

# 寿胎丸提取液透过妊娠大鼠胎盘屏障的药物成分研究

邓丽丽<sup>1</sup> 宋殿荣<sup>1</sup> 胡丽萍<sup>3</sup> 王跃飞<sup>2</sup>

(1 天津中医药大学第二附属医院妇科, 300150; 2 天津中医药大学中医药研究院, 省部共建教育部方剂重点实验室; 3 海洋石油总医院)

**摘要** 目的: 对不同孕期妊娠大鼠给予寿胎丸提取液(STW), 采用 HPLC 研究 STW 透过胎盘屏障的药物成分。方法: 早、中、晚孕期 Wistar 大鼠灌胃 STW, 连续给药 5 天后, 取母体血浆(母血)、脐静脉血及胚胎组织, 用 HPLC 法检测其中所含药物成分。结果: 在实验剂量下, 各孕期 1h 母血中均检测到马钱子苷和槲皮苷, 12h 母血、脐静脉血及胚胎组织中均未检测到待测成分。结论: 实验剂量下, STW 的药物成分未透过胎盘屏障, 提示妊娠期应用寿胎丸不会造成胎儿的宫内暴露。

**关键词** 寿胎丸; 马钱子苷; 槲皮苷; 胎盘屏障; HPLC

## Study on ingredients of Shou Tai Wan extract through placental barrier of rat in pregnancy

Deng Lili<sup>1</sup>, Song Dianrong<sup>1</sup>, Hu Liping<sup>3</sup>, et al.

(1 Gynecology Department of the Second Hospital Affiliated to Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China; 2 The TCM Research Centre of Tianjin University of TCM, Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education; 3 CNOOC General Hospital)

**Abstract Objective:** Use HPLC to study the permeation of ingredients of Shou Tai Wan extract(STW) through placental barriers of Wistar rats at different stages of pregnancy. **Methods:** The pregnant rats were administered by gavage STW for 5 days at early, middle and late stages of pregnancy. Hepatic portal vein plasma, umbilical veins plasma (at late stage of pregnancy) and embryonic tissues were obtained 1 h, 12 h after the final administration of STW. The compounds in biological specimens were identified by HPLC. **Results:** Among the range of experimental doses, loganin and quercitrin were main compounds in 1 h maternal blood but nothing could be examined in 12 h maternal blood, umbilical veins plasma and embryonic tissues at different stages of pregnancy. **Conclusion:** Under the range of experimental doses, the compounds of STW didn't permeate through placental barriers of rats. This result showed that the application of STW is safe to embryo in pregnancy.

**Key Words** Shou Tai Wan; Loganin; Quercitrin; Placental barrier; HPLC

寿胎丸是清代名医张锡纯所创, 主要功能是补肾、养血、安胎, 由炒菟丝子、桑寄生、川续断、阿胶组成, 现广泛用于妊娠期, 其药效已得到了充分肯定<sup>[1-4]</sup>, 现代药理研究亦表明寿胎丸具有安胎作用<sup>[5-7]</sup>。目前对寿胎丸的研究主要集中在单味药的化学成分、药理作用及复方的生殖毒性方面<sup>[8-14]</sup>, 对发挥作用的药效物质基础未见详细报道。运用中药血清药物化学<sup>[15]</sup>方法鉴定血中的移行成分, 阐明体内直接作用物质及体内动态过程, 可以确定中药复方可能的药效成分。因此, 本研究通过对不同孕期 Wistar 大鼠灌胃 STW, 采用 HPLC 研究灌服 STW 后母血、脐静脉血及胚胎组织中的药物成分, 确定透过胎盘屏障的药物成分, 阐明中药胚胎毒性可能的物质基础, 以评价妊娠期应用的安全性。

## 1 材料

1.1 试药与试剂 菟丝子、桑寄生、续断、阿胶药材均购于安徽新兴中药材饮片有限公司, 经天津中医药大学

学郭俊华教授鉴定符合国家 2010 年版药典质量控制标准。标准品绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷、山柰酚(批号分别为: 110753 - 200413、111521 - 200303、111538 - 200403、110861 - 200808, 中国药品生物制品检定所); 马钱子苷、川续断皂苷 VI(纯度 >98%, 天津中医药大学中药研究院提供); 甲醇(色谱纯, 德国 Merk 公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merk 公司); 乙醇(分析纯, 天津市北方天医化学试剂厂); 甲酸(分析纯, 天津市北方天医化学试剂厂); 纯净水(美国 Millipore 超纯水制备系统)。

1.2 动物 SPF 级未交配过的 Wistar 大鼠, 体重约 200 ~ 220g(雌), 350 ~ 380g(雄), 天津市山川红实验动物科技有限公司, 许可证编号: SCXK(津)2009 - 001。Wistar 大鼠以雌雄 1: 2 比例合笼, 次日清晨查看托盘内阴道栓, 将发现阴栓的当日定为妊娠第 0 天, 妊娠第 6 ~ 10 天、11 ~ 15 天、16 ~ 20 天分别为孕早、中、晚期。

1.3 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括自动进样器、DAD 检测器、Agilent 色谱工作站, 美国 Agi-

lent 科技有限公司);METTLER TOLEDO AX205( 十万分之一天平,瑞士 METTLER TOLEDO 公司);JA5003A 分析天平(准确称量到 1mg,上海精密科学仪器有限公司);TOMOS MODEL 2 - 16A 高速离心机(美国 TOMOS 公司);KQ - 250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XW - 80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);N - EAVPTM111 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

## 2 方法

**2.1 STW 的制备** 精密称取干燥的寿胎丸药材粉末 0.5g(菟丝子:桑寄生:续断:阿胶 = 2:1:1:1),置 50mL 具塞锥形瓶中,加入 25mL75% 甲醇中,超声处理 30min,经 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤后备用。同法处理适量药材,浓缩定容至浓度为 1g(药材)/mL 提取液,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称定绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷、山柰酚、马钱子苷、川续断皂苷 VI 等标准品适量,置于 10mL 容量瓶中,用 75% 甲醇溶解定容至刻度,配成浓度分别为 0.559、0.504、0.545、0.522、0.560、0.504mg/mL 的标准品储备液,并于 4 $^{\circ}$ C 保存。

**2.3 生物样品的制备** 将早、中、晚期孕鼠随机分为 2 组,每组 3 只。实验组按 5.4g/kg 灌胃 STW,对照组灌胃生理盐水 1mL/次,1 次/日,各孕期连续给药 5 天,末次给药后 1、12h 取材。乙醚麻醉后,肝门静脉取血 1mL,脐静脉血 0.5mL,剖宫取出胚胎组织。全血 14000r/min 离心 10min,获得血浆。胚胎组织以生理盐水漂洗除去残留血液,滤纸吸干表面水分,称重并记录,锡纸包裹。血浆及胚胎组织均 -80 $^{\circ}$ C 冷冻备用。

**2.4 色谱条件** 色谱柱:Agilent Zorbax SB - C<sub>18</sub> (2.1mm $\times$ 100mm,3.5 $\mu$ m);流动相:A 为 0.05% 甲酸水溶液,B 为乙腈,(0~40min,7%~30%B);检测波长:254nm;流速:0.4mL/min;柱温 40 $^{\circ}$ C;进样量:20 $\mu$ L。

**2.5 生物样品处理方法** 血浆、胚胎组织置于室温条件下融化。孕早期称取全部胚胎组织重量;随机取孕中期及晚期胎鼠各 3 只,称取胎鼠重量,按胚胎组织:生理盐水(1g:1mL)的比例加入生理盐水,冰浴条件下,于匀浆器中充分匀浆。

精密吸取 0.2mL 血浆,加入 10 $\mu$ L 0.1mol/L 盐酸,涡旋 30s,加入甲醇 1mL,涡旋 1min,室温静置 30min,14000r/min 离心 10min,取上清液,于 40 $^{\circ}$ C 水浴,氮气吹干。残渣以 100 $\mu$ L 流动相复溶,涡旋 2min,14000r/min 离心 10min,取上清液进样。精密吸取 1mL 胚胎组织匀浆液,精确分装于 5 个炮弹管中,处理方法同

血浆。

## 3 结果

灌服 STW 后,比对 STW、空白血、母血、脐静脉血及胚胎组织 HPLC 指纹图谱。可知:给药后 1h,各孕期母血中均检测到 2 个色谱峰,分别归属为 3 号峰(马钱子苷)和 8 号峰(槲皮苷),胚胎组织中未检测到待测成分,见图 1~图 2。给药后 12h,各孕期母血、脐静脉血及胚胎组织中均未检测到待测成分,见图 3~图 4。

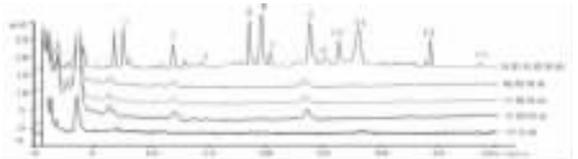


图 1 给药 1h 母血 HPLC 图

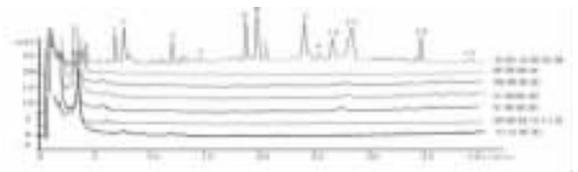


图 2 给药 1h 脐静脉血、胚胎组织 HPLC 图

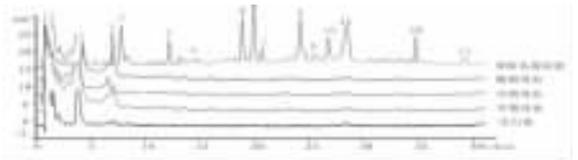


图 3 给药 12h 母血 HPLC 图

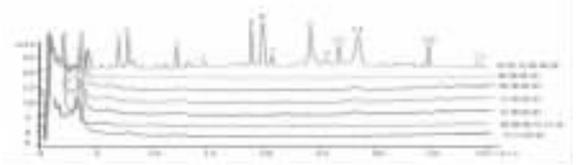


图 4 给药 12h 脐静脉血、胚胎组织 HPLC 图

2. 绿原酸;3. 马钱子苷;6. 金丝桃苷;8. 槲皮苷;  
12. 川续断皂苷 VI;13. 山柰酚

## 4 讨论

寿胎丸中主要含有黄酮类和生物碱类化合物,其中菟丝子及桑寄生含黄酮类物质较多<sup>[8-9]</sup>,最佳检测波长在 365nm<sup>[16]</sup>,续断中环烯醚萜苷类化合物<sup>[10]</sup>的最佳检测波长则在 212nm<sup>[16]</sup>。实验条件下,选取 360nm 波长时,续断可检测的色谱峰少;选取 212nm 波长响应高,但基线噪声大,造成基线不稳。而在 254nm 波长下三种药物成分均有较强吸收,能够满足本实验的测定要求。因此,最终确定紫外检测波长为 254nm。

一般黄酮类化合物(金丝桃苷、槲皮苷、山柰酚)难溶或不溶于水,偏酸性<sup>[17]</sup>。酸性物质在胃内的吸收率高于小肠及大肠,一般脂溶性成分易于被消化道吸收,但是药物必须有一定的溶解度才能在消化道中很好地分散、吸收,而黄酮类物质溶解度小,且胃内容物

会很快排至小肠及大肠,所以黄酮类物质的生物利用度不高。环烯醚萜苷类化合物多连有极性官能团,极性大,偏亲水性<sup>[17]</sup>,不易透过消化道内由脂质构成的上皮细胞膜,生物利用度差。因此实验中对不同孕期大鼠给药 1h 后,仅母血中检测到马钱子苷和槲皮苷两种物质,可能来自川续断和菟丝子或桑寄生;而 12h 母血中均未检测到任何成分。

药物吸收入血后,随血液分布到机体各组织中。胎盘屏障是存在于母体与胎儿循环系统之间,控制母体与胎儿间的物质流通结构,也是药物由母体进入胎儿的流通结构,可减少药物或毒物的胎儿宫内暴露。药物进入母体后,透过胎盘屏障的药物成分须经脐静脉进入胎儿体内,对胎儿的生长发育产生直接影响,而未透过胎盘屏障的药物成分对胎儿的影响可能较小。经研究可知,实验剂量下,孕早、中、晚期脐静脉血及胚胎组织中均未检测到 STW 的药物成分,提示妊娠期应用寿胎丸不会造成胎儿的宫内暴露,但对胎儿是否安全还需要大样本的临床观察。

参考文献

[ 1 ] Wramsby M L, Sten L S, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of Factor V Leiden mutation. *Fertil Steril*, 2000, 7( 5 ): 987 - 991.

[ 2 ] 潘星宇. 寿胎丸加味治疗习惯性流产 62 例疗效观察[ J ]. *光明中医*, 2004, 19( 4 ): 59 - 60.

[ 3 ] 杨东霞, 马宝璋, 曲凡, 等. 寿胎丸治疗抗心磷脂抗体阳性致反复自然流产 42 例[ J ]. *中医杂志*, 2006, 47( 11 ): 848 - 849.

[ 4 ] 秦文敏. 反复自然流产的古今文献及方药证治规律研究[ D ]. 广州中医药大学, 2009: 6.

[ 5 ] 刘丹卓, 尤昭玲, 赵新广, 等. 寿胎丸对大耳白孕兔胚胎 - 胎仔发育毒性的研究[ J ]. *湖南中医杂志*, 2009, 25( 1 ): 89 - 90.

[ 6 ] 何冬梅, 尤昭玲, 赖毛华, 等. 寿胎丸对反复自然流产小鼠母胎界面 CD4<sup>+</sup> T 细胞 STAT 信号转导途径的影响[ J ]. *中国中医药信息杂志*, 2010, 1( 17 ): 23 - 25.

[ 7 ] 刘慧萍, 尤昭玲, 卢芳国, 等. 寿胎丸对自然流产模型小鼠母胎界面  $\gamma$  - 干扰素和白介素 - 10 基因表达的影响[ J ]. *中华中医药学刊*, 2009, 27( 7 ): 1447 - 1449.

[ 8 ] 胡丽萍, 王跃飞, 宋殿荣, 等. HPLC - UV - M 法同时测定菟丝子中 5 种成分的含量[ J ]. *中草药*, 2010, 33( 8 ): 1277 - 1279.

[ 9 ] 曹越, 彭维, 苏薇薇, 等. 广东从化桑寄生药材的 HPLC 指纹图谱研究[ J ]. *中药材*, 2010, 33( 4 ): 532 - 535.

[ 10 ] 刘二伟, 吴帅, 樊官伟. 川续断化学成分及药理作用研究进展[ J ]. *中华中医药学刊*, 2010, 28( 71 ): 1421 - 1423.

[ 11 ] 柯江维, 王建红, 赵宏, 等. 菟丝子黄酮对心理应激雌性大鼠海马 - 下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴性激素受体的影响[ J ]. *中草药*, 2006, 37( 1 ): 90 - 92.

[ 12 ] 丁立, 钱江, 张颂, 等. 寿胎丸的药效学和毒理学研究[ J ]. *中药药理与临床*, 1997, 13( 5 ): 5 - 8.

[ 13 ] 刘丹卓, 尤昭玲, 赵新广. 寿胎丸对 SD 孕鼠胚胎 - 胎仔发育毒性的研究[ J ]. *时珍国医国药*, 2009, 20( 12 ): 2919 - 2920.

[ 14 ] 彭汨. 寿胎丸对大鼠妊娠期及胚胎发育生殖安全性的影响[ D ]. 湖南中医药大学, 2009: 5.

[ 15 ] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究[ J ]. *世界科学技术 - 中药现代化*, 2002, 4( 2 ): 1 - 5.

[ 16 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典( 一部)[ S ]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 281 - 309.

[ 17 ] 吴立军. 实用天然有机产物化学[ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 873 - 1001.

( 2012 - 05 - 21 收稿 )

## 世界中联副主席兼秘书长李振吉教授率世界中联代表团参加 ISO/TC249 第三次全体大会

2012 年 5 月 21 日至 24 日, ISO/TC249 第三次全体大会在韩国大田召开。来自澳大利亚、加拿大、中国、德国、意大利、日本、挪威、韩国、新加坡、南非、西班牙、泰国、蒙古、美国共 14 个国家和世界中联、世界针联两个 A 级联络组织共 130 余位代表参加了会议。世界中联李振吉副主席兼秘书长率世界中联代表团参加了本次会议。作为 ISO/TC249 的 A 级联络组织, 世界中联积极参与 ISO/TC249 的相关活动, 已提出多项新工作项目提案, 并积极倡导各国会员参与中医药国际标准化活动。

大会开幕式上, ISO/TC249 主席 David Graham 博士, 沈远东秘书长作了工作报告。各国代表就编辑小组人选、TC249 官方语言、与 ISO/TC215 成立 JWG( 联合工作组 )、TC249 Business Plan( 工作计划 )、TC249 工作程序、WG1 与 WG2 工作范围等问题进行了讨论。会议期间, WG1( 种子种苗 )、WG2( 中药产品 )、WG3( 针灸针 )、WG4( 中医诊疗设备 ) 和 WG5( 中医药信息 ) 5 个工作组分别召开了小组会议, 对 23 个项目( 包括 2 个 WD 阶段项目和 21 个 NWIP 阶段项目 ) 进行了深入讨论。

在 worlds 世界中联王奎教授与韩国高丙熙教授作为联合召集人共同主持召开的 WG5 第二次工作组会议上, 确定了工作组的工作范围( SCOPE ),

工作计划( WORK PLAN ), 讨论了与 TC215( 健康信息技术委员会 ) 建立 JWG( 联合工作组 ) 等相关问题, 并对现有的 4 项新工作项目提案( NWIP ) 进行了深入讨论。WG5 现有 4 个新工作项目提案, 分别为: 中医基本名词术语( 世界中联 ); 中药材基本名词术语( 世界中联 ); 中药编码系统; 中医药术语集构架标准 - 临床术语部分。经过认真讨论, 工作组形成决议, 向 TC249 建议“中药材基本名词术语”和“中药编码系统”2 个新工作项目提案进入投票程序。

5 月 24 日, 5 个工作组召集人向大会作了报告, 并讨论形成了大会决议。根据大会决议, 23 个项目中, 针灸针和人参种子种苗 2 个项目将由 WD 阶段推进到 CD 阶段, 传统药材重金属检测、电针仪质量、电针仪安全、煎药机、灸器、皮内针、耳针、中药材基本名词、中药编码系统、电子脉冲诊疗设备的通用要求、计算机化舌诊设备共 11 个项目将进入 NP 阶段, 在会后将启动投票程序, 投票通过后即可立项。

自 ISO/TC249 第二次大会会有第一批提案项目, 到本次大会收到 23 项提案项目, ISO/TC249 的中医药国际标准化活动已经走上了稳步发展的轨道, 第一批中医药 ISO 国际标准将于近年内诞生。下一届 ISO/TC249 全体大会将在南非召开。