

• 研究论文 •

伸筋草提取物中玉柏碱在大鼠体内的药动学研究

邹桂欣, 尤献民, 邸子真

辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 110034

摘要: 目的 通过给予大鼠伸筋草提取物, 探讨其中主要活性成分玉柏碱的药动学特征。方法 利用 RP-HPLC 法, 以 Centuryasil C₁₈ EPS 为色谱柱, 甲醇-水 (61:39) 为流动相; 紫外检测器测定大鼠 ig 伸筋草提取物后血浆中玉柏碱的血药浓度, 计算药动学参数。结果 玉柏碱在大鼠体内呈二室模型分布, 线性范围为 0.354~14.16 $\mu\text{g/mL}$, $r=0.999\ 8$ 。日内和日间精密度均小于 5%。玉柏碱口服给药后在大鼠体内的主要药动学参数为: $t_{1/2}$ 为 2.681 h, $t_{\max}$ 为 0.75 h, $C_{\max}$ 为 6.309 mg/L, $\text{AUC}_{(0\rightarrow t)}$ 为 16.626 mg/L, $\text{AUC}_{(0\rightarrow\infty)}$ 为 18.798 mg/L。结论 本方法适用于大鼠血浆中玉柏碱的检测及其体内药动学研究。

关键词: 伸筋草, α -玉柏碱; 药动学; HPLC

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)06-0410-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.06.002

In vivo pharmacokinetic study on α -obscurine in rats after ig administration of *Lycopodium japonicum* extract

ZOU Gui-xin, YOU Xian-min, DI Zi-zhen

Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicines, Shenyang 110034, China

Abstract: **Objective** To study the *in vivo* pharmacokinetic characteristics of α -obscurine in rats after the ig administration of *Lycopodium japonicum* extract (LJE). **Methods** The RP-HPLC was used to monitor the plasma concentration of α -obscurine in rats after the ig administration of LJE. Methanol-water (61:39) as the mobile phase on Centuryasil C₁₈ EPS column. The pharmacokinetic parameters were estimated by the DAS2.0 computer program. **Results** The concentration-time profiles were fitted with an open two compartment model system. The main pharmacokinetic parameters were $t_{1/2}$ 2.681 h, $t_{\max}$ 0.75 h, $C_{\max}$ 6.309 mg/L, $\text{AUC}_{(0\rightarrow t)}$ 16.626 mg/L, $\text{AUC}_{(0\rightarrow\infty)}$ 18.798 mg/L. **Conclusion** The HPLC method is appropriate for the determination and pharmacokinetic study on α -obscurine in rat plasma after the ig administration of LJE.

Key words: *Lycopodium japonicum* Thunb; α -obscurine; pharmacokinetics; HPLC

伸筋草作为治疗风湿痹痛的中药, 具有祛风除湿、舒筋活络之功效, 含有多生物碱成分, 前期研究表明, 伸筋草生物碱中的 α -玉柏碱有明显抑制家兔血小板聚作用^[1], 它的血药浓度测定方法及药动学研究尚未见报道。

本文以五味子醇甲为内标建立了大鼠血中 α -玉柏碱的高效液相色谱测定方法, 计算药动学参数, 以了解 α -玉柏碱在体内的吸收代谢情况, 指导临床合理用药。

1 仪器与材料

SPD—10AT 液相泵, SPD—10A 检测器 (日本

岛津)。XW—80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂), SLJ II 型电动离心机 (沈阳理化仪器厂), BF2000 氮气吹干仪 (北京八方公司), 微量分析天平 TG—328A (上海天平仪器厂)。

α -玉柏碱 (自制, 质量分数经 HPLC 法检查为 95.18%)。伸筋草采自广西桂林龙胜各族自治县花坪国家自然保护区, 由辽宁中医药大学李峰为教授鉴定为 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草。

动物: Wistar 大鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体重 (200 $\pm$ 20) g, 购于吉林省动物质量检测中心, 合格证号 SCXK (吉) 2003-0001。

收稿日期: 2013-07-19

基金项目: 国家 863 课题 (2004 AA 2Z3730-13)

作者简介: 邹桂欣 (1965—), 女, 硕士, 研究员, 主要从事中药新药质量控制研究。Tel: (024)86803184 E-mail: yying_65@126.com

甲醇为色谱纯、乙醚、高氯酸、醋酸乙酯等其他试剂均为分析纯。各种溶液的配制,均使用娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 测定条件

色谱柱为 Century C₁₈ EPS (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水 (61:39) 为流动相, 检测波长 250 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取 α-玉柏碱 14.16 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液 I (1.416 mg/mL), 精密吸取储备液 I 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 冰箱 (4 °C) 内保存备用, 作为储备液 II (141.6 μg/mL)。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取五味子醇甲 10.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备溶液 (100 μg/mL), 精密量取储备溶液 2.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为内标溶液 (5 μg/mL), 冰箱 (-4 °C) 内保存备用。

2.2.3 伸筋草提取物溶液的制备 称取伸筋草药材 2 kg, 加 50%乙醇 8 倍量, 回流提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 上于中性氧化铝柱上 (内径 10 cm, 柱长 1 m, 干法上柱), 用 50%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收至约 2 000 mL 时, 加入水约 2 000 mL, 放置, 离心, 弃去上清液, 沉淀用醋酸乙酯洗涤 1 次, 弃去醋酸乙酯溶液, 沉淀减压干燥至干, 取适量, 溶解于水中, 制成相当于 1 kg/L 药材的供试品溶液。提取液中含玉柏碱 1.51 mg/mL。

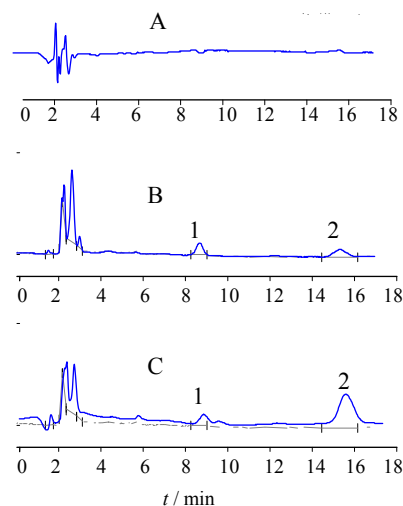
2.3 血浆样品预处理

取血清 200 μL, 加内标液 (五味子醇甲 5 μg/mL) 20 μL, 混匀, 分别用 1 mL 乙醚提取 2 次, 涡旋混合 3 min, 合并有机相, 氮气吹干, 残渣加甲醇 50 μL 溶解, 离心后取上清液 20 μL, 进行测定。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 取空白血清 200 μL, 按“2.2”项下的方法操作 (不加内标溶液), 进样 20 μL, 得空白血清色谱图, 见图 1A; 分别将 2.832 μg/mL 标准溶液和 5 μg/mL 内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 得内标物与对照品的色谱图, 见图 1B。α-玉柏碱和内标物五味子醇甲的保留时间分别为

8.628 min 和 15.253 min。取大鼠给药后的血浆样品, 同法操作, 得色谱图 1C。结果表明, 空白血清中的内源性物质和代谢物不干扰血清中 α-玉柏碱和内标物五味子醇甲的测定。



A-空白样品 B-空白血清加内标及 α-玉柏碱对照品 C-大鼠口服伸筋草提取物 2.5 h 后血清样品 1-内标 2-α-玉柏碱
A- blank sample; B- blank plasma spiked with α-obscurine reference substance and IS; C- rat plasma sample 2.5 h after ig administration
1- IS 2- α-obscurine

图 1 大鼠血清样品中 α-玉柏碱 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of α-obscurine in rat plasma samples

2.4.2 定量限与标准曲线 取空白血浆 200 μL, 加入 α-玉柏碱标准溶液, 制成 0.354、0.885、1.770、3.540、7.080 和 14.16 μg/mL 的模拟血清样品。按“2.3”项下的操作, 记录色谱图。以标准液质量浓度对峰面积比作加权线性回归分析, 求得的直线回归方程 $Y=0.446\ 0\ X-0.029\ 3$, 权重系数为 $1/Y^2$ 。α-玉柏碱的线性范围为 0.354~14.16 μg/mL, 回归系数为 0.999 8。方法的定量下限 0.354 μg/mL。

2.4.3 日内精密度与日间精密度 取空白血浆 200 μL, 制成高、中、低 3 个质量浓度 (0.442 5、2.832、11.33 μg/mL) 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度进行 5 次分析, 连续测定 3 d, 根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品的测得浓度。根据 QC 样品测定结果计算本法的精密度。结果见表 1。

2.4.4 溶液稳定性 取空白血清 200 μL, 制成低、中、高 3 个质量浓度 (0.442 5、2.832、11.33 μg/mL) 的模拟血浆样品, 按“2.3”项下处理后, 分别在室温下放置 8 h 及 -20 °C 保存 7 d 后测定。结果表明, 血浆样品 -20 °C 保存 7 d、处理后样品室温放置 8 h,

表1 方法学精密度与准确度 ($n=5$)
Table 1 Precision, and accuracy of HPLC analysis ($n=5$)

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度/%		准确度/%
	日内	日间	
0.442 5	1.8	3.7	101.6 $\pm$ 4.3
2.832	2.6	2.4	96.03 $\pm$ 2.6
11.33	2.3	2.1	98.48 $\pm$ 3.8

稳定性良好, RSD 均在 $\pm 10\%$ 之内。

2.5 生物样品采集

健康 Wistar 大鼠 6 只, 雌雄各半, 体质量 (200 ± 20) g, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。ig 给予伸筋草提取物 2.5 g/kg, 分别于给药 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12 h 时, 由眼静脉取血 0.5 mL, 并立即移入离心试管中, 静置 30 min 后, 离心 5 min (10 000 r/min), 分离血清, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。

2.6 药动学测定结果

2.6.1 血药浓度与药时曲线 对 6 只大鼠在平行条件下测得的血药浓度, 以时间为横坐标, 以 α -玉柏碱在血中的平均浓度为纵坐标, 绘制出平均药时曲线, 见图 2。

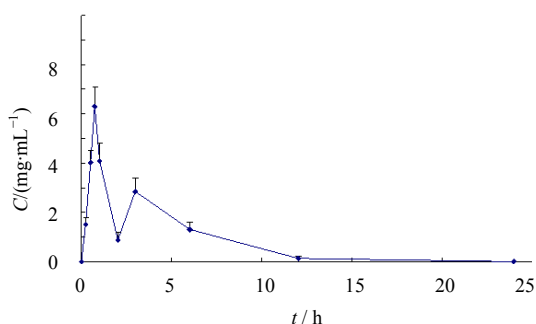


图2 单次 ig 给予伸筋草提取物后 α -玉柏碱在大鼠体内血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time profiles of α -obscurine in plasma of rats after ig administration of LJE

2.6.2 药动学参数 用 DAS2.0 药动学程序, 分别用权重系数 $1/C$ 、 $1/C^2$ 进行拟合优度比较, 结果在权重为 $1/C^2$ 最合理, 在此基础上, 经批处理计算的主要药动学参数见表 2。

3 讨论

3.1 血样处理方法的选择

实验中分别采用甲醇、乙腈、高氯酸除蛋白;

用醋酸乙酯、乙醚提取 α -玉柏碱; 用中性氧化铝小柱去除杂质等多种血样处理方法, 最终确定使用乙醚提取, 空白血清中无干扰, 回收率良好。

表2 ig 给予伸筋草提取物后 α -玉柏碱在大鼠体内主要药动学参数

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of α -obscurine in rats after ig administration of LJE

参数	单位	数值
$t_{1/2}$	h	2.681
$t_{\max}$	h	0.75
$C_{\max}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.306
$\text{AUC}_{(0-4)}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	16.626
$\text{AUC}_{(0-\infty)}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	18.798
$\text{MRT}_{(0-4)}$	h	3.398
$\text{MRT}_{(0-\infty)}$	h	4.508

3.2 溶解残渣溶剂的选择

由于 α -玉柏碱在甲醇、丙酮、醋酸乙酯等多种溶剂中溶解性良好, 因此实验中分别采用不同试剂溶解残渣, 结果表明, 用甲醇溶解的样品含量高, 无杂质峰干扰, 确定用甲醇溶解残渣。

3.3 内标物的选择

实验过程中曾分别以五味子醇甲、欧前胡素、桂皮酸、胡椒碱和二甲基苯甲醛为内标物, 结果表明, 五味子醇甲与 α -玉柏碱色谱峰的保留时间适当, 且空白血样中无色谱峰干扰, 因此确定以五味子醇甲为内标物。

3.4 药动学分析

α -玉柏碱在大鼠血中处理模型为二室房模型。 α -玉柏碱的达峰时间为 0.75 h, 最大峰浓度为 6.306 mg/L。 α -玉柏碱的药-时曲线出现双峰现象, 分别在口服给药后 0.75 h 及 3 h 左右。根据现在的研究资料, 双峰现象可能由肝-肠循环、双部位吸收或胃-肠循环等多种原因引起, 也可能是几种原因的共同作用。弱碱性药 (吗啡、地西洋、哌替啶) 等常有胃肠循环。有资料报道, 哌替啶为弱碱性药物, 在胃液中几乎完全离子化, 而在血液中仅部分离解, 血液/胃液的 pH 梯度可使胃液中的药物浓度比血液中高 7~430 倍, 且实验中发现, 哌替啶可从血液转运至胃液。静注和肌注后, 哌替啶从血液转运至胃液中浓集, 一旦胃液排入肠腔, 因肠液的 pH 近中性, 使大量的药物重新转变成非离子型, 后者易于跨膜转运, 又被重吸收, 使血药浓度出现第二峰。

α -玉柏碱也是弱碱性药物，它的双峰出现是否由胃肠循环造成，还有待于进一步进行试验研究。

参考文献

- [1] 曾元儿, 叶木荣, 徐 晖. 伸筋草不同提取部位抗炎镇痛药理研究 [J]. 时珍国医国药, 1999, 10(9): 641-642.
- [2] 尹丽颖, 边晓燕, 韩玉生, 等. 伸筋草醇提物对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织的形态学影响 [J]. 中医药信息, 2008, 25(2): 28-30.
- [3] Wang Y W, Chu D F, Gu J K, *et al.* Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of huperzine A in dog plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 803: 375-378.
- [4] Wu Q Q, Gu Y H. Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2006, 40: 993-998.
- [5] Yue P, Tao T, Zhao Y, *et al.* Determination of huerzine A in rat plasma by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2007, 44: 309-312.