

论著·中药研究

杠柳毒苷在大鼠体内排泄的初步研究^{*}

王 强, 任晓亮, 王 焱, 潘桂湘, 高秀梅, 戚爱棣

摘要: [目的] 研究杠柳毒苷在大鼠体内的排泄情况。[方法] 建立了液—液萃取后用高效液相色谱测定大鼠尿液、粪便和胆汁中杠柳毒苷含量的方法, 并对大鼠静注及灌胃杠柳毒苷后的排泄情况进行分析。[结果] 大鼠按 12 mg/kg 剂量灌胃给予杠柳毒苷后, 72 h 尿中杠柳毒苷和其代谢物的累积排泄量占给药剂量的 0.44%, 粪中杠柳毒苷及其水解代谢物的累积排泄量占给药剂量的 12.39%; 按 0.74 mg/kg 剂量尾静脉注射给予杠柳毒苷后, 72 h 尿中杠柳毒苷及其代谢物的累积排泄量占给药剂量的 6.24%, 粪中杠柳毒苷及其水解代谢物的累积排泄量占给药剂量的 7.33%; 按 0.74 mg/kg 剂量尾静脉注射给予杠柳毒苷后, 21 h 内累积经胆汁排泄的杠柳毒苷占给药总量的 76.13%。[结论] 杠柳毒苷原形药物主要经胆汁排泄, 但从尿液和粪便排泄则很少, 尿液中可能存在结合代谢物, 粪便中主要以肠菌代谢物(杠柳次苷)的形式排泄。

关键词: 杠柳毒苷; 粪便; 尿液; 胆汁; 排泄; 代谢物

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1673-9043(2008)01-0029-04

Study on excretion of periplocin in rats

WANG Qiang, REN Xiao-liang, Wang Yan, et al

(Key Laboratory of the Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study on excretion of periplocin in rats. [Methods] A liquid-liquid extraction followed by high performance liquid chromatography (HPLC) method was used to detect the content of periplocin in feces, urine and bile of rats. Then the study of excretion after oral and intravenous administration was carried out. [Results] After oral administration Periplocin at a dose of 12mg/kg, the cumulative excretions of Periplocin and its conjugated metabolite in urine within 72h was 0.44%, and in feces the values of Periplocin and its hydrolytic metabolite was 12.39%. When administered intravenously at a dose of 0.74mg/kg, the cumulative excretions of Periplocin and its conjugated metabolite in urine within 72h was 6.24%, and in feces the values of Periplocin and its hydrolytic metabolite was 7.33%, and the cumulative excretions of Periplocin in bile within 21h was 76.13%. [Conclusion] Periplocin was mainly eliminated via bile, but hardly via feces and urine. And Periplocin was eliminated via feces and urine in the forms of its metabolites by intestinal bacteria (deduced as Periplocymarin), conjugated metabolites, respectively.

Key words: Periplocin; feces; urine; bile; excretion; metabolite

杠柳毒苷(periplocin)是中药香加皮(Cortex Periplocae)的主要强心成分,其结构式含杠柳苷元-D-(加拿大麻糖)-D-(葡萄糖)(见图1)。现代药理研究表明,杠柳毒苷强心作用具有速度快,持续时

间短,无蓄积作用等特点。目前国内外对其体内过程的研究比较少,本文对大鼠口服及静注杠柳毒苷后的尿液、粪便、胆汁中原药和主要代谢产物的排泄进行了初步研究。

1 实验材料

高效液相(HPLC)分析: Waters 600E 高效液相色谱系统, Waters 2487 紫外检测器。

高效液相—质谱(HPLC-MS)分析: HP1100 高效液相色谱系统: 四元泵, 在线脱气机, 自动进样

^{*} 基金项目: 天津市科技发展计划项目(05YFJJC01102); 天津

市科委应用基础研究计划项目(07JCYBJC01800)。

作者单位: 300193 天津中医药大学中医药研究院, 教育部省部共建方剂学重点实验室

作者简介: 王 强(1982-), 男, 硕士, 主要从事中药药物分析。

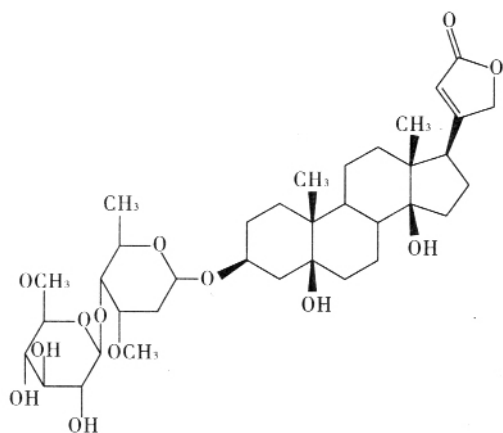


图 1 杠柳毒苷结构式

器,柱温箱,二极管阵列检测器(DAD);Finnigan 离子阱质谱仪(LCQ Advantage Max)配有电喷雾(ESI)离子源。

其他仪器:台式离心机(Beckman),N-EVAP111 型氮吹仪(Organomation Associates, Inc.),超纯水系统(Millipore),药物代谢笼(天津中医药大学动物实验中心提供)。

杠柳毒苷对照品(天津中医药大学中医药研究院自制,经熔点、紫外、红外、核磁共振波谱、质谱鉴定及高效液相测定,纯度大于 98%)。杠柳毒苷含量为 50%的有效部位(天津中医药大学中医药研究院自制),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

杠柳毒苷灌胃溶液:取杠柳毒苷有效部位适量,加适量水配成杠柳毒苷含量为 1 g/L 浓度的溶液,每只大鼠灌胃 3 mL(相当于给药剂量为 12 mg/kg)。

杠柳毒苷静注溶液:取杠柳毒苷对照品适量,溶于适量生理盐水配成杠柳毒苷含量为 0.37 g/L 浓度的溶液,每只大鼠尾静脉注射 0.5 mL(相当于给药剂量为 0.74 mg/kg)。

2 实验动物

SD 雄性大鼠(天津药物研究院动物室提供),体重(250±10) g,给药前禁食 12 h,自由饮水。

3 样品收集

取体质量为(250±10) g 的雄性大鼠 5 只,置于代谢笼中预适应 3 d,收集此期间的尿液和粪便作为空白样品。自灌胃或注射给药之时起,收集 0~12, 12~24, 24~48, 48~72 h 的尿液及粪便。尿液测量体积, -20℃ 冰箱贮存。粪便干燥后称质量, -20℃ 冰箱贮存样品采集期间,大鼠正常供水给食。

取体质量为(250±10) g 的雄性大鼠 5 只,实验前

禁食 12 h,自由饮水。手术前麻醉,仰位固定,实施胆汁插管手术,收集 1 h 空白胆汁样品,尾静脉注射杠柳毒苷生理盐水溶液,自注射之时起,收集 0~3, 3~6, 6~11, 11~21 h 胆汁样品,记录体积, -20℃ 冰箱贮存。

4 样品处理

尿液样品,室温下融化,每 1 mL 尿样加 3 mL 提取溶剂(乙酸乙酯:异丙醇=5:1)涡旋提取 3 min, 4 000 r/min 离心取上清液,空气流下吹干, 250 μL 甲醇复溶,进样。另取各只大鼠不同时间段尿样各 1 mL,室温下融化,装于具塞试管中,用 HCl 调节 pH 至 1,置于 35℃ 水浴中水解 24 h,水解液加 3 mL 提取溶剂(乙酸乙酯:异丙醇=5:1)涡旋提取 3 min, 4 000 r/min 离心取上清液,空气流下吹干, 250 μL 甲醇复溶,进样。

取各只大鼠不同时间段粪便样品,在研钵中研匀后称质量,转移至具塞锥形瓶中,按 1×10^{-4} g/L 加入乙腈,超声提取 30 min,提取液 4 000 r/min 离心,取上清液 3 mL,空气流下吹干, 300 μL 甲醇复溶,进样。

胆汁样品加 3 倍提取溶剂(乙酸乙酯:异丙醇=5:1),涡旋提取 3 min, 4 000 r/min 离心取上清液,空气流下吹干, 250 μL 甲醇复溶,进样。

5 分析测定条件

液相分析条件:Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),乙腈:水=25:75 为流动相测定尿液样品,乙腈:水=23:77 为流动相测定尿液酸水解样品,乙腈:水=24:76 为流动相测定粪便样品,乙腈:水=25:75 为流动相测定胆汁样品,柱温为室温,进样 10 μL,检测波长 220 nm,流速为 1 mL/min。

液质分析条件:Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 5 μm),甲醇:水=40:60 为流动相,进样 10 μL,柱温为 25℃,流速为 0.2 mL/min,紫外检测波长 220 nm;质谱参数:电喷雾离子源(ESI)喷雾电压 4.5 kV,毛细管温度 300℃,毛细管电压 37 V,壳气流速 40 arb,辅助气流速 5 arb,正离子模式监测。MS 模式下监测 m/z=190~900 总离子流(TIC)信号,MS² 模式碰撞能量 20%,监测 m/z=100~900 TIC 信号。

6 实验结果

6.1 测定方法学评价 精密称取适量的杠柳毒苷及杠柳苷元对照品,用适量水溶解,配制成系列浓度的杠柳毒苷及杠柳苷元对照品溶液,进样 10 μL,以峰面积(Y)平均值为纵坐标,进样量(X)为横坐标作

图,得回归方程(见表 1)。

6.2 样品的测定

6.2.1 给药后代谢产物的检测 大鼠灌胃及静注杠柳毒苷后,均可从 0~12 h 粪便样品中检测出一弱极性的代谢物($t_R=68\text{ min}$) (见图 2), 对其进行质谱分析,正离子模式下准分子离子峰为 $m/z\ 535$,与杠柳次苷 $[M+H]^+$ 相符。对 $m/z=535$ 峰进行二级质谱分析,得到 $m/z=391$ 、 373 、 355 、 337 碎片离子,与杠柳苷元的 3 个羟基依次脱一分子水加 H^+ 所产生的离子 m/z 相符,推测该代谢产物为水解掉一分子葡萄糖的杠柳次苷。

将测得的样品峰面积代入标准曲线求算被测组分在样品中的浓度,将尿液经酸水解后的产物(杠柳苷元)和粪便中经肠菌代谢得到的代谢产物(杠柳次苷)乘以相应的系数(杠柳苷元:1.777,杠柳次苷:1.298)换算成原形的量,再把尿药粪药浓度乘以相应的排泄尿量及粪量,并累加求和,计算得到杠柳毒苷及其可能得代谢产物累积排泄量,然后除以给药量计算相应的排泄率。

6.2.2 大鼠灌胃给药排泄率 大鼠按 12 mg/kg 剂量灌胃给予杠柳毒苷后 72 h,尿中杠柳毒苷和其可能的代谢物累积排泄量占给药剂量的 0.44%,粪中杠柳毒苷和其水解代谢物的累积排泄量占给药剂量的 12.39%。

6.2.3 大鼠静脉注射给药排泄率 按 0.74 mg/kg 剂量尾静脉注射给予杠柳毒苷后 72 h,尿中杠柳毒苷和其可能的代谢物累积排泄量占给药剂量的 6.24%,粪中杠柳毒苷和其水解代谢物的累积排泄量占给药剂量的 7.33%。

6.2.4 大鼠尾静脉注射杠柳毒苷胆汁排泄率 按 0.74 mg/kg 剂量尾静脉注射给予杠柳毒苷后 21 h 内累积经胆汁排泄的杠柳毒苷占给药总量的 76.13%。

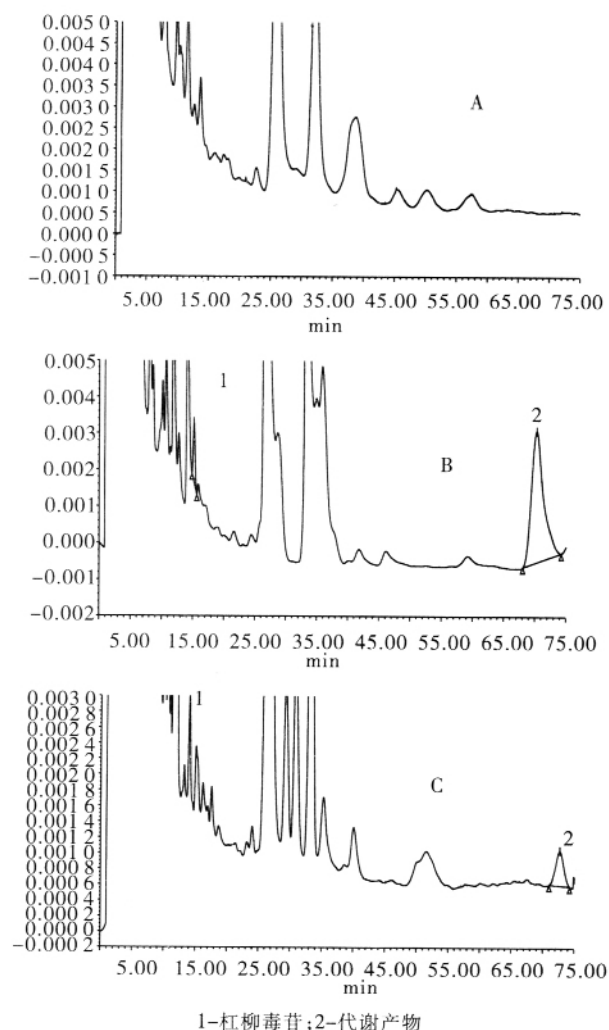
7 讨论

杠柳毒苷原形在尿液中排泄率很低,灌胃给药后 3 d 内尿液中原形排泄率约为 0.06%,静注给药排泄率约为 1.64%,且尿液中也没有发现杠柳次苷和杠柳苷元;将尿液用盐酸调节 pH 至 1 并于 35 水解 24 h 后测定水解产物杠柳苷元,再换算为杠柳毒苷的排泄率,灌胃给药后 3 d 内尿液中排泄率约 0.44%,静注给药排泄率约 5.94%,较原形排泄率有很大提高,说明杠柳毒苷可能在体内发生结合反应后经尿液排泄。推测尿中除了杠柳毒苷外,还有以杠柳苷元为母核的结合产物,如与葡萄糖苷酸、硫酸等的结合物。根据药物体内代谢的一般规律,药物及其代谢物在体内易与葡萄糖醛酸、硫酸等结合生成相代谢产物,通过 HPLC-UV 法检测到了相代谢产物,而没有检测到 相代谢物,可能其相代谢物的量较少或极性较大很难与内源性物质

表 1 提取回收率和精密度

剂量	粪便			尿液			胆汁		
	峰面积	回收率(%)	RSD(%)	峰面积	回收率(%)	RSD(%)	峰面积	回收率(%)	RSD(%)
低	81 005	85.6	3.1	281 168	88.6	5.9	99 985	88.4	6.0
	88 045			316 378			113 973		
	85 395			323 054			109 080		
	85 016			280 598			102 493		
	86 558			291 563			114 129		
	424 248			1 127 292			511 963		
中	514 628	89.8	8.2	1 140 552	84.9	2.1	553 796	89.3	4.0
	479 218			1 152 165			530 749		
	526 343			1 191 334			523 542		
	491 705			1 191 255			564 175		
	2 953 390			7 458 473			2 683 143		
高	2 958 863	103.6	2.6	7 549 221	96.4	3.7	2 716 045	95.2	2.9
	2 952 964			8 035 168			2 891 806		
	3 088 206			7 582 901			2 768 473		
	3 111 406			8 104 654			2 737 478		

注:因为目前无法得到大量的杠柳次苷的对照品,故不能绘制杠柳次苷的标准曲线,经前期研究发现和质的量的杠柳毒苷和杠柳次苷在高效液相—紫外检测中具有非常相似的紫外吸收,即测得的峰面积很接近,所以本实验用杠柳毒苷的标准曲线推测杠柳次苷在大鼠尿样和粪便样品中的含量,并将测得值为转换为杠柳毒苷相对含量。



1-杠柳毒苷;2-代谢产物
A 空白粪便;B 大鼠灌胃杠柳毒苷后 0~12 h 粪便样品;C 大鼠静注
杠柳毒苷后 0~12 h 粪便样品

图 2 大鼠灌胃及静注杠柳毒苷后粪便样品色谱图

分开,故没有能检测到;实验中的酸水解可以将杠柳毒苷相代谢产物如葡萄糖苷酸、硫酸等的结合物水解为杠柳苷元,但杠柳毒苷在体内也可能存在未能被酸水解的相代谢产物,这些还有待进一步

研究。

杠柳毒苷在粪便中主要的排泄形式是杠柳次苷,灌胃给药后粪便中杠柳毒苷原形含量并不高,而有较大比例的杠柳次苷随粪便排出,应该是杠柳毒苷被肠道菌群代谢所致;静注给药后 0~12 h 的粪便中也测到了杠柳次苷,推测是杠柳毒苷经胆汁排泄至十二指肠,又被肠道菌群代谢。

大鼠尾静脉注射杠柳毒苷后,药物原形的胆汁排泄速度迅速,21 h 内平均从胆汁中共回收给药剂量的 76.13%,没有发现明显的代谢产物,说明杠柳毒苷经胆汁主要以原形排泄。

杠柳毒苷以口服方式给药,3 d 内在尿和粪便中累积排泄量占给药总量的 12.85%;以静注方式给药,3 d 内排泄量占给药总量的 13.27%。还有相当比例的药物没有说明排泄途径,推测杠柳毒苷还有其他的消除方式或代谢产物,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王敏,贾燕平. 抗心衰中药复方参加片的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(2): 135-136.
- [2] 卢进宝,田丰华. 复方生脉饮治疗慢性充血性心力衰竭 30 例[J]. 河南中医, 2003, 24(1): 32-33.
- [3] Lindenbaum J. Urinary excretion of reduced metabolites of digoxin[J]. Am J Med, 1981, 71(1): 67-74.
- [4] Ming Yao, Hongjian Zhang, Saeho Chong, et al. A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for quantitative determination of digoxin in rat plasma[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 32: 1189-1197.
- [5] 钱文,王雷娜,宋敏,等. 左旋黄皮酰胺在大鼠体内的排泄[J]. 药学报, 2006, 41(8): 789-792.
- [6] 杜鹏,钱之玉. 西红花苷-1 大鼠吸收及排泄的研究[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(9): 801-804.
- [7] 车庆明,陈颖,潘丽怡,等. 灯盏花乙素苷元的胆汁排泄研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1710-1712.

(收稿日期: 2007-11-02)

声 明

文稿的著作权属于作者,本刊享有版权,文责由作者自负,署名作者的人数和顺序由作者自定。作者若不允许本刊对文稿作文字性及少量内容修改,或不同意其他报、刊、数据库等转载、摘编其作品,或不同意进入“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、中国科技信息所“万方数据网络系统”、“中文科技期刊数据库”,请在来稿时声明,否则视为作者同意论文入网。