

葛根素与阿魏酸单用及联合应用在局灶性脑缺血模型大鼠体内药动学研究

杨荣兵, 周惠芬, 张宇燕, 杨洁红, 万海同*

浙江中医药大学 心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 研究葛根素、阿魏酸在局灶性脑缺血模型大鼠体内单用以及合用后的药动学差异, 分析2种成分相互影响情况。方法 将24只雄性SD大鼠随机分为葛根素组(50 mg/kg)、阿魏酸组(50 mg/kg)以及葛根素与阿魏酸合用组(50 mg/kg+50 mg/kg), 制备大脑中动脉阻塞(MCAO)模型后, 尾iv给药, 于不同时间点眼眶取血。应用高效液相色谱仪(HPLC-DAD)测定血浆中葛根素、阿魏酸的质量浓度, 应用DAS 3.2.6软件以及SPSS 19.0统计分析软件进行药动学参数的分析处理。结果 依据非房室模型的统计矩参数, 葛根素单用组、阿魏酸单用组与葛根素与阿魏酸合用组比较, 其血药浓度-时间曲线下面积(AUC)、消除半衰期($t_{1/2}$)、达峰浓度(C_{max})、一阶矩血浆浓度时间曲线下面积(AUMC)均差异不显著($P>0.05$); 与葛根素组比较, 合用组的葛根素血浆清除率(CL)、平均滞留时间(MRT)差异显著($P<0.05$); 与阿魏酸组比较, 合用组的阿魏酸MRT明显延长($P<0.05$)。结论 在局灶性脑缺血模型大鼠体内, 葛根素与阿魏酸合用能明显延长各自在血液中的MRT, 呈现了药物相互作用后的缓释效应。

关键词: 葛根素; 阿魏酸; 局灶性脑缺血模型; 药动学; 联合用药

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2759-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.016

Pharmacokinetic study on puerarin and ferulic acid alone or their combination used in rats with focal cerebral ischemia

YANG Rong-bing, ZHOU Hui-fen, ZHANG Yu-yan, YANG Jie-hong, WAN Hai-tong

Cerebrovascular Disease Research Institute, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To study the pharmacokinetic changes of puerarin and ferulic acid alone or their combination used in rats with focal cerebral ischemia and to analyze their mutual influence. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups such as puerarin (50 mg/kg) group, ferulic acid (50 mg/kg) group, and combination (50 mg/kg + 50 mg/kg) group. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established. The model rats were iv injected with puerarin and ferulic alone, and then the blood was collected at different time points. The HPLC-DAD method was applied to determining the plasma concentration of puerarin and ferulic acid at different time points and the drug-time curve was drawn. The DAS 3.2.6 and SPSS 19.0 softwares were used to analyze the data. **Results** The pharmacokinetic parameters: AUC, $t_{1/2}$, C_{max} , and AUMC had no significant difference ($P > 0.05$), while the clearance of puerarin group had the significant difference with that of the combination group and mean residence time (MRT) of combination group was more extended than that of ferulic acid group. **Conclusion** In rats with focal cerebral ischemia, the combination of puerarin and ferulic acid could significantly extend the MRT in rats, which reflects the slow-release effect between drug-drug interaction.

Key words: puerarin; ferulic acid; model of focal cerebral ischemia; pharmacokinetics; combination administration

脑卒中是以脑部缺血以及出血性损伤为主要症状的脑部疾病, 严重危害着人类尤其是中老年人的身体健康^[1]。治疗脑卒中的药物很多, 功效各异, 但是主要机制是活血化瘀、通脉舒络, 从而使血管畅通。养阴通脑颗粒是中药复方新药, 已完成 II、

III 期临床试验研究, 其中葛根素和阿魏酸是主要药效成分。葛根素具有扩张血管、降低血压、改善微循环、保护心肌细胞、增加纤溶活性、降低血黏度等作用^[2-3]; 阿魏酸具有抗血小板聚集、抑制血小板5-羟色胺释放、抑制血小板血栓素的生成等功效^[4-5],

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81374053, 81274176, 81202636); 浙江省中医药(中西医结合)重点学科(2012-XK-A06)

作者简介: 杨荣兵(1988—), 硕士研究生。Tel: 13968080224 E-mail: yangrongbing131x@126.com

*通信作者 万海同, 教授, 博士生导师。Tel: (0571)86613711 E-mail: whtong@126.com

2种药物明显的功效为抗氧化以及抗炎。葛根素和阿魏酸是很多中药复方配伍中的主要成分^[6-7]，而对2种物质相互之间药动学的影响研究甚少，本实验主要探究葛根素、阿魏酸单用以及合用后在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的药动学，为二者配伍及合理应用提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂与药品

葛根素(批号110752-201313)、阿魏酸(批号11073-201313)，质量分数均 $\geq 98\%$ ，中国食品药品检定研究院；肝素钠(批号2B010350，北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)；对羟基苯甲酸(内标物，质量分数 $\geq 99\%$ ，上海五连化工厂)；甲醇、乙腈(色谱纯，Tedia公司)；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

XS205DU梅特勒精密天平(Mettler Toledo公司)；2-16PK离心机(德国Sigma公司)；CASCADA BIO MK2超纯水仪(美国Pall公司)；QL-861涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)；ND100-1氮气吹扫仪(杭州瑞诚仪器有限公司)；Agilent1200型高效液相色谱系统(包括G1311A四元梯度泵、G1316A柱温箱、G1315D二极管阵列检测器、G1315D DAD检测器、G1322A在线脱气机和化学工作站)；VMS-LDF1型多普勒激光血流仪(Moor公司，英国)。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠，体质量(280 \pm 20)g，上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供，许可证号SCXK(沪)2013-0016。饲养环境：室温(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ ，湿度(50 \pm 5)%，实验前适应饲养7d，饮水自由，实验前12h禁食不禁水。

2 方法

2.1 大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型的制备

大鼠以10%水合氯醛(350 mg/kg) ip麻醉，依据Longa等^[8]的方法进行改进，大鼠仰卧位固定，剪毛并消毒后，分离右颈总动脉并用眼科剪剪一小口，将线栓(购于北京沙东生物技术有限公司，型号A4级，2838-50)于切口处插入，以颈总动脉分叉处为起点插入(18.5 \pm 0.5)mm，直到大脑中动脉起始处以便完全阻断供血。手术造成大脑中动脉局灶性缺血，缺血45 min后，将线栓拔出，缝合伤口。造模完成以后，对大鼠进行筛选分类，应用多普勒激光血流仪对大鼠进行筛选，脑部血流降幅在

75%~80%的大鼠为造模成功，造模不成功的大鼠舍弃后增补。

2.2 分组与给药

将24只造模成功的SD雄性大鼠随机分为3组，每组8只，分别为葛根素组(50 mg/kg)、阿魏酸组(50 mg/kg)以及葛根素与阿魏酸合用组(50 mg/kg+50 mg/kg)，药物用0.9%的生理盐水配制。各组大鼠在缺血45 min后尾iv给药12 mL/kg。

2.3 血样采集及处理

3组大鼠分别于给药后2、5、10、15、30、45、60、90、120、180、240、300 min眼眶取血0.4 mL，加入15 μL 肝素钠抗凝，6 000 r/min离心10 min，精确量取上层血浆100 μL ，先后加入20 μL 内标(0.2 mg/mL)、300 μL 甲醇，震荡涡旋5 min，12 000 r/min离心10 min，取上清液氮气吹干。进样前，用100 μL 流动相复溶，12 000 r/min离心10 min，取上清液供HPLC测定。

2.4 色谱条件

Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(150 mm \times 4.6 mm，5 μm)；流动相采用二元体系。梯度洗脱：0~5 min，乙腈-0.3%磷酸水(8:92)；5~20 min，乙腈-0.3%磷酸水(15:85)；柱温30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量20 μL ；体积流量1.0 mL/min；检测波长254 nm。

2.5 对照品溶液和内标溶液的制备

精密称取葛根素对照品、阿魏酸对照品，溶于甲醇中，分别配制成2.5 mg/mL的母液，并用甲醇配制1 mg/mL对羟基苯甲酸溶液作为内标母液。将葛根素、阿魏酸对照品的母液，分别用大鼠空白血浆稀释成333.0、167.0、83.0、42.0、21.0、10.0、5.0、3.0、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液，同时将内标母液稀释5倍待用。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 取“2.5”项配制的对照品溶液100 μL ，加入20 μL 内标溶液(0.2 mg/mL)，按照“2.3”项的血样处理方法处理，按照“2.4”项中色谱条件进样，分别以血浆中葛根素及阿魏酸的质量浓度为横坐标(X)，葛根素、阿魏酸与内标的峰面积比值为纵坐标(Y)作图，得到2种成分的回归方程。

2.6.2 精密度试验 分别取葛根素以及阿魏酸333.0、42.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 3个质量浓度的血浆对照品溶液，按“2.3”项的方法进行处理，在“2.4”项的色谱条件下进样。在1 d内分别测定5次计算日内精

密度, 在 1 周内分别测定 5 d 计算日间精密度。

2.6.3 回收率试验 精密量取葛根素和阿魏酸母液, 分别稀释成高、中、低 3 种质量浓度 (333.0、42.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$) 溶液, 各取 100 μL 加入 400 μL SD 大鼠空白血浆中, 加入 20 μL 内标溶液 (0.2 mg/mL), 按照“2.3”项的血样处理方法处理, 在“2.4”项的色谱条件下进样。将葛根素及阿魏酸峰面积与内标峰面积之比代入标准曲线方程计算两者质量浓度, 以测得值与加入值的比值计算回收率 ($n=5$)。

2.6.4 稳定性试验 分别取葛根素及阿魏酸 333.0、42.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度的对照品溶液, 加入大鼠空白血浆中, 将含药血浆在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次, 测定血浆中药物质量浓度。

2.7 葛根素与阿魏酸药动学研究

将“2.3”项下处理的血浆样品按“2.4”项色谱条件下进样测定, 根据标准曲线得到各时间点药物的血药浓度, 以血药浓度为纵坐标, 时间为横坐标, 绘制葛根素与阿魏酸的药时曲线, 计算药动学参数。

2.8 数据处理与统计分析

各组药物的血药浓度-时间数据采用药动力学计算程序 DAS 3.2.6 处理, 对主要药动学参数采用配对 t 检验进行统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析。

3 结果

3.1 方法学考察结果

3.1.1 色谱行为及专属性考察结果 在“2.4”项色谱条件下, 对羟基苯甲酸、葛根素以及阿魏酸的保留时间分别为 7.63、9.08、15.75 min, 血浆内源性物质不干扰葛根素、阿魏酸以及对羟基苯甲酸的测定, 表明色谱行为以及专属性良好 (图 1)。

3.1.2 线性关系考察结果 葛根素的回归方程为 $Y=13.068 X+0.033$, $r=0.999 8$, 在 10.0~333.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性良好; 阿魏酸回归方程为 $Y=21.253 X+0.031 4$, $r=0.999 9$, 在 1.0~333.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性良好。当 $S/N=10$ 时, 最低定量限为葛根素 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.1.3 精密度试验结果 葛根素血浆样品的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 3.51%、4.62%、3.68%和 4.52%、4.98%、5.42%, 阿魏酸血浆样品的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 4.73%、3.26%、3.47%和 5.26%、7.32%、3.24%。表明日内、日间精密度 $\text{RSD}<15\%$ ($n=5$), 符合生物样品测定要求。

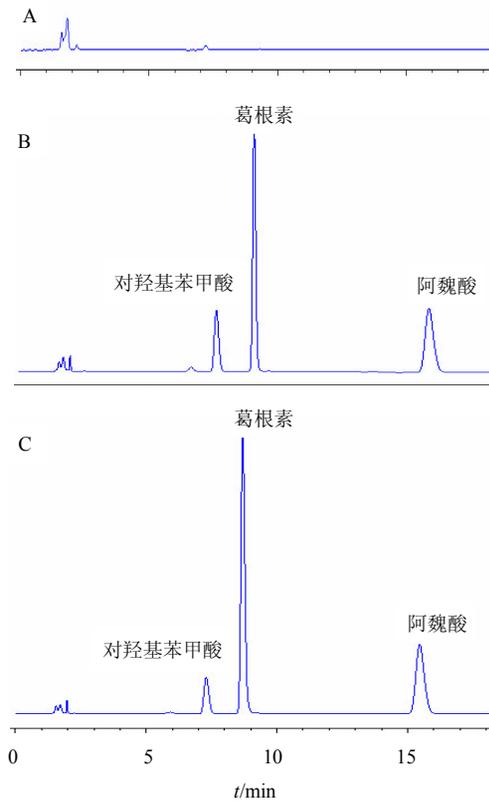


图 1 大鼠空白血浆 (A)、合用组给药后 30 min 血浆样品 + 内标 (B) 和空白血浆 + 葛根素 + 阿魏酸 + 内标 (C) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of blank plasma of rats (A), plasma sample + internal standard after 30 min of combination administration (B), and blank plasma + puerarin + ferulic acid + internal standard (C)

3.1.4 提取回收率试验结果 按照“2.6.3”项方法, 测得葛根素回收率为 $(97.62 \pm 2.32)\%$ 、阿魏酸回收率为 $(92.85 \pm 3.54)\%$, $\text{RSD}<10\%$ ($n=5$), 表明回收率符合要求。

3.1.5 稳定性试验结果 将含药血浆在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次后, 处理进样, 以测得的新鲜血浆样品中阿魏酸和葛根素的质量浓度为 100%, 冻融后含药血浆中的葛根素质量浓度为初测的 96.23%、阿魏酸为初测的 93.24%, 表明反复冻融后样品稳定性良好。

3.2 单用与合用时葛根素与阿魏酸药动学参数比较

应用药动力学软件分别对各组数据进行计算, 分别得到葛根素以及阿魏酸的药动学参数, 应用 SPSS 19.0 软件对所得药动学参数进行分析。

3.2.1 单用及合用葛根素的药动学参数比较 单用及合用阿魏酸以后, 葛根素在局灶性脑缺血大鼠体内的药-时曲线见图 2, 基本药动学参数见表 1, 由药-时曲线以及药动学参数可知, 在合用阿魏酸以后葛根

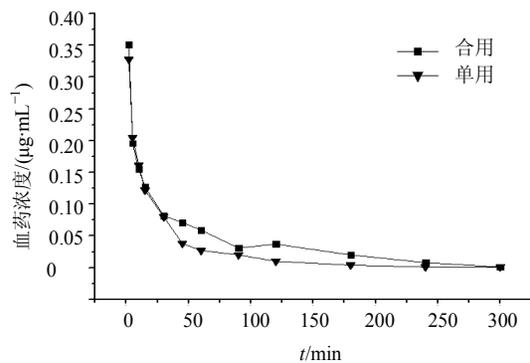


图 2 葛根素药-时曲线

Fig. 2 Average concentration-time curves of puerarin

表 1 葛根素、阿魏酸药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison on pharmacokinetic parameters of puerarin and ferulic acid alone or combination used in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参数	单位	葛根素		阿魏酸	
		单用	合用	单用	合用
AUC _{0-t}	µg·min·L ⁻¹	7.84 ± 0.58	12.21 ± 2.56	4.38 ± 0.62	4.37 ± 0.53
AUMC _{0-t}	µg·min·L ⁻¹	302.16 ± 28.04	829.38 ± 282.72	261.27 ± 48.43	296.05 ± 27.62
MRT _{0-t}	min	38.44 ± 1.14	64.48 ± 8.56*	27.62 ± 2.66	68.23 ± 2.10*
t _{1/2}	min	54.58 ± 14.45	30.26 ± 3.29	60.29 ± 3.01	64.61 ± 13.48
CL	min·kg ⁻¹	4 402.22 ± 788.24	6 375.92 ± 478.39*	11 559.62 ± 1 604.89	11 310.83 ± 1 255.96
C _{max}	µg·L ⁻¹	0.33 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.120 ± 0.003	0.10 ± 0.02

与相应单独给药比较: *P<0.05

*P<0.05 vs puerarin group or ferulic acid group

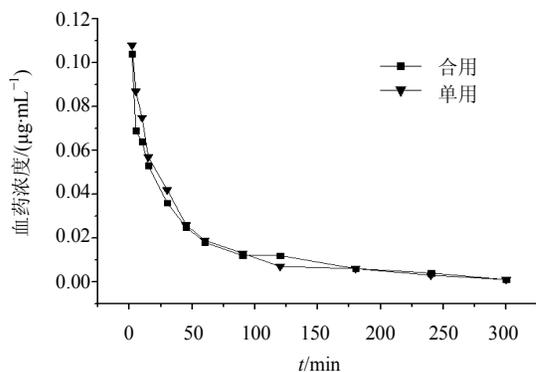


图 3 阿魏酸药-时曲线

Fig. 3 Average concentration-time curves of ferulic acid

4 讨论

本实验研究了养阴通脑颗粒中 2 种主要成分葛根素和阿魏酸单用及合用后的药动学行为。葛根素以及阿魏酸单独用药在正常大鼠中的药物代谢动力学已经有了很多的研究^[9-10]，但是对 2 种药物在治疗脑缺血疾病方面的联合用药未见报道，因此本研究对临床合理用药意义重大。中药成分复杂，各成

素的药动学参数：血药浓度-时间曲线下面积 (AUC)、消除半衰期 (t_{1/2})、达峰浓度 (C_{max})、一阶矩血浆浓度时间曲线下面积 (AUMC) 差异不显著 (P>0.05)，血浆清除率 (CL) 及平均驻留时间 (MRT) 差异显著 (P<0.05)。

3.2.2 单用及合用阿魏酸的药动学参数比较 单用及合用葛根素以后，阿魏酸在局灶性脑缺血大鼠体内的药-时曲线见图 3，基本的药动学参数见表 1，可知，在合用葛根素以后阿魏酸的主要药动学参数除 MRT 差异显著 (P<0.05) 外，其余参数单用及合用差异均不显著。

分之间不是单一起效，而是相互协同、相加以及拮抗来发挥作用，因此往往选用多种成分进行配伍，更好地研究其药理效应。但是配伍用药研究比较繁琐，选取主要的有效成分进行研究更加简单、直接。葛根素和阿魏酸是多种常用中药复方的有效成分，大量研究^[11-12]显示含有这 2 种成分的复方在多种疾病尤其是心脑血管疾病方面有很好的疗效。本实验主要研究了葛根素和阿魏酸在局灶性脑缺血模型大鼠中的单用及联合用药情况，考察联合用药对药动学参数的影响。

实验结果表明，葛根素以及阿魏酸合用于脑缺血再灌注大鼠后，药物在体内的 MRT 都有所延长，表明合用药物后，药物在体内的停留作用时间延长，可能是 2 种药物互相影响所致。而葛根素单用组血浆药物清除率更快，表明阿魏酸对葛根素的吸收有一定影响。其他药动学参 AUC、t_{1/2}、C_{max}、AUMC 均差异不显著。本研究初步阐明了葛根素与阿魏酸单用及合用在局灶性脑缺血大鼠体内的药动学过程，发现联合用药对 2 种成分的体内过程均存在一

定的相互影响。但只从药动学方面不能很好地描述药物疗效,在此后的研究中,将研究两者单用及合用后药效之间的差异,建立药动-药效学模型,以便更好地指导临床合理用药。

参考文献

- [1] Wolinsky F D, Gurney J G, Wan G J, *et al.* The sequelae of hospitalization for ischemic stroke among older adults [J]. *J Am Ger Soc*, 1998, 46(5): 577-582.
- [2] Zhang X, Xiong J, Liu S, *et al.* Puerarin protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models [J]. *Neuroscience*, 2014, 280(7): 88-98.
- [3] Wang N, Zhang Y M, Wu L, *et al.* Puerarin protected the brain from cerebral ischemia injury via astrocyte apoptosis inhibition [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 79: 282-289.
- [4] Sung J H, Gim S A, Koh P O. Ferulic acid attenuates the cerebral ischemic injury-induced decrease in peroxiredoxin-2 and thioredoxin expression [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 566(30): 88-92.
- [5] Sung J H, Kim M O, Koh P O. Ferulic acid attenuates the focal cerebral ischemic injury-induced decrease in parvalbumin expression [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 516(1): 146-150.
- [6] 张婷, 郑夺, 王文彤, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在参芍养心颗粒质量评价中的应用研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(13): 1920-1925.
- [7] 李晶, 金艺, 崔玉琴, 等. RP-HPLC法同时测定升阳散火汤浸膏粉中葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(9): 1415-1419.
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] 相妍笑, 刘沙, 魏春敏, 等. 乙酰葛根素在大鼠体内的药动学研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(11): 2247-2249.
- [10] 莫李立, 王素军, 杨本坤. 阿魏酸在 Caco-2 细胞模型的通透性及其在大鼠体内吸收特性研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(5): 947-951.
- [11] Wu L, Qiao H, Li Y, *et al.* Protective roles of puerarin and Danshensu on acute ischemic myocardial injury in rats [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(10): 652-658.
- [12] Koh P O. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 507(2): 156-160.