

羊脂油对淫羊藿炮制品提取物中宝藿苷 I 在大鼠体内药动学特征的影响

钱 浅^{1,2}, 孙 娥¹, 樊宏伟³, 崔 莉¹, 谭晓斌¹, 韦英杰¹, 贾晓斌^{1,2*}

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028

2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

3. 南京医科大学附属南京第一医院 临床药理实验室, 江苏 南京 210006

摘要: **目的** 研究炮制辅料羊脂油对淫羊藿炮制品提取物中主要活性成分宝藿苷 I 在大鼠体内药动学特征的影响。**方法** 大鼠分别 ig 给予相同剂量 (15 g/kg) 的淫羊藿生品提取液、加热品提取液、羊脂油炙品提取液, HPLC-ESI-MS 法测定大鼠宝藿苷 I 血药浓度, 经 DAS 2.0 程序处理数据, 比较宝藿苷 I 药动学参数。**结果** 3 种淫羊藿炮制品提取物在血液中的达峰浓度 ($C_{\max}$)、药时曲线下面积 (AUC) 等药动学参数大小为油炙品>加热品>生品, 均具有统计学差异。**结论** 羊脂油能促进淫羊藿提取物中宝藿苷 I 的口服吸收, 提高其生物利用度。

关键词: 淫羊藿提取物; 宝藿苷 I; 药动学; 羊脂油; 生物利用度

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1981-05

Effect of suet oil on *in vivo* pharmacokinetic characteristics of icaraside I in extract from processed *Epimedii Herba* in rats

QIAN Qian^{1,2}, SUN E¹, FAN Hong-wei³, CUI Li¹, TAN Xiao-bin¹, WEI Ying-jie¹, JIA Xiao-bin^{1,2}

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Department of Pharmaceutics, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

3. Clinical Pharmacology Laboratory, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

Abstract: Objective To research the influence of suet oil on *in vivo* pharmacokinetic characteristics of icaraside I in extract from processed *Epimedii Herba* in rats. **Methods** The rats were ig administrated with the extract solutions of raw products, heating products, and processed products (15 g/kg), respectively. The plasma drug concentration of icaraside I was analyzed by HPLC-ESI-MS. The data were processed by program DAS 2.0 and the pharmacokinetic parameters of icaraside I were compared. **Results** The differences of $C_{\max}$ and AUC among three products were statistically significant (processed products > heating products > raw products). **Conclusion** Suet oil could promote the oral absorption of icaraside I in extract from processed *Epimedii Herba* and increase the bioavailability.

Key words: extract from processed *Epimedii Herba*; icaraside I; pharmacokinetics; suet oil; bioavailability

淫羊藿为我国传统的补益中药, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效^[1], 临床上主要用于治疗阳痿、不孕、骨质疏松、支气管炎、慢性肝炎等^[2]。炙淫羊藿临床应用最为广泛, 疗效也极为显著。前期研究表明, 加热可使淫羊藿主要活性成分黄酮的量发生变化, 即加热使淫羊藿产生更多的易于吸收的具有生物活性的黄酮, 如淫羊藿苷、宝藿苷 I; 同时淫羊藿苷在体内会水解成宝藿苷 I, 而宝藿苷 I

比淫羊藿苷更容易被吸收^[3-7]。然而炮制辅料羊脂油能否提高淫羊藿的体内生物利用度还需进一步的深入研究。本实验通过对大鼠 ig 淫羊藿生品提取液、加热品提取液、羊脂油炙品提取液后的宝藿苷 I 血药浓度-时间曲线及其药动学参数的比较分析, 探讨淫羊藿经羊脂油炮制后其提取物在大鼠体内的药动学参数的变化, 进一步揭示羊脂油炮制淫羊藿的科学内涵, 探索其炮制用药的合理性。

收稿日期: 2012-02-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572372, 30973944); 江苏省六大人才高峰资助项目 (2009); 江苏省中医药科学技术项目 (LZ09067)

作者简介: 钱 浅, 女, 安徽无为为人, 硕士研究生, 主要研究方向为中药炮制机制。Tel: 18066062677 E-mail: pharm_qian@163.com

*通讯作者 贾晓斌 Tel: (025)85608672 E-mail: xiaobin_jia_nj@126.com

1 材料

1.1 药材与试剂

淫羊藿饮片(批号 S0806364), 购于安徽亳州市万珍中药饮片厂, 经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭宝林教授鉴定为柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim. 的干燥叶。淫羊藿苷(批号 110737-200312)、黄豆苷元对照品(内标, 批号 110723-200411), 均为中国药品生物制品检定所提供; 宝藿苷 I 对照品, 实验室自制, 质量分数 >98%; 乙腈、甲酸为色谱纯, 德国 Merck 公司; 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Waters Alliance 2695—ZQ 2000 液相色谱-质谱联用仪(包括双高压泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子化接口、2695 型液相色谱仪、Masslynx 4.0 色谱工作站), 美国 Waters 公司; Mettler Toledo AB135—S 分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; KQ 3200 DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 氮吹仪, 美国 Organomation 公司; XW—80A 微型涡旋混合仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司; 85—2 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器厂; TGL—16G 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.3 动物

SD 大鼠, 雌性, 体质量(200±20) g, 上海斯莱克实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK(沪)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 药液的配制

淫羊藿饮片 2 kg 用于生品研究; 另取 2 kg 在 170 °C 烘制加热 7 min; 另取 2 kg 加 0.4 kg 羊脂油在温度 170 °C 下烘制 7 min, 上述炮制过程均由本实验室完成。分别取上述 3 种淫羊藿药材炮制品, 依次用 18 和 12 倍量的 50% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 旋转蒸发得淫羊藿提取物浓缩液 1 L, 滤过, 备用。

2.2 分组与给药

SD 大鼠给药前禁食不禁水 12 h, 给药后 2 h 内禁水, 全程禁食。将大鼠随机分为对照组、淫羊藿生品组、淫羊藿加热品组、淫羊藿油炙品组, 每组 8 只。对照组 ig 生理盐水, 3 个淫羊藿组 ig 给予相应药物 15 g/kg 1 次。各组大鼠进行颈静脉插管手术, 于给药后 0、5、15、30、45、60、90、120、180、240、360、480、600、720 min 颈静脉取血。

2.3 宝藿苷 I 的测定

2.3.1 血浆样品处理 采血后血液样品置 1.5 mL 肝素化离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上层血浆样品 100 μL, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入 1 μg/mL 的黄豆苷元甲醇溶液 100 μL、乙腈 400 μL, 涡旋震荡混合 2 min, 11 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 氮气下吹干, 残渣用甲醇 100 μL 超声溶解, 11 000 r/min 离心 15 min, 取上清液供 LC-MS 检测。

2.3.2 内标溶液制备 精密称取黄豆苷元适量, 加甲醇溶解成 0.5 mg/mL 的储备液, 4 °C 保存。临用前加甲醇稀释成 1 μg/mL, 即得。

2.3.3 对照品溶液制备 精密称取宝藿苷 I 对照品适量, 加甲醇溶解成 0.5 mg/mL 的储备液, 4 °C 保存。临用前取对照品储备液适量, 先用甲醇稀释至 0.001 mg/L, 再按倍数稀释法稀释至所需质量浓度, 即得。

2.3.4 质控样品的制备 取空白血浆样品 100 μL, 加入对照品溶液和内标溶液, 乙腈 400 μL, 置 1.5 mL 离心管中, 涡旋震荡混合 2 min, 11 000 r/min 离心 15 min, 上清液氮气下吹干, 残渣用 100 μL 甲醇超声溶解, 11 000 r/min 离心 15 min, 取上清液供 LC-MS 检测。

2.3.5 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 分析柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, B 为水, 梯度洗脱: 0~29 min, 25% A; 29~30 min, 25%~41% A; 30~35 min, 41% A; 55~56 min, 41%~25% A; 51~64 min, 25% A。体积流量 110 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 40 μL, 检测波长 270 nm。

2.3.6 质谱条件 毛细管电压 2.5 kV, 锥孔电压 30 V, 干燥气体积流量 240 L/h, 离子源温度 120 °C, 辅助气温度 300 °C。全扫描检测, 正离子检测, 气电辅助电喷雾离子化(ESI)方式, 扫描范围 m/z : 100~1 000。

2.3.7 专属性试验 取大鼠空白血浆、质控样品、各淫羊藿炮制品提取物组大鼠血浆样品各 5 份, 按“2.3.1”项方法处理, 分别进样、测定。在上述条件下, 宝藿苷 I、黄豆苷元与血浆中蛋白杂峰、内源性物质均能很好的分离, 宝藿苷 I、淫羊藿提取物中的其他成分以及这些成分的体内代谢物和结合性成分均无干扰, 根据宝藿苷 I 分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 515.84, 其保留时间为 28.80 min, 黄豆苷元的保留时间为 14.07 min, 血浆中无杂质峰干扰宝藿苷 I 及黄豆苷元, 表明本方法专属性良好。色谱图见图 1。

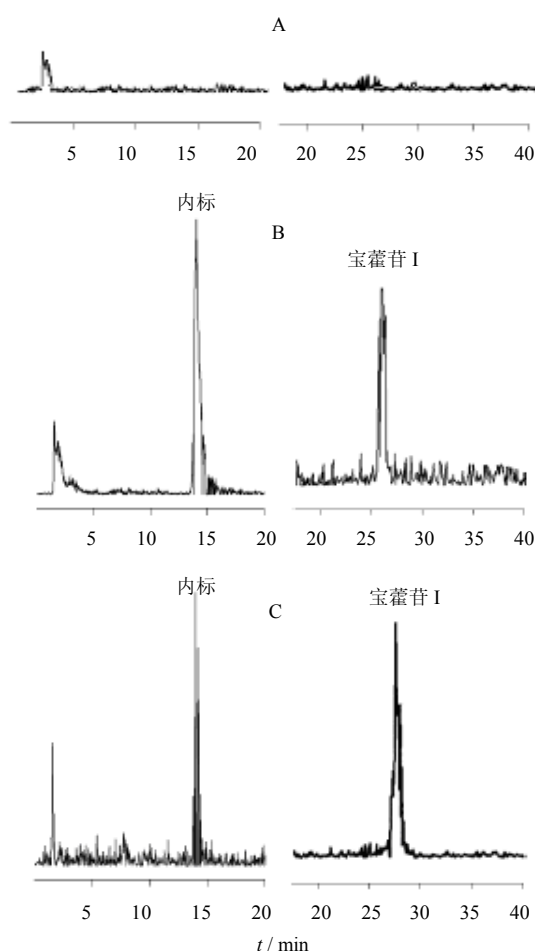


图1 大鼠空白血浆(A)、质控样品(B)和给予淫羊藿生品提取液1 h后血浆(C)离子流色谱图

Fig. 1 Ion current chromatograms of rat blank plasma (A), blank plasma + icarisiside I + internal standard (B), and plasma sample after 1 h treatment with extract solution from raw products of *Epimedii Herba* (C)

2.3.8 线性关系考察 取宝藜苣 I 储备液和大鼠空白血浆,按倍数稀释法稀释成 25、50、100、200、400、800、1 000 ng/mL 不同质量浓度的宝藜苣 I 血浆样品各 5 份,按“2.3.1”项下方法处理,HPLC-MS 测定。以血浆中宝藜苣 I 的质量浓度 (ng/mL) 为横坐标 (X),宝藜苣 I 与内标的峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行回归,得回归方程为 $Y=0.002 X-0.048 6$ ($r=0.994 5$),宝藜苣 I 在血浆中质量浓度为 25~1 000 ng/mL 时线性关系良好。检测限为 10 ng/mL, RSD 为 11.7%。

2.3.9 精密度试验 取宝藜苣 I 储备液和大鼠空白血浆,按倍数稀释法分别制成 25、250、750 ng/mL 3 种质量浓度各 5 份样品,按“2.3.1”项方法处理。

取中质量浓度样品连续、重复进样 6 次,计算进样精密度 RSD 为 8.12%。测得低、中、高 3 组样品中宝藜苣 I 的日内精密度 RSD 分别为 6.69%、8.07%、3.33%,日间精密度 RSD 分别为 14.0%、12.7%、11.6%。

2.3.10 回收率试验 用大鼠空白血浆配制低、中、高 3 种质量浓度 (25、250、750 ng/mL) 宝藜苣 I 血浆样品各 5 份,按“2.3.1”项方法处理后经 HPLC-MS 测定,测得宝藜苣 I 的提取回收率分别为 $(100.69 \pm 5.59) \%$ 、 $(88.01 \pm 4.87) \%$ 、 $(110.42 \pm 3.35) \%$ 。

2.3.11 稳定性试验 用空白血浆配制低、中、高 3 种质量浓度 (25、250、750 ng/mL) 宝藜苣 I 血浆样品各 5 份,置室温放置 12 h、 -70°C 冰冻条件下存放 7 d,反复冻融 3 次,按“2.3.1”项方法处理,取上清液进行 HPLC-MS 分析。结果显示,宝藜苣 I 的质量浓度变化在 85%~115%,表明其血浆样品在上述处理条件下稳定。

2.4 提取物中有效成分测定

精密吸取 3 种淫羊藿提取物 20 μL ,用甲醇稀释至 1 000 μL ,进样。按《中国药典》2010 年版方法测定淫羊藿苷和宝藜苣 I 的量,结果淫羊藿生品、加热品、油炙品中淫羊藿苷的量分别为 (6.03 ± 0.68) 、 (8.52 ± 0.21) 、 $(8.53 \pm 0.32) \text{ mg/g}$,宝藜苣 I 的量分别为 (4.02 ± 0.12) 、 (5.80 ± 0.42) 、 $(5.87 \pm 0.45) \text{ mg/g}$ 。

2.5 药动学研究

大鼠给予不同淫羊藿提取物后,以 DAS2.0 药动学数据分析程序计算血浆样品中宝藜苣 I 的相关药动学参数,其中 C_{max} 和 t_{max} 为实测值,其他参数为计算值。结果表明,3 种炮制品的 C_{max} 、AUC 大小为油炙品>加热品>生品,各组间比较均具有统计学差异 ($P<0.05$ 、0.01)。淫羊藿加热品组与生品组比较以及油炙品组与加热品组比较大鼠血浆中宝藜苣 I 的 AUC、MRT、 C_{max} 均有显著差异 ($P<0.05$ 、0.01)。药时曲线见图 2,药动学参数见表 1。

3 讨论

由于淫羊藿苷在生物样品中的量低于其检测限而无法定量,同时根据淫羊藿苷在大鼠体内主要转化成宝藜苣 I 而被吸收^[8-10]这一特点,因此本实验采用 HPLC-ESI-MS 联用技术,建立了快速、简便的宝藜苣 I 血药浓度测定方法,通过选择性监测样品和内标的分子离子峰的加氢峰进行定量,具有较高的专属性,灵敏度高,方法的重现性好,结果准确,符合生物样品分析要求。同时对 ig 淫羊藿生品、加热品、油炙品提取液的大鼠血浆中宝藜苣 I 主要药

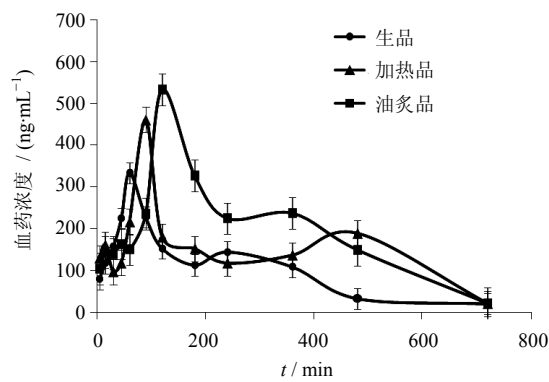


图 2 淫羊藿生品、加热品和油炙品提取液中宝藿苣 I 药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 2 Concentration-time profiles of icarisperone I in extract solutions from raw products, heating products, and oil broiled products of *Epimedium Herba* ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

动力学参数进行比较分析。结果表明, 3 种炮制品间 $C_{\max}$ 、AUC 等药动学特征参数均具有统计学差异。淫羊藿加热品组大鼠血浆中宝藿苣 I 的 AUC、MRT、 $C_{\max}$ 与生品组比较均有显著差异。

有研究显示, 淫羊藿加热炮制后, 其主要活性成分淫羊藿甙、宝藿苣 I 的量显著增加, 淫羊藿甙进入大鼠体内进一步转化为宝藿苣 I 而被吸收, 因此给予淫羊藿加热品的大鼠血浆中宝藿苣 I 的 AUC 较生品组显著增加, 表明淫羊藿炮制后易于吸收的黄酮成分增加, 进而使其血药浓度增加, 最终表现为生物利用度的提高^[11-12], 本实验进一步证明了这一点。淫羊藿油炙品组大鼠血浆中宝藿苣 I 的 AUC、MRT 与加热品组比较均有显著性差异, $C_{\max}$ 有统计学差异, 表明辅料羊脂油能进一步提高

表 1 淫羊藿不同炮制品提取物中宝藿苣 I 在大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Main pharmacokinetic parameters of icarisperone I in extracts from various processed *Epimedium Herba* products in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参 数	单 位	生品	加热品	油炙品
AUC _{0~t}	μg·L ⁻¹ ·h	1 173.89 ± 104.84	1 882.53 ± 133.53**	2 026.89 ± 167.98**
AUC _{0~∞}	μg·L ⁻¹ ·h	1 266.78 ± 104.69	1 608.02 ± 135.12**	2 081.80 ± 154.18**▲▲
MRT _{0~t}	h	3.76 ± 0.14	5.30 ± 0.27**	3.94 ± 0.08**▲▲
MRT _{0~∞}	h	4.70 ± 0.27	12.67 ± 1.093	4.24 ± 0.17**
t _{1/2}	h	3.07 ± 0.36	7.68 ± 2.59	2.14 ± 0.34**
t _{max}	h	1.00	1.50	2.00
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	158.84 ± 13.27	51.92 ± 21.33**	96.52 ± 6.96**▲▲
V _z	L·kg ⁻¹	705.19 ± 119.42	726.31 ± 398.15	299.03 ± 60.04**▲
C _{max}	μg·L ⁻¹	333.75 ± 55.19	461.38 ± 69.41**	533.75 ± 72.99**▲

与生品组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与加热品组比较: ▲P<0.05 ▲▲P<0.01
*P<0.05 **P<0.01 vs raw products group; ▲P<0.05 ▲▲P<0.01 vs heating products group

宝藿苣 I 的体内生物利用度, 推测其原因可能是羊脂油中含有大量的高级饱和脂肪酸、少量饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸, 如棕榈酸、硬脂酸、油酸等, 这些成分类似于药剂学中的表面活性剂, 可提高宝藿苣 I 的透膜性并改善药物的溶解性^[13-14], 从而提高宝藿苣 I 的生物利用度, 所以淫羊藿油炙品组大鼠血浆中宝藿苣 I 的 $C_{\max}$ 和 AUC 较加热品组显著增加。
本实验初步证明炮制使淫羊藿产生更多易于吸收的具生物活性的黄酮成分, 且辅料羊脂油能提高活性黄酮成分的生物利用度, 增强炙淫羊藿的疗效。但羊脂油具体是如何促进宝藿苣 I 的吸收还需要进一步深入研究。

参考文献
[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 张 峰, 杨晓华. 淫羊藿的生物活性成分及其开发策略研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 329-332.
[3] 陈 彦, 贾晓斌, Hu M. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
[4] Chen Y, Zhao Y H, Jia X B, et al. Intestinal absorption mechanisms of prenylated flavonoids present in the heat-processed *Epimedium loreanum* Nakai (Yin Yanghuo) [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(9): 2190-2199.
[5] 陈 彦, 贾晓斌, 丁安伟. 淫羊藿炮制机理研究回顾与新思路 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1439-1443.
[6] 陈 彦, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 大鼠肠道水解酶对淫羊藿黄酮苷的处置影响 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(7):

- 516-519.
- [7] 单 淇, 周渭渭, 周福军, 等. 阿可拉定的有关物质研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 92-95.
- [8] Liu M, Liu H P, Lu X M, *et al.* Simultaneous determination of icariin, icaraside II and osthole in rat plasma after oral administration of the extract of Gushudan (a Chinese compound formulation) by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 860(1): 113-120.
- [9] Chen Y, Wang J Y, Jia X B, *et al.* Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in yinyanghuo [J]. *Molecules*, 2011, 16(2): 1336-1348.
- [10] 邱 峰, 陈英杰, 鹿野美弘, 等. 淫羊藿苷在大鼠体内的代谢 [J]. 药学报, 1999, 34(3): 222-226.
- [11] 陈玲玲, 贾晓斌, 贾东升. 淫羊藿炮制机制研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2108-2111.
- [12] 金晓勇, 贾晓斌, 孙 娥, 等. 炙淫羊藿炮制过程中 5 种黄酮类成分变化规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2738-2742.
- [13] 中国药用动物志协作组. 中国药用动物志 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1983.
- [14] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.

天津中草药杂志社售过刊信息

天津中草药杂志社是经国家新闻出版总署批准于 2009 年 8 月在天津滨海新区注册成立。编辑出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines*、《现代药物与临床》(2009 年由《国外医药·植物药分册》改刊)、《药物评价研究》(2009 年由《中文科技资料目录·中草药》改刊)。欢迎投稿, 欢迎订阅。

《中草药》杂志合订本: 1974—1975 年、1976 年、1979 年、1988—1993 年 (80 元/年), 1996、1997 年 (110 元/年), 1998 年 (120 元/年), 1999 年 (135 元/年), 2000 年 (180 元/年), 2001—2003 年 (200 元/年), 2004 年 (220 元/年), 2005 年 (260 元/年), 2006—2008 年 (280 元/年), 2009 年 (400 元/年), 2010 年 (400 元/年), 2011 年 (550 元/年)。

《中草药》增刊: 1996 年 (50 元), 1997 年 (45 元), 1998 年 (55 元), 1999 年 (70 元), 2000、2001 年 (70 元), 2002—2007 年 (65 元/年), 2008、2009 年 (55 元/年)。凡订阅《中草药》杂志且提供订阅凭证者, 购买增刊 7 折优惠, 款到寄刊。

Chinese Herbal Medicines 合订本: 2010 年 (150 元/年), 2011 年 (150 元/年)。

《现代药物与临床》合订本: 2009 年 (120 元/年), 2010 年 (120 元/年), 2011 年 (120 元/年)。

《国外医药·植物药分册》合订本: 1996—2008 年 (80 元/年), 2006—2008 年 (90 元/年)。

《药物评价研究》2009 年单行本每册 15 元, 2010 年合订本 (120 元/年), 2011 年 (120 元/年)。

《中文科技资料目录·中草药》: 1993—2006 年合订本 (全套 2040 元), 2007—2008 年单行本, 每册定价 30 元, 全年订价 210 元 (6 期十年索引)。

天津中草药杂志社

地 址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮 编: 300193

电 话: (022) 27474913 23006821

传 真: (022) 23006821

电子信箱: zcy@tiprpress.com

网 址: www.中草药杂志社.中国

www.tiprpress.com (在线投稿)

开户银行: 兴业银行天津南开支行

账 号: 44114010010081504

户 名: 天津中草药杂志社