

黄连血中移行成分经时变化规律探讨

卢芳¹, 陈平平¹, 刘树民^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040;
2. 黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040)

〔摘要〕 目的:通过分析黄连血中移行成分的经时变化规律,明确黄连体内的直接作用物质基础及体内代谢过程。方法:采用中药血清药物化学方法研究黄连进入体内后化学成分分布、数目、存在状态(原型成分或代谢产物)及其随时间的变化。结果:认定了黄连给药后 9 个血中移行成分中的 5 个成分(表小檗碱、药根碱、黄连碱、巴马汀、盐酸小檗碱);除 2 号峰经分析认定为代谢产物外,其他色谱峰均是以原型形式进入体内而存在。3,4,5,6,7,8,9 号峰被吸收入血后,在一定时间内血药浓度达峰值(120 min),达峰时间均较长,而后随着血液循环在体内消除。3,4 号峰吸收入血后,血药浓度降低,但相对含量呈上升趋势,说明有其他成分向其转化。结论:黄连血中移行成分中主体成分在给药后 60 min 可检测到,120 min 达峰值,240 min 时的含量与 60 min 时相当;少量成分存在其他成分向其转化的特点。通过给药后血中移行成分分析可确定药物在体内直接作用的物质,根据该移行成分的经时变化规律可建立中药的科学给药方案及配伍用药方案。

〔关键词〕 黄连;血中移行成分;经时变化规律;表小檗碱;药根碱;黄连碱;巴马汀
〔中图分类号〕 R283.6;R945;R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)22-0108-04
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220108

Investigation of Time Change Rule of Compositions Derived from
Coptidis Rhizoma Absorbed into the Blood

LU Fang¹, CHEN Ping-ping¹, LIU Shu-min^{2*}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

〔Abstract〕 **Objective:** Through studying time change rule of compositions derived from Coptidis Rhizoma absorbed into the blood, to clear *in vivo* directly effective substance and metabolic process of Coptidis Rhizoma. **Method:** Serum pharmacochemistry method was adopted to study distribution, number and state (prototype components or metabolites) of chemical compositions from Coptidis Rhizoma absorbed into the body, then investigate its variation with time. **Result:** This study determined five components (epiberberine, jateorhizine, coptisine, palmatine and berberine hydrochloride) among these nine components from Coptidis Rhizoma absorbed into the body; in addition to peak 2 identified as metabolites by analysis, other peaks were in prototype form into the body. After peak 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 were absorbed into the blood, blood drug concentration reached its peak in a certain period of time (120 min), peak time was longer, and then was eliminated with the blood circulation in the body. After peak 3 and 4 were absorbed into the blood, blood drug concentration decreased, but their relative contents were increased, which indicated conversion of other components to them. **Conclusion:** Main components of compositions derived from Coptidis Rhizoma absorbed into the blood can be detected at 60 min after

〔收稿日期〕 20140411(007)
〔基金项目〕 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2007CB512608);黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划项目
〔第一作者〕 卢芳,博士,副研究员,从事中药药性理论及药效物质基础相关问题研究,Tel:13804525109,E-mail:lufang_19790501@163.com
〔通讯作者〕 *刘树民,博士,教授,从事中药临床药效物质基础及中药药性理论研究,Tel:0451-82193278,E-mail:keji-liu@163.com

administration, they reach peak value at 120 min, their contents at 240 min are similar to these at 60 min; minor components can be transformed from other components. Effective components directly in the body may be determined by analyzing components of drugs from serum after taking medicines orally, scientific administration and combination scheme of traditional Chinese medicine can establish by according to change rule of components from serum after taking medicines orally.

[Key words] Coptidis Rhizoma; compositions absorbed into the blood; time change rule; epiberberine; jateorhizine; coptisine; palmatine

中药含有复杂的化学成分,但只有被吸收入血的那些成分才能产生药理作用。传统中药多口服给药,药物成分通过消化道直接吸收入血,或经消化液、消化酶及肠道内细菌的作用分解成次生代谢产物被吸收入血,或经肝药酶(P_{450})代谢成有活性的代谢产物进入体循环^[1]。因此中药的活性成分及药效物质基础研究应在给药后的血清中进行。采用中药血清药物化学方法对中药口服后体内药物成分分析,进而确定中药药效物质基础已被多项研究证实是可行的^[2]。国内外对中药及其复方的血清药物化学相关研究报道多限于某一特定时间(如1 h)采集血样进行有效成分分析,这种方法在某种程度上仅能反映特定时间点的血清药物化学成分情况,不能全面反映中药口服给药后各成分在体内的变化过程。

黄连味苦,性寒,归心、脾、胃、肝、胆、大肠经,功效清热燥湿、泄火解毒^[3]。目前有关黄连血中移行成分的经时变化规律研究尚未见报道。本实验拟对大鼠灌胃一定剂量黄连提取物后,分析其血中移行成分的经时变化规律,通过动态方式考察不同时间进入血液的化学成分在大鼠体内的变化过程,为黄连的体内药效机制分析提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪和 OASIS WCX Cartridge 型固相萃取柱(美国 Waters 公司),KDC-160HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),DZF-6030B 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),BS124S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Milli-Q 型纯水机(美国密理博公司)。

黄连购自黑龙江省药材公司,产地四川,经黑龙江中医药大学中医药研究院刘树民教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎;盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品(中国食品药品检定研究院,批号依次为 110713-200609, 0733-

200005, 110732-200506),黄连碱(上海融禾科技医药股份有限公司,批号 080109),表小檗碱(自制),乙腈为色谱级,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

Wistar 大鼠,雄性,清洁级,体重(200 ± 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2007-0001,置于室内保持 12 h 光照和 12 h 避光循环饲养,给予标准饲料和饮用水,控制室内温度(22 ± 1) °C,相对湿度约 40%。

2 方法

2.1 大鼠灌胃药液的制备 取黄连干燥根茎 150 g,粉碎成块,分别加 10, 8 倍量水回流提取 2 h,合并水煎液,浓缩、真空干燥至恒重,粉碎得棕褐色粉末^[4],取适量粉末,加水制成 $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取黄连水煎液浓缩干粉 22 mg(合生药材 0.1 g),置 50 mL 量瓶中,加水 50 mL,超声处理 30 min,加水补足减失的溶液至刻度,摇匀,过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、黄连碱、表小檗碱对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过,得质量浓度依次为 1.90, 1.18, 1.55, 1.60, $1.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.4 血液样品的采集^[4-5] 取雄性 Wistar 大鼠,禁食 12 h,称重,等分为 3 组,每组 6 只,给药组按 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃给予黄连提取物,空白组给予相应剂量水。黄连血中移行成分认定试验为于给药 90 min 后用 20% 乌拉坦按 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,经肝门静脉取血 5 mL,离心($6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min,下同),取上清液。黄连血中移行成分经时变化试验为在乙醚麻醉状态下,分别在给药后 60, 90, 105, 120, 135, 150, 180, 240 min 尾静脉采血 0.8 mL,血样置肝素化的离心管中,离心,取上清液。

2.5 血浆样品处理^[6] 取空白组及给药组各时间

点血清,用 4% 磷酸酸化,上样至激活、平衡后的固相萃取柱,加 5% 氨水 1 mL 清洗,依次加甲醇和 2% 甲酸-甲醇各 1 mL 淋洗,收集 2% 甲酸-甲醇洗脱液减压收干,用甲醇 200 μL 复溶,过 0.45 μm 微孔滤膜,待 HPLC 分析。该方法可较好地去除杂质,灵敏度高,对不同组分的选择性大,可检测出血清中极微量的成分,适用于体内药物分析微量成分的检测,故采用固相萃取法作为黄连血中移行成分的研究方法。

2.6 色谱条件 迪马公司 Diamonsil (钻石) C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾(B,磷酸调 pH 3.0)梯度洗脱(0 ~ 6 min,10% ~ 14% A;6 ~ 10 min,14% ~ 18% A;10 ~ 22 min,18% ~ 19% A;22 ~ 40 min,19% ~ 22% A;40 ~ 52 min,流 22% ~ 28% A;52 ~ 60 min,28% ~ 40% A),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.8 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 276 nm,进样量 10 μL (黄连体外成分分析)或 20 μL (黄连体内成分分析)。

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 精密称取同一批水煎液黄连干粉,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.6 项下色谱条件重复进样 5 次,结果显示各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 分

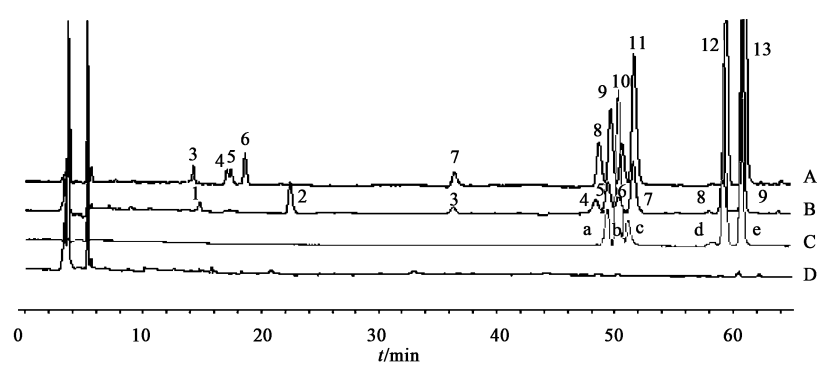
别为 0.02% ~ 0.12%,0.3% ~ 2.9%,表明仪器精密度良好。

2.7.2 稳定性试验 精密称取同一批黄连水煎液干粉,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别在 0,6,12,18,24 h 按 2.6 项下色谱条件测定,结果各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 分别为 0.01% ~ 0.21%,0.26% ~ 2.45%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.3 重复性试验 精密称取同一批水煎液黄连干粉,按 2.2 项下方法平行制备 5 份供试品溶液,按 2.6 项下色谱条件测定,结果各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 分别为 0.02% ~ 0.24%,0.15% ~ 2.89%,表明该方法重复性良好。

3 结果

3.1 黄连血中移行成分认定 通过 HPLC 检测,确定黄连给药后 9 个血中移行成分。通过药材样品、血清样品(给药血清和空白血清)及对照品图谱比对,以保留时间作为鉴定标准进行色谱峰的认定,见图 1,结果确定给药血清中 5,6,7,8,9 号峰分别为表小檗碱、药根碱、黄连碱、巴马汀、盐酸小檗碱。



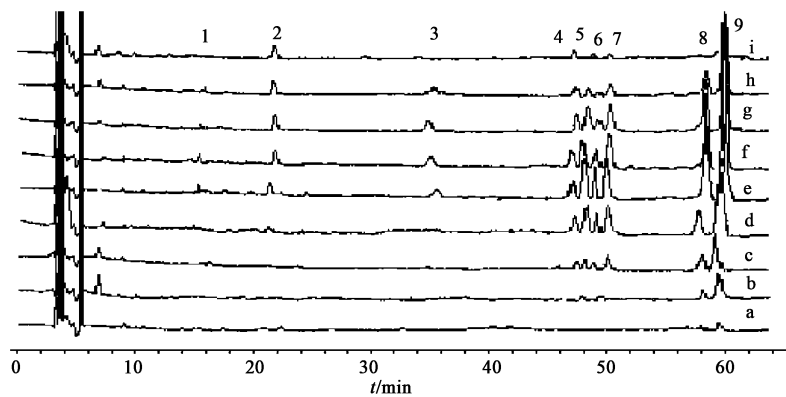
a. 表小檗碱;b. 盐酸药根碱;c. 黄连碱;d. 盐酸巴马汀;e. 盐酸小檗碱;A. 药材;B. 血清样品;C. 对照品;D. 空白样品
图 1 黄连血中移行成分 HPLC

3.2 黄连血中移行成分经时变化 取各时间点血清样品,按 2.6 项下色谱条件测定,见图 2。以 5 号峰表小檗碱为例,拟合血中移行成分经时变化曲线,见图 3。给药后 0 ~ 4 h 血清中能全部检测到 3.1 项下认定的 9 个血中移行成分,根据血中移行成分经时变化曲线,可将这 9 个血中移行成分分为 3 类:① 3,4,5,6,7,8,9 号峰被吸收入血后,在一定时间内血药浓度达峰值(120 min),达峰时间均较长,而后随着血液循环在体内消除;② 3,4 号峰吸收入血后,血药浓度降低,但相对质量分数呈上升趋势,说

明有其他成分向其转化;③ 2 号峰是药材本身没有的成分,疑是药材中其他成分的代谢物,尤其可能是 1,2,4,5,6 号峰成分的代谢物。由以上结果可知,黄连血中移行成分中主体成分在给药后 60 min 可检测到,120 min 达峰值,240 min 时含量与 60 min 相当;少量成分存在其他成分向其转化的特点。

4 讨论

给药血清中 2 号峰在药材样品中未被检测到,分析其可能为黄连药材提取物经过体内变化产生的代谢产物;1,3,4,5,6,7,8,9 号峰存在于药材样品



a. 空白血清;b. 60 min;c. 90 min;d. 105 min;e. 120 min;f. 135 min;g. 150 min;h. 180 min;i. 240 min;5. 表小檗碱;
6. 药根碱;7. 黄连碱;8. 巴马汀;9. 盐酸小檗碱

图2 黄连血中移行成分经时变化 HPLC

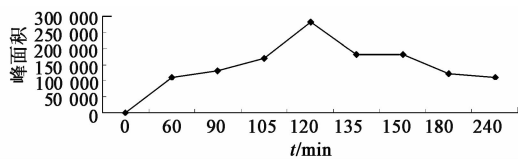


图3 黄连血中移行成分表小檗碱经时变化曲线

中,并且给药血清中亦能够检测得到,可认为这8种成分均以原型形式进入体内而存在。给药血清中1,2,4,5,6号峰在体外药材样品中均未检出,可能是由于含量太低或代谢成其他成分所致。

黄连血中移行成分动态变化规律研究时,需要满足同一动物个体多次采样,故本文选择尾静脉采血。在黄连血中移行成分的认定与分析中,取血方式为肝门静脉采血,目的是为了兼顾原型成分及代谢产物,以在本文分析条件下能较全面地掌握黄连血中移行成分的体内真实状态;但该方法不适合血中移行成分的经时变化研究,因此选择尾静脉采血的方法。结果得到3,4,5,6,7,8,9号峰被吸收入血后,在一定时间内血药浓度达峰值(120 min),达峰时间均较长,而后随着血液循环在体内消除;3,4号峰吸收入血后,血药浓度降低,但相对含量呈上升趋势,说明有其他成分向其转化。

通过中药及其复方给药后血中移行成分分析可确定体内直接作用的物质;根据该移行成分的经时变化规律可建立中药及其复方的科学给药方案,即根据血中移行成分的半衰期确定给药间隔;通过生物利用度、分布容积及有效浓度确定给药剂量,加之整体代谢规律确立配伍用药方案,从而可使中医药真正实现规范化、科学化,加入真正药理学行列。

[参考文献]

[1] 王永林,陈慧,郑林,等. 荭草的血清药物化学初步研究[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(13):1100.
[2] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2002,4(2):1.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:285.
[4] 卢芳,刘树民,陈平平,等. 基于药物成分体内过程的黄连苦寒药性研究[J]. 山东中医药大学学报,2011,35(3):250.
[5] 邓翀,张艺,孟宪丽,等. 三黄泻心汤血清药化学初步探究[J]. 陕西中医学院学报,2009,32(6):57.
[6] 郭辉,刘晓,蔡皓,等. 大黄附子汤血清药物化学初步研究[J]. 中草药,2013,44(5):528.

[责任编辑 刘德文]