

· 药物代谢 ·

雪荔复方中高车前苷在大鼠各组织中的分布研究

胡巍, 方芸*, 彭苗苗

(南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京 210008)

[摘要] 目的:研究雪荔复方灌胃给药后在大鼠体内的组织分布特点,为其临床应用提供理论依据。方法:采用 HPLC 法,Agilent TC-C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(55:45),流速 0.8 mL·min⁻¹,组织样本采用机械匀浆,乙腈沉淀处理供测定。结果:大鼠灌胃给药后的组织分布实验表明,胃中高车前苷含量最高,1 h 时高车前苷浓度最高为(7.496 ± 0.636) μg·g⁻¹,4 h 降低至(5.237 ± 0.373) μg·g⁻¹,7 h 降低至(1.763 ± 0.157) μg·g⁻¹,其次为肾,小肠组织,心、脾、肺中含量相对较低。结论:大鼠灌胃给药后高车前苷在各组织中均有分布,其在肾脏的高分布是雪荔复方治疗尿路感染的主要原因。

[关键词] 雪荔复方;高车前苷;组织分布

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0156-05

[doi] 10.11653/syfy2013100156

Study of Tissue Distribution of Compound *Salvia plebeian* Granules in Rats

HU Wei, FANG Yun*, PENG Miao-miao

(The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the study of tissue distribution of compound *Salvia plebeian* granules in rats and provide theoretical basis for its clinical application. **Method:** The biological samples were extracted with acetonitrile, the Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used as analytical column with a mobile phase consisted of methanol and water (55:45) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The content of homoplantagin was highest in stomach, and the concentration was (7.496 ± 0.636) μg·g⁻¹ after administration 1 hour later, then decreased to (5.237 ± 0.373) μg·g⁻¹ and (1.763 ± 0.157) μg·g⁻¹ after 4 h, 7 h. Followed by kidney and small intestine, the content in heart, spleen and lung was relatively low. **Conclusion:** The homoplantagin was distributed in all organs of rats after administrated compound *S. plebeian* granules. The higher distribution of homoplantagin in kidney can be explained by the forming theory of urinary tract infection.

[Key words] compound *Salvia plebeian* granules; homoplantagin; tissue distribution

雪荔复方是我院的临床验方,由荔枝草(唇形科植物荔枝草 *Salvia plebeia* R. Br. 的全草)、车前草(车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 的全草)、六月雪(茜草科植物六月雪 *Serissa serissoides* (DC.) Druce 的全株)、紫花地丁(堇菜科植物光瓣堇菜

Vida philippice Cav. 的全草)4 味中药组成,具有清热解毒、利尿通淋的功效,临床用于治疗泌尿系统感染、肾盂肾炎等^[1]。该制剂经本院 20 多年的临床应用,验证了其治疗尿路感染的综合疗效,毒副作用低,且能克服抗感染药物容易产生耐药性的缺

[收稿日期] 20121023(003)

[基金项目] 江苏省中医药局管理项目(HZ1016KY)

[第一作者] 胡巍,药师,从事中药药代动力学研究,E-mail: huwei-82@163.com

[通讯作者] *方芸,主任药师,从事临床药学研究,Tel:025-83105660

点^[2],但缺乏较为系统、完整的体内药物吸收、分布研究。高车前苷是该制剂的主要有效指标成分,是控制其质量对照的依据^[3]。本实验以有效成分高车前苷为考察指标,分析雪荔复方经灌胃给药后在大鼠各组织中的分布特点。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,雄性,体重(200±20)g,由南京市青龙山动物繁殖场提供,许可证号SCXK(浙)2008-0033。

1.2 药品与试剂 高车前苷(自制,纯度98%以上),色谱级甲醇,甲基叔丁基醚,乙腈(均由美国Tedia公司生产),乙酸乙酯(南京化学试剂有限公司,批号080910722),盐酸(南京化学试剂有限公司,批号080330233)。荔枝草、车前草、紫花地丁、六月雪(批号080712,均购自南京中药饮片厂),生理盐水(批号0805192,北京双鹤药业股份有限公司)。

1.3 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,VWD 检测器,吹气式浓缩干燥器(汉邦科技有限公司),5417R 高速冷冻离心机(Eppendorf公司),WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司),Direct-Q 超纯水器(Millipore公司),UV-2201型紫外分光光度计(Shimadzu公司),SHZ-III型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂),RE-2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),PTHW 型电热套(南京科尔仪器设备有限公司)。

1.4 波长的选择 以流动相配制一定浓度的高车前苷对照品溶液,在紫外分光光度计200~400 nm进行波长扫描。结果表明,高车前苷在335 nm处有最强吸收。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱为Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),预柱:C₁₈保护柱(4.6 mm×10 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(55:45),流速0.8 mL·min⁻¹,检测器VWD型检测器,检测波长为335 nm,进样量10 μL,柱温25℃。

2.2 高车前苷对照品溶液的制备 精密称取高车前苷对照品4 mg置50 mL量瓶中,加入适量甲醇溶解后再稀释至刻度,摇匀,即得高车前苷对照液(80 mg·L⁻¹)。

2.3 雪荔复方的制备^[4] 分别称取荔枝草、车前草、六月雪、紫花地丁40,40,40,20 g置烧瓶中,加蒸馏水1 400 mL,加热回流2 h,过滤,滤渣再加蒸馏水1 000 mL继续煎煮2 h,过滤,合并滤液,抽滤后

用旋转蒸发器将滤液浓缩至140 mL,加无水乙醇使溶液含醇量达60%,醇沉液置冰箱72 h后抽滤,滤液挥干乙醇后浓缩至70 mL,药液质量浓度为2 g·mL⁻¹。HPLC法测定提取液中高车前苷的含量,平行测定6份,按外标法以峰面积计算。结果雪荔组方水提醇沉液中高车前苷的含量为(0.821±0.011)mg·g⁻¹,RSD 1.18%(n=6)。

2.4 给药方法 取体重180~220 g SD大鼠18只随机分为3组,每组6只,于实验前12 h禁食不禁水。大鼠称重后以40 g·kg⁻¹的剂量灌胃给予上述制备好的雪荔复方溶液。

2.5 组织样本的采集 于给药后1,4,7 h用乙醚麻醉大鼠,放血后脱颈椎处死大鼠,立即取大鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠等组织,用生理盐水清洗表面瘀血和内容物,滤纸吸干脏器表面水分后称重。

2.6 组织样本处理方法的筛选 称取组织1份,剪碎,精密加入生理盐水2.5倍,冰水浴下研磨成匀浆。冷冻离心机4℃下4 000 r·min⁻¹离心10 min,取匀浆上清液。根据文献组织样品的处理方法做以下筛选。

2.6.1 甲醇处理^[5-6] 分别取5,50 μL 0.04 g·L⁻¹高车前苷对照品各3份置drol管中,氮气流吹干溶剂,分别加100 μL组织匀浆上清液,涡旋混匀,加入甲醇400 μL,涡旋振荡2 min,12 000 r·min⁻¹,4℃离心5 min。取上清液,40℃氮气流吹干,残渣用100 μL甲醇复溶,配成高车前苷含量为2,20 mg·L⁻¹的样品,取20 μL进样。

2.6.2 乙酸乙酯加稀盐酸处理^[7] 按2.6.1制备含高车前苷组织匀浆上清液,涡旋混匀,加入1 mol·L⁻¹HCl 20 μL和乙酸乙酯1.5 mL,涡旋振荡2 min,12 000 r·min⁻¹,4℃离心5 min。取上清液,40℃氮气流吹干,残渣用100 μL甲醇复溶,配成高车前苷2,20 mg·L⁻¹的样品,20 μL进样。

2.6.3 乙腈处理^[8-9] 按2.6.1制备含高车前苷组织匀浆上清液,涡旋混匀,加入乙腈200 μL,涡旋振荡2 min,12 000 r·min⁻¹,4℃离心5 min。取上清液,40℃氮气流吹干,残渣用100 μL甲醇复溶,配成高车前苷2,20 mg·L⁻¹的样品,取20 μL进样。

2.6.4 甲基叔丁基醚处理^[10] 按2.6.1制备含高车前苷组织匀浆上清液,涡旋混匀,加入300 μL甲基叔丁基醚,涡旋振荡2 min,冷冻离心机12 000 r·min⁻¹,4℃离心5 min。取上清液,40℃氮气流吹干,残渣用100 μL甲醇复溶,配成高车前苷含量为

2, 20 mg·L⁻¹ 的样品, 取 20 μL 进样。

2.7 组织样本的处理 称取脏器组织 0.2 g, 剪碎, 精密加入生理盐水 0.5 mL, 冰水浴下研磨成匀浆。冷冻离心机 4 ℃ 下 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取匀浆上清液, 加入 2 倍量乙腈沉淀蛋白, 涡旋振荡 2 min, 冷冻离心机 4 ℃ 下 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 50 ℃ 水浴, 氮气流吹干, 残渣用 200 μL 流动相复溶, 冷冻离心机 4 ℃ 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 HPLC 进样。

3 结果

3.1 组织样本不同处理方法的比较 如表 1 所示, 乙腈处理蛋白质方法的峰面积在 2, 20 mg·L⁻¹ 2 个质量浓度时均最大, 其次为乙酸乙酯 + 稀盐酸、乙腈, 甲基叔丁基醚最小。

表 1 组织样品不同处理方法的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组织样本处理	2 mg·L ⁻¹		20 mg·L ⁻¹	
	峰面积	RSD /%	峰面积	RSD /%
甲醇	318.03 ± 17.22	5.41	1 972.88 ± 91.16	4.62
乙腈	435.33 ± 13.65	3.14	3 039.00 ± 286.81	9.44
甲基叔丁基醚	50.67 ± 4.04	7.98	328.33 ± 30.14	9.18
乙酸乙酯 + 稀盐酸	352.33 ± 27.68	7.86	1 866.68 ± 62.43	3.34

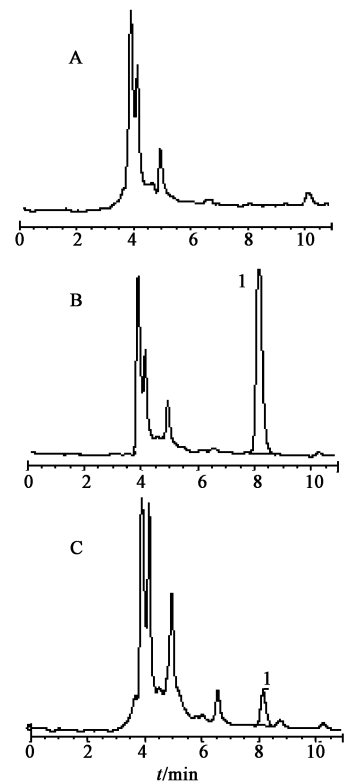
如表 2 所示, 乙腈沉淀蛋白后高车前苷的绝对回收率在 0.04 ~ 4 mg·L⁻¹ 能符合要求, 且回收率较高, 为 90.61% ~ 96.60%。因此, 在本实验中最终采取乙腈沉淀蛋白的处理方法。

表 2 乙腈沉淀蛋白后高车前苷的绝对回收率 /%

质量浓度 / mg·L ⁻¹	绝对回收率 /%	RSD
0.04	96.60	2.24
0.4	90.61	1.83
4	92.60	3.23

3.2 专属性考察 以肝脏为代表(其他组织色谱图略), 精密称取空白大鼠肝脏组织 2 份, 给药组大鼠肝脏组织 1 份, 按 2.7 项下处理, 分别得到肝脏组织空白色谱图、加入高车前苷对照品后的肝脏组织色谱图和给药后的肝脏组织样品色谱图(如图 1)。在 2.1 色谱条件测定, 高车前苷的保留时间为 8.1 min。由色谱图可见肝脏组织内源性杂质与高车前苷的分离良好, 不干扰其测定。

3.3 线性关系考察 分别精密吸取高车前苷对照品母液(80 mg·L⁻¹) 1.25, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.025, 0.012 5, 0.062 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶



1. 高车前苷峰; A: 肝脏组织空白色谱; B: 肝脏组织加高车前苷对照品色谱 C: 样品色谱

图 1 高车前苷 HPLC

中, 用甲醇稀释至刻度, 配成质量浓度分别为 5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025 mg·L⁻¹ 的对照溶液。

称取空白大鼠各脏器组织 0.2 g 数份, 分别加入不同浓度的高车前苷对照品, 配制成高车前苷含量为 5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025 μg·g⁻¹ 的组织样品, 按 2.7 项下处理, 残渣以 200 μL 流动相复溶, 精密量取 10 μL 进样, 按上述条件测定。以大鼠组织样品中的高车前苷配制浓度(C)为横坐标, 色谱图的高车前苷峰面积(A)为纵坐标制备各组织的对照曲线, 采用加权(1/C²)最小二乘法计算直线回归方程, 胃组织匀浆的定量限为 0.1 μg·g⁻¹, 其余为 0.025 μg·g⁻¹, 见表 3。

3.4 精密度、准确度及绝对回收率 按 3.3 项下方法配制 10, 1, 0.1 μg·g⁻¹ 3 个质量浓度的高车前苷大鼠胃组织匀浆样品和 5, 0.25, 0.025 μg·g⁻¹ 3 个质量浓度的高车前苷其余各组织匀浆样品以及随行对照曲线。每个浓度 5 个样本 1 日内连续测定, 求得测定方法的日内精密度; 连续测定 5 d, 每日测定一次, 求得测定方法的日间差; 以测定浓度与配制浓度之比计算准确度; 以提取后的色谱峰面积与未经提取直接进样的色谱峰面积之比计算绝对回收率。结果见表 4。结果表明测定方法符合有关方法学要求。

表3 各组织匀浆液中高车前苷的对照曲线

样品	对照曲线	r	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
心	$Y = 34.994X + 6.7381$	0.9992	0.025 ~ 5
肝	$Y = 38.36X + 2.9648$	0.9995	0.025 ~ 5
脾	$Y = 36.538X + 3.9534$	0.9995	0.025 ~ 5
肺	$Y = 36.247X + 1.2410$	0.9995	0.025 ~ 5
肾	$Y = 42.503X + 1.6238$	0.9997	0.025 ~ 5
胃	$Y = 39.067X - 2.8228$	0.9996	0.1 ~ 10
小肠	$Y = 33.493X + 4.3229$	0.9995	0.025 ~ 5

3.5 给药后大鼠体内的组织分布 灌胃给予雪荔复方后,高车前苷在大鼠体内各组织的分布情况见图2。实验结果显示大鼠按 $40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药后高车前苷在大鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠中均有分布,说明高车前苷在体内可以广泛分布。胃中高车前苷含量最高,1 h 时高车前苷为 $(7.496 \pm 0.636)\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,4 h 降低至 $(5.237 \pm 0.373)\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,7 h 降低至 $(1.763 \pm 0.157)\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。此过程可能是高车前苷吸收入血后迅速分布到胃脏,随后在胃脏中代谢消除。肝、肾、小肠中含量其次,心、脾、肺中含量相对较低。

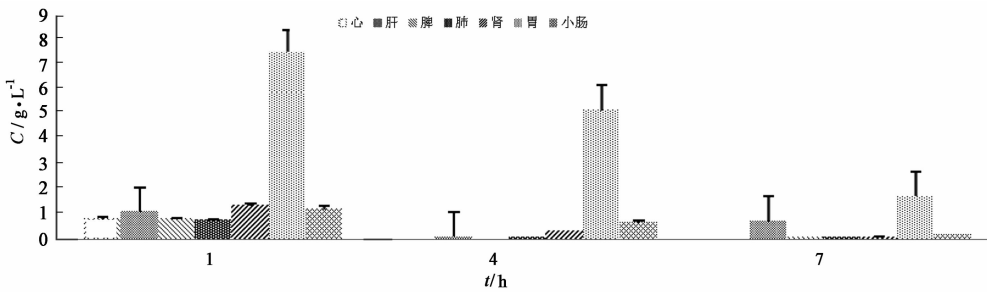


图2 大鼠灌胃给予雪荔复方后高车前苷在各组织中的分布情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表4 样品方法学研究

样品	质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	精密度/%		准确度/%	绝对回收率/%
		日内 RSD	日间 RSD	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
心	0.025	3.13	2.08	96.60 ± 3.02	86.67 ± 3.09
	0.25	2.80	0.91	116.80 ± 3.27	97.51 ± 1.76
	5	0.653	1.64	100.50 ± 0.65	96.55 ± 0.84
肝	0.025	3.32	2.78	91.67 ± 3.04	91.70 ± 2.89
	0.25	4.00	2.90	110.00 ± 4.4	90.65 ± 0.92
	5	1.65	0.85	101.50 ± 1.67	90.67 ± 1.48
脾	0.025	3.22	6.10	88.33 ± 2.84	88.30 ± 2.89
	0.25	0.44	3.48	110.00 ± 0.48	96.54 ± 0.35
	5	0.70	0.72	100.55 ± 0.70	86.08 ± 0.70
肺	0.025	10.20	8.70	84.00 ± 8.57	100.00 ± 5.00
	0.25	0.85	0.49	112.00 ± 0.95	85.98 ± 0.61
	5	0.84	0.29	99.37 ± 0.83	83.18 ± 0.70
肾	0.025	1.72	4.74	95.96 ± 1.65	95.70 ± 1.61
	0.25	1.23	0.85	114.00 ± 1.40	85.77 ± 0.09
	5	0.93	0.73	100.88 ± 0.94	98.93 ± 0.70
胃	0.1	0.88	1.28	107.00 ± 0.94	91.03 ± 1.11
	1	0.91	2.90	110.67 ± 1.01	87.90 ± 0.88
	10	0.83	0.82	99.45 ± 0.83	86.12 ± 0.47
小肠	0.025	2.26	8.34	100.78 ± 2.28	85.59 ± 2.00
	0.25	3.78	4.10	85.00 ± 3.21	84.87 ± 1.94
	5	0.98	1.24	100.88 ± 0.99	82.00 ± 0.79

4 讨论

本实验中,首先考察了不同的组织样品处理方法。按峰面积大小对甲醇、乙腈、甲基叔丁基醚、乙酸乙酯 + 稀盐酸处理后的组织匀浆上清液中高车前苷含量进行了比较。结果表明乙腈处理蛋白质的效果较好,绝对回收率最高,为 90.61% ~ 96.60%。因此,在其后的组织分布研究中采用乙腈处理组织样品。

在制备对照曲线的时候,对照品溶液加入后应先把有机溶剂挥干再进行下面的操作,以免有机溶剂沉淀组织中的蛋白影响对照品在组织匀浆中的溶解,从而影响该样品处理方法的回收率。

组织分布实验结果表明高车前苷主要富集在胃、肾、肝、小肠中。雪荔复方在临床上主要治疗尿路感染,其成因是致病微生物侵袭泌尿系统而引起的肾脏、输尿管、膀胱、尿道的炎症。因此雪荔复方中高车前苷在肾脏的高分布是雪荔复方治疗尿路感染的主要原因,组织分布规律恰符合尿路感染的形成理论,即尿路感染属于湿热淋证的范畴,是细菌在尿中浓集进而达到肾脏和膀胱形成的。该研究结果为进一步研究雪荔复方的作用机制提供科学指导。

[参考文献]

[1] 吴正红,裴云萍,方芸,等. 高效液相色谱法测定复方荔枝草颗粒剂中高车前苷含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 388.
[2] Ruth G Jepson, Jonathan C Craig. A systematic review

of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention [J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51: 738.
[3] Rafi M M, Rosen R T, Vassil A, et al. Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid [J]. Anticancer Res, 2000, 20(4): 2653.
[4] 吴正红,裴云萍,方芸,等. 复方荔枝草颗粒剂提取工艺的实验研究[J]. 江苏药学与临床研究, 2000, 8(2): 1.
[5] Wang Jinping, Zhu Xiali. Preparation of lomustine loaded liposomes and studies of its pharmacokinetics and tissue distribution properties [J]. J Chin Pharm Sci, 2010, 19: 353.
[6] 陈永顺,吴珍. 水飞蓟宾明胶微球在大鼠体内的药动学及组织分布[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 128.
[7] 刘建群,李青,张锐,等. LC-MS/MS 法研究甘草对雷公藤甲素药代动力学及组织分布与排泄的影响[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1664.
[8] 郑枫,刘文英,魏伟. 注射用 BAPTA-AM 脂质体在大鼠体内的组织分布和胆汁排泄[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(11): 858.
[9] 梁秋云,朱丹,黄慧学,等. 阿特拉津及其主要代谢物在大鼠体内的组织分布[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 222.
[10] 张琦,邹晓丽,孙文华,等. 两种紫杉醇注射剂在荷瘤小鼠体内药动学与组织分布的比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(11): 981.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,320 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行人,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfx_2010@188.com,网址:www.syfxzz.com。