

· 药物代谢 ·

赤芍、大黄药对提取物中丹皮酚
和大黄酸的分布研究

陈琳¹, 牛笑怡², 张振秋^{2*}

(1. 大连市第三人民医院, 辽宁 大连 116033; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:建立同时测定大鼠组织中丹皮酚和大黄酸含量的高效液相色谱法。方法:采用 Phenomexsil BDS C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈-0.1%磷酸(37:63)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,以橙黄决明素为内标,在 274 nm 下进行检测。结果:丹皮酚的线性范围为 $Y = -0.055 + 0.03X$ ($r = 0.993\ 2$),日内和日间的 RSD 均 <4.1%;大黄酸的线性范围为 $Y = -0.152 + 0.014X$ ($r = 0.993\ 5$),日内和日间的 RSD 均 <4.9%。组织样品的稳定性符合要求。结论:所建立的大鼠组织中丹皮酚和大黄酸 HPLC 测定方法,适用于大鼠体内赤芍、大黄药对的分布研究。

[关键词] 丹皮酚; 大黄酸; 赤芍; 大黄; 组织; 高效液相色谱法

[中图分类号] R285.5;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0107-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050107

Tissue Distribution of Drug-couple Radix Paeoniae Rubra and Rhei Radix et Rhizoma CHEN Lin¹, NIU Xiao-yi², ZHANG Zhen-qiu^{2*} (1. The Third People's Hospital of Dalian City in Liaoning Province, Dalian 116033, China; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous quantification of paeonol and rhein in the tissue of rats. **Method:** The adopted chromatographic column was Phenomexsil BDS C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (37:63), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and detection wavelength was set at 274 nm. Methyl alcohol was used to precipitate the protein of the plasma samples and the aurantio-obtusin was used as an internal standard. **Result:** The linear range of paeonol was $Y = -0.055 + 0.03X$ ($r = 0.993\ 2$). The intra-day RSD and inter-day RSD were less than 4.1%. For rhein, the linear range was $Y = -0.152 + 0.014X$ ($r = 0.993\ 5$), the intra-day RSD and inter-day RSD were less than 4.9%. The stability of the plasma sample were well acceptable. **Conclusion:** The developed method for the quantification of paeonol and rhein in rat plasma is suitable for the distribution studies of drug-couple Radix Paeoniae Rubra and Rhei Radix et Rhizoma in the tissue of rats.

[Key words] paeonol; rhein; Radix Paeoniae Rubra; Rhei Radix et Rhizoma; tissue; HPLC

赤芍、大黄药对始见于孙思邈《千金方》的神明度命丸^[1]。赤芍、大黄二药伍用,大黄得赤芍直入血分,而破血中之滞,赤芍得大黄则祛瘀力宏,共奏泄热逐瘀,和营止痛之功^[2-3]。两药配伍主治久病,腹中积聚,大小便不通,其上抢心,腹中胀满,逆害饮食之证,现在临床常用于治疗瘀血或湿热所致下腹疼痛。大黄中有效成分主要为蒽醌类,有泻下、抗

炎、解热等作用^[4-7];赤芍中主要含有丹皮酚、氧化芍药苷、芍药苷等成分,有抗血栓、抗血小板聚集、调节心血管、保肝等作用^[8-13]。本文以赤芍、大黄药对的药代动力学研究为基础^[14-17],首次采用 HPLC 内标法同时测定赤芍中主要成分丹皮酚和大黄中主要成分大黄酸在大鼠组织内的含量,探讨其在体内分布情况,为赤芍、大黄药对的临床应

[收稿日期] 20140612(027)

[第一作者] 陈琳,主管中药师,从事中药学药效、药代研究, Tel:15842619189, E-mail:linchendl@sohu.com

[通讯作者] * 张振秋,博士,教授,从事药物分析研究,博士生导师, Tel:0411-85890199, E-mail:zhangzhenqiu@sina.com

用提供科学依据。

1 仪器与试剂

日本岛津高效液相色谱仪 (LC-10Avp 泵, SPD-10Avp 可见-紫外检测器, 浙江大学 N-2000 色谱工作站), AS3120A 型超声波清洗器 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司), AR2140 型电子分析天平 (上海奥豪斯公司), AB135-S 型 1/10 万电子天平 (瑞士 Mettler), TGL-16C 型高速离心机 (上海安亭科学仪器厂), XW-80A 型微型涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司), ACO-328 型电磁式空气压缩机 (广东海利集团有限公司), 微量移液器 (芬兰 Dragon), 101 型电热鼓风干燥箱 (北京市永光明医疗仪器厂), 水浴锅 (常州赛普实验仪器厂), DAS2.0 软件。

大黄酸 (批号 110757-200206), 丹皮酚 (批号 121123) 对照品均由天津一方科技有限公司提供, 纯度为 98%, 橙黄决明素 (批号 20120514, 上海永恒生物科技有限公司)。甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

赤芍和大黄饮片经辽宁中医药大学李峰教授鉴定为芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根及掌叶大黄 *Rheum palmatum* 的干燥根和根茎。

SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 200 ~ 250 g, 均由大连医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (辽) 2008-0002。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验 Phenomsil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, ; 流动相 乙腈-0.1% 磷酸 (37:63), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 274 nm, 进样体积 20 μL。

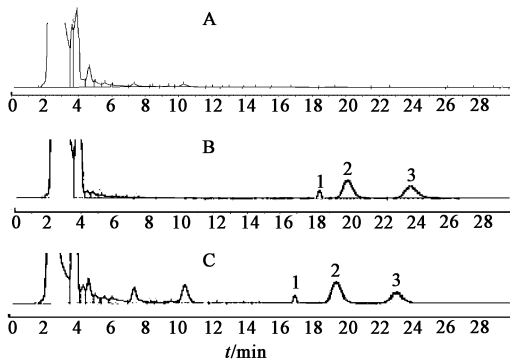
2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 中含丹皮酚 0.832 mg 的对照品储备液; 精密称取大黄酸对照品适量, 加甲醇分别制成每 1 mL 大黄酸 0.077 2 mg 的对照品储备液。

2.3 内标溶液的制备 精密称取橙黄决明素对照品适量, 加甲醇配制成每 1 mL 含橙黄决明素 0.057 2 mg 的对照品溶液。

2.4 组织样品的处理方法 分别取大鼠心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、胃各 0.2 g, 加纯净水 2 mL, 匀浆, 离心 (10 000 r·min⁻¹) 5 min, 吸取上清液 400 μL, 加入内标芍药苷 (0.057 2 g·L⁻¹) 10 μL, 加甲醇 2 mL, 涡旋 2 min, 离心 (10 000 r·min⁻¹) 10 min, 取上清在 40 ℃ 空气流下吹干, 残渣加 50 μL

甲醇, 涡旋 2 min, 离心 5 min (10 000 r·min⁻¹), 吸取 20 μL 进样。

2.5 方法的专属性 取大鼠空白肝组织, 加入一定浓度对照品溶液的空白肝组织, 赤芍、大黄药对提取物灌胃后肝组织样品按 2.4 项下操作, 得色谱图。结果表明, 丹皮酚、大黄酸对照品与内标物色谱峰分离良好, 不受内源性物质的干扰。见图 1。



A. 空白肝组织; B. 空白肝组织 + 内标 (橙黄决明素); C. 赤芍、大黄药对提取物灌胃后 + 内标; 1. 丹皮酚; 2. 橙黄决明素; 3. 大黄酸

图 1 赤芍、大黄药对提取物灌胃后 + 内标的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of paeonol, rhein and aurantio-obtusifolin (internal standard) in rat liver tissue

2.6 线性范围 取大鼠肝各 0.2 g, 加入丹皮酚、大黄酸对照溶液, 配制相当于丹皮酚质量浓度各为 1.664, 4.16, 12.48, 29.12, 66.56, 166.4 mg·L⁻¹ 的组织样品, 相当于大黄酸组织浓度各为 0.772, 2.316, 5.404, 27.02, 61.76, 154.4 mg·L⁻¹ 的组织样品, 照 2.4 项下方法操作, 进样 20 μL, 记录色谱图; 分别以丹皮酚、大黄酸的组织浓度 X 为横坐标, 以待测峰面积与内标物质的峰面积比值 Y 为纵坐标, 用加权最小二乘法求得的直线回归方程。见表 1。

表 1 两种成分的标准曲线方程及线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, and linear ranges of two compounds

化合物	标准曲线	r	线性范围/mg·L ⁻¹
丹皮酚	Y = -0.055 + 0.03X	0.993 2	1.664 ~ 166.4
大黄酸	Y = -0.152 + 0.014X	0.993 5	0.772 ~ 77.2

2.7 提取回收率 取大鼠空白肝组织匀浆上层液 400 μL, 按 2.6 项下方法分别制备丹皮酚、大黄酸低、中、高 3 个质量浓度 (丹皮酚分别为 1.664, 83.2, 166.4 mg·L⁻¹; 大黄酸分别为 0.772, 38.6, 77.2 mg·L⁻¹) 的对照品组织液, 各浓度平行操作 3 个样品, 进样 20 μL, 记录色谱峰面积 (A_i)。另取空白肝组织匀浆上层液 400 μL, 精密加入内标液 10 μL, 乙腈 1 mL,

涡旋混合 2 min,离心 10 min($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液,加入相应浓度的对照品溶液 10 μL (各浓度平行操作 3 个样品),在 40 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干,用 100 μL 甲醇溶解,涡旋 2 min,离心 5 min($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),吸取 20 μL 进样,记录色谱峰面积(A_{r})。以每一种浓度 2 种处理方法得峰面积比值,计算提取回收率。经测定,本法丹皮酚在低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 58.7% ,50.2% ,53.8% ,RSD 分别为 8.2% ,9.4% ,4.8% 。本法大黄酸在低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 68.3% ,61.7% ,63.5% ,RSD 分别为 4.9% ,5.4% ,5.0% 。同法考察内标回收率为 75.1% 。

2.8 精密度与准确度

2.8.1 日内精密度的测定 取大鼠空白肝组织匀浆上清液 400 μL ,于同一日内按 2.6 项下方法分别制备丹

皮酚、大黄酸低、中、高 3 个浓度的对照品组织液,各浓度平行操作 5 个样品,进样 20 μL ,记录峰面积比值,计算 RSD。见表 2。

2.8.2 日间精密度的测定 取大鼠空白肝组织匀浆上清液 400 μL ,连续 3 d 按 2.6 项下方法分别制备丹皮酚、大黄酸低、中、高 3 个浓度的对照品组织液,各浓度平行操作 5 个样品,进样 20 μL ,记录峰面积比值,计算 RSD。见表 2。

2.9 稳定性考察

2.9.1 室温 24 h 稳定性的测定 取大鼠空白肝组织匀浆上清液 500 μL ,按 2.6 项下方法分别制备丹皮酚、大黄酸低、中、高 3 个浓度的对照品组织液,各浓度平行操作 10 个样品,取其中 5 份立即进样 20 μL ,记录峰面积比值,计算 RSD;另外 5 个样品室温放置 24 h 再次测定,记录峰面积比值,计算 RSD。见表 3。

表 2 丹皮酚、大黄酸在大鼠肝组织中的精密度

Table 2 Precision of paeonol and rhein in rat liver tissue

成分	剂量	日内			日间		
	/mg·L ⁻¹	测得量/mg·L ⁻¹	准确度/%	RSD/%	测得量/mg·L ⁻¹	准确度/%	RSD/%
丹皮酚	1.664	1.484	89.2	4.1	1.456	87.5	2.8
	83.2	74.75	89.8	4.1	72.64	87.4	3.0
	166.4	148.2	89.1	3.6	146.5	88.0	2.5
大黄酸	0.772	0.643 2	83.3	4.9	0.661 7	85.7	2.5
	38.6	32.57	84.4	3.6	33.7	87.4	3.1
	77.2	67.07	86.9	3.4	67.994	88.1	3.6

表 3 丹皮酚、大黄酸的稳定性

Table 3 Stability of paeonol and rhein

成分	剂量	24 h 稳定性			冻融稳定性		
	/mg·L ⁻¹	测得量/mg·L ⁻¹	准确度/%	RSD/%	测得量/mg·L ⁻¹	准确度/%	RSD/%
丹皮酚	1.664	1.478	88.8	3.2	1.474	88.6	2.5
	83.2	74.04	89.0	2.9	72.66	87.3	4.1
	166.4	146.8	88.2	3.5	145.7	87.6	3.6
大黄酸	0.772	0.680 7	88.2	3.1	0.667	86.4	1.0
	38.6	33.9	87.8	3.6	33.79	87.5	3.5
	77.2	67.91	67.91	4.0	67.26	86.8	3.1

2.9.2 反复冻融样品的稳定性 取大鼠空白肝组织匀浆上清液 400 μL ,按 2.6 项下方法分别制备丹皮酚、大黄酸低、中、高 3 个浓度的对照品组织液,各浓度平行操作 6 个样品,然后置于冰箱(约 -20 $^{\circ}\text{C}$) 1 d 后全部取出融解后,取出 3 个浓度的样品各 2 份,按 2.4 项下方法进行处理后测定。其余的样品放入冰箱继续冷冻储存,于第 2 天取出余下的所有样品,再次融解后,继续取 3 个浓度的样品各 2 份,按 2.4 项下方法进行处理后测定。剩下的样品再次放入冰箱冷冻,于第 3 天取出,继续取取 3 个浓度的

样品各 2 份,按 2.4 项下方法进行处理后测定。将 3 组测得结果一起分析比较,得到反复冻融样品的稳定性。见表 4。

2.10 赤芍、大黄药对提取物灌胃溶液的制备 取赤芍 150 g,大黄 50 g,精密称定,加 12 倍量水,回流提取 3 次,每次 1 h,过滤,合并 2 次滤液,浓缩至 3 g·mL⁻¹。

2.11 样本采集与处理 取健康雌、雄大鼠各 5 只,实验前禁食 24 h,自由饮水,按 48 g·kg⁻¹ 药材的剂量,灌胃给予 4 mL,于灌胃后 30 min,1,2 h 时处死,

表 4 不同时间点丹皮酚、大黄酸在大鼠体内的组织分布

Table 4 Tissue distribution of paeonol and rhein in rat at different time mg·L⁻¹

成分	组织	各时间点的组织分布		
		30 min	1 h	2 h
丹皮酚	心	17. 56	19. 15	23. 96
	肝	83. 21	79. 66	87. 83
	脾	27. 51	32. 58	21. 39
	肺	28. 72	26. 13	23. 18
	肾	26. 26	24. 99	21. 78
	大肠	30. 33	33. 19	41. 21
	小肠	54. 9	54. 32	56. 99
	胃	74. 19	72. 13	77. 28
大黄酸	心	31. 96	24. 12	23. 96
	肝	63. 37	56. 98	87. 83
	脾	26. 11	19. 24	21. 39
	肺	31. 27	34. 02	23. 18
	肾	28. 82	23. 34	21. 78
	大肠	24. 85	20. 8	41. 21
	小肠	43. 19	39. 95	56. 99
	胃	47. 03	51. 38	77. 28

立即解剖采集心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、胃等组织,生理盐水冲洗组织表面血液和内容物,滤纸吸干,-20℃冰冻保存待测。

2.12 丹皮酚、大黄酸在大鼠体内的组织分布 大鼠灌胃赤芍、大黄提取物后,丹皮酚、大黄酸在大鼠体内不同时间点各组织中的含量。见表 4。

3 讨论

大鼠灌胃赤芍、大黄药对提取物 30 min 时组织中丹皮酚含量从高到低顺序是:肝>胃>小肠>大肠>肺>脾>肾>心;大黄酸含量从高到低顺序是:肝>胃>小肠>心>肺>肾>脾>大肠。

鼠灌胃赤芍、大黄药对提取物 1 h 时组织中丹皮酚含量从高到低顺序是:肝>胃>小肠>大肠>脾>肺>肾>心;大黄酸含量从高到低顺序是:肝>胃>小肠>肺>心>肾>大肠>脾。

鼠灌胃赤芍、大黄药对提取物 2 h 时组织中丹皮酚含量从高到低顺序是:肝>胃>小肠>大肠>心>肺>肾>脾;大黄酸含量从高到低顺序是:肝>小肠>胃>脾>肺>肾>心>大肠。

在沉蛋白的溶剂选择上,分别考察了甲醇、乙腈,结果用乙腈提取不但提取回收率高,而且对内标物质及待测物质的测定均无干扰,故最终选择乙腈沉蛋白法。

大鼠灌胃赤芍、大黄药对提取物后,丹皮酚、大黄酸在各组织中的分布不同,在大肠、小肠、脾、胃等

均有吸收,在肝中待测成分的浓度相对较高;有效成分在器官中的含量与疗效有一定相关性。通过组织分布更加证明了中医归经理论的科学性。

[参考文献]

[1] 孙思邈. 千金方[M]. 张瑞贤校注. 北京:华夏出版社, 1993;191.

[2] 胥庆华. 中药药对大全[M]. 北京:中国中医药出版社,1996;364.

[3] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002: 170,181.

[5] 李红,张艳,于宜平,等. 大黄解热作用与降低血浆一氧化氮作用的 PK-PD 研究[J]. 中国中药杂志,2013, 38(8):1231-1236.

[6] 孙丽霞,任金荣,单保恩,等. 大黄制剂对小鼠的急性毒性和自然免疫调节作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2006,18(1):35-41.

[7] 贺玉琢编译. 大黄趋精神作用[J]. 国外医学:中医中药分册,1997,19(2):9-11.

[8] 王文祥,蒋小岗,顾明. 芍药的化学成份研究[J]. 天然产物研究与开发,2000,12(6):37-38.

[9] 刘超,王静,杨军. 赤芍总苷活血化瘀作用的研究[J]. 中药材,2000,23(9):557-560.

[10] 杨琪伟,杨莉,熊爱玲,等. 赤芍与白芍抗血小板凝集作用的 UPLC-MS 代谢组学初步研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):698-701.

[11] 张永珍,阎西艳. 赤芍和硝苯啉对慢性高脂血症兔血浆 TXB2 和 62 酮 2PGF1α2 的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1990,10(11):669-671.

[12] 朱惠民,祝彼得. 中药赤芍对球囊损伤术后血管重构的干预研究[J]. 中国微循环,2003,7(3):154-156.

[13] 李延昌,孙玉凤,冯志杰,等. 赤芍抗肝纤维化的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(10): 767-768.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010;147

[15] 张村,李丽,肖永庆,等. HPLC 法同时测定大黄不同来源药材中 2 个蒽醌苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(1):53-55.

[16] 张村,李丽,肖永庆,等. 大黄不同饮片中 2 个蒽醌苷类成分的比较研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(22):2872-2875.

[17] 刘爱玲,张盛,王坤波,等. 赤芍中芍药苷和白芍苷纯化工艺研究[J]. 湖南中医药大学学报,2008,28(3): 35-37.

[责任编辑 邹晓翠]