

• 药理与临床 •

黄连解毒汤中小檗碱及其他成分模拟组合在脑缺血大鼠体内药动学比较研究

王文哲, 周 静, 郭立玮, 朱华旭, 潘林梅*, 潘永兰

南京中医药大学药学院 中药复方分离工程重点实验室, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 比较基于黄连解毒汤原方比例的 4 种不同模拟组合中主成分小檗碱在脑缺血模型大鼠体内的药动学变化过程。方法 大鼠按体质量分为模型组和假手术组, 模型组以线栓法复制大鼠脑缺血模型。每组又分为 4 个亚组, 分别为小檗碱 (247.4 mg/kg) 组、小檗碱 (247.4 mg/kg) + 黄芩苷 (190.7 mg/kg) 组、小檗碱 (247.4 mg/kg) + 栀子苷 (149.5 mg/kg) 组、小檗碱 (247.4 mg/kg) + 栀子苷 (149.5 mg/kg) + 黄芩苷 (190.7 mg/kg) 组。各组分别于 ig 给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24、48、72 h 眼眶取血, HPLC 法测定小檗碱在大鼠血浆中的浓度变化, 绘制药-时曲线, DAS 2.0 计算药动学参数。结果 根据统计矩参数, 模型组和假手术组小檗碱的吸收顺序均为小檗碱+栀子苷组>小檗碱+栀子苷+黄芩苷组>小檗碱组>小檗碱+黄芩苷组。结论 针对脑缺血模型, 黄连解毒汤中的栀子苷可促进小檗碱的吸收, 黄芩苷则对小檗碱的吸收有一定的抑制作用, 而三者组合给药后栀子苷可以降低黄芩苷对小檗碱吸收的抑制作用。

关键词: 黄连解毒汤; 小檗碱; 脑缺血; 模拟组合; 药动学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)01-0064-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.013

Comparative study on *in vivo* pharmacokinetics of simulated combination of berberine and other ingredients in Huanglian Jiedu Decoction in rats with cerebral ischemia

WANG Wen-zhe, ZHOU Jing, GUO Li-wei, ZHU Hua-xu, PAN Lin-mei, PAN Yong-lan

Key Laboratory of Separation Engineering of Chinese Materia Medica Compound, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To compare the pharmacokinetic changing process of the main component berberine in four different simulated combinations based on the proportion of Huanglian Jiedu Decoction (HJD) in rats with cerebral ischemia. **Methods** According to body weight the rats were divided into model and Sham groups, and the middle cerebral artery occlusion (MCAO) was reproduced by suture method to make rats with cerebral ischemia in the model group. Each group was divided into four sub-groups: berberine (247.4 mg/kg), berberine (247.4 mg/kg) + baicalin (190.7 mg/kg), berberine (247.4 mg/kg) + geniposide (149.5 mg/kg), and berberine (247.4 mg/kg) + geniposide (149.5 mg/kg) + baicalin (190.7 mg/kg) groups. After ig administration, orbital blood was collected in 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, and 72 h, respectively. HPLC method was used for the determination of berberine concentration change in rat plasma. The concentration-time curve was plotted and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0. **Results** According to the statistical parameters, the absorbed order of berberine in the model and Sham groups was as follows: berberine + geniposide > berberine + geniposide + baicalin > berberine > berberine + baicalin. **Conclusion** For MCAO rats, geniposide in HJD could promote the absorption of berberine, and baicalin could inhibit the absorption of berberine, but the combination of the three could alleviate the inhibition of berberine absorption by baicalin.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction; berberine; cerebral ischemia; simulated combination; pharmacokinetics

收稿日期: 2013-05-31

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2012855); 江苏省中医药管理局资助项目 (LZ11199); 江苏省高校优势学科项目; 南京中医药大学中医学优势学科开放课题 (S2012ZYX310)

作者简介: 王文哲 (1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物药剂学研究。Tel: 15895893130 E-mail: zhezhe1234888@126.com

*通信作者 潘林梅 E-mail: linmeip@126.com

黄连解毒汤是清热解毒方中的经典方剂,由黄连(君)、黄芩(臣)、黄柏(佐)和栀子(使)配伍而成。近年来,黄连解毒汤的药效学研究不断取得新的进展,研究表明该方具有良好的改善脑缺血、缺氧等作用^[1-3],在用于治疗脑血管疾病方面具有可观前景。其主要成分小檗碱能够透过血脑屏障^[4],为其治疗脑部疾病提供了保障;还可明显扩张脑缺血大鼠软脑膜微循环,加快微循环血流速度,对维持缺血时大脑血流量有重要意义。因此,研究黄连解毒汤中主要药效成分相互之间如何发挥脑缺血保护作用及作用规律就显得尤为重要。黄连解毒汤主要含生物碱、黄酮、环烯醚萜苷3大类成分,代表成分分别为小檗碱、黄芩苷、栀子苷^[5]。本研究其主成分之一小檗碱,通过比较其不同模拟组合的药动学过程,探究黄连解毒汤中其他主要成分对小檗碱的体内吸收的影响,为进一步研究黄连解毒汤复方成分的相互作用规律提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

小檗碱(批号110713-200609)对照品购自中国食品药品检定研究院;栀子苷(质量分数95%,批号ZL20100923),黄芩苷(质量分数98%,批号ZL20100834),小檗碱(质量分数98%,批号ZL20100965)购自南京泽朗医药科技有限公司;肝素钠购自Sigma公司;乙腈(色谱纯,Merck公司),水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD检测器,美国);TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器制造厂);微量移液器(德国,Eppendor公司);MTN-2000W氮气浓缩仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);Libror AEL-40SM电子分析天平(日本岛津);WH-90A型微型混合器(上海亚荣生化仪器厂);KQ3200nE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);-80℃超低温冰箱(中国海尔集团有限公司)。

1.3 动物

雄性SD大鼠,清洁级,体质量280~300 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号:SCXK(沪)2008-0033。

2 方法

2.1 脑缺血模型制备

SD大鼠按体质量分为模型组和假手术组,每

组又分为小檗碱组、小檗碱+黄芩苷组、小檗碱+栀子苷组、小檗碱+黄芩苷+栀子苷组。其中模型组参照文献方法^[6]对大鼠进行大脑中动脉栓塞(MCAO)手术。大鼠ip 10%水合氯醛,在颈部偏右方切口,钝性分离右颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),挂线备用,结扎ECA远心端,用动脉夹夹闭CCA近心端、ICA远心端后,迅速于分叉处下ECA上做一切口,从切口处插入备好的线栓,线导入ICA后,在ECA处系一线固定线栓,不宜太紧,打开夹闭ICA的动脉夹,轻柔送线接近20 mm处,遇阻力即止,固定栓线,结扎ECA,缝合皮肤4 h后,轻轻拔出线栓并进行大鼠行为学评分,按文献方法^[7],对动物进行神经症状评分。将行为学评分≥2分的大鼠作为复制成功的脑缺血模型大鼠。假手术组除不切口插线外,其余操作同模型组。

2.2 给药剂量的确定

给药量是按复方中的各成分量和原方中比例进行模拟,与复方具有可比性。根据本实验室已有的优选工艺提取黄连解毒汤制剂,得到复方中水提物粉末,得率为26.69%。黄连解毒汤给药剂量为全方生药40 g/kg,折算为提取物约为全方提取物10.68 g/kg。黄连解毒汤复方提取物中小檗碱、黄芩苷、栀子苷的质量分数分别为2.27%、1.75%、1.33%。而小檗碱、黄芩苷、栀子苷质量分数分别为98%、98%、95%。可知小檗碱、黄芩苷、栀子苷的给药剂量分别为247.4、190.7、149.5 mg/kg。

2.3 给药与血样采集

大鼠给药前禁食12 h,自由饮水。假手术组及模型组大鼠术后24 h取空白血浆0.5 mL于肝素化试管中。1 h后ig给药,具体剂量为小檗碱247.4 mg/kg、黄芩苷190.7 mg/kg、栀子苷149.5 mg/kg。分别于给药后0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24、48、72 h眼眶取血。所有血样置于肝素化试管中,5 000 r/min离心5 min,取上清液,备用。

2.4 大鼠血浆样品中小檗碱的测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为Agilent Zorbax C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,洗脱程序:0~13 min, 88% B;13~28 min, 74% B;体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;进样量为20 μL。内标法进行峰面积定量。

2.4.2 血浆样品的处理 取100 μL血浆样品置于具塞离心管中,加入0.01 mol/L冰醋酸50 μL,再

加入 400 μL 无水甲醇沉淀蛋白, 涡旋混匀 30 s, 混匀后, 5 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移至另一尖底试管中, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 N_2 挥发至干。残渣定量加入甲醇 100 μL 溶解, 涡旋混匀 30 s, 混匀后, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为样品液, 待测。

2.4.3 对照品溶液制备 分别精密称取适量小檗碱对照品, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇将其定容至刻度, 得到对照品储备液; 再分别吸取适量储备液, 置于 5 mL 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 配成质量浓度为 9.68 $\mu\text{g/mL}$ 小檗碱溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4.4 线性关系考察 取 7 份空白血浆各 100 μL , 置具塞试管中, 并分别加入不同质量浓度的小檗碱

对照品溶液各 100 μL 配成质量浓度分别为 9.68、4.84、2.42、1.21、0.605、0.303、0.151 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 按“2.4.2”项操作, 依法测定, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 绘制各对照品的标准曲线。血浆中小檗碱质量浓度在 0.14~9.5 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系, 回归方程为 $Y=24.829X+2.9649$, $r=0.9979$ 。当 $S/N \geq 3$ 时, 最低检测量为 0.14 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.5 专属性试验 在上述色谱条件下, 小檗碱对照品的保留时间为 21.812 min, 给药 1 h 后小檗碱+黄芩苷+栀子苷组血浆样品中小檗碱的保留时间分别为 21.867 min, 空白血浆在相同保留时间处皆无吸收峰。结果见图 1。

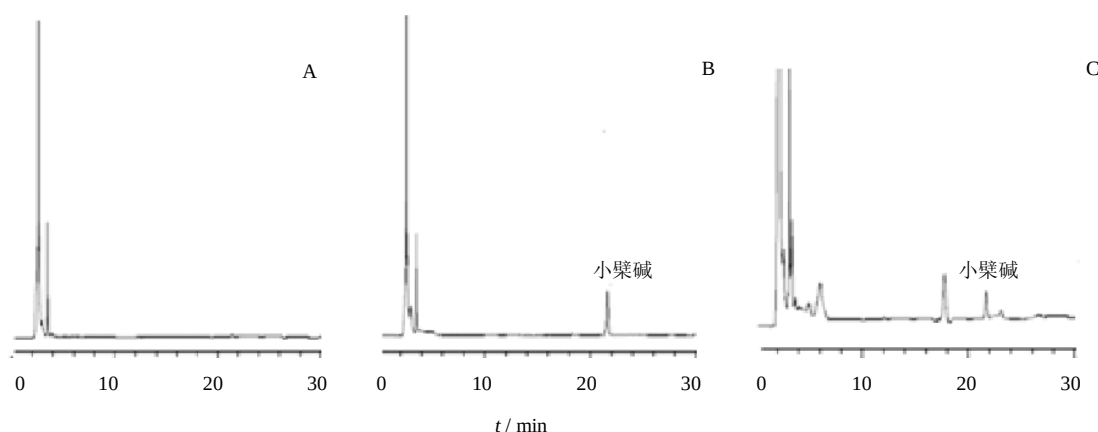


图1 大鼠空白血浆 (A)、小檗碱对照品+空白血浆 (B)、药后 1 h 小檗碱+黄芩苷+栀子苷组血浆样品 (C) HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of blank plasma (A), berberine reference substance + blank plasma (B), and plasma sample after 1 h of administration by berberine + baicalin + geniposide (C)

2.4.6 稳定性试验 考察了反复冻融的稳定性。将加入 2.42、0.605、0.151 $\mu\text{g/mL}$ 小檗碱对照品溶液的空白血浆样品, 放置 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏 7 d, 用 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴反复冻融 3 次后, 处理样品, 解冻后考察稳定性。高、中、低 3 种质量浓度血浆样品小檗碱峰面积的 $\text{RSD} \leq 15\%$ 。结果表明小檗碱在大鼠血浆内反复冻融 3 次稳定。

2.4.7 精密度试验 分别取 9 份空白血浆各 100 μL 置具塞试管中, 配制含有 2.42、0.605、0.151 $\mu\text{g/mL}$ 小檗碱对照品的血浆样品, 按“2.4.2”项操作, 依法测定, 计算日内和日间精密度。小檗碱低、中、高 3 个质量浓度的日内精密度 RSD 分别为 2.12%、1.64%、1.36%; 日间精密度 RSD 分别为 5.23%、6.37%、4.62%。结果表明, $\text{RSD} < 15\%$ ($n=5$)。

2.4.8 回收率试验 分别取 15 份空白血浆各 100 μL 置具塞试管中, 加入 2.42、0.605、0.151 $\mu\text{g/mL}$

小檗碱对照品溶液 100 μL , 每个质量浓度样品 5 份, 按“2.4.2”项操作, 依法测定。将峰面积代入标准曲线方程, 计算出血浆中小檗碱的质量浓度, 以测得值与加入值之比计算绝对回收率, 结果绝对回收率为 $(87.7 \pm 10.3)\%$ ($n=5$)。

2.5 统计学处理

小檗碱血药浓度数据采用药动学计算程序 DAS 2.0 处理, 计算药动学参数, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用 t 检验。

3 结果

假手术组与模型组大鼠分别 ig 小檗碱、小檗碱+黄芩苷、小檗碱+栀子苷、小檗碱+黄芩苷+栀子苷后, 小檗碱血药浓度随时间呈动态变化, 药-时曲线见图 2, 小檗碱药动学参数见表 1。

表 1 结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠体内小檗碱均呈现吸收增加的特征, 且在体内消除

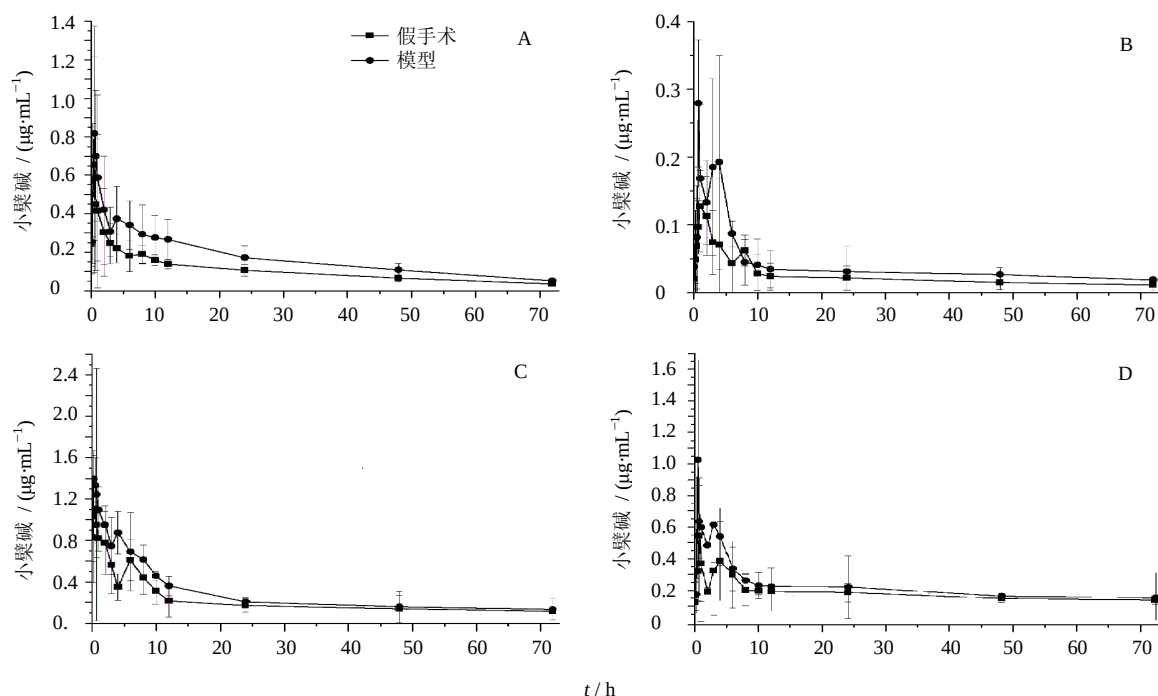


图 2 小檗碱组 (A)、小檗碱+黄芩苷组 (B)、小檗碱+栀子苷组 (C)、小檗碱+黄芩苷+栀子苷组 (D) 小檗碱在大鼠体内药-时曲线

Fig. 2 *In vivo* concentration-time curves of berberine in berberine (A), berberine + baicalin (B), berberine + geniposide (C), and berberine + geniposide + baicalin (D) groups in rats

表 1 各组小檗碱药动学参数比较

Table 1 Comparison on pharmacokinetic parameters of berberine in each subgroup

参数	单位	小檗碱		小檗碱+栀子苷	
		假手术组	模型组	假手术组	模型组
$AUC_{0\sim t}$	$mg\cdot L^{-1}\cdot h$	9.212 ± 3.943	12.159 ± 3.658	15.173 ± 3.339	19.924 ± 5.074
$AUC_{0\sim \infty}$	$mg\cdot L^{-1}\cdot h$	10.863 ± 3.893	14.776 ± 4.677	20.129 ± 5.318	28.765 ± 17.936
$MRT_{0\sim t}$	h	26.140 ± 6.674	23.751 ± 1.879	24.503 ± 5.301	21.539 ± 7.392
$MRT_{0\sim \infty}$	h	41.423 ± 11.707	39.766 ± 10.725	56.647 ± 52.203	46.073 ± 41.259
$t_{1/2z}$	h	30.295 ± 7.479	29.003 ± 7.622	39.617 ± 41.435	32.391 ± 27.537
t_{max}	h	0.667 ± 0.204	0.708 ± 0.188	0.625 ± 0.703	0.458 ± 0.188
C_{max}	$mg\cdot L^{-1}$	0.836 ± 0.516	0.959 ± 0.525	1.382 ± 0.232	1.623 ± 0.126
参数	单位	小檗碱+黄芩苷		小檗碱+栀子苷+黄芩苷	
		假手术组	模型组	假手术组	模型组
$AUC_{0\sim t}$	$mg\cdot L^{-1}\cdot h$	1.831 ± 0.637	2.818 ± 0.801	12.936 ± 1.563	15.744 ± 2.802
$AUC_{0\sim \infty}$	$mg\cdot L^{-1}\cdot h$	2.765 ± 0.710	4.101 ± 1.660	22.692 ± 6.339	22.807 ± 14.948
$MRT_{0\sim t}$	h	22.217 ± 3.887	24.071 ± 2.253	31.159 ± 2.479	28.764 ± 5.291
$MRT_{0\sim \infty}$	h	74.518 ± 79.127	62.329 ± 49.281	82.153 ± 39.967	59.714 ± 66.709
$t_{1/2z}$	h	51.056 ± 63.051	45.955 ± 41.037	51.223 ± 30.607	38.756 ± 45.289
t_{max}	h	2.083 ± 1.429	1.708 ± 1.427	2.458 ± 2.277	1.333 ± 1.438
C_{max}	$mg\cdot L^{-1}$	0.180 ± 0.046	0.348 ± 0.081	0.826 ± 0.172	1.155 ± 0.453

得更慢,平均驻留时间延长。在不同组别中小檗碱的药-时曲线均出现了双峰现象,提示其存在二次吸收的特征,有必要进一步开展不同吸收机制的研究。

表1数据显示模型组小檗碱的AUC和 $C_{\max}$ 均呈现小檗碱+栀子苷组>小檗碱+栀子苷+黄芩苷组>小檗碱组>小檗碱+黄芩苷组趋势,而假手术组的趋势也基本相同。可知黄酮苷类成分黄芩苷抑制了生物碱类成分小檗碱的吸收,环烯醚萜苷类成分栀子苷促进了生物碱类成分小檗碱的吸收,而小檗碱、栀子苷和黄芩苷三者组合则显示了栀子苷对小檗碱吸收的促进作用大于黄芩苷对小檗碱吸收的抑制作用,这些主成分的有机组合可协调发挥抗脑缺血的作用。

4 讨论

中药复方所含化学成分复杂,各成分可相互影响药动学过程。表现为各有效成分通过相同或者不同的作用机制,或协同或拮抗最终产生疗效。来源于化工过程领域的系统模拟是现代科学研究的一种重要方法,可成为分析预测复杂大系统的有力工具。本实验以黄连解毒汤中主效应成分之一小檗碱为主体,基于黄连解毒汤中的原方比例进行主成分的系统模拟,开展其他效应成分对其体内吸收影响的研究,有助于探讨主要成分的体内作用规律。

在不同组别中小檗碱的药-时曲线均出现了双峰现象,这与文献报道的基本一致^[8-11]。黄芩苷抑制小檗碱吸收的机制,文献也有报道,刘李等^[12]研究小檗碱影响黄芩苷药动学行为的机制,发现小檗碱显著降低口服黄芩苷的AUC,小檗碱可能通过与黄芩苷生成共沉淀和抑制 β -葡萄糖醛酸酶活性进而减少黄芩苷转化成黄芩素影响黄芩苷的吸收。栀子苷促进小檗碱吸收的机制还有待于进一步研究。

结合本实验所做的特定剂量给药后体内药物浓度的变化的研究,进一步进行药效动力学过程的研究,将可为黄连解毒汤治疗脑缺血疾病提供重要的合理用药依据,并为其新药开发提供参考。

参考文献

- [1] 吴彦,孙建宁,于绍坤,等.黄连解毒汤有效部位对动物脑缺血缺氧的保护作用[J].中国现代应用药学杂志,2004,21(6):452-454.
- [2] 徐静华,于庆海,蔡爽,等.黄连解毒汤对小鼠急性脑缺血、缺氧的影响[J].沈阳药科大学学报,2003,20(2):132-134.
- [3] 陈国华,单萍,邱昕.黄连解毒汤治疗老年性痴呆(心肝火旺型)临床研究[J].中国中医急症,2007,16(4):386-434.
- [4] Wang X, Xing D, Wang W, et al. Pharmacokinetics of berberine in rat thalamus after intravenous administration of *Coptidis Rhizoma* extract [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(6): 935-943.
- [5] 刘磊,姜鹏,窦圣姍,等.黄连解毒汤的化学及药理学研究进展[J].中草药,2008,39(6):935-938.
- [6] 朱继,万东,唐文渊.改良线栓法制备大鼠局灶脑缺血模型[J].第四军医大学学报,2008,29(8):685-687.
- [7] 谭杰,李承晏,李涛,等.局灶性脑梗死模型大鼠相对体质量、Bederson评分与梗死类型的鉴别[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(37):6875-6878.
- [8] 吴晓霞.黄连解毒汤三种生物碱在糖尿病大鼠体内的药代动力学研究[D].北京:中国中医科学院,2006.
- [9] 肖学风,乔晓莉,高岚,等.黄连解毒汤中三种成分在大鼠体内的药代动力学研究[J].中国医药导报,2008,5(3):13-17.
- [10] Deng Y, Liao Q, Li S, et al. Simultaneous determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study after oral administration of *Coptis-Evodia* herb couple [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 863(2): 195-205.
- [11] 朱华旭,张新龙,曾明飞,等.黄连解毒汤中小檗碱在脑缺血模型大鼠体内药动学与药效学相关性研究[J].中草药,2012,43(3):546-550.
- [12] 刘李,邓远雄,张冬梅,等.小檗碱对黄芩苷在大鼠中药代动力学的影响[J].中国天然药物,2007,3(5):137-341.