

表 2 不同批次样品中有效成分的测定结果
Table 2 Results of active components in samples
from different batches

批 次	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	五味子醇甲	五味子醇乙	五味子甲素	五味子乙素
1	6.5853	5.6985	0.4722	5.4214
2	9.3564	8.2791	0.5477	7.0702
3	7.5145	4.4713	0.4672	4.4909
4	8.1754	6.3176	0.4046	5.8443
5	8.4742	6.3884	0.7621	6.4284
平均值	8.0211	6.2310	0.5308	5.8510
RSD/ %	12.97	22.13	26.17	16.78

细胞损伤试验,结果显示均有效,因此认为这些成分为主要药效成分。这种思路有一定借鉴意义,但忽略了两个问题,首先,对各成分逐一进行药效评价不能体现中药多成分作用的特点,其次,不能反映制剂中各主要成分吸收入血后其量比例变化造成的药效差异。要认定含药血清中检测到的药源性成分为主要药效成分,合理的方法是将这些成分按含药血清中的量及比例加入空白血清,与含药血清进行药效比较,其前提是建立含药血清中药源性成分的量测

定方法,因此本实验的开展具有方法学意义。

实验中的绝对回收率试验结果显示,血清样品在提取处理过程中待测定成分的损失较多,其原因可能是蛋白质变性沉淀过程中包裹了部分成分,可试用固相萃取的处理方法加以改进,在将体外化合物加入空白血清进行药效试验时,也可以参照本次测定和绝对回收率试验结果适当扩大加样量。

参考文献:

- [1] 窦志华,丁安伟,王陆军,等. 复方五仁醇胶囊血清药化学研究[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1137-1140.
- [2] 窦志华,丁安伟,居文政,等. 复方五仁醇胶囊含药血清中木脂素类成分的 UPLC-MS/MS 分析[J]. 中成药, 2007, 29(4): 550-555.
- [3] 窦志华,丁安伟,王陆军,等. 复方五仁醇胶囊含药血清指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(12): 892-895.
- [4] 张 兵,窦志华,罗 琳,等. 复方五仁醇胶囊保肝作用的血清药理学研究[J]. 南通大学学报:医学版, 2007, 27(6): 494-496.
- [5] 窦志华,罗 琳,丁安伟,等. 复方五仁醇胶囊含药血清指纹图谱与保肝作用的谱效关系[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(2): 116-118.
- [6] 潘卫松,刘美凤,石 钱,等. 血清药理学、血清化学和中药药代动力学[J]. 世界科学技术:中药现代化, 2002, 4(3): 51-55.
- [7] 王胜春,胡咏武,王俊琴,等. 五灵胶囊药效作用的有效成分[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(17): 1587-1591.

灌胃天麻素小鼠脑组织中天麻苷元的药动学研究

蔡 铮¹, 侯世祥^{2*}, 刘中秋¹, 陈秋红², 杨兆祥³

(1. 南方医科大学药学院, 广东 广州 510515; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041;

3. 昆明制药集团药物研究院, 云南 昆明 650100)

摘 要:目的 建立小鼠脑组织中天麻苷元的 HPLC 测定方法,并考察灌胃天麻素后小鼠脑中天麻苷元的药动学特性。方法 脑匀浆用醋酸乙酯提取后,采用 HPLC 法测定。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(10.5 : 89.5),体积流量 1.0 mL/min;检测波长 221 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL 。结果 方法线性范围为 50 ~ 1 616 ng/mL ($r=0.9996$),回收率为 93.8% ~ 95.1%,日内及日间 RSD 均低于 10%。小鼠脑组织中天麻苷元的质量浓度与时间曲线呈现双峰($t_{\text{max}1}=15\text{ min}$, $t_{\text{max}2}=90\text{ min}$),药时曲线下面积为 52 822.5 ng·min/g,消除半衰期为 54.8 min。结论 该分析方法灵敏、准确,适合于脑组织中天麻苷元的测定。天麻素经小鼠口服给药后,能较快入脑并代谢为天麻苷元,消除也较快。

关键词:天麻素;天麻苷元;脑组织;高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)03-0389-03

Pharmacokinetics of gastrodigenin in brain tissue of mice after intragastric administration of gastrodin

CAI Zheng¹, HOU Shi-xiang², LIU Zhong-qiu¹, CHEN Qiu-hong², YANG Zhao-xiang³

(1. School of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. West China

* 收稿日期:2008-06-07

作者简介:蔡 铮(1977—),男,江西吉安人,讲师,博士,1999年毕业于沈阳药科大学制剂专业,2002年获云南中医学院中药学硕士学位,2002—2005年工作于昆明制药集团药物研究所,2008年获四川大学华西药学院药剂学博士学位,研究方向为新型给药系统研究。Tel: (020) 61648597 E-mail: caizheng2002@sina.com

* 通讯作者 侯世祥 Tel: (028) 85502809 E-mail: housix @263.net

School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Institute of Pharmaceutical Research, Kunming Pharmaceutical Co., Kunming 650100, China)

Abstract : Objective To establish an HPLC method for determination of gastrodigenin concentration in brain tissue of mice and investigate its pharmacokinetics after intragastric administration of gastrodin. **Methods** The brain homogenate was extracted with acetoacetate and analyzed by HPLC method. The separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) under the following chromatographic conditions: mobile phase, acetonitrile-water (10.5 : 89.5); column temperature, 25 °C; flow rate, 1.0 mL/min; detection wavelength, 221 nm; and sampling amount, 20 μL. **Results** The calibration curve showed good linearity within the concentration range of 50 - 1 616 ng/mL ($r = 0.999 6$). The relative recoveries were 93.8 % - 95.1 %, and the RSDs of the intra- and inter-day precision were less than 10 %. The concentration-time profile of gastrodigenin in brain tissue of mice showed double peaks ($t_{\max 1} = 15$ min, $t_{\max 2} = 90$ min). The AUC was 52 822.5 ng · min/g, and $t_{1/2(ke)}$ was 54.8 min. **Conclusion** The analytical method established for assay of gastrodigenin in brain tissue of mice is sensitive and accurate. The result indicates that gastrodin could rapidly distribute to the brain, be metabolized into gastrodigenin, and be eliminated after oral administration.

Key words: gastrodin; gastrodigenin; brain tissue; HPLC

天麻素是天麻的主要活性成分,具有镇静、镇痛等药理作用,且毒性低,不良反应小,被广泛应用于眩晕、头痛、神经衰弱等疾病的治疗^[1]。天麻素不能直接作用于脑部的苯二氮_䇇受体,其在体内代谢为天麻苷元,天麻苷元可与苯二氮_䇇受体结合,产生中枢抑制作用^[2]。因此,脑内天麻苷元的浓度与天麻素的药理效应密切相关,可作为评价指标,用于天麻素新型给药系统,如脑靶向制剂的研究。脑内天麻苷元的浓度较低,有报道用同位素标记法测定^[3],灵敏度高,但不便操作。本实验采用 HPLC 法对其进行测定,并考察了脑内天麻苷元的药动学特性。

1 仪器、试剂与动物

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国惠普公司); YKH- 型液体快速混合器(江西医疗器械厂); TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

天麻素(昆明制药集团股份有限公司,质量分数为 99.7 %);天麻苷元对照品(仪征市鼎信化工有限公司,质量分数为 99.5 %);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

昆明种小鼠,雄性,体质量 18 ~ 22 g,由四川大学华西实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(10.5 : 89.5);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 221 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的配制:精密称取天麻苷元对照品适量,以水溶解,配制成 1.01 mg/mL 的储备液,再定量稀释,得到一系列天麻苷元对照品溶液。4

冰箱内保存。

2.3 内标液的制备:取对苯二酚适量,用甲醇配制成 100 μg/mL 的溶液,即得。

2.4 样品的预处理:称取小鼠脑组织,置匀浆器内,加入 2 倍量生理盐水制成匀浆。精密吸取脑匀浆 500 μL,置离心管中,精密加入 10 μL 内标液,混匀,再加入 3 mL 醋酸乙酯,涡旋萃取 3 min,4 000 r/min 离心 5 min。吸取上层有机相 2.5 mL,50 °C 水浴空气流吹干溶剂,残渣用 200 μL 甲醇溶解,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得。

2.5 专属性试验:取空白脑匀浆、空白脑匀浆加对照品和脑匀浆样品,采用样品的预处理方法处理,进样测定,得色谱图,见图 1。可见,脑匀浆中的内源性物质不干扰天麻苷元及内标的测定,二者的保留时间分别为 8.8、7.2 min。

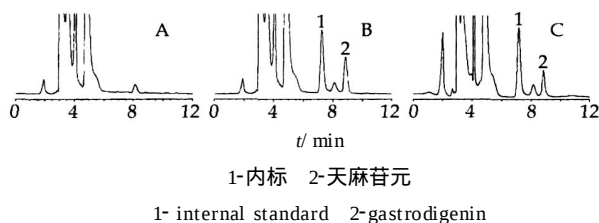


图 1 空白脑匀浆(A)、空白脑匀浆加对照品、内标(B)和脑匀浆样品(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank brain homogenate (A), blank brain homogenate spiked with gastrodigenin and internal standard (B), and brain homogenate sample (C)

2.6 标准曲线的制备:取空白脑匀浆,精密加入系列天麻苷元对照品溶液,配成质量浓度在 50 ~ 1 616

ng/mL 的含药脑匀浆,然后按样品的预处理方法处理,测定。以天麻苷元与内标的峰面积比质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y = 8.44 \times 10^{-4} X + 5.06 \times 10^{-3}$ ($r = 0.999\ 6$),结果表明脑匀浆中天麻苷元在 $50 \sim 1\ 616$ ng/mL 具有良好的线性关系。方法的最低检测限(LOD)为 10 ng/mL ($S/N \geq 3$)。

2.7 精密度试验:分别于 1 d 和 5 d 内测定含天麻苷元 101 、 404 、 $1\ 616$ ng/mL 的脑匀浆,计算,结果日内 RSD 分别为 3.83% 、 4.62% 、 2.75% ($n = 5$);日间 RSD 分别为 6.83% 、 4.49% 、 6.13% ($n = 5$)。

2.8 回收率试验:取空白脑匀浆,精密加入天麻苷元对照品溶液适量,配成 101 、 404 、 $1\ 616$ ng/mL 的含药脑匀浆,然后按样品的预处理方法处理,测定。另取未经处理的相应质量浓度天麻苷元对照品溶液进行测定,以测定值与未经处理组之比计算提取回收率,结果分别为 80.6% 、 75.6% 、 77.4% ,RSD 分别为 5.16% 、 4.17% 、 6.11% ($n = 5$)。将所得峰面积比分别代入回归方程计算测定量,以测定量与加入量之比计算方法回收率,结果分别为 93.8% 、 95.1% 、 94.5% ,RSD 分别为 3.25% 、 3.48% 、 4.95% ($n = 5$)。

2.9 药动学试验:取小鼠 65 只,实验前禁食不禁水 12 h,随机平均分成 13 个时间组。给小鼠灌胃天麻素 200 mg/kg,分别于给药后 5 、 10 、 15 、 20 、 30 、 45 、 60 、 75 、 90 、 105 、 120 、 150 、 180 min 处死,迅速取出脑组织。制备脑匀浆样品并测定其中天麻苷元,结果见图 2。可见呈现双峰,采用统计矩法对实验数据进行处理,所得药动学参数见表 1。

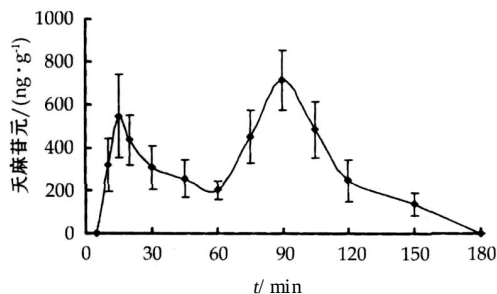


图 2 小鼠灌胃天麻素后脑组织中天麻苷元的浓度-时间曲线

Fig. 2 Concentration-time curve of gastrodigenin in brain tissue of mice after ig administration of gastrodin

3 讨论

供试脑匀浆样品中天麻苷元的质量浓度较低,而其蛋白结合率较高(69.3%)^[4],采用蛋白沉淀法回收率差,故用醋酸乙酯对样品进行提取并浓缩,使灵敏度满足检测要求。选择与天麻苷元化学结构相似的对苯二酚为内标,二者提取回收率接近,且均不

表 1 小鼠脑组织中天麻苷元的药动学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of gastrodigenin in brain tissue of mice

参数	单位	数值
t_{max1}	min	15
C_{max1}	ng/g	546.9 ± 195.4
t_{max2}	min	90
C_{max2}	ng/g	714.8 ± 138.6
AUC	ng·min/g	52 822.5
MRT	min	79.1
$t_{1/2(ke)}$	min	54.8

被样品中的内源性物质干扰,分析时间不超过 10 min。

小鼠经灌胃给予天麻素后,脑组织中天麻苷元的浓度与时间曲线呈现双峰,用隔室模型难以较好拟合,故采统计矩法计算主要药动学参数。脑内天麻苷元的质量浓度与 4 个体内过程密切相关:天麻素经胃肠道的吸收、向脑内的分布、向天麻苷元的转化以及脑内天麻苷元的消除,其中某一过程为非线性动力学,则有可能产生双峰现象。由药动学参数可知,天麻素经小鼠口服给药后,能较快入脑并代谢为天麻苷元, 15 min 即达第一个峰,从脑部消除也较快, $t_{1/2(ke)}$ 不足 1 h。

天麻素为水溶性药物,一些学者推测其在体内先水解为脂溶性较强的苷元,再透过血脑屏障进入脑内发挥药理作用。但天麻素在血中并不易发生代谢反应^[5],并且由于天麻苷元与蛋白结合力较强,难以在组织间进行分布,脑内的天麻苷元主要应该由入脑后的天麻素代谢而得。已有研究证实天麻素可以直接入脑,然后迅速代谢为天麻苷元^[3]。众所周知,水溶性药物一般是无法透过血脑屏障的,天麻素可借助何种途径入脑?这可能与其化学结构有关,天麻素是由天麻苷元与一分子葡萄糖构成,苷元部分结构简单,相对分子质量小,可视为葡萄糖的取代基,因此,天麻素有可能是通过脑毛细血管内皮细胞上特异性的葡萄糖载体转运至脑内。

参考文献:

- [1] 吕国平,王春芹,蔡中琴.天麻素注射液的药理及临床研究[J].中草药,2002,33(5):附3-5.
- [2] 郭正平,谭天秋,钟裕国,等.天麻素及天麻苷元作用机理的研究[J].华西医学报,1991,22(1):79-82.
- [3] 游金辉,谭天秋,匡安仁,等. 3H -天麻素和 3H -天麻素在小鼠体内的分布和代谢[J].华西医学报,1994,25(3):325-328.
- [4] 陆光伟,邹元杰,莫启忠. 3H -天麻素在大鼠体内的吸收、分布、代谢和排泄[J].药学报,1985,20(3):167-172.
- [5] 刘克辛,苏成业,韩国柱,等.天麻素在大鼠体内生理处置的研究[J].大连医学院学报,1988,10(1):62-66.