

黄连、木香药对提取物中盐酸小檗碱在大鼠血浆中的药动学研究

万琳琳¹, 张振秋^{1*}, 刘文君², 刘泽华³ (1.辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2.沈阳市神龙药业有限公司, 沈阳 110168; 3.沈阳圣元药业有限公司, 沈阳 110043)

摘要: 目的 大鼠灌胃黄连-木香药对提取物后, 测定盐酸小檗碱在大鼠血浆中的药动学参数, 研究药对配伍后对盐酸小檗碱在大鼠血浆中的影响。方法 采用高效液相色谱法测定大鼠灌胃后血浆中盐酸小檗碱的含量, 色谱柱: Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(42:58), 每 100 mL 含有 0.34 g 磷酸二氢钾, 0.17 g 十二烷基硫酸钠; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 349 nm, 柱温: 35 °C。结果 药对提取物药动学参数: MRT₍₀₋₂₄₎(12.470±1.538)h, MRT_(0→∞)(29.711±7.176)h, AUC₍₀₋₂₄₎(17.797±7.956)mg·L⁻¹·h⁻¹, AUC_(0→∞)(92.522±53.784)mg·L⁻¹·h⁻¹, T_{max} 2 h, C_{max}(1.360±0.042)mg·L⁻¹。结论 黄连、木香药对配伍后, 采用 DAS2.0 软件处理, 房室模型拟合分析, 药室模型符合一房室模型。

关键词: 黄连; 木香; 盐酸小檗碱; 药动学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)06-0443-04

Pharmacokinetic Study on Berberine in the Extract of Rhizoma Coptidis-Radix Aucklandiae Drug-pair in Rats

WAN Linlin¹, ZHANG Zhenqiu^{1*}, LIU Wenjun², LIU Zehua³ (1.Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2.Shenyang Shenlong Drug Industry Co.,Ltd., Shenyang 110168, China; 3. Shenyang Shengyuan Drug Industry Co.,Ltd., Shenyang 110043, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The pharmacokinetic parameters of berberine in rat plasma were studied after oral administration to the monomer of drug-pair of Rhizoma Coptidis-Radix Aucklandiae and explored the pharmacokinetics effect on berberine in rat plasma after oral administration to drug-pair. **METHODS** The HPLC method was used to determine the quantity of berberine in rat plasma. The Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)column was used, the mobile phase consisted of acetonitrile and water (42:58), including 0.34 g Potassium dihydrogen phosphate and 0.17 g Sodium dodecyl sulfate per 100 mL, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the UV detector was operated at 349 nm and the column temperature was controlled at 35 °C. **RESULTS** Pharmacokinetic parameters of the extract of drug-pair: MRT₍₀₋₂₄₎(12.470±1.538)h, MRT_(0→∞)(29.711±7.176)h, AUC₍₀₋₂₄₎(17.797±7.956) mg·L⁻¹·h⁻¹, AUC_(0→∞)(92.522±53.784) mg·L⁻¹·h⁻¹, T_{max} 2 h, C_{max}(1.360±0.042) mg·L⁻¹. **CONCLUSION** Drug-pair of Rhizoma Coptidis-Radix Aucklandiae is one-compartment model.

KEY WORDS: Rhizoma Coptidis; Radix Aucklandiae; berberine; pharmacokinetics

中药药动学研究近几年发展迅速, 由于中药成分复杂, 药效成分不明确, 大多以中药材或制剂的标示成分的纯品进行药动学的研究, 并是在化学成分的含量和变化、药理作用等方面研究较多, 对各药材之间相互影响及其机制的探讨研究, 药对之间在动物体内药物代谢动力学的研究较少。本实验以药对为研究对象, 研究其相互影响, 揭示药对组成的机制。

黄连、木香药对由黄连(吴茱萸制)、木香组成, 配伍比例为 5:1, 具有清热化湿、行气止痛的功效, 用于大肠湿热所致的痢疾, 肠炎, 疗效确切。盐酸小檗碱是黄连药材的主要有效成分, 本实验以黄连-木香药对 5:1 的提取物为主要研究对象, 研究药

对在大鼠体内的药物代谢动力学行为及药动学参数, 以探讨中药药对的作用配伍机制。

1 材料与仪器

1.1 试药与动物

盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-200208), 土的宁对照品(批号: 705-9004)(均购自中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 纯度大于 98%), 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钾(沈阳试剂一厂), 十二烷基硫酸钠(沈阳市联邦试剂厂), 试验用水为重蒸水, 黄连、木香药材均购自河北安国, 经辽宁中医药大学李峰教授鉴定黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎, 木香为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根。

作者简介: 万琳琳, 女, 硕士研究生 *通信作者: 张振秋, 男, 博士, 教授 Tel: (0411) 87586058 Email: zhangzhenqiu@sina.com

1.2 实验动物

SD 大鼠[♀♂兼用, 体重 250~300 g, 购自大连医科大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK(辽)2004-0017]。

1.3 仪器

岛津高效液相色谱仪, LC-10ATvp 输液泵, SPD-10Avp 紫外检测器(日本岛津公司), TGL-16G 型离心机(上海安亭仪器厂), XW-80A 涡旋混合器(上海沪西仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1]

色谱柱: Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(42:58), 每 100 mL 含 0.34 g 磷酸二氢钾, 0.17 g 十二烷基硫酸钠; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 345 nm; 柱温: 35 ℃。

2.2 溶液的配制

2.2.1 盐酸小檗碱系列对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱适量, 用盐酸-甲醇(1:100)溶解制成

2.112 μg·mL⁻¹ 的储备液。分别精密量取储备液适量, 用盐酸-甲醇(1:100)稀释成浓度为 0.066, 0.132, 0.264, 0.528, 1.056, 2.112 μg·mL⁻¹ 的盐酸小檗碱系列对照品溶液, 置 4 ℃ 冰箱中保存。

2.2.2 内标溶液 精密称取土的宁适量, 用甲醇溶解配制成 0.098 4 mg·mL⁻¹ 的内标溶液, 置 4 ℃ 冰箱中保存。

2.3 血浆样品中盐酸小檗碱分析方法的评价

2.3.1 血浆样品的处理 取血浆样品 200 μL, 置 5.0 mL 离心管中, 加入内标溶液 50 μL, 加入 1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 100 μL, 甲醇 2.0 mL, 涡旋 2 min, 离心 5 min(10 000 r·min⁻¹), 取上清液, 45 ℃ 空气流下吹干, 用 50 μL 甲醇溶解, 涡旋 2 min, 离心 5 min(10 000 r·min⁻¹), 取 20 μL 进样。

2.3.2 方法专属性 大鼠空白血浆、空白血浆加对照品溶液及内标溶液、灌胃后血浆样品加内标溶液的色谱图见图 1。结果表明, 盐酸小檗碱与内标物色谱峰分离良好, 不受内源性物质的干扰。

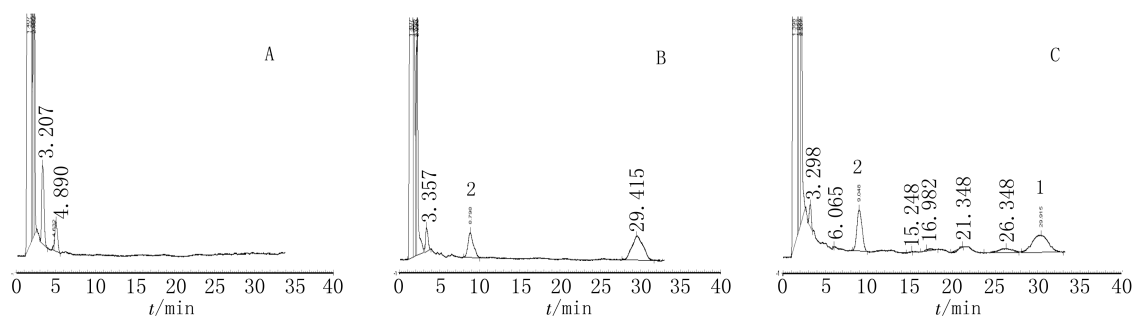


图 1 大鼠血浆中盐酸小檗碱和内标的高效液相色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+内标物(土的宁)+盐酸小檗碱; C-大鼠 ig 药对提取物后 2 h 的血浆样品;
1-盐酸小檗碱; 2-土的宁

Fig 1 HPLC chromatograms of berberine and strychnine (internal standard) in rat plasma

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with internal standard-strychnine and berberine; C-plasma sample 2 h after ig drug-pair extracts to a rat;
1-berberine; 2-strychnine

2.3.3 线性范围 取大鼠空白血浆 200 μL, 依次加入系列对照品溶液 20 μL, 配制成相当于大鼠血浆药物浓度为 0.006 6, 0.013 2, 0.026 4, 0.052 8, 0.105 6, 0.211 2 μg·mL⁻¹。按“2.3.1”项下操作, 进行测定, 建立标准曲线。以血浆中盐酸小檗碱的浓度(X)为横坐标, 盐酸小檗碱峰面积与内标峰面积的比值(Y)为纵坐标, 用加权(1·C⁻²)最小二乘法^[2]进行回归计算, 求得直线回归方程为 $Y=7.474\ 6\ X+0.191\ 25$, $r=0.994\ 8$, 表明血浆中盐酸小檗碱在 0.006 6~0.211 2 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 定量限为 0.002 μg·mL⁻¹。

2.3.4 盐酸小檗碱提取回收率 取大鼠空白血浆 200 μL, 加入按“2.2.3”项下方法制备含盐酸小檗碱

分别为 0.006 6, 0.026 4, 0.211 2 μg·mL⁻¹ 的对照品血浆, 每一浓度进行 6 样本分析, 按“2.3.1”项下操作。另取空白血浆 200 μL, 加入内标溶液 50 μL, 加入 1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 100 μL, 甲醇 2.0 mL, 涡旋 2 min, 离心 5 min(10 000 r·min⁻¹), 取上清液, 分别加入相应浓度的对照品溶液 20 μL(各浓度平行操作 3 个样品), 45 ℃ 空气流下吹干, 用 50 μL 甲醇溶解, 涡旋 2 min, 离心 5 min(10 000 r·min⁻¹)。分别取 20 μL 进行 HPLC 分析, 获得相应峰面积值(测定的平均值)。以每一种浓度两种处理方法得峰面积比值, 计算提取回收率。经测定, 低、中、高浓度的盐酸小檗碱的平均提取回收率分别为 93.4%, 96.2%, 90.3%。

2.3.5 内标物提取回收率 取大鼠空白血浆 200 μL 6 份, 按“2.3.1”项下操作。另取空白血浆 200 μL , 加入 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾 100 μL , 甲醇 2.0 mL, 涡旋 2 min, 离心 5 min(10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液, 加入内标溶液 50 μL (各浓度平行操作 3 个样品), 45 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干, 用 50 μL 甲醇溶解, 涡旋 2 min, 离心 5 min(10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)。分别取 20 μL 进行 HPLC 分析, 获得相应峰面积值(测定的平均值)。以两种处理方法得峰面积比值, 计算提取回收率。经测定, 士的宁的平均提取回收率为 97.7%。

2.3.6 日内精密度 分别取 18 份 200 μL 的空白血浆, 分为 3 组, 加入盐酸小檗碱对照品溶液 20 μL , 配成浓度分别为 0.006 6, 0.026 4, 0.211 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 于同一日内按“2.3.1”项下进行操作及测定, 记录盐酸小檗碱峰面积。计算日内精密度和准确度。低、中、高浓度的日内精密度分别为 5.7%, 2.1%, 0.36%, 准确度分别为 103.8%, 101.1%, 100.3%。

2.3.7 日间精密度 于 1, 2, 3 d 分别取同一只大鼠的空白血浆 200 μL , 加入盐酸小檗碱对照品溶液 20 μL , 配成浓度分别为 0.006 6, 0.026 4, 0.211 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 每天按“2.3.1”项下操作及测定, 记录盐酸小檗碱峰面积。计算日间精密度和准确度。低、中、高浓度的日间精密度分别为 4.8%, 3.0%, 0.40%, 准确度分别为 103.2%, 100.0%, 100.3%。

2.3.8 稳定性 将日内精密度项下的样品在室温(20 $^{\circ}\text{C}$)条件下放置 24 h。将放置 24 h 的样品与其处理后立即进样的数据进行分析比较, 得到样品处理后 24 h 的稳定性。经测定, 低、中、高浓度的 RSD% 分别为 4.8%, 2.8%, 0.34%。

2.4 盐酸小檗碱在大鼠体内的药动学研究

2.4.1 黄连-木香药对(5:1)提取物的制备 按 5:1 重量比例称取黄连药材、木香药材, 加 6 倍量 80% 乙醇溶液, 回流提取 1 次, 提取 3 h, 滤过, 滤液置水浴锅浓缩至浸膏, 干燥, 备用。

2.4.2 样本采集与处理 分别取健康 δ 大鼠各 3 只, 实验前禁食 24 h, 自由饮水, 取空白血浆 0.5 mL 后, 分别于给药后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h 时, 各从大鼠眼底静脉丛取血 0.5 mL, 置于预先肝素化的离心管中, 离心 5 min(10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 精密吸取血浆样品 200 μL 及内标溶液 50 μL , 自“加入 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾 100 μL 起, 按“2.3.1”项下方法操作, 进行分析。

2.4.3 血药浓度-时间曲线及药动学参数^[3] 药物

时间数据经中国药理学学会数学药理专业委员会编制的药物与统计(Drug And Statistics)简称 DAS 统计软件进行药动学拟合计算, 获得相关的药代参数。本实验建立的方法研究了黄连、木香药对配伍经乙醇提取后灌胃给大鼠, 在大鼠体内黄连中有效成分盐酸小檗碱的药动学。平均药时曲线见图 2, 统计矩参数结果见表 1。

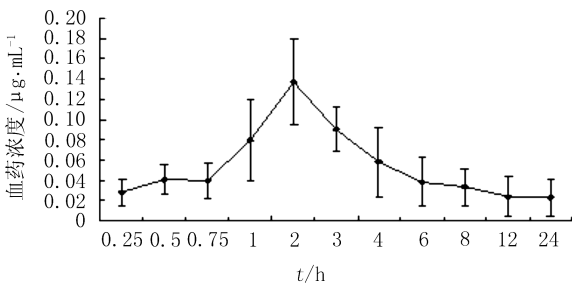


图 2 大鼠灌胃黄连、木香药对提取物的平均药时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of berberine hydrochloride after ig. the extract of drug-pair to rats

表 1 大鼠血药浓度 DAS 2.0 模拟统计矩参数

Tab 1 The statistical spacing parameters of berberine in rats plasma calculated by DAS 2.0

统计矩参数	参数值
$\text{AUC}_{0-24}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	1.409 $\pm$ 0.559
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	2.936 $\pm$ 1.350
AUMC_{0-24}	17.797 $\pm$ 7.956
$\text{AUMC}_{0-\infty}$	92.522 $\pm$ 53.784
$\text{MRT}_{0-24}/\text{h}$	12.470 $\pm$ 1.538
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{h}$	29.711 $\pm$ 7.176
$\text{VRT}_{0-24}/\text{h}^2$	74.876 $\pm$ 18.662
$\text{VRT}_{0-\infty}/\text{h}^2$	664.087 $\pm$ 572.457
MAT/h	24.859 $\pm$ 13.031
T_{max}/h	2.000 $\pm$ 0.000
$C_{\text{max}}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.360 $\pm$ 0.042

3 讨论

通过对实验结果分析, 采用 DAS 2.0 软件处理, 房室模型拟合分析, 药室模型符合一房室模型, 大鼠灌胃黄连、木香药对提取物后与同法处理的黄连单味药材比较, 黄连、木香药对提取物的达峰时间较黄连提取物的达峰时间快, 其最大血药浓度大于黄连提取物, 说明木香能增加黄连中盐酸小檗碱的溶出。

曾用甲醇、乙酸乙酯、乙醚不同溶剂进行提取, 经比较甲醇提取回收率较高, 沉淀蛋白, 同时提取盐酸小檗碱, 血浆中内源性物质没有干扰。

内标物曾选用氯化两面针碱和士的宁, 由于氯化两面针碱的相对保留时间与盐酸小檗碱的相对保留时间接近, 两个色谱峰没能达到较好的分离

度, 故弃用; 而在士的宁的 t_R 处, 空白血浆没有干扰, 分离较好, 故选用士的宁作为内标物。

REFERENCES

- [1] DING Z P, LIN L, ZHENG X H, et al. Study on pharmacokinetics of different particle size of Rhizoma Coptidis powder in rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中医学刊), 2004, 22(5): 835-836.
- [2] ZHONG D F. Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with the weighted least squares method [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 1996, 16(5): 343.
- [3] CHEN Z Y, ZHENG Q S, SUN R Y. The Function Information of Pharmacological DAS software [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2002, 7(6): 562.

收稿日期: 2008-07-28