

鱼腥草挥发油在家兔体内的药动学研究

孙 瑜¹, 肖学风^{1*}, 毛学建²

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 济南中信医药有限公司, 山东 济南 250023)

摘要:目的 以甲基正壬酮为指标, 研究鱼腥草挥发油在家兔体内药动学参数, 确定其药动学模型。方法 使用气相色谱法检测鱼腥草挥发油中甲基正壬酮在家兔血浆中的血药浓度, 采用 SPB-5 毛细管气相色谱柱, 程序升温: 起始温度 90 ℃, 以 10 ℃/min 升至 190 ℃, 保持 5 min, 进样口温度 250 ℃, FID 检测温度 300 ℃, 进样量 5.0 μL, 无分流进样, 溶剂为正己烷; 载气为氮气, 柱头压 55.2 kPa, 内标物 正十五烷; 并运用 3P97 程序对甲基正壬酮的血药浓度测定值进行拟合。结果 建立了用气相色谱法测定鱼腥草挥发油中甲基正壬酮血药浓度的方法, 甲基正壬酮在 0.04~60.0 μg/mL 线性关系良好 ($r=0.9870$); 其药-时过程符合二室开放模型。结论 本实验为鱼腥草药材的合理用药及二次开发提供了药动学依据; 同时也为中药材挥发油类成分的药动学研究提供了可借鉴的方法。

关键词: 鱼腥草挥发油; 甲基正壬酮; 药动学

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)04-0524-04

Pharmacokinetic study on volatile oil from whole herbs of *Houttuynia cordata* in rabbits *in vivo*

SUN Yu¹, XIAO Xue-feng¹, MAO Xue-jian²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Jinan Zhongxin Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250023, China)

Abstract: **Objective** Taking methyl nonyl ketone as index to establish pharmacokinetic compartment model for study volatile oil from the whole herb of *Houttuynia cordata* by pharmacokinetic parameters in rabbits *in vivo*. **Methods** Using GC to determine the blood concentrations of methyl nonyl ketone in the volatile oil from whole herbs of *H. cordata* in rabbit plasma. The GC system used a capillary SPB-5 column and helium as carrier gas; the initial temperature was at 90 ℃, then raised to 190 ℃ by 10 ℃/min and kept for 5 min; the injector temperature was 250 ℃ and the FID detector temperature was 300 ℃; the injection volume was 5.0 μL with splitless injection mode; *n*-hexane was used as solvent and *n*-pentadecane as interior standard substance. The blood concentration value of methyl nonyl ketone was fitted with 3P97 procedure. **Results** A capillary GC method was established for the determination of methyl nonyl ketone in the volatile oil from whole herbs of *H. cordata* in rabbit plasma. Methyl nonyl ketone linearity was good ($r=0.9870$) within 0.04—60.0 μg/mL. The blood concentration-time course of precision in rabbit plasma conformed to two compartment model. **Conclusion** The experiment provides pharmacokinetic evidence for the rational administration and the further development of *H. cordata* and some methods for pharmacokinetic study of volatile oils from traditional Chinese medicinal materials.

Key words: the volatile oil from the whole herbs of *Houttuynia cordata* Thunb.; methyl nonyl ketone; pharmacokinetics

鱼腥草为三白草科蕺菜属植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的全草, 具有清热解毒, 消痈排脓, 利尿通淋等功能, 用于痰热喘咳、热痢、热淋、痈肿疮毒等症^[1]。鱼腥草具有抗菌、抗病毒、增强机体免疫、抗炎等作用, 在呼吸科、五官科和消化科疾病中都有广泛的应用^[2]。鱼腥草主要化学成分为挥发

油和黄酮, 而甲基正壬酮是挥发油中的主要成分之一, 且性质稳定。近几年来鱼腥草制剂在临床应用不良反应的报道越来越多, 甚至有死亡报道。为此, 本实验采用气相色谱法, 以甲基正壬酮为指标, 测定鱼腥草挥发油在家兔血浆中的药物浓度, 以期说明其在家兔体内的吸收过程, 从而对鱼腥草药材的二

收稿日期: 2006-10-09

作者简介: 孙 瑜 (1979—), 女, 山东省济南市人, 天津中医药大学在读硕士研究生, 研究方向为药剂学、药动学。

E-mail: sunrain806@163.com

* 通讯作者 肖学风 Tel: (022)81820938 E-mail: kail219@163.com

次开发提供依据。

1 材料与仪器

大耳白健康家兔, 体重(2±0.2) kg, 由本校动物室提供。甲基正壬酮对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0834-9501), 鱼腥草购自天津市安舜大药房, 肝素钠注射液(天津市生物化学制药厂, 批号 H12020505), 正十五烷(气相色谱参比物, 天津市化学试剂二厂色谱技术开发公司), 正己烷、无水乙醇(分析纯, 天津市北方天医化学试剂厂)。

Agilent 6820 气相色谱仪, 氢火焰离子检测器, QA-QC 工作站; LG10-2.4A 型高速离心机(北京医用离心机厂); N-EVAPTM111 氮吹仪(Organomation Associates, Inc. 266River Road West Berlin, MA01503. U. S. A.); XW-80A 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); ZY-10 型婴儿秤(无锡仪器厂)。

2 方法与结果^[3]

2.1 色谱条件^[4]: SPB-5 毛细管色谱柱(内径: 0.32 mm, 长 30 m, 涂膜厚: 0.25 μm); 程序升温起始温度为 90 °C, 以 10 °C/min 升至 190 °C, 保持 5 min; 进样口温度为 250 °C; FID 检测温度为 300 °C; 进样量 5.0 μL; 无分流进样; 溶剂为正己烷; 载气为氮气; 柱头压为 55.2 kPa; 内标物为正十五烷。

2.2 鱼腥草挥发油的提取: 以挥发油提取器采用水蒸气蒸馏法(参照《中国药典》2005 年版一部附录 XD 挥发油测定法)提取鱼腥草药材中的挥发油, 产率为 0.14%。

2.3 血浆样品预处理: 取含待测药物的血浆 1 mL 于离心管(肝素抗凝)中, 加入适量正十五烷无水乙醇溶液和 1.5 mL 正己烷, 漩涡混合 5 min, 5 000 r/min 离心 10 min。吸取正己烷层用氮吹仪常温吹干, 用 100.0 μL 无水乙醇复溶, 进样, 见图 1。

2.4 动物实验: 取健康家兔禁食 12 h 后称重, 用 3% 戊巴比妥麻醉, 分离颈总动脉, 插入肝素管, 按 0.2 g/kg 剂量耳缘静脉注射鱼腥草挥发油(以 1, 2-丙二醇为溶剂配制成 0.2 g/mL 的注射液), 分别于给药后 5、10、20、30、40、50 min, 1、1.5、2、2.5、3、4、6、7、12、24 h 从颈总动脉取血 1 mL (n=6), 体外肝素抗凝, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 按血浆样品预处理方法处理。

2.5 方法学评价

2.5.1 标准曲线的制备: 取空白血浆(肝素抗凝)1 mL, 加入不同量甲基正壬酮对照品无水乙醇溶液, 使血浆中药物质量浓度分别为 0.04、0.08、0.4、

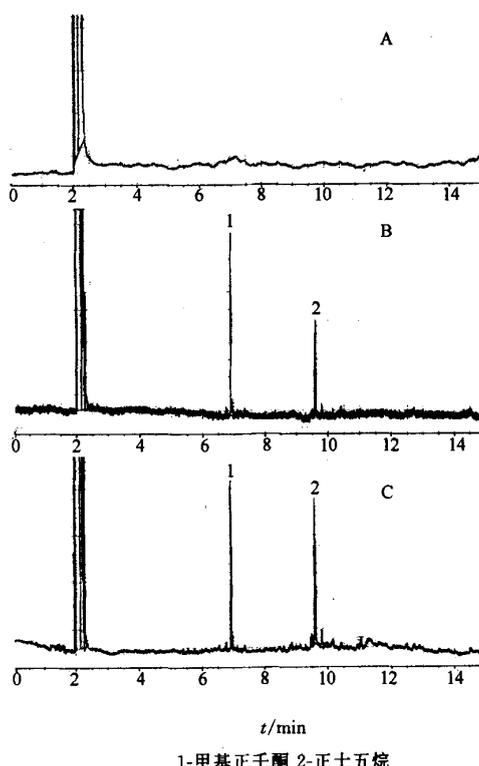


图 1 空白血浆(A)、甲基正壬酮及正十五烷在空白血浆(B)和给药后血样(C)的气相色谱图

Fig. 1 GC Chromatograms of blank plasma (A), methyl nonyl ketone and *n*-pentadecane in blank plasma (B), and plasma sample after single iv volatile oil from whole herbs of *H. cordata*

1.6、8.0、24.0、40.0、60.0 μg/mL, 按血浆样品预处理方法操作。以甲基正壬酮对照品与内标物正十五烷的峰面积比(Y)对甲基正壬酮的血药浓度(C)做图。结果甲基正壬酮在 0.04~60.0 μg/mL 内线性关系良好, 其回归方程为 $Y=0.077 C-0.020 8$, $r=0.987 0$ 。

2.5.2 精密度试验: 配制质量浓度为 0.4、8.0、24.0 μg/mL 的甲基正壬酮血浆样品, 各 5 份, 按血浆样品预处理方法处理并测定药物浓度, 同一质量浓度每隔 1 h 测 1 次, 测 3 次, 进行日内精密度计算; 每隔 1 d 测定 1 次, 测定 3 次, 进行日间精密度计算, 结果见表 1。结果表明日内和日间 RSD 值均小于 6.0%。

2.5.3 准确度试验: 配制 0.4、8.0、24.0 μg/mL 甲基正壬酮血浆样品, 按血浆样品预处理方法处理, 每种质量浓度各做 5 份, 计算甲基正壬酮与内标的峰面积比值, 按标准曲线法计算质量浓度和相对回收

率。结果见表 2。3 种质量浓度样品的准确度均在 80%~100%，RSD 值均小于 8.0%。根据药物临床前药动学研究指导原则^[5]，准确度应在 80%~120%，RSD 值应小于 15.0%，结果符合规定。

2.5.4 提取回收率试验：配制 0.4、8.0、24.0 μg/mL 甲基正壬酮血浆样品，按血浆样品预处理方法处理，每种质量浓度各做 5 份，以配制的甲基正壬酮对照品溶液为标准计算提取回收率。结果见表 3。3 种质量浓度样品的提取回收率均大于 70%，RSD 值均小于 6.0%。符合药物临床前药动学研究指导原则的要求。

表 1 甲基正壬酮在家兔血浆中的精密性试验结果 (n=5)

Table 1 Precision test of methyl nonyl ketone in rabbit plasma (n=5)

加入量/ (μg · mL ⁻¹)	日内精密性		日间精密性	
	测得量/ (μg · mL ⁻¹)	RSD/%	测得量/ (μg · mL ⁻¹)	RSD/%
0.413	0.335	5.44	0.331	5.58
8.248	7.233	3.68	7.054	4.15
24.802	22.853	2.86	22.855	3.16

表 2 甲基正壬酮在家兔血浆中的准确度试验 (n=5)

Table 2 Accuracy test of methyl nonyl ketone in rabbit plasma (n=5)

加入量/ (μg · mL ⁻¹)	测得量/ (μg · mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
0.413	0.335	81.03	7.09
8.248	7.233	87.87	6.45
24.802	22.853	92.25	4.08

表 3 甲基正壬酮在家兔血浆中的提取回收率试验 (n=5)

Table 3 Extracting recovery test of methyl nonyl ketone in rabbit plasma (n=5)

加入量/ (μg · mL ⁻¹)	测得量/ (μg · mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
0.413	0.335	70.01	5.44
8.248	7.233	78.38	3.68
24.802	22.853	84.75	2.86

2.6 家兔给药后的药动学：家兔 0.2 g/kg 耳缘静脉注射鱼腥草挥发油，绘制的药-时曲线见图 2。采用 3P97 药动学计算程序对药-时数据进行处理，分别按一室、二室、三室模型进行模拟，获得 AIC 值和相关系数 r。根据 AIC 值最小和 r 值最大原则 (AIC=-12.231 91, r=0.999 889 1)，判定甲基正壬酮在家兔体内的药-时过程符合二室开放模型 (权重参数为 1/C²)。并计算其药动学参数，结果见表 4。

另用 3P97 程序将药-时数据进行统计矩分析，得到非隔室模型药动学参数，见表 5。

3 讨论

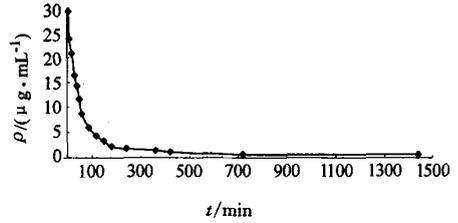


图 2 家兔静注鱼腥草挥发油后甲基正壬酮的药-时曲线 (n=6)

Fig. 2 Mean blood concentration-time curve of methyl nonyl ketone after single iv volatile oil from whole herbs of *H. cordata* in rabbit (n=6)

表 4 家兔静注鱼腥草挥发油后甲基正壬酮的药动学参数 (隔室模型)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of methyl nonyl ketone after single iv volatile oil from whole herbs of *H. cordata* in rabbit (compartment model)

参数	单位	数值
A	μg · mL ⁻¹	26.110 884
α	min ⁻¹	0.018 114
B	μg · mL ⁻¹	1.450 321
β	min ⁻¹	0.000 728
V(c)	(g · kg ⁻¹) · (μg · mL ⁻¹) ⁻¹	0.007 257
t _{1/2α}	min	38.265 491
t _{1/2β}	min	951.680 600
K ₂₁	min ⁻¹	0.001 643
K ₁₀	min ⁻¹	0.008 029
K ₁₂	min ⁻¹	0.009 170
CL(s)	(g · kg · min ⁻¹) · (μg · mL ⁻¹) ⁻¹	0.000 058
AUC	(μg · mL ⁻¹) · min	3 432.731 400

表 5 家兔 iv 鱼腥草挥发油后甲基正壬酮的药动学参数 (非隔室模型)

Table 5 Pharmacokinetic parameters of methyl nonyl ketone after single iv volatile oil from whole herbs of *H. cordata* in rabbit (incompartment model)

参数	单位	数值
AUC(S0)	(μg · mL ⁻¹) · min	2 772.518 800
AUMC(S1)		833 181.940 000
S2		712 580 100.000 000
MRT	min	300.514 430
VRT	min · min	166 706.500 000

3.1 给药剂量的选择：根据药物临床前药动学研究指导原则的要求，其中一个剂量应相当于药效学试验有效剂量，高剂量一般接近于最大耐受量。在预试验中曾给家兔 0.4 g/kg 剂量耳缘静脉注射，发现家兔有抽搐后死亡现象，又以 0.3 g/kg 剂量给家兔耳

缘静脉注射,发现家兔有抽搐现象,而以 0.2 g/kg 剂量给药后,家兔在实验过程中状态正常。兼顾实验仪器的灵敏度,将给药剂量定为 0.2 g/kg。

3.2 内标法在气相色谱定量分析中是一种重要的技术。采用内标法定量时,要求内标物与待测组分结构相似,并且在色谱条件下与待测物质能够较好的分离。实验参考相关文献报道^[6],选择正十五烷为内标物。

3.3 血浆样品的预处理:实验曾使用乙腈沉淀蛋白,效果较好,但由于甲基正壬酮溶于乙腈,致使药物在蛋白沉淀过程中大量损失,影响药物浓度的测定。故采取液-液萃取法,以正己烷为萃取剂^[6]。由于在液-液萃取中尽可能采用极性溶剂,这样可得到合适的回收率,又使干扰杂质的提取量减至最小。为了克服碳氢化合物的弱极性,溶剂中常加少量醇类^[7]。故本实验中对照品、内标物均由无水乙醇配制,大大

提高了药物的萃取率。

References:

[1] Wu W. Advances in studies on *Houttuynia cordata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(4): 367-368.
 [2] Gong Y Q, Wu Y J. Advances in studies on clinical pharmacology *Houttuynia cordata* [J]. *China Pharm* (中国药业), 2005, 14(3): 73-74.
 [3] Wei L P, Wu M H. Pharmacokinetics of β -asarone and β -asarone in volatile oil from *Acrous tatarinowii* Schott in rabbits [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2005, 26(15): 1431-1434.
 [4] Yu J D, Hu Y X. Determination of methyl-n-nonylketone in *Houttuynia cordata* [J]. *Chin J Med Anal* (药物分析杂志), 1999, 19(1): 50-51.
 [5] Zheng X Y. *Investigation & Directions Principle of Chemicals and Biological Product for Therapy* (化学药品和治疗用生物用品研究指导原则(试行)) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2005.
 [6] Shi C Y, Fang J G. Determination of methyl-n-nonylketone in Yuxingcao Injection by SPE-GC [J]. *Herald Med* (医药导报), 2005, 24(3): 225-226.
 [7] Zhang J R, Zang H C. *Medicine Analysis In Vivo* (体内药物分析) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.

聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶催化酸水解盾叶薯蓣薯蓣皂苷元的研究

张裕卿, 李滨县

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:目的 提高纤维素酶在催化过程中的稳定性,并考察聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶在盾叶薯蓣薯蓣皂苷元转化为薯蓣皂苷元过程中的可行性。方法 采用聚氧乙烯-马来酸酐共聚物对纤维素酶进行化学改性,并以相对酶活考察改性酶的稳定性。以薯蓣皂苷元的提取率和熔点为指标,比较了纤维素酶和改性酶的辅助催化作用。对改性酶催化所得薯蓣皂苷元产品进行元素分析和 HPLC 分析。结果 改性酶在高温下的活力衰减速率减小,在 50 °C pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中放置 100 min,保持了初始酶活的 69.4%。改性酶辅助催化盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的转化时,较未改性酶的效果好,所得薯蓣皂苷元产品提取率为 97.6% 以上,为白色或乳白色,熔点为 200~203 °C,元素分析结果为 H:77.96%, O:10.11%, HPLC 法测定的质量分数高达 96.03%。结论 聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶在较高温度下能够保持较高的催化活性,可以更有效地促进盾叶薯蓣薯蓣皂苷向薯蓣皂苷元的转化。

关键词:盾叶薯蓣; 聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶; 薯蓣皂苷; 薯蓣皂苷元

中图分类号:R284.2;R286.02 文献标识码:B 文章编号:0253-2670(2007)04-0527-04

Biocatalytic acid hydrolysis of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* through polyoxethylene oxide-maleic acid anhydride modified cellulose enzyme

ZHANG Yu-qing, LI Bin-xian

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; polyoxethylene oxide-maleic acid anhydride modified cellulose enzyme (PEO-MA); dioscin; diosgenin

收稿日期:2006-08-19

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(413395-0306);天津市科技攻关计划项目(033180811);天津大学青年教师基金资助项目(411716)

作者简介:张裕卿(1963-),男,天津人,生物化工专业博士后,副教授,研究生导师,研究方向为生物催化医药、化工新型材料和分离。
Tel: (022)27890470 E-mail: zhangyuqing@tju.edu.cn