

莪术油中吉马酮在小鼠组织内的分布研究

张辉靠*,王冬东,孙程,吕晓敏,胡荣*(扬州大学医学院,江苏扬州 225001)

中图分类号 R285.5;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0512-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.22

摘要 目的:研究莪术油中吉马酮在小鼠各组织中的分布特征,为莪术油的进一步应用提供参考。方法:取30只KM小鼠ig莪术油0.5 mL,分别于给药1、2、4、8、12 h后随机取6只,采用高效液相色谱法测定其心、肝、脾、肺、肾组织中吉马酮含量;取15只KM小鼠,给药法及取样方法同上,每个时间点取3只,采用荧光法观察上述组织切片中吉马酮的荧光强度;两个实验均取相同数量小鼠作为对照。结果:1~4 h各组织吉马酮浓度随着时间的延长而逐渐增加,4 h时达到峰值,且肝、脾浓度明显高于心、肺,吉马酮在各组织内的浓度依次为肝>脾>肾>心>肺;各组织荧光强度观察结果与上述结果一致。结论:两种方法考察吉马酮在小鼠组织中的分布特征一致,证明吉马酮在肝、脾、肾中分布较多,在心、肺分布较少。

关键词 莪术油;组织分布;吉马酮;高效液相色谱法;荧光观察

Study on the Distribution of Germacrone from Zedoary Turmeric Oil in Tissues of Mice

ZHANG Huikao, WANG Dongdong, SUN Cheng, LYU Xiaomin, HU Rong (Medical College of Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the distribution characteristics of germacrone from zedoary turmeric oil (ZTO) in each tissue of mice, and to provide reference for further application of zedoary turmeric oil. METHODS: 30 KM mice were given zedoary turmeric oil 0.5 mL; 6 mice were randomly selected 1, 2, 4, 8, 12 h after medication, respectively. The contents of germacrone in heart, liver, spleen, lung and kidney tissues were determined by HPLC. 15 KM mice were selected, medication and sampling method were same as above; 3 mice were collected at each time point respectively. The fluorescence intensity of germacrone in above sections were observed by fluorescence. The same number of mice were selected as control in 2 trials. RESULTS: The concentration of germacrone in each tissue 1-4 h increased gradually as time and reached the peak value at 4 h. The contents of germacrone in liver and spleen were significantly higher than in heart and lung. The concentrations of germacrone in each tissue were ranked as liver>spleen>kidney>heart>lung. The results of fluorescence intensity observation was same as above results. CONCLUSIONS: Results of 2 methods show same distribution characteristics of germacrone in mice tissues, and indicate that germacrone is distributed more in liver, spleen and kidney tissues and less in heart and lung.

KEYWORDS Zedoary turmeric oil; Tissue distribution; Germacrone; HPLC; Fluorescence observation

莪术油为莪术经水蒸气蒸馏所得挥发油^[1],其中吉马酮(牻牛儿酮)、 β -榄香烯、莪术醇、莪术二酮等为其有效成分^[2-3],具有抗病毒、抗菌、抗炎、抗肿瘤等多重药理作用^[4]。以莪术油中莪术醇、莪术二酮为指标成分进行血浆浓度及药动学研究常用方法包括毛细管气相色谱法(CGC)^[5]、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[6]、高效液相色谱法(HPLC)^[7]等,尚缺乏对莪术油或其成分在组织分布的研究。吉马酮是2015年版《中国药典》(一部)中莪术油及莪术药材项下的主要质量控制指标成分,且在莪术油中含量较高,利于体内试验生物样品的检测,故本研究选择莪术油中吉马酮作为考察组织分布的含量测量指标。吉马酮属于倍半萜类化合物^[8],有较大的共轭体系,前期预实验证实其具有荧光的特性,利用这一特性,在荧光显微镜下观察各组织冰冻切片荧

光^[9]变化情况,可作为考察莪术油中吉马酮在体内的分布特征研究依据。

1 材料

1.1 仪器

e2695 HPLC仪,包括Waters 2998 PDA检测器、Empower工作站(美国Waters公司);970CRT荧光分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);80i荧光显微镜(日本Nikon公司);TDL-5离心机(昆山飞鸽离心机有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

莪术药材(购自安徽省亳州市众和中药材销售有限责任公司,经扬州大学医学院药用植物与生药教研室刘量博士鉴定,HPLC显示含吉马酮13.38%);吉马酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111665-201204,纯度:100%);美国樱花O.C.T冷冻切片包埋剂(美国Sakura公司,批号:4583,规格:118 mL/支);乙腈、甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂。E-mail: yzkhk1314@163.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:药物制剂。电话:0514-87978840。E-mail:398563432@qq.com

KM小鼠54只,♀♂各半,体质量(25±2)g,由扬州大学比较医学中心提供[许可证号:SYXK(苏)2012-0029]。实验前适应性饲养1周,禁食不禁水24h。

2 方法与结果

2.1 莪术油样品溶液的制备

取莪术药材适量,按2015年版《中国药典》(四部)挥发油测定法甲法^[10]提取,冻除水分,称取5.00g,置于50mL量瓶中,定量加入聚山梨酯80,振摇混匀,加蒸馏水20mL,超声(功率:100W)15min,蒸馏水稀释至刻度,即得质量浓度为0.10g/mL的莪术油样品溶液。

2.2 吉马酮对照品溶液的制备

精密称取吉马酮对照品2mg,置于10mL量瓶中,加乙腈溶解定容,制得0.20mg/mL的吉马酮对照品溶液,再用乙腈稀释制成0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、15.00、20.00μg/mL的吉马酮系列标准溶液。

2.3 样品、空白组织匀浆液的采集与预处理

取30只KM小鼠ig“2.1”项下莪术油样品溶液0.5mL,分别于给药1、2、4、8、12h后随机取6只,颈椎脱臼处死。摘取心、肝、脾、肺、肾,用滤纸吸除表面血液与水分后称取质量,分别加4倍量生理盐水匀浆(g/mL),离心(离心半径为10cm,3000r/min,下同)15min;吸取上清液300μL,置于1.5mL离心管中,加入乙腈0.6mL,涡旋混合5min后离心15min;吸取上清液,用0.45μm微孔滤膜过滤后,即得样品组织匀浆液。另取6只KM小鼠作为空白对照,于给药前颈椎脱臼处死,同上法制得空白组织匀浆液。

2.4 吉马酮的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Symmetry C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~15min,55%~65%A;15~30min,65%~80%A);流速:1mL/min;柱温:25℃;检测波长:210nm;进样量:20μL。

2.4.2 专属性考察 取空白组织匀浆液、空白组织匀浆液+对照品溶液、样品组织匀浆液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果,吉马酮的保留时间为23.6min,在各组织内分离度较好,组织液中内源性物质不干扰其测定。色谱图见图1(仅列出肾组织色谱图,其余图略)。

2.4.3 线性关系、定量下限和检出限考察 精密吸取300μL小鼠空白心、肝、脾、肺、肾组织匀浆液,各7份,分别加入“2.2”项下吉马酮系列标准溶液20μL,涡旋混合,制成质量浓度分别为0.033、0.067、0.133、0.333、0.667、1.000、1.333μg/mL的生物物质控样品(即相当于在各组织中的浓度为0.133、0.267、0.533、1.333、2.667、4.000、5.333μg/g),按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。以各组织中吉马酮浓度(x,μg/g)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。各组织中吉马酮的线性方程、定量下限(信噪比为10)、检出限(信噪比为3)见表1。

2.4.4 精密度试验 精密吸取空白心、肝、脾、肺、肾组

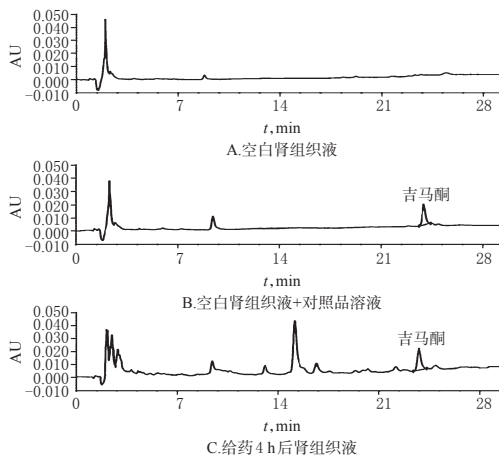


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 各组织中吉马酮的线性方程、定量下限和检出限结果(n=7,μg/g)

Tab 1 Regression equation, lower limit of quantitation and detection of germacron in each tissue of mice (n=7,μg/g)

组织	线性方程	线性范围	r	定量下限	检出限
心	$y=14.954x+345.65$	0.133~5.333	0.999 6	0.133	0.045
肝	$y=14.892x+682.19$	0.133~5.333	0.999 7	0.133	0.045
脾	$y=15.154x+654.98$	0.133~5.333	0.999 3	0.133	0.045
肺	$y=15.132x+490.89$	0.133~5.333	0.999 5	0.133	0.045
肾	$y=14.979x+407.78$	0.133~5.333	0.999 6	0.133	0.045

织匀浆液适量,分别加入吉马酮标准溶液适量,涡旋混合,制备成0.267、1.333、5.333μg/g的生物物质控样品。按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,考察日内精密度和连续6d的日间精密度。结果,日内RSD均小于5%(n=6)、日间RSD均小于11%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 精密吸取“2.4.4”项下生物物质控样品适量,分别测定室温放置12h、4℃保存4周、-20℃反复冻融3次的稳定性,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果,3项稳定性试验的RSD均小于10%(n=6),表明样品稳定性良好。

2.4.6 准确度试验 以方法回收率考察本方法的准确度。精密吸取“2.4.4”项下生物物质控样品溶液适量,共6份,按“2.4”项下色谱条件进样测定。结果,各生物物质控样品的方法回收率均在93%~102%之间(RSD<15%,n=6),表明本方法的准确度良好。

2.5 吉马酮在小鼠各组织分布考察

按“2.3”项下方法收集和处理组织匀浆,按“2.4”项下色谱条件进样测定,测定各组织各时间点吉马酮的含量,结果见图2。

由图2可知,1~4h各组织中吉马酮浓度随时间的延长而增加;在给药后4h,各组织中吉马酮的浓度达到峰值,且肝、脾中浓度明显高于心、肺;4~12h组织浓度呈现下降趋势。吉马酮在各组织内的浓度大小依次为:

肝>脾>肾>心>肺,第12 h心和肺内已不能检测出。

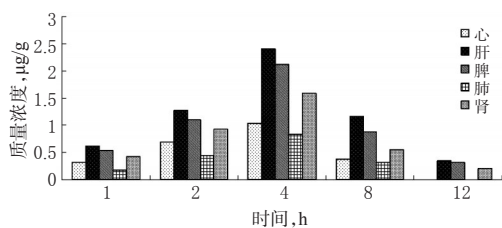


图2 小鼠各组织中吉马酮的浓度 ($n=6, \mu\text{g/g}$)

Fig 2 The concentration of germacrone in each tissue of mice ($n=6, \mu\text{g/g}$)

2.6 小鼠各组织切片荧光观察

取15只KM小鼠ig吉马酮对照品溶液0.5 mL (0.5 mg/mL, 溶剂为10%乙醇), 分别于给药1、2、4、8、12 h后随机取3只, 颈椎脱臼处死后, 取出心、肝、脾、肺、肾, 用滤纸吸除表面血液与水分后称取质量, 冰冻切10 μm 片; 另取3只作为空白对照, 于给药前处死, 其余方法同上。各组织用黏附性载玻片黏附并标记, 依次置于荧光显微镜下观察。小鼠各组织中吉马酮的荧光强度观察结果见表2。

表2 小鼠各组织中吉马酮的荧光强度观察结果 ($n=3$)

Tab 2 Fluorescence intensity of germacrone in each tissue of mice ($n=3$)

组织	时间点				
	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h
空白	-	-	-	-	-
心	*	**	***	**	*
肝	*	**	*****	*****	**
脾	*	**	*****	*****	***
肺	*	**	**	*	-
肾	**	****	*****	****	***

注: “*”表示荧光的强弱; “-”表示未检测到荧光

Note: “*” means the intensity of fluorescence; “-” means fluorescence not detected

由表2可知, 吉马酮ig后, 小鼠各组织中呈现了明显的荧光分布规律。1~4 h, 各组织中的荧光强度随着时间的变化而逐渐增强; 在4 h时, 各组织荧光强度达到最强值, 各组织中的荧光强度排序为: 肝>脾>肾>心>肺; 4~12 h, 各组织中荧光强度逐渐减弱; 在12 h时, 心、肺组织中已很难观察到荧光。

3 讨论

药物被机体吸收后, 由循环系统运送到各个组织器官。药物的组织分布受多种因素的影响, 如药物的理化性质、与组织的亲和力等。了解药物的组织分布特点, 有助于更好地发挥药物疗效。本研究采用ig给药方式, 通过两种方法考察了莪术油中吉马酮在小鼠体内的组织分布情况, 结果可靠、直观。前期预试验中, 研究组对组织切片的方法进行考察发现, 冰冻切片法^[11]较石蜡切片快捷、简便, 较好地保留了新鲜组织中原型药物。因此采用此法对吉马酮ig给药后的新鲜组织样品进行切

片, 再在荧光显微镜下观察其荧光强弱。

小鼠单次ig莪术油或吉马酮对照品后, 通过吉马酮含量测定及荧光观察, 可以得出吉马酮在小鼠各组织中的分布随着时间的变化而变化。4 h时, 吉马酮组织浓度达到最高, 在组织中的总体分布趋势为: 肝>脾>肾>心>肺, 说明吉马酮与肝、脾亲和力较高, 与莪术油归肝、脾经的中医药理论相符。莪术油在临床上主要用于抗病毒、抗炎, 这可能与其主要成分吉马酮作用于脾脏组织、提高了机体自身的免疫力有关。

综上所述, 莪术油中吉马酮在小鼠肝、脾、肾组织中分布较多, 在心、肺分布较少, 为莪术油口服制剂研发及含吉马酮相关制剂的组织分布研究提供了参考, 同时也为莪术油的归经理论提供了一定的现代科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 412-413.
- [2] He H, Ma S, Tian S, et al. HPLC determination of six components in zedoary turmeric oil and its related injections[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2010, 35(5): 593-597.
- [3] Chen M, Wang S, Tan M, et al. Applications of nanoparticles in herbal medicine: zedoary turmeric oil and its active compound β -elemene[J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(6): 1093-1102.
- [4] 展晓日, 曾昭武, 孟凡莉, 等. 莪术油药理学研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2011, 10(5): 454-458.
- [5] 孙艳涛, 张振秋, 李想, 等. CGC法同时测定两种莪术油在大鼠血浆中莪术醇和莪术二酮的含量[J]. *中成药*, 2010, 32(6): 991-995.
- [6] Peng Y, Zhang M, Li W, et al. A validated LC-MS/MS assay for the quantitative determination of curdione in rabbit plasma and its application to a pharmacokinetic study after administration of zedoary turmeric oil and bioavailability of the oil[J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(10): 1360-1365.
- [7] 季德, 毛春芹, 李金慈, 等. 莪术挥发油中莪术二酮、吉马酮在大鼠体内的药动学研究[J]. *中成药*, 2013, 35(12): 2622-2626.
- [8] 崔友, 孙秀燕, 张慧. 薄层色谱法鉴定莪术油中倍半萜类成分的研究[J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1119-1121.
- [9] 蒋莹. 荧光法在生物样品理化检测标准中的应用进展[J]. *中国医药指南*, 2016, 14(4): 45-46.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 203-204.
- [11] Taylor SR, Jorgensen JB. Use of fluorescent angiography to assess donor site perfusion prior to free tissue transfer[J]. *Laryngoscope*, 2015, 125(6): 192-197.

(收稿日期: 2016-06-21 修回日期: 2016-10-18)

(编辑: 刘明伟)