

金银花-连翘药对中绿原酸和连翘苷 在大鼠各组织中的分布研究

孙艳涛*, 王冰, 李云兴, 栾泽柱

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:通过绿原酸和连翘苷在大鼠各组织中的含量测定,分析金银花-连翘药对的作用特点。方法:采用 HPLC, 依利特 Betasil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.4% 磷酸溶液 (30:70) 为流动相, 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹ 的色谱条件分析绿原酸和连翘苷在大鼠各组织中的含量。结果:各组织中均检测到绿原酸和连翘苷, 除消化道外, 脑中含量最高。结论:各组织中的绿原酸和连翘苷含量分布符合金银花连翘药对“皆轻清宣散, 偏于清透上半身之邪”的特点。

[关键词] 药对; 绿原酸; 连翘苷; 组织分布

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0157-05

Determination of Chlorogenic acid and Frusthin of the Drug Pairs of Flos Lonicerae and Fructus Forsythiae in Rats' Organs

SUN Yan-tao*, WANG Bing, LI Yun-xing, LUAN Ze-zhu

(College of Pharmacy of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the feature of the drug pairs of Flos Lonicerae and Fructus Forsythiae by determining the content of chlorogenic acid and forsythsin. **Method:** The content of chlorogenic acid and forsythsin in different organs was analyzed by using the Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.4% phosphoric acid as mobile phase; the velocity of flow was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 280 nm. **Result:** Chlorogenic acid and forsythsin can be detected in all the organs and there was more in brain except the gastrointestinals. **Conclusion:** The distribution of chlorogenic acid and forsythsin fit in with the feature 'clearing away the heat-evil to relieve the exterior with light drug'.

[Key words] drug pairs; chlorogenic acid; frusthin; tissue distribution

金银花-连翘药对为清热解毒药物中最常用的药对。二药功效相似。二者相须为用, 清热解毒效力更强, 并能宣通气血, 导十二经之气滞血凝, 消肿散结, 二药常联合使用, 方如银翘散^[1]。当前对于金银花-连翘单体药物及药对^[2]的研究较多, 如林丽美等^[3]人采用 HPLC 对金银花-连翘单煎、单煎后合并以及混合煎后绿原酸和连翘脂苷 A^[4]的含量进行分析; 邢学锋等^[5]对金银花-连翘药对挥发油成分进行了 GC-MS 分析, 段红妍等^[6]采用银花连翘药对配

伍对于发热大鼠体温和血清中 NO 含量进行分析。本实验以有效成分绿原酸和连翘苷为考察指标, 分析金银花连翘药对经灌胃^[7]给药后在大鼠各组织中的分布特点。

1 材料

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪(配置二元梯度泵; 在线脱气机; CBM 检测器), 依利特 Betasil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱, METTLER AB135-S 101/万电子分析天平(瑞士), HC-2518 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司), AR2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司), FS-2 型可调高速分散器(江苏金坛荣华仪器制造有限公司), XW-80A 型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司), 876-1 型真空干燥箱(上海阳

[收稿日期] 20120228(002)

[通讯作者] * 孙艳涛, 讲师, 博士, 从事药物分析及体内药物分析研究, Tel: 0411-87586007, E-mail: sunyt_ky@163.com

光实验仪器有限公司)。

1.2 试药 绿原酸(中国药品生物制品检定所,批号 110885-200102),连翘苷(中国药品生物制品检定所,批号 110821-200508),槲皮素(中国药品生物制品检定所,批号 11520-200201)。金银花、连翘药材(沈阳东北大药房,经药学院鉴定教研室王荣祥教授鉴定为正品)。乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯),水为重蒸馏水,乙腈、甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯),磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯)。

1.3 动物 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,雄性(300 ± 30)g,雌性(250 ± 30)g[购于大连医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(辽)2008-0002]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 依利特 Betasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相 乙腈-0.4% 磷酸溶液(30:70),检测波长 280 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 15 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸和连翘苷对照品适量,加甲醇分别制成每毫升中含绿原酸为 1.04 mg,含连翘苷 0.010 1 mg 的对照品溶液即得。

2.2.2 内标物溶液的制备 精密称取槲皮素对照品适量,加甲醇稀释成每毫升含 0.112 mg 的溶液即得。

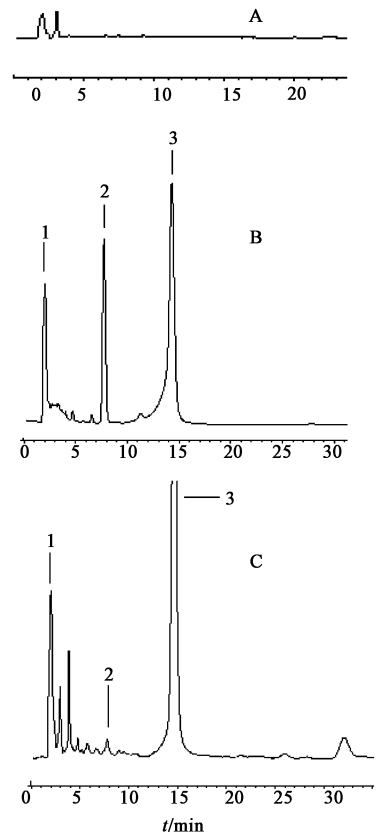
2.2.3 样品处理方案 取大鼠组织 0.5 g 精密称定,加入 0.5 mL 0.4% 磷酸溶液,匀浆;转移至 0.4% 磷酸溶液润洗过的样品管中,精密加入内标物 50 μL,乙醚 3 mL,涡旋 1 min,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,精密吸取上清液 2 mL,于 40 °C 水浴吹干,精密加入 50 μL 甲醇,涡旋 0.5 min,精密吸取 15 μL 进样分析。

2.2.4 药品处理方案 精密称取金银花连翘(按 1:1 比例)药材粉末(过 3 号筛)80 g,加 30% 乙醇 300 mL 回流 2.5 h,过滤后挥干溶剂。向干膏加入 80 mL 重蒸馏水混匀即得。

2.3 线性关系考察 取肝组织 0.5 g,精密称定,加入 0.5 mL 0.4% 磷酸溶液,匀浆,平行 6 份;分别精密加入绿原酸对照品溶液 5, 20, 30, 40, 80, 100 μL 和连翘苷对照品溶液 5, 20, 30, 40, 80, 150 μL;内标液 50 μL,乙醚 3 mL,涡旋 1 min,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,精密吸取上清液 2 mL,于 40 °C 水浴吹干,精密加入 50 μL 甲醇,涡旋 1 min,精密吸取 15 μL 进

样分析。以峰面积比(对照峰面积/内标峰面积)Y 为纵坐标,质量浓度 X(g · L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。结果绿原酸标准曲线 Y = 0.201X - 0.110 9 (r = 0.993 0),线性范围 0.347 ~ 6.93 g · L⁻¹;连翘苷标准曲线 Y = 0.580 5X - 0.004 2 (r = 0.995 8),线性范围 0.034 ~ 0.101 g · L⁻¹。

2.4 专属性考察 分别取空白肝脏和经灌胃给药 2 h 大鼠肝脏,按 2.2.3 项下要求处理(空白肝脏不加内标液)分别进样分析,色谱图见图 1。



1. 绿原酸;2. 连翘苷;3. 内标物槲皮素

图 1 空白肝组织(A)、空白肝组织加对照品和内标物(B)和给药 2 h 肝组织(C)的 HPLC

2.5 精密度试验 取空白肝脏 0.5 g,精密称定,加入 0.5 mL 0.4% 磷酸溶液,匀浆后分别加入 20, 40, 100 μL 的绿原酸溶液和 20, 40, 150 μL 的连翘苷溶液,按照 2.2.3 项处理方法。分别连续进样 3 d,根据液相色谱图中峰面积比值计算日内、日间精密度。结果显示,绿原酸对照品日内精密度(n = 6)的 RSD% 高、中、低 3 个质量浓度分别为 7.8%, 5.4%, 6.2%,连翘苷对照品日内精密度(n = 6)的 RSD% 高、中、低 3 个浓度分别为 6.5%, 10.1%, 8.4%;日间精密度(n = 6)的 RSD%:绿原酸对照品高、中、低 3 个质量浓度分别为 9.5%, 8.7%, 11.1%,连翘苷高、中、低 3 个浓度的 RSD% 分别为 5.5%, 12.1%,

7.9%,符合生物样品的测定要求。

2.6 稳定性及冻融次数试验 将加入 40 μL 的绿原酸和 40 μL 的连翘苷对照品溶液的空白肝脏样品 6 份,按 2.2.3 项处理方法,室温放置,分别于 0,2,4,6,8,10 h 进样分析;将加入 40 μL 的绿原酸和 40 μL 的连翘苷的空白肝脏样品按 2.2.3 项处理方法处理,于第 1,2,3,4,5,6 d 进样。另取冰箱冷冻保存的加入 40 μL 的绿原酸,40 μL 的连翘苷对照品的空白肝脏样品,反复冻融 5 次,按 2.2.3 项下确定处理方法进行样品处理,根据各色谱图峰面积比考察日内、日间稳定性,及冻融次数影响。结果显示,绿原酸和连翘苷日内稳定性的 RSD 分别为 7.1% 和 6.0%;日间稳定性的 RSD 分别为 11.0%,12.4%;冻融次数绿原酸和连翘苷的 RSD 分别为 11.4%,9.6%,上述结果表明本实验样品在日内 10 h 稳定,日间 6 d 稳定,冻融 5 次稳定。

2.7 重复性试验 取空白肝脏 0.5 g 6 份,分别精密称定,加入 40 μL 绿原酸和 40 μL 连翘苷对照品溶液后按 2.2.3 项下要求处理,在上述色谱条件下进样分析,结果显示绿原酸和连翘苷的 RSD 分别为

12.5%,9.8%,符合相关要求。

2.8 回收率试验

2.8.1 测定方法的绝对回收率 分别按照 2.2.3 方法配制高、中、低 3 个质量浓度的绿原酸和连翘苷空白肝脏样品各 6 份,进样 15 μL ,计算各浓度样品中指标性成分的峰面积与内标的峰面积比值(A);另用甲醇配制高、中、低浓度的绿原酸、连翘苷各一份,使绿原酸的进样量分别为 6.24,12.48,31.2 μg ,连翘苷的进样量分别为 0.060 6,0.121 2,0.303 μg ,计算各质量浓度样品中指标性成分的峰面积与内标的峰面积比值(B),两者比值(A/B)计算绝对回收率,结果见表 1。

2.8.2 含量测定方法的方法回收率 将 2.8.1 测定峰面积比结果,分别代入 2.3 线性方程中得到相应指标成分量 M_1, M_2 ,根据 (M_1/M_2) 计算方法回收率,结果见表 2,表明方法回收率符合有关要求。

2.8.3 内标物的绝对回收率试验 将 2.8.1 的高、中、低 3 组浓度水平的实验数据按 2.8.1 方法进行处理,得内标物槲皮素的绝对回收率,结果见表 3。

表 1 绿原酸、连翘苷的绝对回收率

成分	进样量/ μg		绝对回收率/%					$\bar{x}/\%$	RSD/%
绿原酸	6.24	88.62	82.47	97.54	90.50	79.26	71.33	84.95	10.9
	12.48	77.48	80.66	92.14	85.23	69.84	67.77	78.85	11.8
	31.2	91.54	77.46	80.16	69.23	75.14	88.77	80.38	10.5
连翘苷	0.060 6	81.15	97.05	72.74	79.41	88.44	70.82	81.60	12.1
	0.121 2	71.88	81.36	94.71	69.45	84.47	78.19	80.01	11.5
	0.303	91.56	80.74	75.54	87.24	97.06	78.87	85.17	9.7

表 2 指标成分的方法回收率

成分	进样量/ μg		绝对回收率/%					$\bar{x}/\%$	RSD/%
绿原酸	6.24	81.54	79.68	68.44	60.79	85.63	70.47	74.42	12.7
	12.48	67.71	87.41	66.22	80.56	69.18	79.52	75.10	11.5
	31.2	68.31	85.54	71.08	83.26	66.07	61.38	72.61	13.3
连翘苷	0.060 6	72.66	66.29	61.08	86.04	71.11	60.47	69.61	13.7
	0.121 2	75.54	68.98	65.08	84.06	74.61	68.98	72.88	9.3
	0.303	71.77	83.34	68.26	73.96	62.91	67.78	71.34	9.8

表 3 内标物槲皮素的绝对回收率

进样量		绝对回收率/%					$\bar{x}/\%$	RSD/%	
内标物	低	71.68	84.92	90.08	82.41	85.37	81.72	82.69	7.5
	中	89.06	72.85	91.18	86.73	77.94	95.04	85.47	9.9
	高	98.01	72.58	69.82	81.47	72.46	91.08	80.90	14.3

2.9 含量测定 SD 大鼠 20 只,按雌雄各半分成 5 组,每只鼠按灌胃给药 4 mL,在相应时间点处死,取内脏 0.5 g,用生理盐水洗去表面血渍后按 2.2.3 项

下要求制备,在 2.1 色谱条件下测定,将各个测定结果的峰面积比代入标准曲线计算各组织中每 0.5 g 样品中有效成分含量,结果见表 4。

表 4 不同组织不同时间点有效成分平均含量(n=4)

组织	t/h	μg/0.5 g	
		绿原酸	连翘苷
心	1	12.556 0	0.184 7
	2	14.790 0	0.179 8
	3	16.552 2	0.202 3
	4	14.550 7	0.154 6
	5	16.450 4	0.187 4
脑	1	20.444 5	0.162 1
	2	25.867 6	0.248 9
	3	29.446 2	0.202 3
	4	15.669 0	0.214 9
	5	16.177 1	0.131 7
肝	1	16.584 7	0.247 5
	2	18.191 1	0.363 9
	3	18.598 4	0.486 2
	4	14.584 4	0.271 2
	5	21.521 5	0.259 4
肾	1	21.806 3	0.336 7
	2	17.471 4	0.190 1
	3	24.882 2	0.722 6
	4	15.959 5	0.281 9
	5	15.679 2	0.333 0
脾	1	20.392 0	0.294 2
	2	12.315 9	0.139 7
	3	10.437 5	0.1674
	4	11.424 5	0.164 2
	5	21.222 1	0.138 4
肺	1	-	-
	2	9.930 7	0.163 2
	3	12.336 5	0.150 9
	4	11.924 0	0.254 8
	5	11.479 2	0.206 1
小肠	1	22.089 9	0.345 8
	2	91.246 3	1.324 1
	3	12.354 5	0.284 1
	4	13.583 2	0.203 1
	5	16.036 5	0.131 6
大肠	1	16.140 1	0.166 9
	2	17.462 8	0.251 8
	3	18.280 8	0.126 4
	4	15.048 3	0.294 0
	5	15.534 6	0.207 6

3 讨论

有关连翘苷研究采用注射复方药物研究其在大鼠血液中的动力学特征。绿原酸的研究,采用注射双黄连粉针后研究绿原酸在大鼠血浆及唾液中的分布。上述研究^[8-9]均检测到相应成分,为本实验的实施提供了前提条件和借鉴。

各组织中均检测到有效成分绿原酸和连翘苷。除脾、小肠外,各组织中有效成分含量均在 3 h 达到

峰值。其中小肠中有效成分含量在 2 h 达到峰值,远远高于其他组织脏器而后有效成分含量逐渐降低,在 5 h 左右又有升高趋势,说明金银花连翘药对在小肠内属于二次吸收的特点,其中第一次吸收为主要过程。大肠中绿原酸和连翘苷含量 5 h 内相对平稳且相对含量低于小肠,说明小肠为金银花连翘药对的主要吸收器官。

对各组织成分分析发现,心和肺中有效成分含量相对较低,而脑中各成分含量显著高,这与金银花连翘皆“轻清宣散,偏于清透上半身之邪”^[1]相符。其余组织肝、肾中有效成分含量较高。除小肠外,肾中连翘苷浓度最大,绿原酸含量仅低于脑,此外在表 4 中大部分组织中有效成分含量都有两次达峰的特点,这应该是与“肾主水液,能将脏腑组织利用后归于肾的水液,经肾阳的蒸腾作用再升清降浊,将大量的浊中之清者,吸收输布周身重新被利用”^[10]有关。肝脏中绿原酸含量二次达峰的药物浓度高于一次峰值,应该是与肝有“贮藏血液,能制约肝阳,疏而不亢,有助于肝的疏泄”效应有关。

【参考文献】

[1] 王希琳,吴晨,魏琴,等.常用中药及配伍手册[M].赤峰:内蒙古科学技术出版社,2002:90.

[2] 夏伯候,王智民,林丽美,等.银翘药对的药效学研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(3):80.

[3] 林丽美,王智民,王维皓,等.RP-HPLC对金银花和连翘单煎、单煎后合并及混煎的分析[J].中国中药杂志,2007,32(21):2241.

[4] 赵燕,玄振玉.正交法优选连翘脂苷提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):13.

[5] 刑学锋,陈飞龙,罗佳波.金银花、连翘药对配伍挥发油成分的GC-MS分析[J].中药新药与临床药理,2009,20(4):358.

[6] 段红妍,赵琴,马成.银花连翘配伍对发热大鼠体温和血清中NO含量的影响[J].新疆中医药,2009,27(2):11.

[7] 吴俊珠,严亚,高鹏飞.灯盏花素吸收与促进吸收策略的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):219.

[8] 李秋红,冯宇飞,刘佩莉,等.高剂量双黄连粉针中绿原酸的药动学及其在唾液中的分布[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):47.

[9] 董新荣,郝圣峰,葛铭,等.复方制剂中连翘苷的药物动力学试验[J].中国兽医杂志,2009,45(3):80.

[10] 张登本.中医学基础[M].北京:中国中医药出版社,2005:52.

[责任编辑 邹晓翠]

· 药理 ·

大黄炮制品各组分泻下作用的比较研究

刘亮亮^{1,2}, 隋峰^{2*}, 闫美娟², 李燕², 林娜^{2*}, 郑燕芳², 肖永庆², 李丽²

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**分析比较大黄不同炮制品各组分的泻下作用及机制。**方法:**小鼠随机分为对照组和大黄各炮制品组。除对照组外,各给药组均给与相应组分生药剂量 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,观察 5 h 内各组泻下只数、各小鼠首次泻下时间、5 h 内泻下次数和总排便次数;采用炭末推进法,研究各大黄炮制品对小鼠炭末推进的影响;大鼠随机分成 13 组,除对照组外,其余按生药剂量 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续给药 5 d,取结肠组织测定 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性。**结果:**生大黄组分 2 和生大黄组分 3 产生泻下作用,其余组别未见泻下作用;从总排便次数来看,除熟大黄组分 2、组分 3 以及生大黄组分 4 和大黄炭组分 4 外,其他各组分均明显高于空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与生大黄组分 2 相比,熟大黄组分 2 的总排便次数显著减少 ($P < 0.05$);与生大黄组分 3 比较,熟大黄组分 3 和大黄炭组分 3 两组的总排便次数明显减少 ($P < 0.01$);大黄炮制品各组分除熟大黄组分 2 外,均有提高小鼠小肠炭末推进率的作用趋势,生大黄组分 2 和组分 3 小鼠小肠推进率与空白组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$);各炮制品组分之间比较,生大黄组分 2 炭末推进率显著高于熟大黄组分 2 ($P < 0.05$);生大黄组分 3 炭末推进率显著高于熟大黄组分 3 ($P < 0.05$);大黄炮制品各组分均对大鼠结肠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性有抑制作用,其中生大黄组分 2,生大黄组分 3,大黄炭组分 3 与空白对照组比较有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。组分 2 各炮制品之间,生大黄组分 2 抑制作用最强,与熟大黄和大黄炭相比差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);组分 3 各炮制品之间,生大黄组分 3 的活性低于其他两组,其中与熟大黄相比差异显著 ($P < 0.05$)。**结论:**在所有大黄各炮制品组分中,生大黄组分 2 和组分 3 的泻下作用最强,其作用机制可能与抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性、促进小鼠肠推进有关。

[关键词] 大黄炮制品; 组分; 泻下作用; 排便次数; 小肠推进率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0161-05

Comparative Study on Purgative Effects Among Different Components of Processed Rhex Radix et Rhizoma

LIU Liang-liang^{1,2}, SUI Feng^{2*}, YAN Mei-juan², LI Yan², LIN Na^{2*},
ZHENG Yan-fang², XIAO Yong-qing², LI Li²

(1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;)

[Abstract] **Objective:** To study the different purgative effects and molecular mechanisms among different components of processed Rhex Radix et Rhizoma (extracts from Rhex Radix et Rhizoma, cooked Rhex Radix et Rhizoma and Rhex Radix et Rhizoma carbon). **Method:** Mice were randomly divided into control group and treatment groups with different components of processed Rhex Radix et Rhizoma at a dose of $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The different samples were administered to mice for observing the purgative number, the first purgative time, the 5 hour purgative times and defecation quantity. The effects on small intestinal propulsion were determined by propulsion rate of charcoal powder in mice. The effects on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in rat colon wall cell membrane were determined

[收稿日期] 20111027(005)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30730111)

[通讯作者] *隋峰,医学博士,研究员,从事中药药性与中药药理研究, Tel:010-64041008, E-mail: suifeng2136@126.com

*林娜,医学博士,研究员,从事中药药理与中药药性研究, Tel:010-64011692, E-mail: linna888@163.com