主要含量测定成分的与质量的相关性,实现了指标性成分测定反映中成药内在质量的目的。

参考文献

- 1 朱鹰,侯俊玲. 试析李东垣对枳术丸的发挥. 山西中医, 2000, 16(2) 44~46.
- 2 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究. 世界科学技术—中药现代化, 2002, 4(2) 1~4.
- 3 蔡逸平. 枳实、枳壳类药材的化学成分及药理研究概况. 江西中医学院学报, 1999, 11(1) 18~19.

A Qualitative & Quantitative Analysis: Migrating Constituents of Zhizhu Pills in Rat Blood*Wang Xijun, Chen Xi, Yang Ge, Ying Jingchelang**(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, 150040 Harbin)**Cao Hongxin**(China Academy of Chinese Medical Science, 100700 Beijing)*

The aim of this analysis is to determine the active compounds of Zhizhu Pills in vivo, and establish an approach to measure the contents using HPLC. Serum pharmacology and RP-HPLC were used to measure the concentration of two main constituents in the oral pills, at a wavelength of 283nm. 13 compounds were detected in the rat blood, after an oral administration of Zhizhu Pills. 6 of them were original in form, and 7 others were metabolites. An approach was created to measure Hesperidin and Naringin, with a respective recovery of 101.13% and 98.56%. It is concluded that Hesperidin, Neohesperidin and Naringin are the main elements that have a direct effect. The established approach is able to stage a comprehensive and accurate quantitative analysis of Zhizhu Pills.

Keywords: HPLC; serum Pharmacology; Zhizhu Pills; Hesperidin; Naringin

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:果德安, 责任译审:邹春申)

(Continued from Page 32)

Methods for Collecting Digital Color Tongue Data*Chen Songhe, Liang Rong, Wang Shenghua**(Department of Traditional Chinese Diagnostics, School of Preclinical Medicine,**Beijing University of Chinese Medicine, 100029 Beijing, China)**Wang Zhaoping**(Medical Examination Center of Beijing Tongren Hospital, 100730 Beijing, China)**Huang Qingmei, Li Bocong**(National Laboratory of Color Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, 100081 Beijing, China)*

This study investigates the methods of collecting color tongue data for digital tongue picture, especially from the process of clinical tongue diagnosis. In the study, an array of methods have been used, including (1) comparing the color of different parts of the tongues in 142 selected digital pictures of light red tongues; (2) sampling different color data in 706 tongue pictures by clinicians. Authors found that (1) the lateral part, the tip, thin white coating, thick white coating, the glistening part, and the shadowy part of the tongue are statistically different; (2) colorimetric data of different tongue colors sampled by clinicians also show statistical differences, with their own independent space in the 3-D color pictures. It is concluded that the methods for collecting color tongue data makes an important guarantee for the subsequent accurate analysis.

Keywords: tongue diagnosis; digital tongue picture; analysis of tongue color; color space; lab color model

(责任编辑:张述庆, 责任编审:张志华, 责任译审:邹春申)

[World Science and Technology Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 57