

黄连、吴茱萸药对中盐酸小檗碱在大鼠体内的药代动力学研究

王静, 袁子民, 张振秋*

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

摘要 目的: 大鼠分别灌胃盐酸小檗碱单体和含有相同剂量盐酸小檗碱的黄连提取物、黄连-吴茱萸药对提取物后, 分别测定盐酸小檗碱的药代动力学参数, 比较单体和黄连提取物及药对提取物中盐酸小檗碱的药代动力学差异, 分别研究黄连药材和药对配伍后对盐酸小檗碱在大鼠体内过程的影响。方法: 采用高效液相色谱方法测定, 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (20:10:70); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 345 nm; 柱温: 35 °C。结果: 盐酸小檗碱单体药代动力学参数: $MRT_{0-24} = (8.552 \pm 0.4228) h$, $MRT_{0-\infty} = (18.6864 \pm 8.4062) h$, $AUC_{0-24} = (0.2664 \pm 0.02677) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $AUC_{0-\infty} = (0.3662 \pm 0.04586) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $T_{max} = (2.1 \pm 1.2449) h$, $C_{max} = (0.0268 \pm 0.002683) mg \cdot L^{-1}$; 黄连提取物药代动力学参数: $MRT_{0-24} = (8.5584 \pm 0.3852) h$, $MRT_{0-\infty} = (16.7118 \pm 2.3550) h$, $AUC_{0-24} = (0.202 \pm 0.02053) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $AUC_{0-\infty} = (0.2688 \pm 0.01918) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $T_{max} = (1.35 \pm 0.9287) h$, $C_{max} = (0.026 \pm 0.008631) mg \cdot L^{-1}$; 药对提取物药代动力学参数: $MRT_{0-24} = (9.3252 \pm 2.2441) h$, $MRT_{0-\infty} = (16.3202 \pm 4.1508) h$, $AUC_{0-24} = (0.2754 \pm 0.1267) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $AUC_{0-\infty} = (0.339 \pm 0.1436) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $T_{max} = (0.9 \pm 0.6519) h$, $C_{max} = (0.0474 \pm 0.01467) mg \cdot L^{-1}$ 。结论: 黄连药材和药对配伍均能使盐酸小檗碱单体的吸收加快, 消除加快。房室模型拟合分析, 发现三者均是一房室模型, 即体内分布过程没有显著性差异。

关键词: 黄连; 吴茱萸; 盐酸小檗碱; 药代动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)05-0755-05

Pharmacokinetic studied on berberine hydrochloride in Rhizoma Coptidis- Fructus Evodiae drug- pair in rat

WANG Jing YUAN Zi-min, ZHANG Zhen-qiu*

(School of Pharmacy Liaoning University of TCM, Dalian 116600 China)

Abstract Objective To study the pharmacokinetics of berberine hydrochloride in rat plasma after oral administration separately to the monomer of berberine hydrochloride, the extracts of Rhizoma Coptidis and drug-pair of Rhizoma Coptidis- Fructus Evodiae containing equal quantity of berberine hydrochloride, to compare the differences and explore the pharmacokinetics effect on berberine hydrochloride in rat plasma after oral administration separately to Rhizoma Coptidis and drug-pair. **Method** HPLC was used to determine the quantity of berberine hydrochloride in rat plasma. A Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used, the mobile phase consisted of acetonitrile, methanol and 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (20:10:70), the flow rate was 1.0 mL/min, the UV detector was operated at 345 nm and the column temperature was controlled at 35 °C. **Result** Pharmacokinetic parameters of the monomer of berberine hydrochloride: $MRT_{0-24} = (8.552 \pm 0.4228) h$, $MRT_{0-\infty} = (18.6864 \pm 8.4062) h$, $AUC_{0-24} = (0.2664 \pm 0.02677) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $AUC_{0-\infty} = (0.3662 \pm 0.04586) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $T_{max} = (2.1 \pm 1.2449) h$, $C_{max} = (0.0268 \pm 0.002683) mg \cdot L^{-1}$; Pharmacokinetic parameters of the extract of Rhizoma Coptidis: $MRT_{0-24} = (8.5584 \pm 0.3852) h$, $MRT_{0-\infty} = (16.7118 \pm 2.3550) h$, $AUC_{0-24} = (0.202 \pm 0.02053) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $AUC_{0-\infty} = (0.2688 \pm 0.01918) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$, $T_{max} = (1.35 \pm 0.9287) h$, $C_{max} = (0.026 \pm 0.008631) mg \cdot L^{-1}$; Pharmacokinetic parameters of the extract of drug-pair: $MRT_{0-24} = (9.3252 \pm 2.2441) h$, $MRT_{0-\infty} = (16.3202 \pm 4.1508) h$, $AUC_{0-24} = (0.2754 \pm 0.1267) mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,

* 通讯作者 Tel: (0411)87586058 E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

$AUC_{0-\infty} = (0.339 \pm 0.1436) \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, $T_{\max} = (0.9 \pm 0.6519) \text{ h}$, $C_{\max} = (0.0474 \pm 0.01467) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Conclusion Rhizoma Coptidis and drug-pair both enhance the absorption and elimination of berberine hydrochloride. By the analysis of compartment model, they are all one-compartment model; they have no significant effect on their distribution from the centre compartment to the peripheral compartment.

Key words Rhizoma Coptidis, Fructus Evodiae, berberine hydrochloride, pharmacokinetic

中药药代动力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代动力学的研究。对各药材之间相互影响及其机制的探讨, 研究相对较少。近几年, 对组成最小、最简单的复方-药对的研究较多, 大多是在化学成分的含量和变化、药理作用等方面研究较多, 药对及各药材之间在动物体内药物代谢动力学的研究较少。本实验以单体、单味药材与药对为研究对象, 研究其相互影响, 揭示药对组成的机制。

黄连-吴茱萸是临床应用广泛的药对之一, 黄连-吴茱萸药对以 6:1 组成的经典方剂-左金丸, 具有镇痛、抗胃溃疡、保护胃粘膜、抑制胃酸分泌等作用, 疗效确切。盐酸小檗碱是左金丸、黄连药材的主要有效成分, 本实验以黄连-吴茱萸药对 6:1 的提取物为主要研究对象, 研究盐酸小檗碱单体、含有其相同剂量的黄连药材和药对在大鼠体内的药物代谢动力学行为, 比较药代动力学参数的差异, 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 对照品盐酸小檗碱 (批号 110713-200208)、氯化两面针碱 (批号 848-9001) 均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钾为分析纯, 试验用水为重蒸水; 黄连、吴茱萸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, 吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实。SD 大鼠, 雌、雄兼用, 体重 250~300 g, 购自大连医科大学实验动物中心。

1.2 仪器 LC-10AT_{vp} 输液泵, SPD-10A_{vp} 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 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (20:10:70); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 345 nm; 柱温: 35 °C。

3 血浆样品中盐酸小檗碱的含量测定

3.1 溶液的配制

3.1.1 系列对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 用甲醇溶解制成 88 μg·mL⁻¹ 的储备液。分别精密量取储备液适量, 用甲醇逐级稀释, 制成浓度为 0.0088, 0.022, 0.044, 0.088, 0.176 μg·mL⁻¹ 的系列溶液, 置 4 °C 冰箱中保存。

3.1.2 内标溶液 精密称取氯化两面针碱对照品适量, 用甲醇溶解配制成 240 μg·mL⁻¹ 的储备液。取储备液 0.3 mL 至 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成 1.47 μg·mL⁻¹ 的内标溶液, 置 4 °C 冰箱中保存。

3.2 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 磷酸二氢钾溶液 100 μL, 甲醇 2.0 mL, 涡旋 2 min, 10000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液, 空气流下 40 °C 吹干, 用 50 μL 甲醇溶解, 取 20 μL 进样。

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

3.4 线性范围 取大鼠空白血浆 200 μL, 依次加入系列对照品溶液 100 μL, 配制成浓度为 0.0044, 0.011, 0.022, 0.044, 0.088 μg·mL⁻¹ 对照品血浆。按“3.2”项下方法操作, 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, 盐酸小檗碱与内标峰面积比 (Y) 为纵坐标, 用加权 ($1 \times C^{-2}$) 最小二乘法进行回归计算, 求得直线回归方程为:

$$Y = 8.560X + 0.04412 \quad r = 0.9901$$

表明血浆中盐酸小檗碱在 0.0044~0.088 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 定量限为 0.002 μg·mL⁻¹。

3.5 提取回收率 取大鼠空白血浆 200 μL, 按“3.4”项下方法制备含盐酸小檗碱分别为 0.0044, 0.022, 0.088 μg·mL⁻¹ 的质控血浆样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 另取空白血浆 200 μL, 按“3.2”项下方法操作, 取上清液, 分别加入相应浓度的对照品溶液 100 μL (各浓度平行操作 3 个样品), 于空气流下 40 °C 水浴下吹干, 残留物溶于 50 μL 甲醇, 涡旋

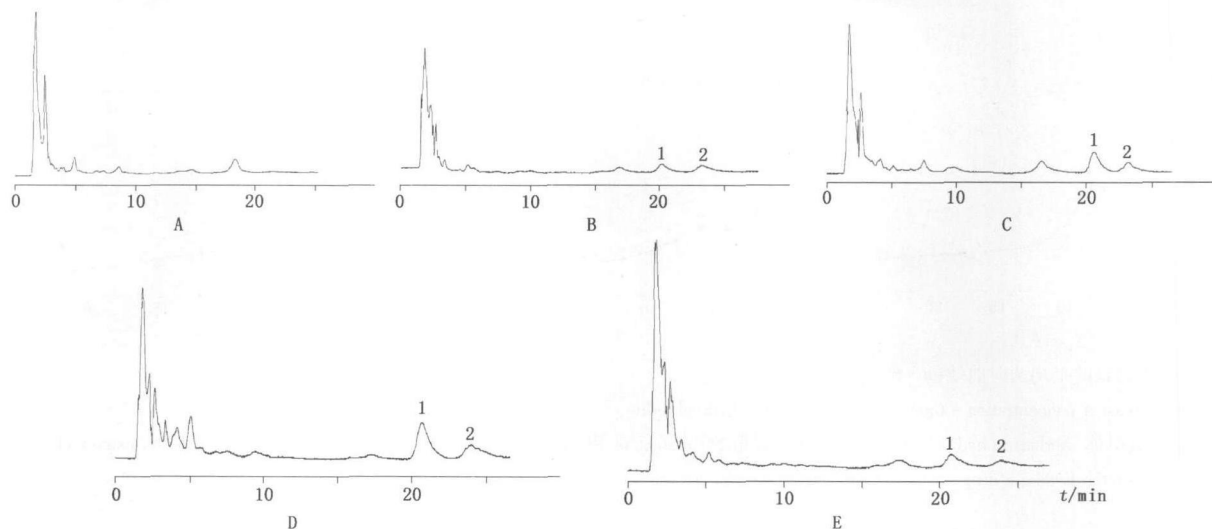


图 1 大鼠血浆中盐酸小檗碱和内标的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of berberine hydrochloride and nitidine chloride (internal standard) in rat plasma

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 空白血浆 + 内标 (氯化两面针碱) + 盐酸小檗碱 ($0.044 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) [blank plasma spiked with internal standard (nitidine chloride) and berberine hydrochloride ($0.044 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)] C. 大鼠灌胃盐酸小檗碱单体后 1 h 的血浆样品 (plasma sample 1 h after ig berberine hydrochloride to a rat) D. 大鼠灌胃黄连提取物后 1 h 的血浆样品 (plasma sample 1 h after ig Rhizoma Coptidis extracts to a rat) E. 大鼠灌胃药对提取物后 1 h 的血浆样品 (plasma sample 1 h after ig drug-pair extracts to a rat)

1 盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride) 2 氯化两面针碱 (nitidine chloride)

1 min, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后吸取 20 μL 进行 HPLC 分析, 获得相应峰面积值 (3 次测定的平均值)。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, 本法低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 (94.1 ± 3.8)%, (95.5 ± 1.7)%, (93.2 ± 2.1)%。同法考察内标回收率为 (90.2 ± 3.4)%。

3.6 精密度与准确度 制备含盐酸小檗碱浓度分别为 0.0044 0.022 $0.088 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆, 6 样本, 连续测定 3 d 随行标准曲线, 测定浓度, 与配制浓度对照, 求得血浆样品测定方法的精密度与准确度。结果日内 RSD 分别为 7.4%, 6.1%, 5.0%; 日间 RSD 分别为 5.7%, 5.0%, 4.5%; 准确度分别为 93.8%, 107.7%, 99.1%。

3.7 稳定性 按“3.4”项下方法制备含盐酸小檗碱分别为 0.0044 0.022 $0.088 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆各 6 样本, 然后置于室温 (约 20°C) 保存 1 d 测定, 以考察处理后的盐酸小檗碱血浆样品在室温下的稳定性。计算 3 个浓度下血浆样品中盐酸小檗碱测定均值与加入值之间的相对误差 (RE)。低、中、高 3 种浓度的 RE 分别为 -6.2%, 7.7%, -8.9%。试验结果表明, 对照品血浆经处理后于室温保存 1 d 盐酸小檗碱的浓度仍可被准确测定。

4 盐酸小檗碱在大鼠体内的药动学研究

4.1 黄连提取物的制备 取黄连药材, 加入 10 倍药材量的 65% 乙醇溶液, 回流提取 1.5 h 提取 3 次, 合并提取液, 置水浴锅浓缩至浸膏, 干燥, 备用。

4.2 黄连 - 吴茱萸药对 (6:1) 提取物的制备 按 6:1 重量比例取黄连药材、吴茱萸药材, 加入 10 倍药材总重量的 65% 乙醇溶液, 回流提取 1.5 h 提取 3 次, 合并提取液, 置水浴锅浓缩至浸膏, 干燥, 备用。

4.3 样本采集与处理 分别取健康雌、雄大鼠各 3 只, 实验前禁食 24 h 自由饮水, 取空白血 0.5 mL 后, 按每 1 kg 大鼠体重灌胃 0.1140 g 盐酸小檗碱给予盐酸小檗碱单体, 按每 1 kg 大鼠体重灌胃 1.5334 g 黄连生药材给予“4.1”项制备的黄连提取物, 按每 1 kg 大鼠体重灌胃 1.7975 g 药对生药材给予“4.2”项制备的药对提取物, 三者所含盐酸小檗碱成分的量相同。分别于 0.25 0.5 0.75 1 2 3 4 6 8 12 24 h 眼眶取血 0.5 mL, 置于预先肝素化的离心管中, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 得血浆。精密吸取血浆样品 200 μL 及内标溶液 50 μL , 自“加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液 100 μL ”起, 按“3.2”项下方法操作, 进行分析。

4.4 血药浓度 - 时间曲线及药动学参数 盐酸小檗碱的平均药时曲线见图 2 其中最大血浆浓度及达峰时间用实测值表示, 数据用 DAS 2.0 软件处理, 主要药动学参数见表 1。

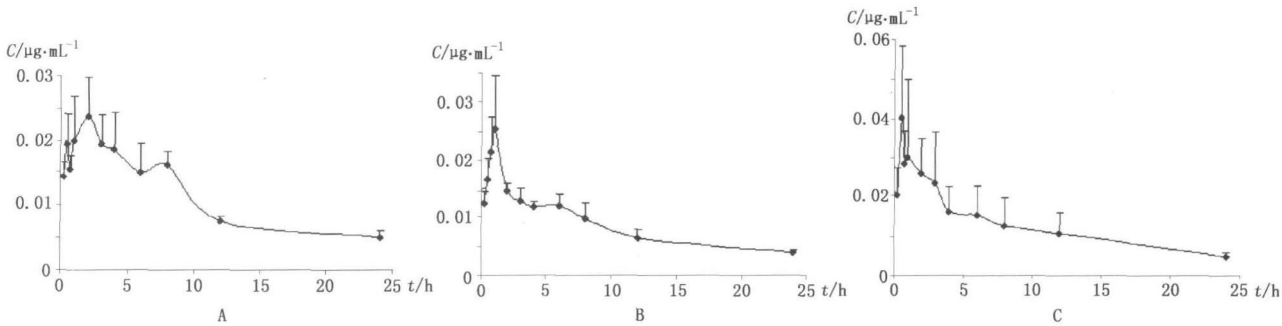


图 2 盐酸小檗碱的平均药时曲线 (n= 6)

Fig 2 Mean plasma concentration- time curves of berberine hydrochloride

A. 盐酸小檗碱单体 (berberine hydrochloride) B. 黄连提取物 (extract of Rhizoma Coptidis) C. 黄连 - 吴茱萸药对提取物 (extract of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae drug- pair)

表 1 大鼠灌胃盐酸小檗碱单体、黄连提取物、药对提取物后盐酸小檗碱药动学参数 (均值 ±SD, n= 6)
Tab 1 Pharmacokinetic parameters of berberine hydrochloride in rats after oral administration separately to the monomer of berberine hydrochloride, the extracts of Rhizoma Coptidis and drug- pair (mean ±SD, n= 6)

参数 (parameter)	大鼠灌胃盐酸小檗碱单体 (ig the extract of berberine hydrochloride to rats)	大鼠灌胃黄连提取物 (ig the extract of Rhizoma Coptidis to rats)	大鼠灌胃药对提取物 (ig the extract of drug- pair to rats)
MRT ₀₋₂₄ /h	8.552 ±0.4228	8.5584 ±0.3852	9.3252 ±2.2441
MRT _{0-∞} /h	18.6864 ±8.4062	16.7118 ±2.3550	16.3202 ±4.1508
AUC ₀₋₂₄ /mg· (L· h) ⁻¹	0.2664 ±0.02677	0.202 ±0.02053	0.2754 ±0.1267
AUC _{0-∞} /mg· (L· h) ⁻¹	0.3662 ±0.04586	0.2688 ±0.01918	0.339 ±0.1436
T _{max} /h	2.1 ±1.2449	1.35 ±0.9287	0.9 ±0.6519
C _{max} /mg· L ⁻¹	0.0268 ±0.002683	0.026 ±0.008631	0.0474 ±0.01467

5 讨论

通过对药物代谢研究结果分析发现,大鼠灌胃药对提取物后 T_{max}最小 [(0.9 ±0.6519) h], C_{max}最大 [(0.0474 ±0.01467) mg· L⁻¹];大鼠灌胃黄连提取物后的 T_{max} [(1.35 ±0.9287) h]与灌胃盐酸小檗碱单体后的 T_{max} [(2.1 ±1.2449) h]相比较小,但二者的 C_{max} (mg· L⁻¹)没有太大差别,黄连提取物的 MRT_{0-∞} [(16.7118 ±2.3550) h]和药对提取物的 MRT_{0-∞} [(16.3202 ±4.1508) h]均比盐酸小檗碱单体的 MRT_{0-∞} [(18.6864 ±8.4062) h]要小,这说明,与盐酸小檗碱单体相比较,大鼠灌胃黄连提取物后达峰时间较快,消除较快,但峰浓度没有太大变化,黄连药材中的其他成分能加快盐酸小檗碱的吸收和消除;与黄连提取物相比较,大鼠灌胃药对提取物后达峰时间加快,达峰浓度最大,但消除时间没有太大变化,说明黄连、吴茱萸药对配伍后,吴茱萸能促进盐酸小檗碱的吸收,对消除影响不大。通过对药代数据采用 DAS 2.0 软件处理,房室模型拟合分

析,发现三者均是一房室模型,即体内分布过程没有显著性差异。

曾用不同方法提取血浆样品^[1~3],提取回收率均不满意。用乙醚进行液-液萃取,血浆中内源性物质没有干扰,但是提取回收率很低。最后确定用磷酸二氢钾碱化血浆样品,用甲醇沉淀蛋白,同时用甲醇提取盐酸小檗碱,因为预实验发现,盐酸小檗碱在甲醇中溶解性最好,这种提取方法不但提取回收率高,而且血浆中内源性物质没有干扰。

采用 C₁₈ 色谱柱,对甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水按不同比例流动相^[4~6]进行考察,结果发现流动相为甲醇-乙腈-0.05 mol· L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (10: 20: 70) 时,血浆样品中盐酸小檗碱达到基线分离,出峰时间适中,血中内源性物质无干扰。

参考文献

1 HuaW, Ding L, Chen Y, et al Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography - electrospray ionization - mass

- spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 44(4): 931
- 2 Deng YX, Lu T, Xie L, *et al* High-performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic study of wogonoside in rat serum after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(10): 1098
 - 3 Li Y, Gao JP, Xu X, *et al* Simultaneous determination of baicalin, rhein and berberine in rat plasma by column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 838(1): 50
 - 4 ZHONG Da-fang(钟大放). Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with the weighted least squares method(以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1996, 16(5): 343
 - 5 LIU Li(刘李), DENG Yuan-xiong(邓远雄), ZHANG Dong-mei(张冬梅), *et al* Effect of berberine on pharmacokinetics of baicalin in rats(小檗碱对黄芩苷在大鼠中药代动力学的影响). *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2007, 5(2): 137
 - 6 Tan B, Ma YM, Shi R, *et al* Simultaneous quantification of three alkaloids of *Coptidis Rhizoma* in rat urine by high-performance liquid chromatography: application to pharmacokinetic study. *Biopharm Drug Dispos* 2007, 28(9): 511

(本文于 2008 年 3 月 27 日收到)

科技部“十一五”课题 3“药用新辅料临床前安全性评价及药品与包装材料的相容性安全研究任务”分配会在京召开

为促进科技部“十一五”国家科技支撑计划重点项目“我国当前急需建立和提高的药品监督检验技术研究”之课题 3“药用新辅料临床前安全性评价及药品与包装材料的相容性安全研究”的实施,课题总负责单位中国药品生物制品检定所(简称中检所)于 2009 年 4 月 28 日在北京召开了课题研究任务分配会。

国家食品药品监督管理局(简称国家局)科技管理办公室、中检所科研管理处处长李冠民,国家局药品注册司综合处夏军平以及中检所、中山大学、上海市食品药品监督管理局包装材料测试所、国家局上海药包材测试中心、东北大学、上海食品药品监督管理局、广东药品检验所等 26 家参与课题研究单位的项目负责人约 50 人出席了会议。

会议由课题总负责人、中检所药用辅料及包材室副主任孙会敏主持;夏军平代表国家局注册司综合处处长李茂忠向大会表示祝贺;李冠民处长介绍了课题申请的艰难历程及经费的严格使用要求,强调所有参与单位要共同努力,按时完成课题研究,为申请“十二五”课题打好基础。

随后,4 个子课题的负责人分别介绍了各子课题的研究计划和研究进展,并分组讨论了各子课题的工作分配计划与研究内容,最后所有参与的研究人员签署了任务分配书和承诺书。

详见 <http://www.nicpbp.org.cn>