

落新妇苷在小鼠体内的组织分布

李玉琪¹, 顾瑾¹, 宦征¹, 邱瑾¹, 李玉莲², 邓昌国² (1. 上海市杨浦区中心医院, 上海 200090; 2. 兰州军区乌鲁木齐总医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的 建立落新妇苷组织浓度的高效毛细管电泳分析方法, 并对其在小鼠体内的组织分布进行测定。方法 高效毛细管电泳之胶束电动模式测定小鼠尾静脉注射 30 mg/kg 落新妇苷后不同时间点各组织中药物含量。结果 落新妇苷在组织器官的浓度分布特点是: $C_{心} > C_{肝} > C_{肾} > C_{脾} > C_{肺} > C_{脑}$ 。心脏组织 $C_{5\ min} > C_{15\ min} > C_{60\ min}$, 自 5 min 浓度达峰后呈缓慢递减趋势, $C_{60\ min}$ 仍保持较高浓度。其他组织 $C_{15\ min}$ 达峰, 肝脏在 $C_{15\ min}$ 至 $C_{60\ min}$ 均保持较高药物浓度, $C_{60\ min}$ 在各组织中浓度最高。60 min 内脑组织含有较稳定药物含量。结论 落新妇苷在小鼠体内分布广泛, 心、肝、肾保持较高组织浓度, 且能够穿越血脑屏障分布到脑组织中。

[关键词] 落新妇苷; 高效毛细管电泳; 组织分布

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)03-0201-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.03.011

Tissue distribution of astilbin in mice

LI Yu-qi¹, GU Jin¹, HUAN Zheng¹, QIU Jin¹, LI Yu-lian², DENG Chang-guo² (1. Department of Pharmacy, Shanghai Yangpu District Central Hospital, Shanghai 200090, China; 2. Urumqi general Hospital, Lanzhou Military Region of PLA, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a high performance capillary electrophoresis (HPCE) method for analysis of tissue distribution of astilbin in mice. **Methods** The model of micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) of HPCE was adopted after intravenous injection. The concentrations of astilbin in biological samples were determined. **Results** The tissue distribution feature of astilbin was $C_{heart} > C_{liver} > C_{kidney} > C_{spleen} > C_{lung} > C_{brain}$. The Chart shows $C_{5\ min} > C_{15\ min} > C_{60\ min}$ and $C_{5\ min}$ is C_{max} . But $C_{15\ min}$ was C_{max} in other tissues. The steady content of astilbin was found in brain tissue within 60 min. **Conclusion** Astilbin was widely distributed in main tissues, which could also permeate blood brain barrier.

[Key words] astilbin; high performance capillary electrophoresis (HPCE); tissue distribution

落新妇苷 (astilbin, ATB) 系从中药赤土茯苓中提取、分离并鉴定出的单体二氢黄酮醇苷类有效成分^[1], 曾称赤土茯苓苷, 药理研究表明, ATB 对缺血心肌具有良好的保护作用^[2-4]。前期对赤土茯苓药材资源、质量标准、ATB 的动物药动学进行了系统性研究^[5-9]。本文利用高效毛细管电泳 (high performance capillary electrophoresis, HPCE) 之胶束电动模式 (micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC) 测定小鼠尾静脉给药后 ATB 在各组织的分布, 以期了解其药理效应靶器官提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 试药 实验用落新妇苷 (本室提取制备, 批号: 20090619, 含量 95%) 及其对照品 (本室提取、分

离、鉴定, 纯度 99%)^[1]; 芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 100080-200306); 甲醇为色谱醇; 十二烷基硫酸钠 (SDS, BDH Chemical Ltd. Poole England), 聚山梨酯-80 质量标准符合中华人民共和国药典 2005 年版标准。其它试剂为 AR 级。

1.2 仪器 Biofocus Capillary Electrophoresis System 3000 型毛细管电泳仪 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 紫外检测器; Biofocus operating software (Version 6.0)。TGL-16B 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), SK-1 型快速混匀器 (江苏省金坛医疗仪器厂); 800 型离心沉淀器 (上海手术器械厂); Mettler Toledo 十万分之一分析天平, Mettler Toledo Delta 320 型 pH 计。

1.3 动物 昆明种小白鼠, 雌雄兼用, 体质量 18 ~ 22 g, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 动物合格证号: 医动字第 16-003 号。饲养环境: 温度 20 °C ~ 25 °C, 相对湿度 50% ~ 70%, 噪声小于 60 dB, 昼夜明暗交替时间 12 h : 12 h。自由进食及饮水。

[基金项目] 上海市杨浦区卫生局科研课题 ([2010]211-002)。

[作者简介] 李玉琪 (1959-), 男, 硕士, 副主任药师。Tel: (021) 65690520-277, E-mail: liyuqi01@sina.com。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 新毛细管柱的预处理及运行毛细管柱的处理同文献^[5]。未涂层熔硅弹性石英毛细管柱(Bio-rad), 50 μm(ID) × 50 cm, 有效长度为柱长减去4.5 cm。运行缓冲液为44 mmol/L 硼酸-22 mmol/L 十二烷基硫酸钠(SDS)-12% 甲醇(pH8.22); 操作电压19 KV, 极性正极→负极, 柱温20 ℃, 压力进样124.11 kPa(18 psi · sec), 检测波长208 nm。运行缓冲液和样品均经0.45 μm 滤膜过滤, 进样前离心脱气。

2.2 对照品储备液、内标液及落新妇苷注射液的制备 精密称取60 ℃ 真空干燥至恒重的ATB对照品0.040 0 g, 置100 ml 量瓶中, 加80% 甲醇溶解并定容, 精密吸取1 ml, 置10 ml 量瓶中, 加10% 甲醇稀释并定容, 即得40 μg/ml 对照品储备液, 0~4 ℃ 保存备用。精密称取60 ℃ 真空干燥至恒重的芦丁对照品0.050 0 g, 置50 ml 量瓶中, 加10% 甲醇溶解并定容。精密吸取5 ml, 置50 ml 量瓶中, 加10% 甲醇稀释并定容, 即得芦丁对照品溶液(100 μg/ml), 作为内标液。精密称取实验用ATB 0.075 0 g 于50 ml 量瓶中, 加入聚山梨酯-80 2.5 ml 助溶, 加生理盐水适量, 在60 ℃ 水浴热溶, 加生理盐水稀释并定容, 即得1.5 mg/ml ATB 注射液, 4 ℃ 冰箱备用。

2.3 组织样本制备 将给药后不同时间点剖取的小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑等器官组织, 用生理盐水洗净表面浮血, 滤纸吸干, 称取各器官约0.1~0.2 g, 于冰浴下组织匀浆器中加生理盐水制成10% 匀浆, 离心, 吸取上清液500 μl 于1 ml 离心管中, 各管内分别加入芦丁内标液(100 μg/ml)150 μl, 涡旋1 min, 加入乙

酸乙酯: 甲醇(9:1) 萃取三次, (依次加500、300、300 μl), 每次萃取均需混匀3 min, 离心6 min(10 000 r/min), 合并乙酸乙酯: 甲醇萃取液, 于氮气流下40 ℃ 水浴吹干。残留物用300 μl 10% 甲醇复溶, 离心6 min(10 000 r/min), 吸取上清液进样。

2.4 标准曲线的绘制 取40 μg/ml ATB 对照品储备液, 配制成2、4、8、16、32 μg/ml 系列对照品溶液。照2.3 组织样本制备方法, 取未给药小鼠, 制备心、肝、脾、肺、肾、脑等组织匀浆液, 离心, 吸取上清液各200 μl, 分别加入上述系列对照品溶液各50 μl, 涡旋混匀。各管内分别加入芦丁内标液(100 μg/ml) 150 μl, 按2.3 方法处理, 进样电泳。以ATB 峰面积与内标物峰面积比值(A)对ATB 浓度(C)进行线性回归, 求得回归方程, 见表1。

表1 落新妇苷在小鼠各组织的标准曲线

组织	标准曲线	相关系数	线性范围(μg/ml)
心	$C = 14.6004A - 0.6896$	0.9999	0.3333~5.3333
肝	$C = 17.8451A - 0.1859$	0.9977	0.3333~5.3333
脾	$C = 12.1661A - 0.2204$	0.9996	0.3333~5.3333
肺	$C = 4.6002A - 0.0262$	0.9969	0.3333~5.3333
肾	$C = 7.6466A + 0.0859$	0.9986	0.3333~5.3333
脑	$C = 8.2314A - 0.3256$	0.9969	0.3333~5.3333

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性试验 取未给药小鼠空白组织匀浆及尾静脉注射ATB 15 min 后小鼠组织匀浆各200 μl, 按2.3 组织样本制备和2.1 运行条件进样测定, ATB 峰的迁移时间约7 min, 血浆内源性物质不干扰测定(图1)。

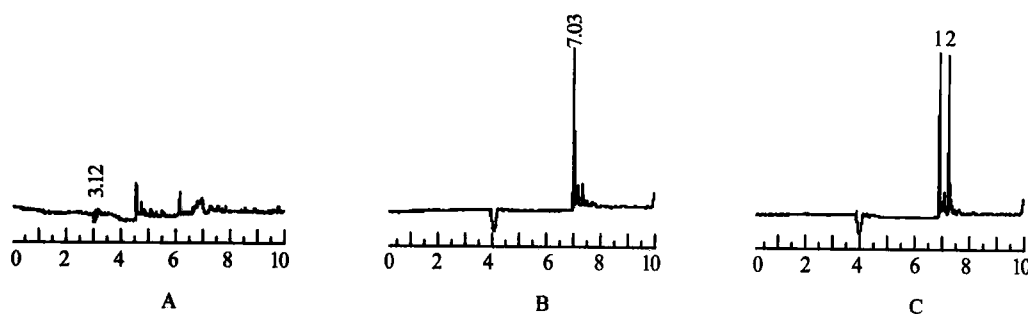


图1 落新妇苷 MECC 电泳谱图

A-空白肝组织匀浆; B-空白肝组织匀浆 + ATB 对照品; C- ivATB15min 肝组织匀浆 + 内标(1. 内标; 2. ATB)

2.5.2 回收率、精密度实验 取各空白组织匀浆, 分别配制成低(4.0 mg/L), 中(8.0 mg/L)、高(16.0 mg/L) 3 种质量浓度的含药组织匀浆液, 按

“2.3”项下方法操作, 每种质量浓度平行做5 份样品, HPEC 测定药物峰面积及内标峰面积, 将两者峰面积比值代入各组织回归方程, 得 ATB 测定浓度,

以测定浓度与配制浓度之比计算回收率,回收率及精密度测定结果见表2。

表2 不同浓度含药组织匀浆液的回收率及精密度试验 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组织	4.0 mg/L		8.0 mg/L		16.0 mg/L	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
心	103.19 ± 0.19	4.83	99.49 ± 0.40	5.17	101.66 ± 0.77	4.73
肝	107.35 ± 0.22	5.12	106.93 ± 0.42	4.96	104.38 ± 0.84	5.02
脾	109.14 ± 0.29	6.67	106.49 ± 0.50	5.91	94.67 ± 0.91	6.03
肺	104.37 ± 0.18	4.35	105.32 ± 0.42	4.93	105.38 ± 0.75	4.46
肾	98.69 ± 0.21	5.28	100.35 ± 0.41	5.14	95.87 ± 0.81	5.26
脑	96.44 ± 0.16	4.27	97.67 ± 0.37	4.78	102.62 ± 0.76	4.61

2.5.3 样品稳定性试验 用具有组织松软及坚韧代表性的肝脏及心脏组织空白匀浆,分别配制成低(4.0 mg/L),中(8.0 mg/L)、高(16.0 mg/L)3种质量浓度的含药组织匀浆液各5份,按2.3项下方法操作,室温下放置1.0、2.0、3.0 h,各测定3次,肝组织3个浓度的RSD分别为6.17%、5.98%、6.22%,心脏组织分别为4.74%、4.96%、5.17%。同法配制低、中、高3个质量浓度的组织样品,保存于-20℃冰箱中,分别于1周及3周后取出,于室温下融化,各测定3次,3个浓度的RSD分别为5.87%、6.21%、5.96%。

2.6 小鼠体内各脏器药物浓度测定及组织分布 昆明种小鼠36只,禁食自由饮水12 h,按30 mg/kg剂量尾静脉注射ATB(1.5 mg/ml)注射液,于注射后5、15、60 min 3个时间点分别随机取12只小鼠断头处死,照“2.3”组织样本制备方法制备组织测定液,胶束电动毛细管电泳测定,记录HPCE谱图,以ATB峰面积与内标物峰面积比值(A)代入各组织相应标准曲线,计算出各组织中药物含量。同一时间点不同组织落新妇苷含量见图2,同一组织不同时间点落新妇苷含量见图3。

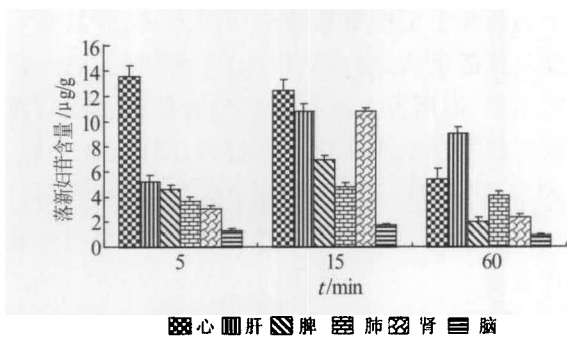


图2 同一时间点不同组织落新妇苷含量

3 讨论

3.1 分析方法学 根据ATB系二氢黄酮醇苷的化学特性,本实验经预试优选,在处理组织样品时,采

用了乙酸乙酯:甲醇(9:1)萃取剂,萃取效率高且可使组织匀浆中ATB与水溶性杂质高效分离。从HPCE谱图可以看出,组织匀浆液中杂质不干扰样品测定。

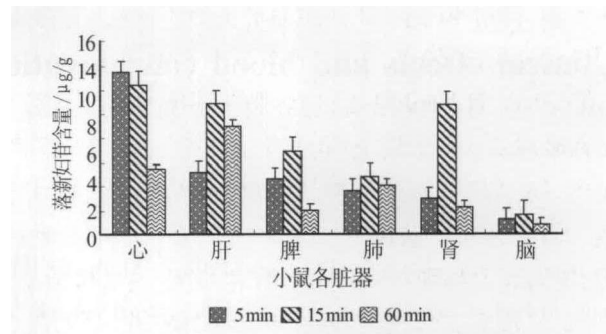


图3 同一组织点不同时间点落新妇苷含量

3.2 组织分布 由图2、图3落新妇苷组织分布图可以看出,心脏组织 $C_{5\text{ min}} < C_{15\text{ min}} > C_{60\text{ min}}$,自5 min达浓度峰值后呈递减趋势,但代谢与消除缓慢, $C_{60\text{ min}}$ 仍保持较高浓度,结合此前药理研究结果^[2-4],ATB对缺血心肌具有良好的保护作用,此分布方式有利于ATB对心脏发挥药理效应。提示心脏可能是ATB的靶器官之一。

脑组织中 $C_{5\text{ min}} < C_{15\text{ min}} > C_{60\text{ min}}$,提示ATB可透过血脑屏障进入脑组织,虽浓度不高,但持续时间较长。此可能是ATB对不完全脑缺血^[10]及海马神经元缺血再灌注损伤小鼠^[11]保护作用的基础。

肝脏在 $C_{15\text{ min}}$ 至 $C_{60\text{ min}}$ 间隔,药物均保持较高的组织浓度, $C_{60\text{ min}}$ 在各组织中浓度最高,分析其原因,ATB在肝脏的代谢主要途径^[12]为异构化及3'-O-甲基化,ATB异构体及其甲基化产物3-甲基落新妇苷,可能具有极相似的化学行为及生物学行为。本研究所测肝脏组织的ATB浓度有可能系ATB原型、异构体及其3-甲基落新妇苷代谢物的总浓度。3-甲基落新妇苷是否系活化代谢物及其HPCE行为、排除方式及消除途径,有等于进一步研究。

(下转第230页)

供试品(丹参酮 IIA 含量为 0.427 2 mg/g) 0.500 g, 分别按高、中、低 3 个比例加入丹参酮 IIA 对照品适量,按 3.2.3 项下方法制得供试品溶液,进行含量测定,计算平均回收率和 RSD。结果见表 1。

表 1 复方汉防己颗粒中丹参酮 IIA 的加样回收率试验结果 (n=9)

成分	含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
丹参酮 IIA	213.6	150.1	358.1	98.46	97.97	0.34
	214.0	151.4	356.1	97.45		
	213.6	153.9	359.8	97.90		
	214.5	200.4	407.3	98.17		
	213.6	201.6	406.2	97.83		
	213.6	202.5	405.8	97.52		
	214.0	250.3	456.1	98.23		
	213.6	253.8	458.6	98.12		
	214.0	252.6	457.4	98.03		

3.4.7 样品测定 按本色谱条件对照品溶液和供试品溶液各进样 20 μl,依法测定 3 批供试品中丹参酮 IIA 的含量。结果见表 2。

表 2 复方汉防己颗粒中丹参酮 IIA 含量测定结果 (n=5)

批号	含量 (mg/g)	RSD (%)	平均含量 (mg/g)
20110412	0.427 2	0.43	0.426 3
20110521	0.422 5	0.41	
20111120	0.429 6	0.46	

4 讨论

4.1 薄层鉴别操作中应避光 2010 版《中国药典》丹参项下丹参酮 IIA 薄层检测中采用乙酸乙酯作为溶剂,但由于丹参酮 IIA 对光、热十分敏感,实际操作时在乙酸乙酯中极易氧化分解,影响薄层检测结

果,因此尝试用乙醚作溶剂并用棕色具塞瓶溶解丹参酮 IIA 对照品,结果显示用乙醚溶解点样后薄层斑点更清晰且无干扰。

4.2 含量测定中溶剂的选择和流动相的比例 笔者分别通过对甲醇、75% 甲醇、85% 乙醇、乙醚等不同溶剂提取的供试品进行含量测定,结果表明用甲醇提取的供试品中丹参酮 IIA 色谱峰峰形及分离度最佳。另外试验中将 2010 版《中国药典》丹参项下的色谱流动相:甲醇-水比例由 75:25 调整为 80:20,操作中既能较快出峰又不影响目标色谱峰峰形及有效分离,可节省检测时间。

【参考文献】

- [1] 中国药典一部[S]. 2010:70.
- [2] 林恒标,林恒宽. 丹参酮 IIA 的稳定性研究[J]. 中医研究, 2005, 18(8):16.
- [3] 侯家玉,方泰惠. 中药药理学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007:149.
- [4] 陈磊,陆茵,郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应[J]. 中草药, 2009, 40(3):476.
- [5] 巴哈尔古丽,徐新. 对乌鸡白凤丸中丹参酮 IIA、芍药苷薄层色谱方法的改进建议[J]. 中国药事, 2006, 20(6):369.
- [6] 汤淮波,李顺祥,谢昭明. 通淋颗粒质量标准的研究[J]. 中医药导报, 2005, 11(4):64.
- [7] 曾振兴,杨非,冯伟红. HPLC 测定市售丹参饮片丹参酮 IIA[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 87.
- [8] 陈雅萍. HPLC 测定肝爽颗粒中丹参酮 IIA 的含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(7): 90.
- [9] 伍丕娥,易秋艳,韦浩. HPLC 测定心元胶囊中大黄素与丹参酮 IIA 的含量[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(2): 107.
- [10] 段秀俊,裴妙荣,段晓军. HPLC 法测定强脉胶囊中丹参酮 IIA 的含量[J]. 中药制剂工程与技术, 2010, 11(1): 23.

[收稿日期] 2012-09-04

[修回日期] 2012-11-02

(上接第 203 页)

【参考文献】

- [1] 李玉琪,李玉莲,张克锦,等. 赤土茯苓苷的分离和结构鉴定[J]. 解放军药学报, 1999, 5(1): 42.
- [2] 李玉琪,周承明,张克锦,等. 赤土茯苓苷对异丙肾上腺素诱发的小鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中草药, 1996, 27(7): 418.
- [3] 邵春红,新华,周承明,等. 赤土茯苓苷对大鼠心肌缺血的保护作用[J]. 新疆医科大学学报, 2000, 23(3): 205.
- [4] 新华·那比,艾尼瓦尔,周承明,等. 赤土茯苓苷对离体大鼠心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 西北药学杂志, 2000, 15(3): 110.
- [5] 李玉莲,李玉琪,曾平,等. 高效毛细管电泳测定赤土茯苓中的赤土茯苓苷[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(9): 747.
- [6] 李玉琪,李玉莲,张文敏,等. 高效毛细管电泳法鉴别土茯苓及其混伪品[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(8): 469.
- [7] 李玉莲,李玉琪,曾平,等. 土茯苓植物资源调查[J]. 中草药, 2002, 33(9): 850.
- [8] 李玉琪,余自成,邓昌国,等. 胶束电动毛细管电泳法测定兔血浆落新妇苷浓度及其药代动力学研究[J]. 解放军药学报, 2003, 29(1): 26.
- [9] 李玉琪,余自成,李玉莲,等. 落新妇苷在小鼠体内的药代动力学研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2478.
- [10] 丁岩,新华·那比,帕尔哈提,等. 赤土茯苓苷对不完全脑缺血小鼠的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(4): 238.
- [11] 丁岩,帕尔哈提·克里木,新华,等. 赤土茯苓苷对小鼠海马 CA 区神经元的缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 新疆医科大学学报, 2000, 23(2): 98.
- [12] 王文艳,全瑶瑶,张林琪. HPLC-MS/MS 法鉴定落新妇苷在大鼠尿中的代谢产物[J]. 质谱学报, 2011, 32(1): 36.

[收稿日期] 2012-10-16

[修回日期] 2012-12-28