

不同工艺大黄提取物在大鼠体内的药动学研究

桂蜀华, 祝晨蓀, 梁远园, 林吉, 叶其馨

(广州中医药大学 新药开发研究中心, 广东 广州 510405)

摘要:目的 以大黄酸为指标, 进行大黄不同提取物的药动学研究, 对大黄工艺优化提供科学依据。方法 于大鼠 ig 大黄不同提取物后不同时间点取血浆, 采用 LC-MS 法建立大黄酸血药浓度的测定方法, 经 3P87 软件计算得药动学参数。结果 大鼠血浆中大黄酸在 2.0~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好, ig 大黄酸体内药时过程可用二室开放模型描述。结论 以 AUC 为指标, SFE- CO_2 萃取+树脂精制产物工艺组最佳, SFE- CO_2 萃取组次之。

关键词: 大黄; 大黄酸; 提取工艺; 药动学

中图分类号: R285.6; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)05-0687-03

Pharmacokinetic study of *Rheum palmatum* in vivo in rats

GUI Shu-hua, ZHU Chen-chen, LIANG Yuan-yuan, LIN Ji, YE Qi-xin

(New Drug Development Center, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract; Objective To provide pharmacokinetic evidences for optimization of *Rheum palmatum* extraction technology, through studying pharmacokinetics of extract by different technologies from *R. palmatum* with rhein as index. **Methods** Blood samples were collected at various time-points after ig given different extract to rats. An LC-MS method was established for determination of rhein in rat plasma and pharmacokinetic parameters were calculated by programe 3P87. **Results** A good linear relationship of rhein existed in the range of 2.0 — 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in rat plasma. The blood concentration-time course of rhein after ig administration can be described as a two-compartment open model. **Conclusion** Considering the AUC as index, SFE- CO_2 and residue resin purification is the best technology and SFE- CO_2 is the second.

Key words: *Rheum palmatum* L.; rhein; extraction technology; pharmacokinetics

大黄是常用的泻下中药, 具有泻热通便、凉血解毒、活血化瘀的功效, 临床常用于实热积滞、便秘腹痛等里实证。大黄产生致泻活性的其中一个途径是部分蒽苷自小肠吸收后, 经肝脏转化为苷元, 再刺激盆神经丛, 增加肠蠕动致泻。大黄酸是大黄致泻的重要成分之一^[1]。本实验以大黄酸为指标成分, 建立大黄酸血浆样品的测定方法, 研究大黄各工艺产物的药动学。

1 仪器与试剂

SORVALL 高速冷冻离心机; Satorius 电子分析天平 (Satorius Co. Ltd. 德国); 美国 Waters platform ZMD400 液质联用仪, 配置 2690 泵, 996 二极管阵列, DAD 紫外检测器, 自动进样器, Micromass 四极杆质谱仪, Mass lynx 3.1 平台, Millipore 纯净水发生器 (Millipore Co. Ltd., 美国)。

大黄药材取自陕西省宝鸡市大黄药材栽培基地, 为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的根及根茎,

经赖小平教授鉴定, 自然干燥。大黄酸对照品购自中国药品生物制品检定所; 内标物为联苯 (化学纯), 色谱纯乙腈、甲醇均为 Merck 公司产品; 纯净水为自制, 其余试剂均为国产分析纯。

Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (2.5 \pm 0.2) kg, 由香港中文大学医学院提供。

2 方法与结果

2.1 血药浓度的测定

2.1.1 色谱条件: Alltima C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 水-乙腈 (60:40); 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm。

2.1.2 质谱条件: 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 3 700 V, 锥孔电压 30 V, 数据采集与分析软件为 Masslynx.data system (version 3.1)。

2.1.3 大黄酸对照品溶液的制备: 精密称取大黄酸 1.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并至刻度, 备用。进样前通过 0.2 μm 滤膜滤过。

收稿日期: 2004-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39800196)

作者简介: 桂蜀华 (1972—), 女, 四川西昌人, 助理研究员, 中药学硕士, 从事中药新药开发。

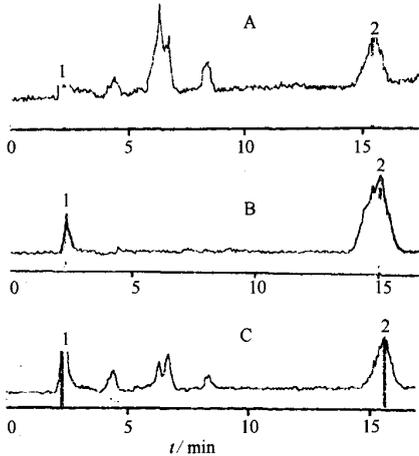
Tel: (020) 36585362 E-mail: gj1615@sohu.com

2.1.4 内标溶液的制备:精密称取联苯 10 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇配制成 400 μg/mL 贮备液,该贮备液用甲醇稀释成 0.2 μg/mL 内标液备用。

2.1.5 血浆样品预处理:精密吸取血浆样品 200 μL,置 5 mL 具塞离心试管中,加入氯仿 200 μL,涡旋液体混合器上振荡 5 min,离心,分离有机相,37 °C 水浴上 N₂ 吹干,由于给不同药后大鼠血浆药物浓度差异较大,对 ig 给予大黄不同工艺产物后的血浆按上述方法处理后的残渣加入甲醇 50 μL 溶解,再加入 0.2 μg/mL 内标液 150 μL,混匀后进样 20 μL^[2]。

2.2 分析方法的考察

2.2.1 方法专属性考察:在选定的条件下,大黄酸和内标物的保留时间分别在 2.35、15.42 min,大鼠空白血浆、空白血浆加大黄酸(100 μg/mL)及内标(0.2 μg/mL)、给药后大鼠血浆样品的色谱图见图 1 和 2,表明血浆中血源性物质不干扰测定。

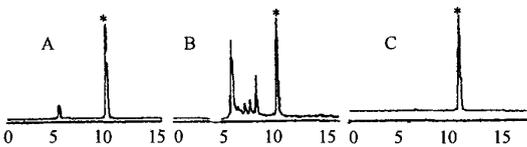


A-空白血浆+大黄酸+内标 B-大黄酸+内标 C-给药大鼠血浆样品 1-大黄酸 2-内标

A-plasma+rhein+inner standard B-rhein+inner standard C-plasma sample 1-rhein 2-inner standard

图 1 大黄酸血浆样品的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow of rhein sample in rat plasma



A-大黄酸+内标 B-空白血浆+大黄酸+内标 C-给药大鼠血浆样品 1-大黄酸 2-内标

A-rhein+inner standard B-plasma+rhein+inner standard C-plasma sample 1-rhein 2-inner standard

图 2 大黄酸血浆样品的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of rhein sample

2.2.2 标准曲线的制备:准确吸取大黄酸对照品溶

液(100 μg/mL) 2、8、10、15、20、30 μL 置 5 mL 具塞离心试管中,加入大鼠空白血浆至 200 μL,混匀,余同“血浆样品预处理”项下操作。以大黄酸的血药浓度为横坐标,大黄酸与内标物的峰面积比为纵坐标,用最小二乘法进行线性回归,每个浓度平行进行 3 个样本的分析,结果表明,大黄酸在 2.0~30 μg/mL 线性关系良好,回归方程为 $Y=0.2117+0.1469X$, $r=0.9991$,最低检测限为 1.0 μg/mL。

2.2.3 精密度试验:分别取大黄酸对照品溶液 8、15、30 μL,加入大鼠空白血浆至 200 μL,混匀,制成低、中、高 3 个浓度的血浆样品,余同“血浆样品预处理”项下操作,分别于 1 d 连续测定 6 次及连续 6 d,每天测定 1 次,记录其色谱峰面积,计算日内和日间精密度,结果见表 1。

表 1 血浆中大黄酸的精密度测定

Table 1 Precision of rhein determination in rat plasma

大黄酸加入量/ (μg · mL ⁻¹)	RSD/%	
	日内(n=3)	日间(n=6)
4.00	0.48	0.48
7.50	0.17	0.30
15.00	0.27	0.17

2.3 回收率试验

2.3.1 分析方法的回收率:分别取大黄酸对照品溶液 8、15、30 μL,加入大鼠空白血浆至 200 μL,混匀,制成低、中、高 3 个浓度的血浆样品,余同“血浆样品预处理”项下操作,每个浓度平行 3 个样本的分析,依回归方程计算测定,按测得量与加入量之比,计算分析方法的回收率,结果分别为 95.0%、92.4%、92.0% (n=9)。

2.3.2 提取方法的回收率:分别取大黄酸对照品溶液 8、15、30 μL,加入大鼠空白血浆至 200 μL,混匀,制成低、中、高 3 个浓度的血浆样品,余同“血浆样品预处理”项下操作,计算待测物与内标物的峰面积比(A);另取大黄酸对照品溶液 8、15、30 μL,加入甲醇至 50 μL,再加入内标 150 μL 后进样,计算待测物与内标物的峰面积比(B),以 $A/B \times 100\%$ 计算得该浓度下药物的提取方法回收率,每个浓度平行 3 个样本的分析,结果分别为 89.9%、91.8%、93.3%。

2.4 药动学试验

2.4.1 大黄大同提取工艺产物的制备:取大黄药材以 5 倍量 50% 甲醇回流提取,总蒽醌得率为 89.41%,番泻苷 A (sennoside A) 转移率为 13.22%;超临界二氧化碳萃取法,总蒽醌得率为 92.46%,sennoside A 为 9.57%;SFE-CO₂+F₂₀ 型大孔树脂工艺法以大极性成分 sennoside A 为指标

成分,其得率为 77.0% (另文报道)。

2.4.2 大鼠 ig 大黄不同提取工艺产物:大鼠 10 只禁食 12 h(自由饮水),取 0.25 mL 空白血后,以大黄酸 500 mg/kg 剂量 ig 给予大黄不同提取工艺产物,于给药后 0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10 h 由颈静脉各取血 0.25 mL,离心后取血浆 0.1 mL,依法测定大黄酸。

2.4.3 大鼠 ig 大黄不同提取工艺产物后药动学参数:大鼠 ig 大黄不同提取工艺产物后,血浆中大黄酸质量浓度变化见表 2。每种工艺产物的血药浓度观测值均用 3P87 药动学程序进行拟合,其一、二、三室模型差异均无显著性。而本研究室前期对大黄 ig 给药药动学研究结果显示,大黄酸 iv 后其药动学符合二室模型,因此均选用二室模型。同时,为减少实测值与理论值的差异,权重均选用 1/C。其主要药动学参数见表 3。

表 2 大鼠 ig 大黄不同提取工艺产物后血浆中大黄酸的变化 (n=9)

Table 2 Rhein alteration in rat plasma after ig rats with different *R. palmatum* extracts (n=9)

时间/h	大黄酸/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	溶剂提取 工艺产物	SFE-CO ₂ 萃取产物	SFE-CO ₂ 萃取+ 树脂精制产物
0.25	64.20±20.34	71.18±38.65	93.27±46.57
0.5	127.83±33.26	142.47±55.43	187.62±67.28
1	83.16±25.38	133.46±58.07	154.37±58.14
2	30.33± 9.8	98.65±34.70	130.94±41.13
3	16.74± 4.07	32.87±11.48	92.45±39.06
4	8.64± 2.78	13.69± 6.89	30.16±12.25
5	4.27± 1.15	5.61± 2.07	10.93± 4.79
6	3.19± 0.98	3.96± 1.65	4.27± 1.52
8	未检出	未检出	3.10
10	未检出	未检出	未检出

3 讨论

本实验采用 LC-MS 建立大黄酸的测定方法,以结构与大黄酸相近的联苯作为内标,通过比较空白血浆、空白血浆加大黄酸及内标、含药血浆的血浆图谱,表明血浆中内源性物质对样品测定无干扰,同时进行了方法学考察,表明本法灵敏度较高,重现性良好。

表 3 大鼠 ig 大黄不同提取工艺产物的主要药动学参数
Table 3 Pharmacokinetic parameters of rhein after ig rats with different *R. palmatum* extracts

参数	单位	溶剂提取 工艺产物	SFE-CO ₂ 萃取产物	SFE-CO ₂ 萃取+ 树脂精制产物
A	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	322.067 20	260.645 17	891.276 00
α	h^{-1}	2.548 52	0.941 42	0.852 98
B	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	80.286 07	298.804 08	208.993 55
β	h^{-1}	0.580 74	0.906 24	0.765 52
K_a	h^{-1}	5.000 58	1.943 09	1.313 90
V/f(c)	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.043 69	0.034 04	0.025 01
$t_{1/2\alpha}$	h	0.271 98	0.736 28	0.812 62
$t_{1/2\beta}$	h	1.193 56	0.764 86	0.905 46
$t_{1/2K_a}$	h	0.138 61	0.356 72	0.527 55
K_{21}	h^{-1}	1.190 81	0.925 33	0.784 60
K_{10}	h^{-1}	1.242 88	0.922 00	0.832 24
K_{12}	h^{-1}	0.695 58	0.000 33	0.001 66
AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	184.160 40	318.666 38	480.505 28
CL _S	$\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$	0.054 30	0.031 38	0.020 81
t_{max}	h	0.428 28	0.825 00	0.955 00
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	127.941 83	149.857 04	181.557 53

大鼠 ig 大黄不同提取工艺产物的血药浓度值经 3P87 软件拟合,一、二、三室模型差异均无显著性,因大黄酸 iv 后其药动学符合二室模型,因此选用二室模型来描述。从大黄不同提取工艺产物的药动学参数来看,3 种工艺产物在体内均能迅速吸收, $t_{1/2K_a}$ 分别为 0.138 61、0.356 72、0.527 55 h。以大黄酸收入血的相对数量和速度来评价提取工艺的指标,吸收相对数量以 AUC 估算,树脂工艺组吸收程度最高,AUC 值为 480.505 28 ($\mu\text{g} \cdot \text{h}$)/mL,溶剂组吸收程度最小,为 184.164 0 ($\mu\text{g} \cdot \text{h}$)/mL,吸收速度以 C_{max} 和 t_{max} 来估算,SFE-CO₂ 萃取加树脂精制产物工艺组的吸收速度介于溶剂组和 SFE-CO₂ 萃取产物组之间,虽然吸收不及溶剂组快,但吸收程度最好,综合上述因素,SFE-CO₂ 萃取加树脂精制产物工艺组为最佳。

References:

[1] Jiu D H, Du S J. Study of Radix et Rhizoma Rhei (大黄研究) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2000.
[2] Zhu C C, Zhen Z H, Chen Z L. et al. Determination of rhein concentration in rats plasma by HPLC-MS [J]. J Chin Med Mater (中草药), 2002, 25 (9): 646.

《中草药》杂志为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

中国科学技术信息研究所经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评议推荐,本刊被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。