

## 质量标准

## 卵泡方在大鼠体内组织分布研究

张金强<sup>1</sup>, 黄慧莲<sup>2</sup>, 果德安<sup>2\*</sup>, 毕开顺<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016;

2. 中国科学院上海药物所中药现代化研究中心, 上海 201203)

〔摘要〕目的: 研究卵泡方在大鼠体内的组织分布规律。方法: 卵泡方大鼠灌胃给药  $6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  后, 应用 HPLC 测定大黄酸、汉黄芩素及千层纸素 A 在大鼠肝、心、脾、肺、肾中的含量, 色谱柱: Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ), 流动相: (A) 乙腈-(B) 0.5% 冰醋酸水溶液 (v/v) 梯度洗脱; 流速为  $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 检测波长为 254, 276nm; 进样量为 10 $\mu\text{L}$ ; 柱温 30℃。结果: 建立了大黄酸、汉黄芩素及千层纸素 A 在大鼠肝、心、脾、肺、肾中的 HPLC 含量测定方法。结论: 该法成功应用于卵泡方单剂量大鼠灌胃给药后, 大黄酸、汉黄芩素及千层纸素 A 在大鼠体内组织分布的研究。

〔关键词〕中药; 卵泡方; HPLC; 组织分布

卵泡方为复旦大学附属医院临床验方, 由黄芩、大黄、淫羊藿、知母、当归、山茱萸、枸杞子、太子参、鸡血藤、龟甲、水蛭、鹿角及海马 13 味中药组成, 临床上主治妇女不孕, 如卵泡发育不良或黄体不健所致的不孕症。本实验室对卵泡方质量控制及其在大鼠体内的药代动力学和排泄规律进行了研究<sup>[1-2]</sup>。为研究卵泡方在大鼠体内的组织分布规律, 建立了大黄酸、汉黄芩素及千层纸素在大鼠肝、心、脾、肺、肾中的高效液相色谱含量测定方法,  $6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  单剂量给大鼠灌胃卵泡方后, 测定了 3 个化合物在 0.25~48h 的 12 个时间点, 5 个主要脏器中的分布经时变化。

## 1 仪器与材料

高效液相色谱仪: Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 (Agilent Technologies, Germany), 配有四元泵、真空脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器; BT 25S 型电子天平 (德国 Sartorius 公司), HCG-36A 氮吹仪 (东莞市永先电子仪器厂), 2-16K 型冷冻高速离心机 (德国 Sigma 公司), MS1 型涡旋混合器 (广州仪科实验室技术有限公司), T18 型内切式组织匀浆机 (广州仪科实验室技术有限公司), 100~1 000  $\mu\text{L}$  微量取样器 [大龙医疗设备 (上海) 有限公司]。对照品大黄酸 (rhein) 和山柰酚 (kaempferol) 购自中国药品生物制品检定所, 汉黄芩素 (wogonin) 和千层纸素 (oroxylin) A 为本文作者由卵泡方中分离得到, 纯度均大于 98%; 乙腈 (Burdick&Jackson, Honeywell

International Inc., USA) 和冰醋酸 (tedia, tedia company, Inc., USA) 均为色谱纯, 醋酸乙酯和甲醇 (国药集团化学试剂有限公司) 为分析纯; 纯净水由 Milli-Q 纯水制备系统制备; 卵泡方样品由上海绿谷制药有限公司提供。

HPLC 测定卵泡方中主要化合物大黄酸, 汉黄芩素和千层纸素 A 的含量分别为: 0.8, 4.1, 2.7  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。卵泡方样品用水溶解成 0.6  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的溶液, 大鼠单剂量给药量为  $6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

## 2 方法与结果

## 2.1 组织样品预处理

取大鼠肝、心、脾、肺、肾脏器, 生理盐水洗净, 滤纸吸干水分, 分别准确称定每一组织脏器的重量, 按 1:2 (m/v) 加入生理盐水, 在冰浴上制备组织匀浆。精密量取组织匀浆 1.0mL, 置 10mL 具塞离心试管中, 加入内标山柰酚溶液 ( $42\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 100 $\mu\text{L}$ , 甲醇 3mL, 涡旋萃取 1min, 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5min, 分取上清液, 残渣再加甲醇 3mL, 涡旋萃取 1min, 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5min, 分取上清液。合并上清液, 于 40℃ 氮气流下吹干, 残渣加入甲醇 400  $\mu\text{L}$ , 涡旋溶解 1min, 0.22 $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 取滤液 10 $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。

## 2.2 对照品溶液制备

## 2.2.1 标准系列对照品溶液的制备

分别称取大黄酸, 汉黄芩素和千层纸素 A 对照品适量, 精密称定, 置容量瓶中, 用甲醇溶解并定

容至刻度，摇匀，即得混合对照品储备液，再加甲醇稀释成标准系列对照品溶液：大黄酸 52, 26, 10.4, 5.2, 2.6, 1.04, 0.52 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；汉黄芩素 150, 75, 30, 15, 7.5, 3, 1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；和千层纸素 A 112, 56, 22.4, 11.2, 5.6, 2.24, 1.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。对照品溶液储存于 4℃，备用。

2.2.2 内标溶液的制备

取山柰酚对照品适量，精密称定，置容量瓶中，甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得浓度为 420 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的内标储备液，再加甲醇稀释至 42 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，储存于 4℃，备用。

2.2.3 QC 样品的制备

分别取空白组织匀浆液，加入对照品溶液，制备成含被测物高、中和低 3 个浓度的质量控制样品 (Quality control sample, QCs)，即大黄酸 0.52, 0.10, 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，汉黄芩素 1.5, 0.3, 0.15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和千层纸素 A 1.12, 0.22, 0.11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，储存于 -80℃，备用。

2.3 HPLC 条件

Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ) (Palo Alto, CA, USA)；Zorbax SB-C<sub>18</sub> 保护柱 (20mm × 4mm, 5 $\mu\text{m}$ ) (Palo Alto, CA, USA)；流动相：(A) 乙腈-(B) 0.5% 冰醋酸水溶液 (v/v)，梯度洗脱程序：0 ~ 20min, A 24 %；20 ~ 46min, A 24 % 升至 51 %；流速 1.0mL · min<sup>-1</sup>；检测波长 254, 276nm；进样量 10 $\mu\text{L}$ ；柱温 30℃。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准工作曲线的绘制

分别取空白组织，依次加入标准系列对照品溶液 100 $\mu\text{L}$ ，内标溶液 (38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 100 $\mu\text{L}$ ，按 2.1 项下操作，以被测物与内标物峰面积比值为纵坐标，被测物浓度为横坐标，用加权最小二乘法进行回归运算，权重系数为 1/ $X^2$ ，求得直线回归方程。3 个被测化合物在标准曲线范围内呈良好线性 ( $r^2 > 0.99$ )，结果见表 1。

2.4.2 方法的专属性

将供试动物的空白组织色谱图与空白组织中加入待测物和内标物后得到的色谱图及给药后不同时间大鼠组织色谱图进行比较，结果表明组织中所含内源性物质不干扰被测物和内标物的测定，被测物峰形良好。

2.4.3 最低定量限 (LLOQ) 与最低检测限 (LOD)

以被测物标准曲线的最低浓度点为最低定量限 (lowest limit of quantification, LLOQ)，要求信噪比

(S/N) 不小于 5，精密度 RSD 小于 20%，回收率在 80% ~ 120%。最低检测限 (limit of detection, LOD) 是信噪比 (S/N) 不小于 3 时的被测物浓度，为能从组织匀浆液体背景信号中区分出被测物的最低浓度。

表 1 大鼠组织中被测组分的标准曲线

| 组织 | 化合物    | 标准曲线                   | <i>r</i> | 线性范围 / $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|----|--------|------------------------|----------|--------------------------------------|
| 肝  | 汉黄芩素   | $Y=0.605\ 5X+0.015\ 4$ | 0.993 0  | 0.15 ~ 15.00                         |
|    | 千层纸素 A | $Y=0.533\ 0X+0.004\ 0$ | 0.994 0  | 0.11 ~ 11.20                         |
|    | 大黄酸    | $Y=0.243\ 7X+0.000\ 4$ | 0.995 8  | 0.05 ~ 5.20                          |
| 心  | 汉黄芩素   | $Y=0.072\ 7X+0.007\ 8$ | 0.999 6  | 0.15 ~ 15.00                         |
|    | 千层纸素 A | $Y=0.569\ 7X+0.002\ 9$ | 0.999 6  | 0.11 ~ 11.20                         |
|    | 大黄酸    | $Y=0.298\ 5X+0.000\ 1$ | 0.999 0  | 0.05 ~ 5.20                          |
| 脾  | 汉黄芩素   | $Y=0.821\ 6X+0.023\ 8$ | 0.998 7  | 0.15 ~ 7.50                          |
|    | 千层纸素 A | $Y=0.738\ 3X+0.010\ 3$ | 0.999 4  | 0.11 ~ 5.60                          |
|    | 大黄酸    | $Y=0.268\ 4X+0.001\ 1$ | 0.996 3  | 0.05 ~ 1.04                          |
| 肺  | 汉黄芩素   | $Y=1.018\ 3X+0.004\ 3$ | 0.989 3  | 0.15 ~ 3.00                          |
|    | 千层纸素 A | $Y=0.865\ 4X-0.003\ 0$ | 0.986 3  | 0.11 ~ 2.24                          |
|    | 大黄酸    | $Y=0.428\ 8X+0.006\ 8$ | 0.993 4  | 0.05 ~ 1.04                          |
| 肾  | 汉黄芩素   | $Y=0.657\ 7X+0.009\ 1$ | 0.999 8  | 0.15 ~ 7.50                          |
|    | 千层纸素 A | $Y=0.584\ 5X+0.003\ 1$ | 0.992 9  | 0.11 ~ 5.60                          |
|    | 大黄酸    | $Y=0.346\ 4X-0.000\ 7$ | 0.991 7  | 0.05 ~ 2.60                          |

2.4.4 精密度和准确度

取 QC 样品高、中、低 3 个浓度各 6 份，每一浓度进行 6 样本分析，测定该方法的日内精密度和回收率。连续测定 3d，并与标准工作曲线同时进行测定，以当日的标准工作曲线计算 QC 样品的浓度，计算该方法的日间精密度和准确度，本方法 QC 样品的日内和日间精密度 RSD 小于 15%，准确度在 ±20% 之间；均符合目前生物样品分析方法指导原则的有关规定<sup>[3]</sup>，该法可用于准确测定大鼠组织中目标化合物的浓度。

2.4.5 绝对回收率

取 QC 样品高、中、低 3 个浓度各 3 样本，按“标准工作曲线”项下方法操作，测得样品中被测物的色谱峰面积，与相应浓度的标准溶液中被测物的色谱峰面积比较，计算绝对回收率。被测物及内标在高、中、低 3 个浓度组织样品中绝对回收率 > 60%，说明组织样品的萃取方法稳定可靠。

2.4.6 组织样品稳定性

取 QC 样品高、低 2 个浓度样品各 3 样本，置于室温保存 (20 ~ 30℃) 4h 后测定，考察组织样品的短期稳定性；取 QC 样品高、低 2 个浓度各 3 样本，制备后 24h 后测定，考察组织样品的制备后稳定性；取 QC 样品高、低 2 个浓度各 3 样本，冷冻保存于 -80℃，在室温中充分解冻，然后再次冷冻，重复 3

个冻融周期后测定，考察组织样品的 3 周期冻融稳定性。结果稳定性 RSD 小于 15%，表明组织中的被测物浓度可以被准确测定。

2.5 组织分布研究

2.5.1 组织样品的采集与预处理

取雌性 SD 大鼠 60 只，随机分成 12 组，每组 5 只。实验前禁食 12h，自由饮水。按  $6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  体重灌胃给予卵泡方后，于 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8,

10, 12, 24, 36, 48h 断头处死，剖取肝、心、脾、肺、肾，于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。取各采样时间点组织，按 2.1 项下方法处理后，进行 HPLC 分析。

2.5.2 组织分布研究结果

大鼠灌胃卵泡方后，考察了大黄酸，汉黄芩素和千层纸素 A 3 个被测化合物在肝、心、脾、肺、肾组织中不同时间点的分布经时变化。各个组织中 3 个化合物的平均浓度经时变化见图 1。

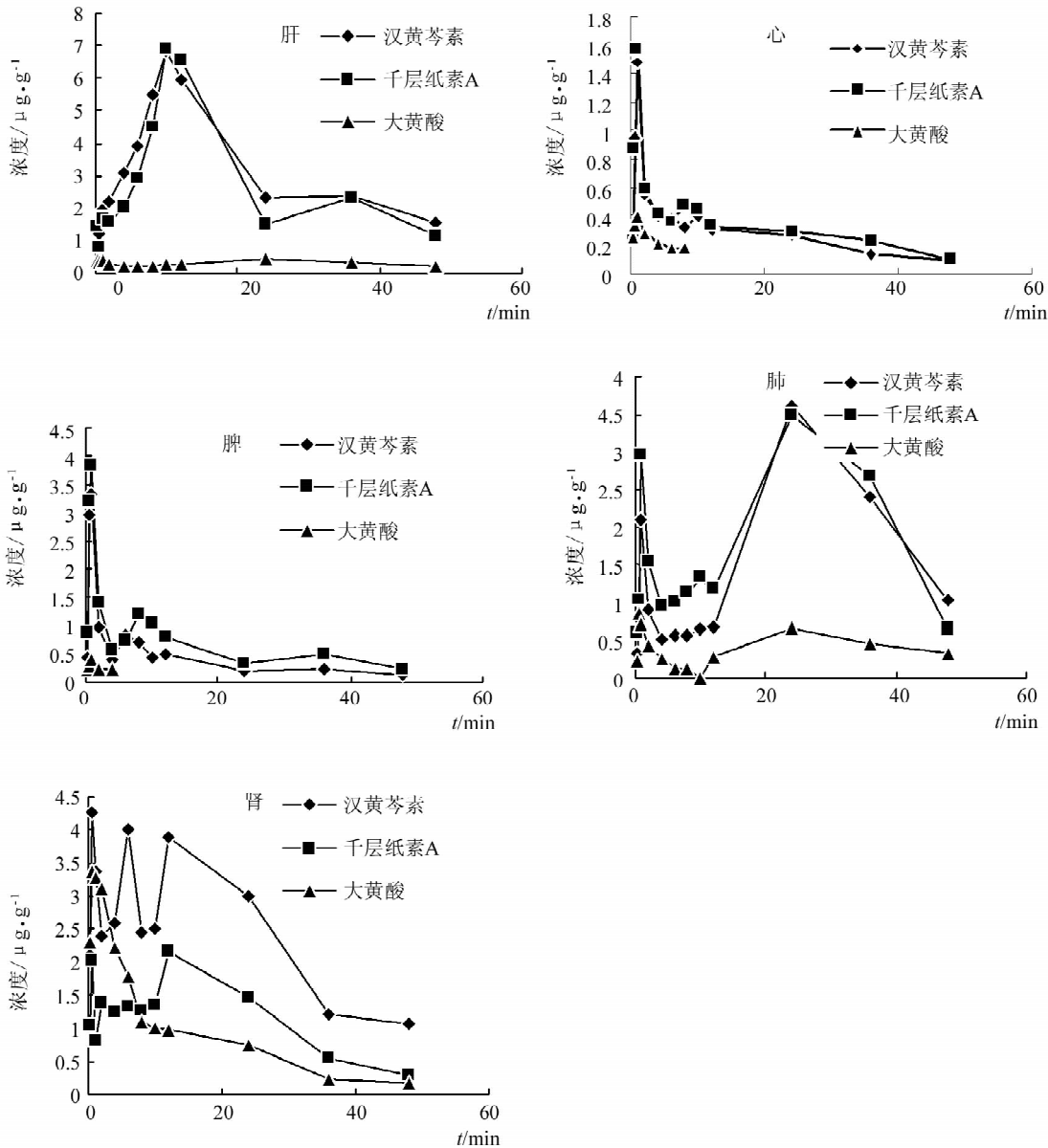


图 1 大鼠灌胃卵泡方后肝、心、脾、肺和肾脏中待测化合物的平均药时曲线 (n = 5)

3 讨论

本实验方法学按照 Guidance for Industry (Bioanalytical Method Validation) [3] 要求进行方法学考察。

在选取内标物时，本实验考察了与待测化合物结构和紫外吸收相似的化合物，如：芦丁、橙皮苷、

山柰酚等。结果表明山柰酚的紫外吸收性质、保留时间以及在血浆中的萃取效率与被测物较为接近，符合内标的选取原则，故选择山柰酚为含量测定的内标物。

在进行此实验之前，曾对该复方的化学成分做

过系统地分离,得到并鉴定了 25 个化合物,其中没有发现山柰酚。同时卵泡方体外样品在 HPLC 图上也没有发现山柰酚的相应峰。作者还建立了 LC-ESI/MS<sup>n</sup> 方法,鉴定了复方中 34 个化学成分<sup>[4]</sup>,也没有发现山柰酚,故认为该方中即使某个单味药材含有山柰酚,但在复方中没有发现该成分,对实验不会带来干扰。同时,组织样品萃取实验也证明山柰酚的萃取回收率非常稳定。

实验结果表明,在给药后的 0.25 ~ 48h 的 12 个时间点,3 个化合物在大鼠肝、心、脾、肺、肾组织中应用该方法被检出。在这 5 个组织中,大黄酸在各组织中均于 0.5 ~ 1h 达到含量的峰值,之后缓慢清除出各器官;黄酮苷元(汉黄芩素和千层纸素 A)在组织中清除较慢。结果还显示:目标化合物在大鼠组织的分布曲线基本上都出现双峰现象,该现象可能是由肝肠循环引起的。**TCM**

## The Distribution Study of Three Constituents in Rat after Oral Administration of Luan-Pao-Prescription

Zhang Jinqiang<sup>1</sup>, Huang huilian<sup>2</sup>, Guo Dean<sup>2</sup>, Bi Kaishun<sup>1</sup>

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang Liaoning 110016, China;

2. Shanghai Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To investigate the distribution in rat after oral administration of Luan-Pao-Prescription.

**Methods:** Rhein, wogonin and oroxylin A were quantitatively determined by HPLC/DAD method in rat tissues including liver, heart, spleen, lung and kidney after oral administration of Luan-Pao-Prescription. The separation was performed on a Zorbax SB-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.5% glacial acetic acid aq. (v/v) using linear gradient elution and UV detection at wavelength of 254 and 276nm. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the column was kept at 30°C. **Results:** The HPLC/DAD method for the simultaneous determination of rhein, wogonin and oroxylin A in rat tissues was developed. **Conclusion:** The method has been successfully applied for the distribution study of three active constituents in rat through oral administration of Luan-Pao-Prescription.

[Key Words] Traditional Chinese medicine; Luan-Pao-Prescription; HPLC; Distribution

## 参考文献

- [1] Zhang JQ, Wang XM, Lu ZQ, et al. Quantitative determination of 14 major constituents in the herbal preparation Luan-Pao-Prescription using HPLC coupled with photodiode array detection [J]. Chromatographia, 2007, 66: 267-270.
- [2] Zhang JQ, Huang HL, Chen GT, et al. LC - DAD analysis of six bioactive constituents in rat urine and bile after oral administration of Luan-Pao-Prescription [J]. Chromatographia. 2007, 67: 325-329.
- [3] Guidance for Industry (Bioanalytical Method Validation), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary medicine (CVM). 2001.
- [4] Zhang JQ, Yang M, Jiang BH, et al. Analysis of Major Chemical Constituents in Luan-Pao-Prescription Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Natural Product Communications. 2008; In press.

(收稿日期 2008-03-31)

(上接第 14 页)

孢子的萌发。对萌发所用的麦冬块根进行组分分析,表明黄酮含量达 0.15%。促进麦冬菌根孢子萌发的物质是否为黄酮类化合物、菌根真菌对麦冬块根黄酮类物质的关系正在深入研究中。**TCM**

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社, 2005: 106-107.
- [2] 杨维平. 菌根菌——影响植物群落结构的又一重要因素[J]. 生物学教学, 2002, 27(4): 42.
- [3] 李晓林, 冯固. 丛枝菌根生态生理[M]. 北京: 华文出版社, 2001: 269-275.

- [4] 刘润进. 丛枝菌根及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 66-74.
- [5] Becard G, Fortin JA. 1988. New aspects on the acquisition of biotrophic status by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita[J]. New Phytol, 1998, 112: 77-83.
- [6] 王鸿, 周俊初. 植物组织培养物和根系对 VA 菌根孢子萌发的影响研究[J]. 四川农业大学学报, 1994, 12(3): 353-356.
- [7] Giovannetti M, Citernesi AS. 1993. Time-course of appresorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Mycol Res, 1993, 97(9): 1140-1142.
- [8] 张勇, 谢丽源, 熊丙全, 等. 银杏根系甲醇溶提物对离体培养条件下丛枝菌根真菌生长发育的研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(12): 2233-2236.

(收稿日期 2007-12-25)