

论著·中药研究

黄柏中盐酸小檗碱的药代动力学研究

肖学风, 乔晓莉, 高 岚, 孙 瑜, 张军平

摘要: [目的] 测定黄柏中有效成分盐酸小檗碱在大鼠体内的药代动力学参数。 [方法] 使用高效液相色谱 (HPLC) 检测黄柏中盐酸小檗碱在大鼠血浆中的血药浓度; 并运用 3p97 程序对黄柏中盐酸小檗碱的药代动力学参数进行拟合。 [结果] 黄柏中盐酸小檗碱在大鼠体内药代动力学参数是: 血药浓度曲线下面积 (AUC)=774.3(mg·L)/min, 肾排泄速度常数 (Ke)= 7.285×10^{-3} L/min, 吸收速度常数 (Ka)= 4.166×10^{-2} L/min, 吸收半衰期 [T_{1/2}(Ka)]=16.64 min, 肾排泄半衰期 [T_{1/2}(Ke)]=95.15 min, 出风时间 [T(peak)]=50.73 min, 最大血药浓度 [C(max)]=3.898 mg/L。 [结论] 黄柏中盐酸小檗碱在大鼠体内呈一室模型分布。

关键词: HPLC; 黄柏; 盐酸小檗碱; 药代动力学

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-9043(2008)04-0263-03

Pharmacokinetic study of berberine hydrochloride of cortex phellodendri in rat plasma

XIAO Xue-feng, QIAO Xiao-li, GAO Lan, et al
(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study pharmacokinetics of berberine hydrochloride in Cortex Phellodendri in the rat. [Methods] Use HPLC to determine serum concentrations of berberine hydrochloride in Cortex Phellodendri in rat pLasma. The pharmacokinetic parameters of berberine hydrochloride was fitted with 3p97 procedure. [Result] The pharmacokinetic parameters of berberine hydrochloride in Cortex Phellodendri were AUC=774.3(mg·L)/min, Ke= 7.285×10^{-3} L/min, Ka= 4.166×10^{-2} L/min, T_{1/2}(Ka)=16.64 min, T_{1/2}(Ke)=95.15 min, T(peak)=50.73 min, C(max)=3.898 mg/L. [Conclusion] The berberine hydrochloride in Cortex Phellodendri showed one-compartment in the body of Wistar rats.

Key words: HPLC; cortex phellodendri; berberine hydrochloride; pharmacokinetics

黄柏为芸香科植物黄檗或黄皮树的干燥树皮, 可分为关黄柏和川黄柏两大类, 现代药理学研究表明黄柏具有抗病原微生物、抗溃疡、降压、抗心律失常等作用^[1]。黄柏药材含有多种生物碱, 包括小檗碱、巴马汀、药根碱、黄柏碱、蝙蝠葛任碱、木兰花碱, 另外还含有苦味素柠檬苦素及黄柏酮^[2], 其中主要成分为小檗碱。小檗碱 (berberine, Ber) 又名黄连素, 作为抗菌药在临床上已应用多年, 其疗效确切, 是一种广谱抗菌药物, 对多种革兰氏阳性、阴性菌以及真菌、霉菌、病毒、原虫、线虫具有抑制杀灭作用^[3]。本次实验用以酸水浸渍法从黄柏中提取的黄柏提取物给大鼠灌胃, 采用高效液相色谱法测定盐酸小檗碱

在大鼠血浆中血药浓度的变化过程, 通过 3p97 药动学计算程序计算其药动学参数, 从而确定黄柏在大鼠体内的药物动力学模型。

1 仪器、药品及动物

1.1 仪器 检测器: Model 500; 高效液相色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (天津色谱科学技术公司); 氮吹仪: N-EVAPTM111 氮吹仪 (Organomation Associates, Inc. 266 River Road West Berlin, MA01503, U.S.A.); SHZ-3 () 型循环水多用真空泵 (河南省予华仪器有限公司); 旋转蒸发器: RE-52AA (上海亚荣生化仪器厂); 超声清洗器: KQ-500E 型医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 真空干燥箱: XMTD 数显调节仪 (余姚市东方电工仪器厂); 旋涡混合仪: XW-80A 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂); 离心机: LG10-2.4A 型高速离心机 (北京医用离心机厂)。

1.2 药品 盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品

作者单位: 300193 天津中医药大学 (肖学风, 高 岚, 孙 瑜)
300193 天津中医药大学第一附属医院 (张军平)
300191 天津市南开医院 (乔晓莉)

作者简介: 肖学风 (1966-), 女, 副教授, 从事中草药药物动力学研究。

检定所,批号:110713-200208),黄柏药材(购于安舜大药房),肝素钠注射液(天津市生物化学制药厂,产品批号:20060201,规格:2 mL 1.25 万单位),乙腈(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),甲醇(色谱纯,天津市协和昊鹏色谱科技有限公司,原中国医学科学院天津协和医学科技公司),硫酸(分析纯,天津市化学试剂三厂),盐酸(分析纯,天津市化学试剂三厂)。

1.3 动物 健康 Wistar 大鼠,雌雄各半,体质量(0.2±0.02)kg,购于天津市药物研究院。

2 方法与结果

2.1 黄柏的提取 称取黄柏药材 50.0 g,用 0.5%硫酸溶液 1 000 mL 浸泡两次,每次 24 h,滤取上清液,共收集浸提液 4 000 mL,加入石灰乳(用氢氧化钙粉末自制),调 pH 8~9,过滤,滤液中加入 10%(W/V)固体工业食盐,搅拌溶解,冷藏过夜,取沉淀,加热水(95℃)溶解,趁热抽滤,滤液中加入浓盐酸调 pH 1~2,冷藏过夜,取沉淀,用少量蒸馏水洗至 pH 5,在 60℃ 以下干燥 1~2 h,即得黄柏提取物为 0.075 3 g。

2.2 对照液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,用甲醇溶解定容,制成 5 mg/L 的对照液,即高浓度对照液;0.5 mg/L 的中浓度对照液;0.05 mg/L 的低浓度对照液。

2.3 色谱条件 色谱柱:Kromasil C18 (250 mm×4.6 mm,5 μm);检测器:Model 500;柱温:25℃;流动相:乙腈—0.033 mol/L 磷酸二氢钾(40:60);流速:1.0 mL/min;检测波长:265 nm;进样体积:20 μL。

2.4 血浆样品预处理 取血浆 0.2 mL 于 1.0 mL 离心管中,加入 0.8 mL 乙腈沉淀蛋白,旋涡混合 5 min 后,用高速离心机以 5 000 r/min 的速度离心 10 min,吸取上清液 0.8 mL 用氮吹仪 45℃ 以下吹干,用 0.2 mL 流动相复溶残渣,9 000 r/min 高速离心 10 min 后,吸取上清液,进液相 20 μL。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线制备 精密量取盐酸小檗碱中浓度对照液(0.5 mg/L)20 μL,盐酸小檗碱高浓度对照液(5 mg/L)20、40、80、120、160、200 μL 于离心管中,分别加入空白血浆 200 μL,按“血浆样品预处理”条件下操作,配制成相当于质量浓度为 0.05、0.5、1、2、3、4、5 mg/L 的血浆样品,以待测物浓度为横坐标,待测物峰面积(RSD)为纵坐标作图,求得直线方程 $Y=4.97 \times 10^3 X + 9.52 \times 10^2$, $r=0.998 9$,说明线性关系良好。最低定量限为 1 ng。

2.5.2 稳定性实验 取空白血浆 0.2 mL,加入高浓度对照液 1.0 mL 于离心管中,按“血浆样品预处理”条件下操作,最后用 1.0 mL 流动相复溶,吸取上清液,分别于 0、2、4、6、8、24、48、72 h,进样 20 μL。结果血浆样品中盐酸小檗碱在 72 h 内 RSD 值为 4.95%($n=5$),稳定性良好。

2.5.3 精密度实验 取空白血浆 0.2 mL,分别加入盐酸小檗碱(低、中、高浓度)对照液,按“血浆样品预处理”条件下操作,进液相测定,同法操作每隔 1 h 测定 1 次,进行日内精密度计算;同法操作每个浓度每隔 1 d 测定 1 次,进行日间精密度计算。结果血浆样品中盐酸小檗碱低、中、高 3 个浓度日内精密度峰面积(RSD)值分别为 5.21%、3.87%、2.28%($n=5$);日间精密度 RSD 值分别为 5.03%、4.02%、2.49%($n=5$),精密度良好。

2.5.4 回收率实验 取空白血浆 0.2 mL,分别加入盐酸小檗碱(低、中、高浓度)对照液 200 μL,各 5 份,按“血浆样品预处理”条件下操作,每份测定 3 次,计算回收率。结果血浆样品中盐酸小檗碱低、中、高浓度回收率分别为 89.37%、93.55%、97.55%,其 RSD 值分别为 0.75%、1.53%、1.41%($n=5$),回收率良好。

2.5.5 提取回收率 取空白血浆 0.2 mL,分别加入盐酸小檗碱(低、中、高浓度)对照液 200 μL,各 5 份,按“血浆样品预处理”条件下操作,以配制的盐酸小檗碱对照品溶液为标准计算回收率。结果血浆样品中盐酸小檗碱低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 76.87%、89.38%、93.90%($n=5$),其 RSD 值为 0.83%、0.91%、1.43%,提取回收率良好。

2.6 动物取样 取健康大鼠 6 只,称质量,称取黄柏提取物用纯净水 4 mL 溶解,按 125 mg/kg 给大鼠灌胃,分别于给药后 5、10、20、30、60、90、120、150、180、240、300、360、420、480、600、720 min 从眼底取血 0.3~0.5 mL,以肝素体外抗凝,以 5 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,吸取血浆 0.2 mL 于离心管中,−20℃ 保存血浆,待用。

2.7 样品测定 取 0.2 mL 血浆样品,加入 0.8 mL 乙腈沉淀蛋白,旋涡混合 5 min 后,以 5 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 0.8 mL 用氮吹仪 45℃ 以下吹干,残渣用 0.2 mL 流动相复溶,再以 9 000 r/min 高速离心 10 min,吸取上清液 20 μL 进样。

2.8 黄柏中盐酸小檗碱在大鼠体内的药时过程 根据 RSD 按标准比较法计算血药浓度。其药时曲线见图 1。

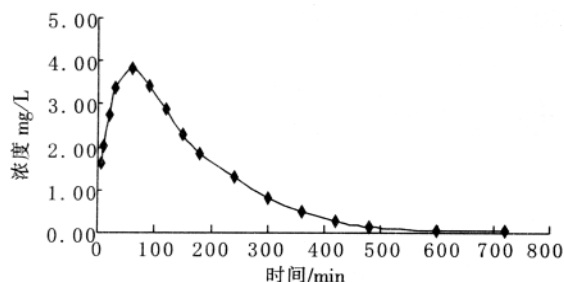


图 1 黄柏中盐酸小檗碱的药时曲线

2.9 黄柏中盐酸小檗碱在大白鼠体内的药代动力学参数 采用 3p97 药代动力学计算程序对药时数据进行处理,分别按一室、二室、三室模型进行模拟,获得(AIC)值和相关系数 r 。根据 AIC 值最小和 r 值最大原则,判定黄柏中盐酸小檗碱在大鼠体内的药时过程符合一室开放模型(权重参数为 1)。并求得其药代动力学参数,见表 1。

表 1 黄柏中盐酸小檗碱的药代动力学参数

药动参数	单位	数值
肾排泄速度常数(K_e)	/min	0.007 285
吸收速度常数(K_a)	/min	0.041 66
时间(time)	min	0.173 1
吸收半衰期($t_{1/2} K_a$)	min	16.64
排泄半衰期($t_{1/2} K_e$)	min	95.15
出风时间($T(\text{peak})$)	min	50.73
最大药浓度(C_{max})	mg/L	3.898
血药浓度曲线下面积(AVC)	(mg·L)/min	774.3

从盐酸小檗碱的药代动力学研究结果发现盐酸小檗碱口服给药吸收少,在血液中的代谢具有达峰时间短,代谢迅速的特点,并且在实验过程中发现盐酸小檗碱同血液蛋白的结合能力不强,乙腈处理蛋白不会影响盐酸小檗碱的检出。

3 讨论

黄柏药材含有多种生物碱,包括小檗碱、巴马汀、药根碱、黄柏碱、蝙蝠葛任碱、木兰花碱^[4],另外还含有苦味素柠檬苦素及黄柏酮,由于小檗碱为黄柏生物碱中含量较高的成分,含量可达总生物碱的 85%以上,作用广泛且较常用,故选盐酸小檗碱作为本次实验的检测指标,能较好地反映实验结果,而其他成分如黄柏碱虽属黄柏的特有成分,但因其含量低不易检测而不宜作为检测指标。

黄柏中提取盐酸小檗碱常用的方法有酸水法、石灰乳法^[5]、醇提法、水煎煮法等,目前研究较多的还有超声提取法等,本次实验首先采用水煎煮法,称取一定量的黄柏,先加 10 倍量的水煎煮 2 h,取滤液,再加 8 倍水煮 1 h,取滤液,再加 8 倍水煮 0.5 h,合并滤液,浓缩成浸膏,60 °C 以下真空干燥,得干浸膏率为 19.24%,盐酸小檗碱提取率约为 0.5%,该提取方法简便、快速。

高效液相色谱条件的摸索:根据参考文献,以乙腈—0.2%磷酸溶液(36:64),柱温:30 °C,流速:1 mL/min,吸收波长:350 nm,该色谱条件盐酸小檗碱出峰较早,与溶剂峰不能很好的分离。以乙腈—0.1%磷酸溶液(25:75),柱温:30 °C,流速:1 mL/min,吸收波长:360 nm,该色谱条件盐酸小檗碱也不能很好的出峰。以乙腈—0.5%冰醋酸溶液(20:80),柱温:25 °C,流速:1 mL/min,吸收波长:350 nm,该色谱条件盐酸小檗碱也不能很好的出峰。最后以乙腈—0.033 mol/L 磷酸二氢钾溶液(40:60),柱温:25 °C,流速:1 mL/min,检测波长:265 nm,该色谱条件盐酸小檗碱出峰相对较好,与溶剂峰能完全分离,出峰时间在 5.723~5.773 min 之间,但仍然有些许拖尾现象,有待于进一步探讨。

黄柏中小檗碱口服不易吸收,血中浓度较低,因而口服给药时毒性很小,季铵型小檗碱不易透过血脑屏障。小檗碱主要经过肝脏代谢,其原形及代谢产物均经肾脏排泄,但以原形排出很少^[6]。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1997:2031-2035.
- [2] 王浴生,邓文龙,薛春生.中药药理与应用[M].北京:人民卫生出版社,2004:1024-1026.
- [3] Cernakova M, Kostalova D. Antimicrobial Activity of berberine—a constituent of Mahonia aquifolium[J]. FoLia Microbiol, 2002, 47(4):375-378.
- [4] 江苏新医学院.中药大辞典(下册)[S].上海:上海科学技术出版社,1990:2031-2033.
- [5] 肖崇厚.中药化学[M].上海:上海科学技术出版社,1987:70-72.
- [6] 王本祥.现代中药药理与临床[M].天津:天津科技翻译出版公司,2004:17-18.

(收稿日期:2008-05-24)