

HPLC 法同时测定大鼠灌胃四物汤后血清阿魏酸和芍药苷含量

沈景芬¹, 金文明¹, 刘 田²

[摘要] **目的:**建立 HPLC 同时测定大鼠灌胃四物汤后血清阿魏酸和芍药苷含量的测定方法。**方法:**24 只大鼠分为空白对照组和四物汤低、高剂量组,各 8 只。空白对照组灌胃蒸馏水,四物汤低、高剂量组分别灌胃生药含量 0.3 g/mL 和 0.6 g/mL 的四物汤,灌胃体积为 10 mL/kg,连续灌胃 7 d。于最后一次灌胃 1 h 后水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,制备含药血清,进行 HPLC 分析,紫外波长 230 nm 处检测。**结果:**阿魏酸和芍药苷的线性回归方程分别为 $Y = 1.0190X - 0.031$ 、 $Y = 1.026X + 0.091$, r 值分别为 0.999 8、0.999 7,线性范围分别为 0.62 ~ 18.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.32 ~ 5.11 $\mu\text{g/mL}$;精密度、专属性、稳定性和提取回收率考查均符合要求;四物汤高剂量组血清中的阿魏酸和芍药苷含量均明显高于四物汤低剂量组 ($P < 0.01$)。**结论:**该方法可以用于同时测定大鼠灌胃四物汤后血清中阿魏酸和芍药苷的含量。

[关键词] 四物汤;阿魏酸;芍药苷;高效液相色谱法

[中图分类号] R 284 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.004

Determination of the serum contents of paeoniflorin and erulic acid in rats treated with intragastric administration of Siwu decoction using HPLC

SHEN Jing-fen¹, JIN Wen-ming¹, LIU Tian²

(1. Lu'an Municipal Food and Drug Inspection Center, Lu'an Anhui 237006;

2. School of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Taipa Macau 519020, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the determination method of the serum contents of paeoniflorin and erulic acid in rats treated with intragastric administration of Siwu decoction using high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods:** Twenty-four rats were randomly divided into the control group, low and high dosage of Siwu decoction groups (8 rats each group). The control group, low and high dosage of Siwu decoction groups were treated with intragastric administration of distilled water, 0.3 g/mL and 0.6 g/mL Siwu decoction (10 mL/kg) for 7 days. The serum in three groups were harvested from abdominal aorta under chloral hydrate anesthesia, and analyzed using HPLC at the 230 nm of wave length. **Results:** The linear regression equation, r value and linear range of paeoniflorin and erulic acid were $Y = 1.0190X - 0.031$ & $Y = 1.026X + 0.091$, 0.999 8 & 0.999 7 and 0.62 to 18.03 $\mu\text{g/mL}$ & 0.32 to 5.11 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The precision, specificity, stability and extraction recovery rate met with the requirement. The serum contents of paeoniflorin and erulic acid in high dosage of Siwu decoction group were significantly higher than those in low dosage of Siwu decoction ($P < 0.01$). **Conclusions:** This method can determinate the serum levels of paeoniflorin and erulic acid in rats treated with intragastric administration of Siwu decoction.

[Key words] Siwu decoction; erulic acid; paeoniflorin; high performance liquid chromatography

四物汤出自《太平惠民和剂局方》,是补血养血的经典之方,由川芎、当归、白芍和熟地黄共四味中药组成^[1]。现代研究^[2-3]表明,四物汤具有抑制血栓形成、改善微循环、促进血管内皮细胞增生、促进血管新生、抗氧化等作用。阿魏酸和芍药苷是四物汤中的主要有效成分^[4-5]。本实验通过 HPLC 法同时测定大鼠灌胃后血清中阿魏酸和芍药苷的含量,建立大鼠灌胃四物汤后含药血清中阿魏酸和芍药苷含量的测定方法,为四物汤补血养血功效的物质基

础研究提供科学依据。现作报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 SD 雄性大鼠 24 只,体质量 230 ~ 260 g,购自广东省实验动物中心,动物合格证书号为 SCXK(粤):2012-002。大鼠购买后先适应性喂养 7 d。

1.1.2 药材及试剂 川芎、当归、白芍和熟地黄均购自安徽省中医院中药房,经安徽中医药大学药学院中药教研室和中药资源教研室周建理教授鉴定为正品。按照四物汤组方(川芎 8 g、当归 10 g、白芍 12 g、熟地黄 12 g)用蒸馏水煎煮 2 次,合并煎煮液,并浓缩至生药含量分别为 0.3 g/mL 和 0.6 g/mL 的浓缩液。

[收稿日期] 2016-06-20

[作者单位] 1. 安徽省六安市食品药品检验中心,237006;2. 澳门科技大学 中医药学院,澳门 氹仔 519020

[作者简介] 沈景芬(1982-),女,主管药师。

芍药苷和阿魏酸对照品购自中国生物制品检定研究院(批号分别为110736-201035、110773-201011),色谱纯磷酸购自上海基准化学试剂有限公司(批号20150311),色谱纯乙腈购自天津彪骑士科技发展有限公司(批号20150912),色谱纯甲醇购自北京京科达瑞科技有限公司(批号20160155)。

1.1.3 仪器 高效液相色谱仪购自 Waters 科技有限公司(2695型),紫外检测器购自 Waters 科技有限公司(2489型)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及含药血清制备 将24只大鼠随机分为空白对照组、四物汤低剂量组和四物汤高剂量组,各8只。空白对照组大鼠灌胃蒸馏水,四物汤低、高剂量组分别灌胃生药含量0.3 g/mL和0.6 g/mL四物汤。3组大鼠均于每天8点和22点分别灌胃,每次灌胃体积为10 mL/kg,连续灌胃7 d。于最后一次灌胃1 h后,水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,静置于不含抗凝剂的采血管中,3 000 r/min离心10 min分离血清,-20℃冰箱中保存备用。

1.2.2 对照品及血清处理 精密称量3.2 mg阿魏酸对照品和10.3 mg芍药苷对照品,分别置于2个100 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度线,混匀备用。

分别精密量取3组大鼠血清1 000 μL于离心管中,加入5 000 μL甲醇混匀,12 000 r/min离心10 min后收集上清液,0.22 μm微孔滤膜过滤后备用。

1.2.3 方法专属性考察 取3组大鼠处理后血清样品,分别加入4.2 μg/mL阿魏酸溶液和2.2 μg/mL芍药苷溶液,进行HPLC分析。色谱条件:Phenomsil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为乙腈:0.1%磷酸(17:83),检测波长为230 nm,流速1 mL/min,柱温30℃,进样量10 μL。

1.2.4 线性关系考察 取处理好的阿魏酸和芍药苷对照品溶液,分别配制0.61、1.22、2.44、4.88、9.76、19.52 μg/mL的阿魏酸溶液和0.32、0.64、1.28、2.56、5.12 μg/mL的芍药苷溶液。取不同浓度阿魏酸和芍药苷溶液各100 μL,氮气吹干,加入100 μL空白对照组血清,混匀,按1.2.2血清处理方法处理,按1.2.3色谱条件进样检测。

1.2.5 精密度考察 根据阿魏酸和芍药苷的线性范围,分别向空白对照组血清中加入适量阿魏酸和芍药苷对照品储备液混匀。配制成阿魏酸浓度为

3.00、10.00、17.00 μg/mL的含药血清,以及芍药苷浓度为1.00、2.50、5.00 μg/mL的含药血清。按照1.2.2方法处理血清,按照1.2.3色谱条件进样,先在1 d内重复测定6次,求日内偏差;再将阿魏酸和芍药苷不同浓度的样品每天测定1次并连续测定6 d,求日间偏差。

1.2.6 提取回收率考察 按1.2.5方法配制浓度为3.00、10.00、17.00 μg/mL的阿魏酸含药血清和浓度为1.00、2.50、5.00 μg/mL的芍药苷含药血清。按照1.2.2方法处理血清样品,按照1.2.3色谱条件进样检测。另外直接取阿魏酸和芍药苷对照品储备液,以甲醇为溶剂,配制成上述相应浓度的阿魏酸溶液和芍药苷溶液,按照1.2.3色谱条件进行检测。比较2种检测方法所得到的阿魏酸和芍药苷3种不同浓度的峰面积。

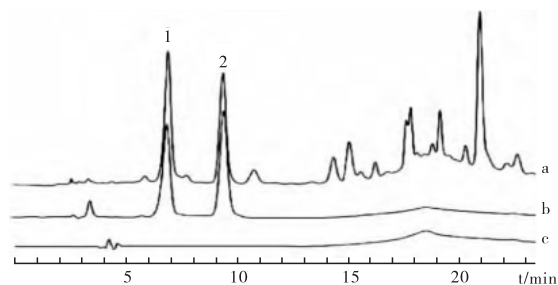
1.2.7 稳定性考察 按照1.2.5方法配制浓度为3.00、10.00、17.00 μg/mL的阿魏酸含药血清和浓度为1.00、2.50、5.00 μg/mL的芍药苷含药血清。将不同浓度的阿魏酸和芍药苷含药血清分别放置0、2、4、6、8、10、12 h。再按照1.2.2方法处理样品,1.2.3色谱条件进行检测。

1.2.8 血清样品检测 取3组大鼠的血清样品按照1.2.3色谱条件进样,分别检测阿魏酸和芍药苷峰面积,再按照阿魏酸和芍药苷的线性回归方程计算血清中的阿魏酸和芍药苷的浓度。

1.3 统计学方法 采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 方法专属性考察 结果显示,在芍药苷和阿魏酸出现色谱峰前后没有其他色谱峰,且芍药苷和阿魏酸色谱峰之间的分离度 $R > 1.5$,提示该色谱条件下同时检测血清中的阿魏酸和芍药苷具有较好的专属性(见图1)。



1: 阿魏酸; 2: 芍药苷

a: 含药血清; b: 混合对照品血清; c: 空白血清

图1 方法专属性考察HPLC图

2.2 线性关系考察 以峰面积为纵坐标,以浓度为

横坐标,得到大鼠血清中阿魏酸和芍药苷的回归方程分别为 $Y = 1.0190X - 0.031$ 、 $Y = 1.026X + 0.091$, r 值分别为 0.999 8、0.999 7,线性范围分别为 0.62 ~ 18.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.32 ~ 5.11 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 精密度考察 芍药苷和阿魏酸低、中、高 3 个浓度的日内精密度和日间精密度 RSD 最低为 0.99%,最高为 2.39%,说明仪器的精密度良好(见表 1)。

2.4 提取回收率考察 结果表明,低、中、高 3 个浓度的阿魏酸和芍药苷的提取回收率均在 98% ~ 102% 之间,说明该方法提取回收阿魏酸和芍药苷良好(见表 1)。

2.5 稳定性考察 结果表明,12 h 内血清中阿魏酸和芍药苷的低、中、高 3 个浓度的稳定性 RSD 最低为 0.63%,最高为 1.10%,说明该方法重复性良好(见表 1)。

表 1 阿魏酸和芍药苷的精密度、提取回收率、稳定性(%)

浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度 RSD	日间精密度 RSD	提取 回收率	稳定性 RSD
阿魏酸				
3.00	1.23	1.67	98.12 \pm 1.31	0.87
10.00	1.45	0.99	101.06 \pm 1.27	0.92
17.00	1.31	1.56	99.47 \pm 1.02	1.01
芍药苷				
1.00	1.42	1.48	99.53 \pm 1.01	0.67
2.50	1.61	2.01	100.56 \pm 1.25	0.63
5.00	1.30	2.39	98.72 \pm 0.98	1.10

2.6 血清样品检测 结果表明,四物汤高剂量组大鼠血清中的阿魏酸和芍药苷含量均显著高于四物汤低剂量组($P < 0.01$)(见表 2)。

表 2 四物汤高、低剂量组大鼠血清中阿魏酸和芍药苷含量比较($\bar{x} \pm s$; $\mu\text{g/mL}$)

分组	n	阿魏酸	芍药苷
四物汤低剂量组	8	3.13 \pm 0.23	2.87 \pm 0.12
四物汤高剂量组	8	5.09 \pm 0.35	4.56 \pm 0.22
t	-	13.24	19.07
P	-	<0.01	<0.01

3 讨论

四物汤是我国中医药补血养血的经典方,关于四物汤的现代临床应用已有诸多报道^[6-7],均提示四物汤有很好的临床疗效,同时,也有很多药理学研

究的相关报道^[8-9],然而关于四物汤物质基础的研究仍然较少。阿魏酸和芍药苷是四物汤中主要的有效成分,关于四物汤给药后血清中阿魏酸和芍药苷浓度的检测少见报道。中药成分复杂,而中药复方的成分则更为繁杂,为中药及中药复方物质基础的研究带来很大的困难,一方面阻碍了四物汤养血补血科学内涵的揭示,另一方面也阻碍了四物汤的创新应用。HPLC 法具有速度快、结果准确、特异性强、检测限低、可定量研究等特点^[10],因此,本研究采用 HPLC 法同时检测大鼠灌胃四物汤后血清中的阿魏酸和芍药苷的含量。

3.1 检测波长的选择 本研究使用二极管阵列检测器在 200 ~ 400 nm 范围内进行扫描,结果表明,阿魏酸和芍药苷分别在 320 nm 和 230 nm 波长处具有最大吸收,而使用 230 nm 作为检测波长时,阿魏酸同样有很好的响应信号,因此,最终选择该波长作为检测波长。

3.2 流动相的选择 预实验过程中,我们分别选择了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.5% 冰乙酸、乙腈-0.1% 磷酸为流动相,结果表明,选择乙腈-0.1% 磷酸为流动相,且二者比例为 17:83 时色谱分析效果最好。

3.3 HPLC 方法学考察 空白对照组血清在保留时间 6.8 min 和 9.3 min 处均没有吸收峰存在。而在空白血清中加入芍药苷和阿魏酸对照品溶液后,在保留时间 6.8 min 和 9.3 min 处均出现吸收峰;大鼠含药血清在以上保留时间处也均出现吸收峰,说明本研究的检测条件可以检测到含药血清中的芍药苷和阿魏酸。经考察,阿魏酸和芍药苷线性范围分别为 0.62 ~ 18.03 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.32 ~ 5.11 $\mu\text{g/mL}$,而四物汤高、低剂量组血清中阿魏酸和芍药苷含量均在此检测限以内,因此,可以使用阿魏酸和芍药苷的回归方程。此外,阿魏酸和芍药苷 3 个浓度的日内精密度和日间精密度均符合要求,说明阿魏酸和芍药苷在本研究期间的精密度符合要求;其回收率、稳定性经考察后亦均符合要求,说明该方法可以准确检测大鼠灌胃四物汤后血清中阿魏酸和芍药苷含量。

3.4 四物汤高、低剂量组大鼠灌胃剂量的选择 阿魏酸和芍药苷是四物汤中的活性成分,有研究^[11-13]表明,阿魏酸和芍药苷单体在增强机体免疫、改善血液流变学、改善心脑血管功能等方面具有药理活性,且这些药理活性与阿魏酸和芍药苷的剂量呈正相关关系。文献^[14-16]报道,大鼠在灌胃 4 倍和 8 倍临床

剂量时具有增强机体免疫、改善血液流变学、改善心脑血管功能等药理活性,且 8 倍临床剂量的药理活性显著好于 4 倍临床剂量。因此,本研究中四物汤高、低剂量组大鼠的灌胃剂量分别为临床用量 8 倍量和 4 倍量。研究结果显示,四物汤高剂量组大鼠血清阿魏酸和芍药苷含量显著高于低剂量组。此外,药理活性和含药血清中的阿魏酸和芍药苷含量具有相似趋势,或可在一定程度上佐证阿魏酸和芍药苷是四物汤药理学作用的物质基础,但四物汤成分复杂,证实上述结论还需进一步实验验证。

[参 考 文 献]

- [1] 金光石,金元哲. 传统中药四物汤对缺血性脑损伤的影响[J]. 时珍国医药,2009,20(7):1753.
- [2] 李子清,喻凯,赵焕英,等. 四物汤对血管性痴呆大鼠的认知功能及脑组织中 AChE、SOD、GSH-Px 活性的影响[J]. 中药药理与临床,2007,23(3):4.
- [3] 张荣桃. 四物汤的现代研究进展[J]. 北京中医药,2012,31(1):73.
- [4] 赵秀花,郑茂东,龙卿,等. HPLC 测定四物汤中阿魏酸的含量[J]. 河北医药,2012,41(13):2049.
- [5] 王玉华,魏英勤,王伟,等. RP-HPLC 测定四物汤中芍药苷的含量[J]. 中成药,2005,28(8):910.
- [6] 李健. 中药加味四物汤治疗骨性关节炎的临床疗效观察[J]. 内蒙古中医药,2015,34(12):10.

- [7] 黄琪,雷鹏,李新中,等. 四物汤配方颗粒汤剂治疗血虚证临床疗效观察[J]. 时珍国医药,2015,26(1):127.
- [8] 蒋逸,马增春,黄先菊,等. 四物汤对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响[J]. 中国中药杂志,2015,61(5):933.
- [9] 王正引,郭明章,全世建. 四物汤对血虚证小鼠肝细胞凋亡以及凋亡相关基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(6):2219.
- [10] 郭晨旭,钱军,李靖,等. 高效液相色谱法确定兔人参药物血清制作中的灌药周期研究[J]. 蚌埠医学院学报,2015,40(6):701.
- [11] 梁娜,孙少平,罗跃娥,等. 阿魏酸的研究进展[J]. 黑龙江中医药,2009,52(3):39.
- [12] 高向东,吴梧桐. 当归及其成分阿魏酸对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国生化药物杂志,1994,19(2):107.
- [13] 孙丽荣,曹雄,侯凤青,等. 芍药苷研究进展[J]. 中国中药杂志,2008,54(18):2028.
- [14] 韩岚,季兆洁,陈卫东,等. 四物汤对血管性痴呆大鼠的神经保护作用及其机制研究[J]. 安徽中医药大学学报,2015,34(4):69.
- [15] 郑传柱,贾梅,张丽,等. 胶艾汤与四物汤对血瘀模型大鼠活血功效的比较研究[J]. 中草药,2014,45(18):2652.
- [16] 李子清,喻凯,赵焕英. 四物汤对血管性痴呆大鼠脑组织中 BDNF 和 EGF 的影响[J]. 中药药理与临床,2008,24(6):10.

(本文编辑 卢玉清)

(上接第 1304 页)

气时全部 Q_s/Q_t 可达到 20% ~ 40%, Q_s/Q_t 增加是导致低氧血症的重要因素之一^[11]。本研究结果表明,右美托咪定静脉输注可改善单肺通气大鼠 Q_s/Q_t ,降低 Q_s/Q_t ,改善氧合。

通过本研究,我们发现与 O 组大鼠相比,I 组大鼠肺组织 HO-1 表达升高,提示雾化吸入右美托咪定减轻大鼠单肺通气所致肺损伤的机制可能与其上调肺组织 HO-1 的表达有关。至于雾化右美托咪定上调肺组织 HO-1 表达的具体机制有待进一步研究。

综上所述,雾化吸入右美托咪定可减轻大鼠单肺通气所致肺损伤,其机制可能与上调肺组织 HO-1 的表达有关。

[参 考 文 献]

- [1] PINHU L, WHITEHEAD T, EVANS T, *et al.* Ventilator-associated lung injury[J]. Lancet,2003,361(9354):332.
- [2] 朱小兵,刘志群,吴论,等. 雾化吸入右美托咪定对大鼠单肺通气炎症反应的影响[J]. 河北医药,2014,36(9):2742.
- [3] KIRKBY KA, ADIN CA. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications [J]. Am J Physiol Renal Physiol,2006,290(3):563.

- [4] 冯惠民,李延坤,吕帅国,等. 七氟醚预处理对大鼠单肺通气时肺组织血红素氧合酶-1 表达的影响. 中华麻醉学杂志[J]. 2012,32(2):232.
- [5] 王同春,高鸿,周菁,等. 丙泊酚对大鼠单肺通气时代谢酶的影响[J]. 中国医学创新,2012,3(13):6.
- [6] 马铭,袁耀宗,刘建生,等. 重组人生长激素联合支链氨基酸对肝硬化患者肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-10 的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2015,40(3):357.
- [7] 温雪萍,王忠慧,丁梅芬. 慢性阻塞性肺疾病患者血清中白细胞介素-10、肿瘤坏死因子- α [J]. 中国医学创新,2012,9(18):19.
- [8] 吕婧,贺新刚,黎锡镇,等. 肾上腺素 α_2 受体调控 MAPK 通道对 VILI 大鼠肺部炎症的影响[J]. 实用医学杂志,2011,27(22):4037.
- [9] SCHREIBER T, NIEMANN C, SCHMIDT B, *et al.* A novel model of selective lung ventilation to investigate the long-term effects of ventilation-induced lung injury[J]. Shock,2006,26(1):50.
- [10] DURANTE W. Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis[J]. Front Biosci,2011,17(1):2372.
- [11] 徐启明. 临床麻醉学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2005:206.

(本文编辑 姚仁斌)