

通窍活血汤家兔体内移行成分川芎嗪的分析

吴思鹏^{1,2}, 汪 宁^{1,2*}, 张 鑫^{1,2}, 晋齐中^{1,2}
(安徽中医药大学, 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院中药药效与安全性评价研究所, 安徽 合肥 230012)

摘要: **目的** 分析通窍活血汤家兔体内的移行成分川芎嗪。**方法** 采用高效液相色谱法筛选检测波长、萃取剂、生物样品蛋白沉淀剂等处理条件, 检测家兔灌胃通窍活血汤后其血清、脑脊液中川芎嗪, 并与川芎嗪标准品以及空白血清和空白脑脊液等样品进行对照, 确定移行成分中川芎嗪。**结果** 波长设置为 280 nm、川芎药材乙醇提取后采用石油醚萃取和家兔含药血清及脑脊液以甲醇作为蛋白沉淀剂更有利于各样品中川芎嗪的检测。在保留时间为 10.7 min 处, 含药脑脊液和含药血清色谱图中出现了与川芎嗪标准品相同保留时间的色谱峰, 而空白血清和空白脑脊液等样品色谱图相应时间无色谱峰出现。**结论** 通窍活血汤中川芎嗪可通过血脑屏障, 结合川芎嗪神经保护作用的药效学研究, 可确定其为复方的效应成分之一。

关键词: 通窍活血汤; 血清; 脑脊液; 移行成分; 川芎嗪

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)08-1782-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.022

Analysis of tetramethylpyrazine in migrated ingredients from Tongqiao Huoxue Decoction in rabbits

WU Si-peng^{1,2}, WANG Ning^{1,2*}, ZHANG Xin^{1,2}, JIN Qi-zhong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Institute for Pharmacodynamics and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

KEY WORDS: Tongqiao Huoxue Decoction; serum; cerebrospinal fluid; migrated ingredients; tetramethylpyrazine

中药是在中医药理论指导下应用的天然药物^[1], 伴随着中医药的国际化, 解析中药在中医临床应用中发挥独特疗效的药效物质基础已成为迫切需要解决的问题^[2]。目前多以中药的主要成分或指标性成分作为中药复方制剂的质量控制成分, 但其并不完全等同于效应成分, 从而引起某些中药复方药效与制剂质量标准之间缺乏关联性。中药复方作用于生物体后, 机体血液、组织液、淋巴液、脑脊液等体液中新出现的中药源性成分及其在体内的代谢产物和中药复方中的原型成分统称为体内移行成分^[3]。对于作用中枢神经系统的中药或复方, 其进入生物体后, 经由血液循环到达相应靶器官,

但最终与靶细胞结合并发生效应的并非含药血清而是脑脊液。由于血脑屏障的存在, 脑脊液成分与血清成分无论在生理性或是药物成分上都存在着显著差异。中药及复方的神经保护作用与其在体内的移行成分能否通过血脑屏障有很大联系。血脑屏障是血液-脑组织和血液-脑脊液之间的屏障, 严格控制血液中的神经毒性物质、炎症因子、免疫细胞等进入中枢神经系统^[4], 从而维持内环境稳定, 但血脑屏障的存在却限制大多数药物充分进入脑内并维持有效治疗浓度。

通窍活血汤源于《医林改错》, 为清代杰出医学家王清任所创。该方由麝香、川芎、红花、桃仁

收稿日期: 2018-03-05
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773933, 81374005); 安徽省高校学科 (专业) 拔尖人才学术资助项目 (jxbjZD15)
作者简介: 吴思鹏 (1993—), 男, 硕士生, 从事中药药理学研究。Tel: 13865977086, E-mail: wsp199346@sina.com
* 通信作者: 汪 宁 (1970—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药脑血管药理学研究。Tel: (0551) 68129186, E-mail: wn-hefei@163.com

等中药材组成,具有活血通窍之功效,主治面部疾病和神经系统性疾病^[5-7]。麝香在通窍活血汤中为君药,开通诸窍、和血通络,麝香酮是其中主要活性成分。课题组在灌胃通窍活血颗粒后家兔脑脊液中检测到了麝香酮^[8]。川芎在方中为臣药,辛温香燥、活血行气,川芎嗪为其主要活性成分之一,又名四甲基吡嗪,是一种生物碱单体,含有量较低但活性高,研究证实其具有抗血栓、增加脑血流量、改善脑损伤等作用^[9-11]。本研究采用高效液相法检测家兔灌胃通窍活血汤后其血清、脑脊液中的川芎嗪,并与川芎嗪标准品及空白血清、脑脊液进行对照,并结合该成分的神经保护作用药效学研究,最终为确定川芎嗪为该复方的神经保护作用的效应成分提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪、Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);岛津 Shimazu LC-15 高效液相色谱仪(日本岛津公司);JA3003N 型电子精密天平(上海精密科学仪器有限公司);旋转蒸发器(RE-3000)(上海嘉鹏科技有限公司)。甲醇、乙腈为色谱级,其余试剂为分析级,所用水为双蒸水。赤芍、川芎、桃仁、红花、人工麝香(合肥义和堂中药饮片有限公司),药材经安徽中医药大学刘守金教授鉴定为正品。川芎嗪标准品(批号 11817-200305)(中国药品生物制品检定所)。

健康家兔 6 只,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,购于安徽医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(皖)2007-001。适应性饲养 3 d 随机分为空白对照组、通窍活血汤给药组,每组 3 只。

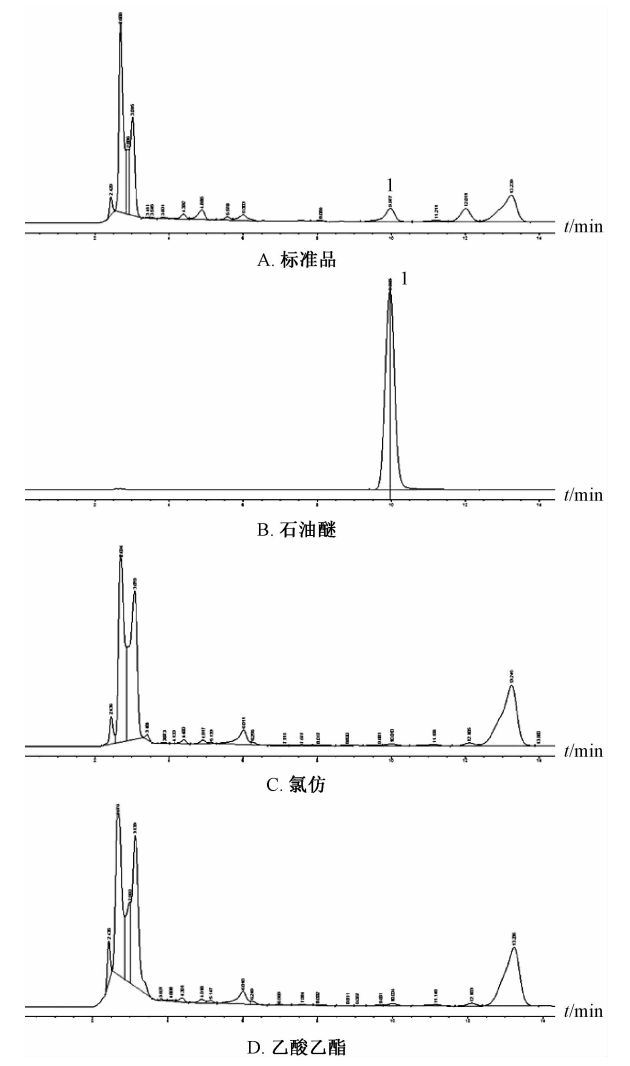
2 方法与结果

2.1 复方及川芎药材中川芎嗪定性检测

2.1.1 色谱条件^[12] Phenomenexluna C₁₈分析色谱柱(4.6 nm×250 mm, 5 μm);甲醇-1%醋酸钠溶液(45:55)为流动相;柱温 25℃;检测波长为 280 nm;检测时间 15 min(川芎乙醇提取物、药材及对照品),20 min(含药血清及含药脑脊液)。

2.1.2 不同溶剂萃取 精密称取 20 g 川芎,粉碎过 20 目筛,加 10 倍量 70% 乙醇浸泡 2 h 再回流提取 2 h,残渣过滤再加 8 倍量 70% 乙醇回流 1.5 h,合并提取液减压浓缩,补水定容至 20 mL,生药质量浓度为 1 g/mL。取 1 mL 提取液于离心管中,石油醚(60~90℃)萃取 4 次,每次 1 mL。氮气吹干,用色谱级甲醇溶解残渣,0.45 μm 微孔滤膜过

滤,定容至 1 mL 得生药质量浓度为 1 g/mL 的石油醚萃取液。重复上述操作,溶剂更换为氯仿和乙酸乙酯。在“2.2.2”项条件下进样得色谱图见图 1。可知川芎嗪标准品与川芎药材乙醇提取物的石油醚萃取样品在 9.97 min 时均有色谱峰的出现,而氯仿和乙酸乙酯在相同时间未见色谱峰,因此采用乙醇提取物的石油醚萃取物用于川芎嗪的检测。复方中川芎嗪的检测样品处理也采用乙醇提取物再经石油醚萃取。



1. 川芎嗪 1. tetramethylpyrazine
图 1 川芎乙醇提取物不同萃取剂下 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of ethanol extract of Chuan-xiong by different extractants

2.1.3 川芎嗪检测 精密称取原方 5 倍量共 160 g,加入 10 倍量 70% 乙醇,浸泡 2 h 后加热回流 2 h。滤过滤渣再以 8 倍量 70% 乙醇回流提取 1.5 h,合并 2 次提取液过滤,滤液减压回收溶剂再以水定容至 160 mL。量取 1 mL 提取液于离心管

中，石油醚萃取 4 次收集萃取液，氮气吹干后甲醇溶解残渣，最后 0.45 μm 微孔滤膜过滤，甲醇定容至 1 mL 作为供试品溶液。在“2.1.1”项条件下进样得色谱图（见图 2）。可知，在 10.4 min 时，川芎和通窍活血汤石油醚萃取样品溶液色谱图中出现了与川芎嗪标准品相同保留时间的色谱峰。重复 3 次实验结果一致。故可确定本实验中使用的川芎及通窍活血汤石油醚萃取物中均含有川芎嗪。

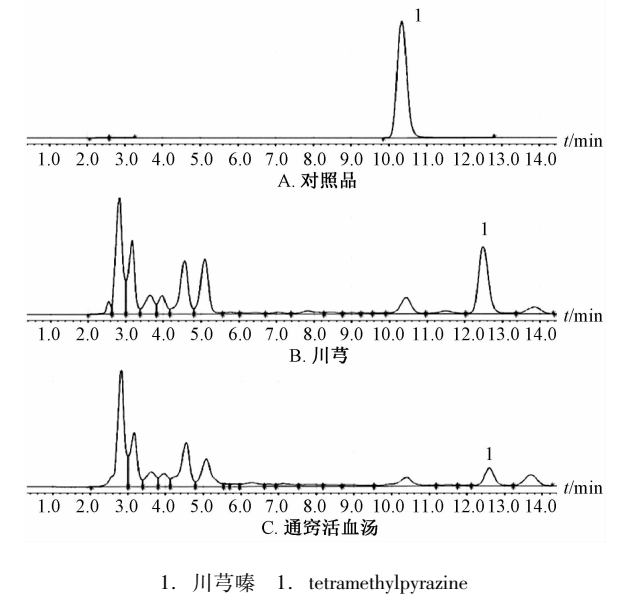


图 2 样品及对照品 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of samples and reference standards

2.2 含通窍活血汤的家兔血清、脑脊液样品处理方法

2.2.1 含通窍活血汤的家兔血清、脑脊液样品制备 按“2.1.3”项下方法提取通窍活血汤。按照给药组和空白对照组进行给药，空白对照组灌胃蒸馏水，给药组按照正常人与家兔剂量进行换算后灌胃通窍活血汤提取液，剂量为 2.7 g/kg，每天 2 次。给药组于第 4 次给药 1 h 后，兔台固定露头，耳缘静脉注射 10% 水合氯醛，观察眼睑及疼痛反射。采用家兔耳中动脉取血，静置 1 h 以上取上清液，装入离心管 5 000 r/min 离心 10 min，取上清液；重复操作合并 2 次离心后上清液。重复上述步骤，合并给药组血清、空白组血清。-20 ℃冻存。取血后家兔头朝下，颅顶部剪毛，沿额顶正中线向枕骨隆突处纵行切开皮肤及皮下组织（约 1.5 cm），显露颅骨，在中线距枕骨隆突 0.5 cm 的两旁约 0.3 cm 处选择操作点（注意避开已暴露的骨皮质内的血管），随即注射器进针吸取脑脊

液^[13]。重复操作，合并给药组与空白组脑脊液。-20 ℃冻存。

2.2.2 含通窍活血汤的家兔血清、脑脊液样品制备与处理 取给药组家兔血清 500 μL，置 2 mL 离心管，加入 3 倍量甲醇，4 ℃涡旋震荡 1 min，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液于离心管，同条件下再离心 1 次，取上清液，合并 2 次上清液。置 -80 ℃冰箱预冻 24 h 后干燥，所得干燥残渣用 100 μL 色谱甲醇溶解，0.45 μm 微孔滤膜过滤。相同方法分别用乙腈、70% 高氯酸处理样品。

2.3 含通窍活血汤的家兔脑脊液和血清中川芎嗪检测 根据家兔含药血清不同处理方法的样品，经高效液相检测筛选结果可得高氯酸沉淀蛋白更为彻底，但在检测时间内仅出现 1 个色谱峰；采用甲醇和乙腈处理虽得到较多的色谱峰，有较高的富集程度分离效果好，但是两者比较无明显优势，但甲醇价廉，因此采用甲醇作为蛋白沉淀剂。家兔含药脑脊液和血清高效液相检测样品按“2.2.1”、“2.2.2”项下甲醇沉淀法处理。在“2.1.1”项条件下进样得色谱图见图 3，可知在 10.7 min 时含药脑脊液和含药血清出现了与川芎嗪标准品相同保留时间的色谱峰，相同时间空白血清和空白脑脊液未出峰。

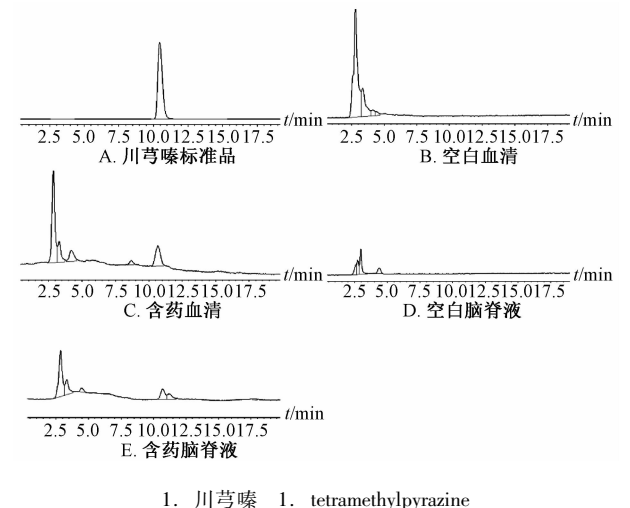


图 3 含药血清及含药脑脊液 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of serum and cerebrospinal fluid

3 讨论

经通窍活血汤及复方中多个单味药多维全息化学特征谱测定发现全方与单味药色谱峰有很大区别，故本实验在对川芎嗪进行液相检测时，兼顾各检测样品特点，采用 70% 乙醇提取物再经石油醚

萃取川芎嗪。

治疗神经系统疾病的中药或复方，药物能否发挥保护作用与其通过血脑屏障进入脑脊液有密切联系，并且检测含药脑脊液可以增加有效成分研究的针对性，尽量减少复杂成分的干扰。为了能保持一定的检测限，且避免脑脊液中蛋白质对检测的干扰，最终选择更为经济的甲醇为本实验血清和脑脊液的蛋白沉淀剂。高效液相检测给药处理后脑脊液、血清与空白脑脊液、空白血清、川芎嗪标准品，HPLC 图发现含药脑脊液、含药血清和川芎嗪标准品在 10.7 min 处均出现相同保留时间色谱峰，而空白血清和空白脑脊液在相同时间均没有色谱峰出现，证实了通窍活血汤中川芎嗪可透过血脑屏障进入脑脊液。

研究^[14-15]证实川芎嗪不仅可以显著改善 PC12 细胞谷氨酸损伤，并能够通过 Rho/Rho-kinase 信号传导损伤通路保护氧糖剥夺损伤脑微血管内皮细胞。从而证明通窍活血汤中的川芎嗪能够通过血脑屏障且对损伤的神经细胞有保护作用，可为通窍活血汤复方制剂的质量标准的建立提供依据。

参考文献：

[1] 闫广利, 孙 晖, 张爱华, 等. 中药血清药物化学研究概况及其理论和方法拓展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3406-3412.

[2] 中药科学与技术的发展战略——香山科学会议第 32 次学术讨论会 [J]. 自然辩证法研究, 1995, 11(11): 64.

[3] 王喜军. 中药血清药物化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.

[4] Kuhlmann C R, Gerigk M, Bender B, *et al.* Fluvastatin prevents glutamate induced blood-brain-barrier disruption *in vitro* [J].

Life Sci, 2008, 82(25-26): 1281-1287.

[5] 芦德银. 观察通窍活血汤治疗脑梗死的疗效 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2015, 3(12): 72-73.

[6] 汪 宁, 邓 奕, 何 群, 等. 通窍活血汤含药血清对谷氨酸损伤的 PC12 细胞的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(10): 1307-1310.

[7] 王清任. 增订医林改错 [M]. 上海: 广益书局出版, 1951.

[8] 汪 宁, 常国洁, 晋齐中, 等. 通窍活血颗粒灌胃家兔后体内血清及脑脊液中麝香酮的分析 [J]. 中药材, 2012, 35(8): 1291-1294.

[9] Yan S, Chen L, Wei X, *et al.* Tetramethylpyrazine analogue CXC195 ameliorates cerebral ischemia - reperfusion injury by regulating endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via Pi3K/Akt signaling [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40 (3): 446-454.

[10] Zhang G X, Zhang F, Zhang T, *et al.* Tetramethylpyrazine nitron improves neurobehavioral functions and confers neuroprotection on rats with traumatic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(11): 2948-2957.

[11] Lin J B, Zheng C J, Zhang X, *et al.* Effects of tetramethylpyrazine on functional recovery and neuronal dendritic plasticity after experimental stroke [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015(7): 1-10.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版二部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1152-1154.

[13] 李惠勉, 李建章, 姚淑芬. 一种实用的采集兔脑脊液方法 [J]. 解剖学杂志, 2000, 23(5): 488.

[14] Yang G, Qian C, Wang N, *et al.* Tetramethylpyrazine protects against oxygen-glucose deprivation-induced brain microvascular endothelial cells injury via Rho/Rho-kinase signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(4): 619-633.

[15] 郭法杰, 汪 宁, 邓 奕, 等. 盐酸川芎嗪对谷氨酸损伤 PC12 细胞的保护作用 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(9): 10-11.