· 中药研究 ·

不同时间点黄芪当归药对含药血清成分含量的研究

宋紫琼[1],李蝶[2],管艳云[3],赵珊[2],钱卫斌[4],蔡欣蕊[1]*

(1. 山东第一医科大学 山东省医学科学院,山东省职业卫生与职业病防治研究院,山东 济南 250062;
2. 山东中医药大学第一临床学院,山东 济南 250014;3. 山东第一医科大学附属省立医院中毒与职业病科,山东 济南 250021;4. 山东中医药大学附属医院肺病科,山东 济南 250011)

摘要 目的:通过靶向代谢组学(LC-MS)测定不同时间点黄芪当归药对含药血清中主要活性成分含量,以期为后续选取最适宜的时间点制备含药血清进行体外实验提供参考依据。方法:将芪归药对中药饮片熬制成药液对大鼠进行灌胃,每日灌胃 2 次,于第 3 天、第 7 天末次灌胃 0.5、1、1.5、2 h 后对大鼠进行腹主动脉无菌采血制备含药血清。采用 LC-MS 构建不同采血时间下含药血清的总离子流色谱图(TIC 图),根据 TIC 图特征峰的峰面积计算黄芪当归药对含药血清中黄芪的有效成分黄芪甲苷和当归的有效成分阿魏酸的含量。结果:黄芪甲苷含量测定结果显示,第 7 天 2 h 后(S2)含量最高,第 7 天明显高于第 3 天;阿魏酸含量测定结果显示,第 3 天 0.5 h 后(T0.5)和第 7 天 0.5 h(S0.5)组含量较高,第 7 天含量明显高于第 3 天。结论:制备芪归药对含药血清的最佳取血时间为给药 7 d 于末次灌胃 2 h 后取血,以期为后续体外实验提供参考。

关键词 黄芪当归药对;血清药理学;含药血清;靶向代谢组学

中图分类号:R285.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1002-2392(2025)09-0033-06

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.250183

中药血清药理学是指将中药或复方经口给动物灌服一定时间后采集动物血液、分离血清,以含药血清代替中药粗提物作为药物源加入离体反应系统中从而研究其药理作用的一种半体内实验方法[1]。中药及其复方化学成分复杂多样,给药后在生物体内经血液循环起到一定作用,其有效物质会以血液为介质输送到相应靶点,产生相应药理作用。阐明中药药效物质基础,找到适用于研究中药复杂体系的方法,一直是中药及其复方研究的难点和关键问题。

含药血清的制备方法是中药血清药物化学研究的关键步骤,直接影响含药血清中有效成分的种类和含量,进而影响含药血清的药理作用和分析结果[2]。首先要解决供体动物的选择,常选用同种属或代谢行为类似的动物,可以缩小或避免动物和人、动物和动物之间的种间差异对血药成分、浓度等造成的影响[3]。含药血清中的血药浓度可以直接反映当时机体的血药浓度,实验动物给药剂量和血药浓度决定了含药血清的量效。目前研究实验中比较公认的方法主要是根据临床等效剂量公式设计给药剂量,根据人的等效剂量换算:给药剂量 = 临床用药量 × 动物等效剂量系数(按体表面积) × 培养基内血清稀释度[4]。中药复方的常用给药途径是水溶液或混悬液口服(灌胃)给药,随着新剂型的不断出现,也可尝试通过注射、皮肤、黏膜、呼吸等途径给药。理想给药时间应按药物的半衰期间隔给药,从而保证在血药浓度最高峰期间采血[5]。依实验所用药物与目的不同,采血方法也不同,多使用动脉取血(腹主动脉、股动脉、颈主动脉等)、眼眶取血、心脏取血、尾静脉取血几种方式[6]。

现代研究中含有黄芪的中医经典名方及复方制剂均把黄芪甲苷作为质量控制的关键成分[7]。当归的主要药理活性成分是阿魏酸,它是中国药典(2020 年版)当归药材与饮片的含量检测指标,是当归质量控制的指标成分[8-9]。本研究将芪归药对中药饮片熬制

收稿日期:2024-08-13 **修回日期**:2025-03-28

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81904143,81704071);国家自然科学基金面上基金项目(82274478)

作者简介:宋紫琼(2000-),女,硕士研究生,主要从事中医药治疗肺系疾病的研究。

*通信作者:蔡欣蕊(1985-),女,博士,主治医师,主要从事中医药治疗肺系疾病的研究。

成药液对大鼠进行每日 2 次灌胃给药，于第 3 天、第 7 天末次灌胃 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 后进行腹主动脉无菌采血以制备含药血清，通过靶向代谢组学检测含药血清中黄芪甲苷和阿魏酸的成分含量，确定不同采血时间下黄芪当归含药血清的最佳制备方法，以期为后续体外实验提供参考。

1 实验动物与材料

1.1 实验动物

SPF 级健康 SD 雄性大鼠 36 只，体重约 180 ~ 200 g，购买于济南朋悦实验动物繁育有限公司，许可证：SCXK(鲁)20190003。动物房恒温(25 ± 2)℃、恒湿(50 ± 5)%，12 h 交替昼夜循环，适应性饲养 1 周，自由饮水进食。本实验方案经山东省职业卫生与职业病防治研究院的实验动物福利伦理委员会批准执行。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 仪器

本实验所用的仪器主要有 TGL - 16 高速冷冻离心机(湖南湘仪)、涡旋振荡仪(湖南湘仪)、移液枪(力辰科技)、水浴锅(力辰科技)、液相色谱 WatersAcquityUPLC、质谱 ABSCIEX5500Qtrap - MS。

1.2.2 药品

黄芪、当归中药饮片均购自山东中医药大学附属医院药房。对照品黄芪甲苷、阿魏酸标准品购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2.3 试剂

甲醇、乙腈均购自美国 sigma 公司色谱级试剂；甲酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 血清样品采集与制备

36 只大鼠随机分为 9 组，空白组(Control，C)，第 3 天(Third day，T)和第 7 天(Seventh day，S)末次灌胃后 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 组，分组分别为 T0.5、T1、T1.5、T2、S0.5、S1、S1.5、S2。以成人每日临床用量作为等效剂量，高剂量为成人等效剂量的 2 倍。按动物体重折算系数公式换算(B 种动物的剂量 mg/kg = $W \times$ A种动物的剂量 mg/kg，查表得人大鼠折算系数 W = 6.3，成人体质量按 70 kg 计算)，计算出灌胃组大鼠每日用药剂量为 2 g/100 g，每 100 g 大鼠灌胃 1 mL，每天 2 次，分别于第 3 天、第 7 天末次灌胃后 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 腹主动脉无菌采血，离心 1 000 r/min、10 min，取上清液混匀，空白组大鼠以同样方式进行采血，离心共得到 9 组血清样本。将血清于 56 ℃恒温水浴锅中灭活 30 min，其间轻轻平摇；于超净台内对提取血清进行除菌操作，用 0.22 μm 滤器进行过滤后分装于 1.5 mL 无菌 EP 管中放置 - 80 ℃冰箱保存备用。

2.2 血清样品处理

将血清样本于 4 ℃冰箱解冻后，取样本 100 μL 置于 1.5 mL 离心管内，然后加入 200 μL 甲醇，漩涡混合 1 min，于 4 ℃温度下超声 30 min，离心 15 min 取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤，随后上机作 LC - MS/MS 分析。

2.3 标准品溶液的配制

精密称取黄芪甲苷和阿魏酸标准品适量，使用 50% 甲醇稀释黄芪甲苷和阿魏酸标准品成浓度分别为 0.078、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10 ng/mL 的混合对照品溶液。

2.4 仪器参数

2.4.1 色谱条件

使用 AcquityUPLCHSST3 (1.8 μm，2.1 mm × 100 mm) 色谱柱；UPLC - Qtrap - MS 方法，柱温：40 ℃、流速：0.30 mL/min 为色谱分离条件；流动相组成为 A - 水(0.01% 甲酸)，B - 乙腈(0.01% 甲酸)；运行时间为 5 min；进样量为 6 μL。具体的样本梯度洗脱程序详见表 1。

表 1 样本梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	乙腈比例/%
初始	0.300	10.0
1.00	0.300	10.0
2.00	0.300	90.0
3.00	0.300	90.0
4.00	0.300	10.0
5.00	0.300	10.0

2.4.2 质谱条件

离子源(Ion Source)：ESI 离子源；气帘气(CurtainGas)：35 arb；碰撞气(CollisionGAS)：9 arb；离子喷雾电压(IonSprayvoltage)：4500 V；离子源温度(Temperature)：450 ℃；离子源气体(IonSourceGas1)：55 arb；离子源气体(IonSourceGas2)：55 arb。

2.4.3 MRM 采集参数

按照表 1 样本梯度洗脱程序色谱及质谱条件，将配制好的标准品溶液加入进样瓶中，进样；物质峰确定的保留时间见表 2。

表 2　质谱 MRM 采集参数

Q1	Q3	保留时间/min	化合物	DP	CE	CXP
785.5	143	2.78	黄芪甲苷	70	20	10
193	134	2.65	阿魏酸_1	−50	−21	−9
193	178	2.65	阿魏酸_2	−63	−15	−10

3　结果

3.1　标准曲线绘制

以目标物的浓度为横坐标、以目标物的峰面积为纵坐标进行线性回归，黄芪甲苷的标准曲线为 $y = 20\,762x + 148.05$，阿魏酸的标准曲线为 $y = 59\,774x + 632.78$，且 R^2 均 > 0.99，说明标准曲线的线性关系较好，可用于样本中两种物质浓度的计算。

3.2　不同取血时间黄芪甲苷含量测定

通过将 9 组血清样本 TIC 图中特征峰的峰面积代入黄芪甲苷标准曲线中，计算得到含药血清中黄芪甲苷的成分含量。分析数据折线图（图 1）和 TIC 图（图 2～4）可知，相较于空白血清，S 组、T 组中黄芪甲苷含量整体水平明显上升，表明通过灌胃给药的方式可以使黄芪甲苷在大鼠胃肠道中经历吸收、分布、代谢和排泄等过程。T 组中，T1 组含量达到峰值，T0.5、T1.5 两组差异较小，T2 组含量最少；S 组中黄芪甲苷整体含量水平明显高于 T 组，血清中的含量在各时间点波动较明显，S 组中 S0.5 组含量最低，S1 组含量高于 S1.5 组，S2 组含量达到峰值。这表明，黄芪甲苷的含量在血清中会随着时间的推移而变化，给药 7 d 末次灌胃 2 h 后取血，大鼠含药血清中黄芪甲苷的含量最高。

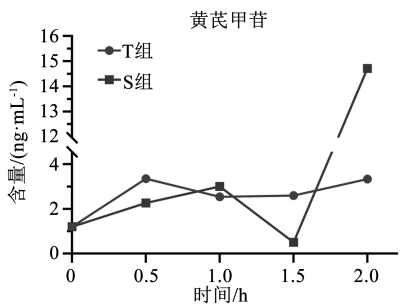


图 1　各组含药血清中平均黄芪甲苷含量测定折线图

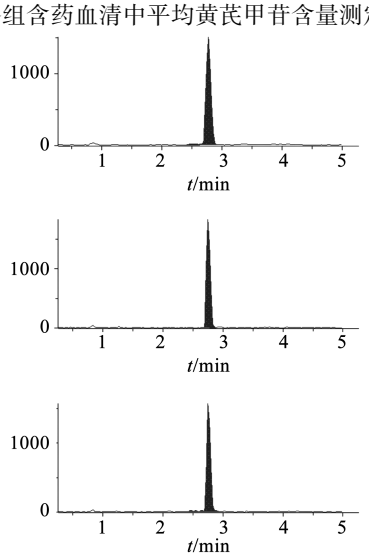
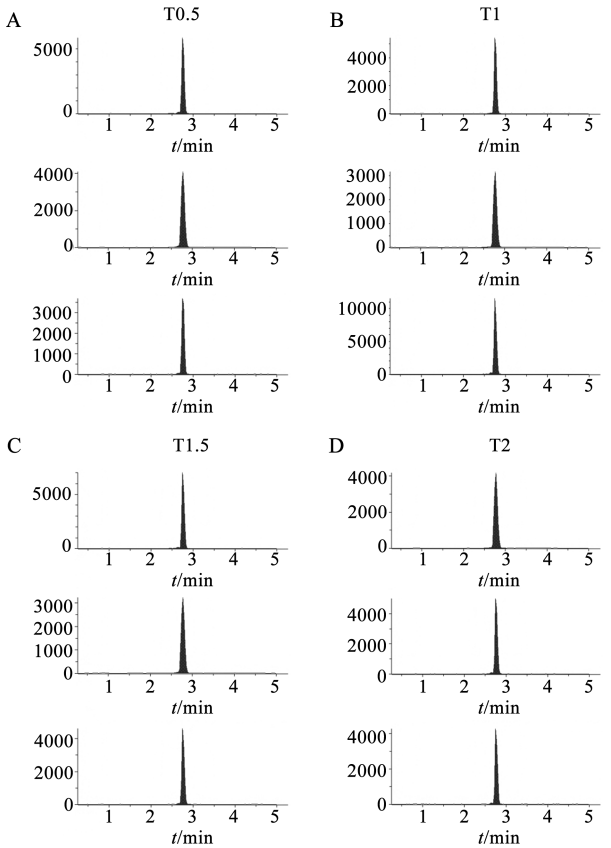
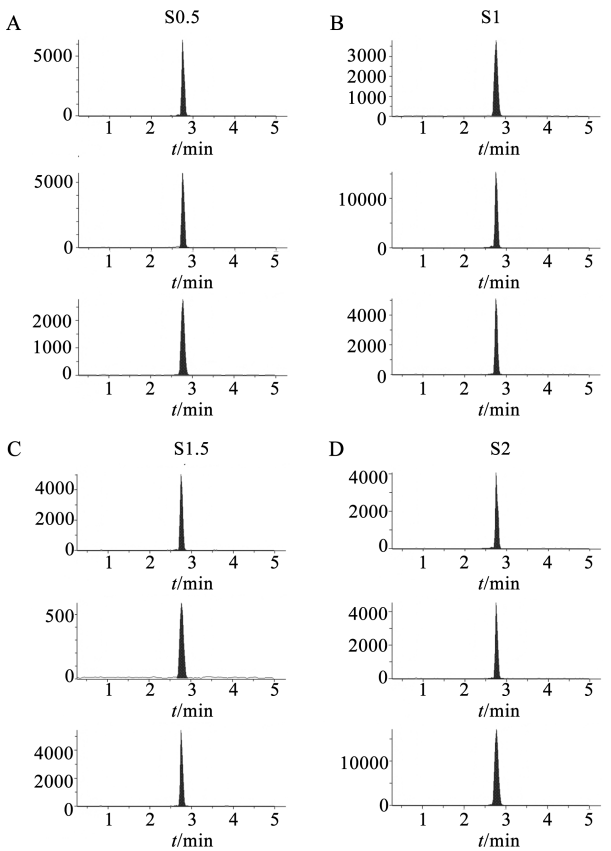


图 2　血清中黄芪甲苷成分含量 TIC 图



注：A. T0.5 组；B. T1 组；C. T1.5 组；D. T2 组。

图 3　3 d 含药血清黄芪甲苷成分含量 TIC 图



注：A. S0.5 组；B. S1 组；C. S1.5 组；D. S2 组。

图 4　7 d 含药血清黄芪甲苷成分含量 TIC 图

3.3　不同取血时间阿魏酸含量测定

通过将 9 组血清样本 TIC 图中特征峰的峰面积代入阿魏酸标准曲线计算含药血清中阿魏酸的成分含量，分析数据折线图（图 5）和 TIC 图（图 6 ~ 8）可知，相较于空白清血，T 组中 T1、T1.5、T2 三组中阿魏酸含量与 C 组相比差异较小；T 组中 T0.5 组含量最高，T1、T1.5、T2 组含量较低且差异较小；S 组阿魏酸含量整体水平明显高于 T 组，S1、S1.5、S2 组含量较平均，S0.5组成分含量最高且与 T0.5 组含量差异较小。这表明，通过灌胃给药的方式可以导致阿魏酸在大鼠胃肠道中经历吸收、分布、代谢和排泄等过程，其含量在血清中会随着时间的推移而变化，给药 3 d 与给药7 d 在末次灌胃 0.5 h 后取血所制备的含药血清中阿魏酸含量相差较小，但整体水平显示，给药 7 d 含药血清中阿魏酸含量整体水平高于给药 3 d。

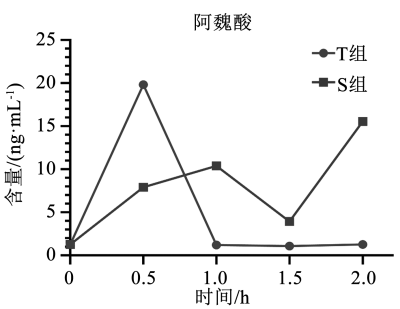


图 5　各组含药血清中平均阿魏酸含量测定折线图

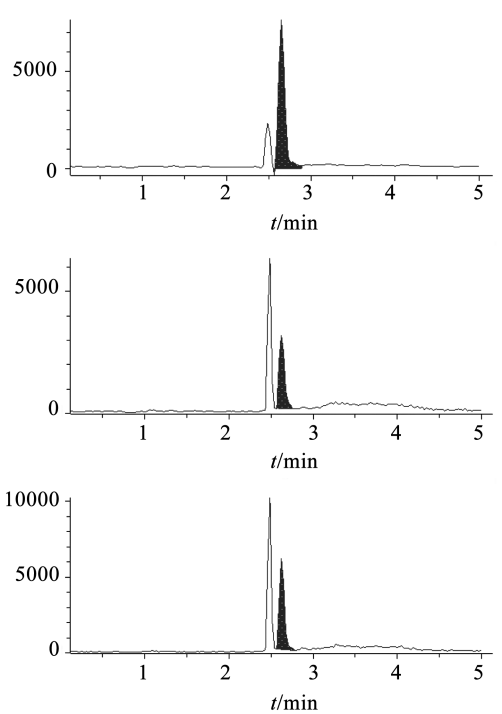
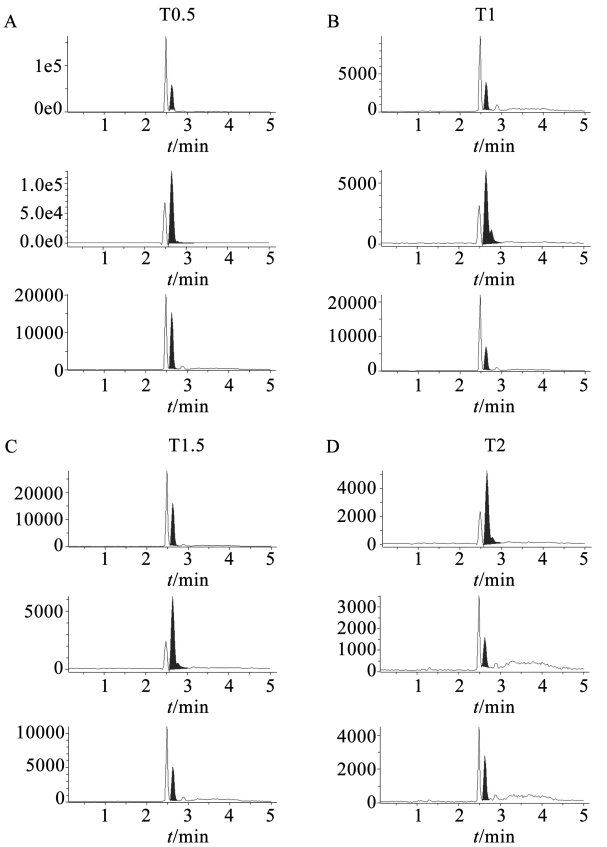
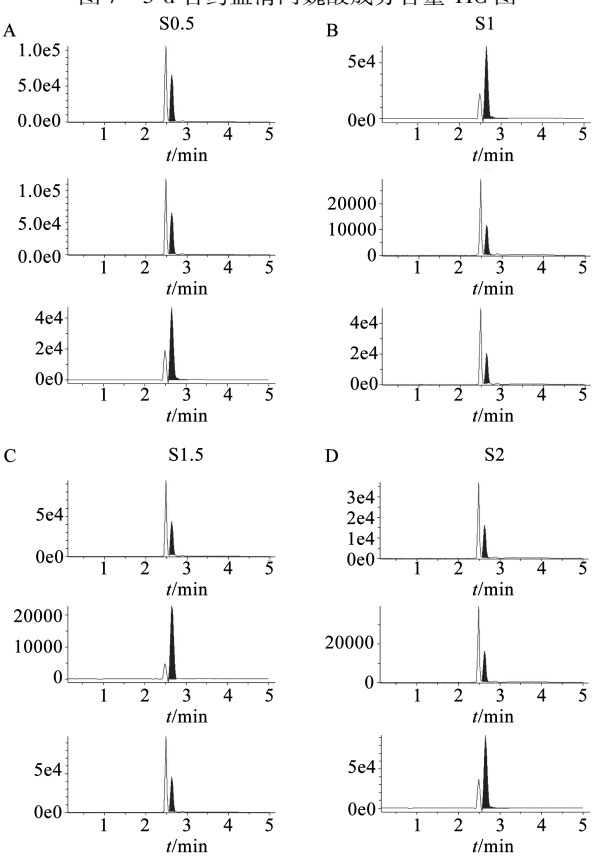


图 6　血清中阿魏酸成分含量 TIC 图



注：A. T0.5 组；B. T1 组；C. T1.5 组；D. T2 组。

图 7　3 d 含药血清阿魏酸成分含量 TIC 图



注：A. S0.5 组；B. S1 组；C. S1.5 组；D. S2 组。

图 8　7 d 含药血清阿魏酸成分含量 TIC 图

4 讨论

南北朝时期徐之才所著的《药对》最早记载“药对”一名,也称“对药”或“姊妹药”,是中药与方剂之间的桥梁,是历代医药学家长期医疗实践并被证明行之有效的药物组合,遵循中医药基本理论而形成的中医临床常用的遣药组方配伍形式,其配伍理论体现了中药配伍的基本特征和方剂组成的核心内涵[10-11]。《神农本草经》中当归、黄芪被列为上品,补气圣药黄芪性温,味甘,以排脓治痈为主[12],当归则“治妇人漏下,绝子”,为补血调经要药,有“血中圣药”之称[13]。黄芪当归药对在历代临床用药中作为气血配伍的经典药对,作为核心配伍,用于补气生血、气血双补[14]。因此,我国历代中医医家治疗气虚血弱诸证遣方用药时常用黄芪当归配伍组成药对。

《中国药典》规定黄芪甲苷和阿魏酸是黄芪和当归的指标性成分。黄芪甲苷是黄芪中的主要单体活性物质,也是评价黄芪质量的主要指标和发挥药效的物质基础,具有抗炎、抗纤维化、抗肿瘤和调节免疫等多种药理作用[15]。阿魏酸是当归中活血止痛的重要物质基础,具有改善心肌缺血、抑制胶原和血小板聚集等药理作用[9]。

中药血清药理学作为一种新型的、科学的实验方法,现阶段多被用于体外实验,以含药血清作为药物直接加入离体反应体系中。相较于以往单纯的中药粗提制剂直接作用于体外实验,血清药理学在中医药复方药理机制的研究中显示出明显优势,通过模拟药物在体内代谢和吸收过程,研究其药效和作用机制,既能防止中药粗提制剂的杂质、渗透压、酸碱度等理化性质对体外实验的干扰,又能真实反映血药浓度下药物与机体的作用规律,直接体现中药及中药代谢产物的药理作用[14]。含药血清的应用领域是中药血清药物化学研究的目的和价值所在,近年来,中药血清药物化学作为重要的干预手段得到了国内外学者的广泛关注和应用,比如应用于心血管系统、神经系统、抗肿瘤作用、抗炎及免疫作用等研究中[16],将含药血清的分析结果与中药的药效、药理、毒理等方面进行相关性分析,从而揭示中药的药效物质基础和作用机制的过程,而最大限度地模拟真实临床状态一直是研究者追求的目标。

基于血清药理学为理论基础的体外细胞实验是研究中药药效机制的一种常见的研究方式,实验过程中筛选中药含药血清最佳干预浓度是整个实验的关键步骤[17]。本研究通过回顾文献选用 SD 大鼠以灌胃的方式给药 3 d 和 7 d,每日给药两次,分别于末次灌胃 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 后采用腹主动脉取血的方式得到并制备含药血清。本研究以黄芪甲苷和阿魏酸作为黄芪当归药对含药血清制备标准的指标性成分,通过靶向代谢组学的方法对含药血清中黄芪甲苷以及阿魏酸的含量进行检测,以确定不同采血时间下黄芪当归药对含药血清最佳制备方法,为后续体外实验提供参考。

因黄芪当归各自的特性,研究结果显示,重补气作用时当以黄芪甲苷为主要研究成分,最佳取血时机为给药 7 d 末次灌胃 2 h 后取血,此时含药血清中黄芪甲苷含量最高;重活血作用时当以阿魏酸为主要研究成分,末次灌胃 0.5 h 后为最佳取血时机,且此时给药 3 d和给药 7 d 无明显区别,但总体分析给药 7 d 后含药血清中阿魏酸含量依然高于给药 3 d 的含量;重补气活血作用时当以黄芪当归药对整体为研究对象,给药 7 d 含药血清中各成分含量效果优于给药 3 d。

本研究通过靶向代谢组学的方法测定黄芪当归药对含药血清中黄芪甲苷和阿魏酸的含量变化趋势,研究结果显示,制备黄芪当归药对含药血清的最佳取血时机为给药 7 d 于末次灌胃 2 h 后取血,此时中药达到最高血药浓度,可以反映中药的药物动力学特征,进行黄芪当归有效成分的筛选、中药复方的优化、中药作用靶点的发现、中药药效物质基础的确定和中药药动学的研究、中药药物相互作用的研究等,以及为后续体外实验提供参考依据。

参考文献:

[1] 郭迎超,梁爽,周波. 中药含药血清制备的思考与探讨[J]. 云南中医中药杂志,2021,42(9):51-55.
[2] 陈旺宇,节笑笑,陈甜甜,等. 中药血清药物化学研究现状[J]. 中国医药科学,2023,13(4):26-29,86.
[3] 张灵娜,林兵,宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望[J]. 中草药,2015,46(17):2662-2666.
[4] 张秋菊,李能莲,王宇,等. 中药药理学体外实验方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(20):283-289.
[5] 孟雪,吴鸿. 中药含药血清制备的研究进展与思考[J/OL]. 辽宁中医杂志,2025,52(6):122-124.
[6] 杨健莉,刘佳,郑志红. 常用实验大小鼠采血方法及其对实验动物福利的影响[J]. 中国比较医学杂志,2019,29(1):90-94.
[7] 肖柳君,吕尚,魏惠珍,等. 药典法测定黄芪药材黄芪甲苷含量方法的商榷[J]. 江西中医药大学学报,2022,34(2):84-87.
[8] 陈锋,张杰,沈敏,等. 当归补血汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷及阿魏酸的含量测定[J]. 中国医药科学,2021,11(11):60-63.
[9] 刘天乐,朱田田,张明惠,等. 当归活性成分生物合成与调控研究

进展[J]. 中草药,2023,54(22):7545 - 7553.
[10] 李彦荣,牛淑秀,刘光炜,等. HPLC - DAD/ELSD 法测定当归 - 黄芪药对不同配比下主要有效成分的含量[J]. 中央民族大学学报(自然科学版),2023,32(1):79 - 85.
[11] 眷树杰,王凯,李霖,等. 药对配伍理论疏义[J]. 中医杂志,2023,64(17):1729 - 1733.
[12] 张瑞华,张静文,刘玲,等. 黄芪及其有效组分药理作用与临床应用现状[J]. 陕西中医,2021,42(8):1138 - 1141,1146.
[13] 牟春燕,殷越,沈子芯. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 山东中医杂志,2024,43(5):544 - 551.
[14] 崔素华,梁枫,张瑞,等. 基于中药血清药理学与血清药物化学的中药药效物质基础的研究进展[J]. 卫生职业教育,2020,38(1):157 - 159.
[15] 李明泽,李国锋,黄玉龙,等. 黄芪甲苷生理功能研究进展[J]. 食品工业,2024,45(6):164 - 168.
[16] 陈健媚,郭姣. 中药血清药理学研究进展[J]. 广东药学院学报,2016,32(3):390 - 393.
[17] 林陶秀,张文娟,张悦健,等. 最佳中药含药血清浓度的筛选方法研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(2):195 - 202.

Study on the Content of Active Components in Serum Containing Astragali Radix and Lophatheri Herba Couplet Medicinals at Different Time Points

SONG Ziqiong[1], LI Die[2], GUAN Yanyun[3], ZHAO Shan[2], QIAN Weibin[4], CAI Xinrui[1]

(1. *Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Institute of Occupational Health and Occupational Medicine, Jinan* 250062, *China*; 2. *The First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250014, *China*; 3. *Department of Poisoning and Occupational Diseases, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan* 250021, *China*; 4. *Department of Pulmonary Diseases, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250011, *China*)

Abstract Objective: To determine the content of main active components in serum containing Astragali Radix and Lophatheri Herba Couplet Medicinals at different time points by targeted metabolomics, so as to provide reference for subsequent in vitro experiments using serum prepared at the most appropriate time point. Methods: The Astragali Radix and Lophatheri Herba couplet medicinals decoction was administered to rats by gavage twice daily. On the 3rd and 7th days, sterile blood samples were collected from the abdominal aorta at 0.5 h, 1 h, 1.5 h, and 2 h after the last gavage to prepare drug - containing serum. Targeted metabolomics (LC - MS) was used to construct total ion current chromatograms (TIC) of drug - containing serum at different blood collection times. Based on the peak areas of characteristic peaks in TIC, the contents of astragaloside IV (active component of Astragali Radix) and ferulic acid (active component of Lophatheri Herba) in the drug - containing serum were calculated, and the data were analyzed to draw conclusions. Results: The content determination of astragaloside IV showed that the highest content was observed at 2 h after administration on the 7th day (S2), with significantly higher levels on the 7th day than on the 3rd day. The content determination of ferulic acid showed that the highest contents were observed at 0.5 h after administration on the 3rd day (T0.5) and 0.5 h after administration on the 7th day (S0.5), with significantly higher levels on the 7th day than on the 3rd day. Conclusion: The optimal blood collection time for preparing drug - containing serum of Astragali Radix and Lophatheri Herba couplet medicinals is 2 h after the last gavage on the 7th day of administration, which may provide reference for subsequent in vitro experiments.

Key words Astragalus - Angelica herb pair; Serum pharmacology; Drug - containing serum; Targeted metabolomics