

· 药物代谢 ·

醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响

赵莹¹, 赵瑞芝^{2*}, 陈有军², 刘丽娟²

(1. 嘉应学院医学院, 广东梅州 514030; 2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:考察醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响,探讨醋柴胡肝引经作用机制。方法:将192只雄性昆明种小鼠随机分为4组,包括龙胆苦苷空白组和龙胆苦苷-醋柴胡低、中、高剂量组,分别于0.08,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,4 h(每个时间点6只动物)采集血浆、肝、心、脾、肺、肾组织,预处理后利用HPLC-MS/MS测定药物含量,分析其药动学过程,以相对摄取率(Re)和相对综合靶向效率(RTE)评价醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响。结果:不同剂量醋柴胡均可增加龙胆苦苷在肝脏的RTE,低、中、高剂量醋柴胡组肝脏的RTE分别为0.25,0.13,0.33。但并不增加龙胆苦苷肝内摄入,而是显著减少药物在其他组织的分布。结论:醋柴胡通过减少龙胆苦苷在其他组织分布达到增加肝RTE的作用。

[关键词] 引经药; 醋柴胡; 龙胆苦苷; 靶向效率; 相对摄取率

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0071-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015170071

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150713.1437.004.html>

[网络出版时间] 2015-07-13 14:37

Effect of Vinegar-baked Bupleuri Radix on Gentiopicroside in Mice ZHAO Ying¹, ZHAO Rui-zhi^{2*}, CHEN You-jun², LIU Li-juan² (1. Medical College of Jiaying University, Meizhou 514030, China; 2. Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of vinegar-baked Bupleuri Radix on distribution of gentiopicroside in mice, and discuss liver induced mechanism of vinegar-baked Bupleuri Radix. **Method:** Male mice were divided into four groups, including gentiopicroside control and gentiopicroside coadministered with three different doses of vinegar-baked Bupleuri Radix. Samples were collected at time points of 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4 h, 6 mice were used in every time point. Samples were detected by HPLC-MS/MS. Targeting effect of different tissues of vinegar-baked Bupleuri Radix on gentiopicroside was evaluated through parameters of relative tissue exposure (Re) and relative targeting efficiency (RTE). **Result:** Three different doses of vinegar-baked Bupleuri Radix could increase RTE of gentiopicroside in liver. RTE values of the low, medium and high dose groups in liver were 0.25, 0.13 and 0.33. Although uptake of gentiopicroside in liver was not increased, vinegar-baked Bupleuri Radix could decrease distribution of gentiopicroside in other tissues except liver significantly. **Conclusion:** Vinegar-baked Bupleuri Radix, the meridian guide drug, can increase RTE of liver by reducing distribution of gentiopicroside in other tissues except liver.

[Key words] meridian guide drug; vinegar-baked Bupleuri Radix; gentiopicroside; targeting efficiency; relative uptake ratio

柴胡入肝、胆和肺经,经醋制后其作用专于肝经,为肝经引经药。《太平惠民和剂局方》^[1]记载“治疗肝郁血虚脾弱证之名方‘逍遥散’,方中君以

柴胡疏肝解郁,使肝气条达,兼为肝经引经药。”现代研究表明醋柴胡具有增大所引成分在肝脏中分布的作用^[2-4],但对环烯醚萜类药物的影响尚未见报

[收稿日期] 20141224(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672668,81073063)

[第一作者] 赵莹,硕士,讲师,从事药物新剂型及相关技术研究,Tel:0753-2209880,E-mail:15016268861@163.com

[通讯作者] *赵瑞芝,研究员,博士生导师,从事药物新剂型及相关技术研究,Tel:020-39318571,E-mail:13610241754@163.com

道。龙胆苦苷为环烯醚萜类成分,是常用中药龙胆、秦艽和獐牙菜的主要活性成分,具有显著的保肝作用^[5],临床常用于治疗病毒性肝炎、原发性肝癌及黄疸等疾病。因此,在临床应用中促进龙胆苦苷向肝组织的分布,增大其肝药浓度,对增强其保肝作用和降低对其他组织的毒副作用均具有重要意义。本实验拟将肝经引经药醋柴胡与龙胆苦苷配伍使用,研究醋柴胡对龙胆苦苷组织分布的影响,探讨醋柴胡引经作用对改变龙胆苦苷体内分布情况的影响。

1 材料

API3000型液相色谱-三级四极杆质谱联用仪[美国AB公司,配有电喷雾离子源(ESI)及Analyst 1.4数据处理系统],1100型高效液相色谱系统(美国安捷伦科技公司),BS224S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),GENIUS3涡漩震荡仪和T10型匀浆仪(德国IKA公司),G20型台式离心机(河北省安新县白洋离心机厂),20管型固相萃取仪(美国沃特世公司),Milli-Q型纯水机(美国密理博公司)。

龙胆苦苷(成都普思生物科技有限公司,批号ps08012501,纯度>98%),扑热息痛对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号090106,纯度>99%),醋柴胡(广东康美药业有限公司,产地湖北,批号20070120,经广东省中医院陈文良主管药师鉴定为伞形科植物北柴胡*Bupleurum chinense*的干燥根醋制品),肝素钠注射液(天津市生物化学制药厂,批号20070609),水为纯水,甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性昆明种小鼠192只,体重(26±2)g,购于广东省医学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2009-0002和SCXK(粤)2009-0094,实验前禁食24h,自由饮水。

2 方法与结果

2.1 药液的配制

2.1.1 龙胆苦苷灌胃液 精密称取龙胆苦苷约250mg,加水溶解并定容至50mL,得5.0g·L⁻¹龙胆苦苷药液,给药剂量100mg·kg⁻¹(按0.02mL·g⁻¹灌胃给药)。

2.1.2 醋柴胡水提液^[6] 称取醋柴胡100g,浸泡0.5h,分别加10,8倍量水煎煮1h和45min,过滤,合并2次滤液,减压浓缩成1g·mL⁻¹水煎液,-20℃保存备用。

2.2 动物分组及给药方法 将动物随机分为4组(每组48只),包括空白组和醋柴胡低、中、高剂量

组(400,800,1200mg·kg⁻¹),空白组灌胃龙胆苦苷药液,醋柴胡低、中、高剂量组灌胃龙胆苦苷药液合并不同浓度的醋柴胡水提液。

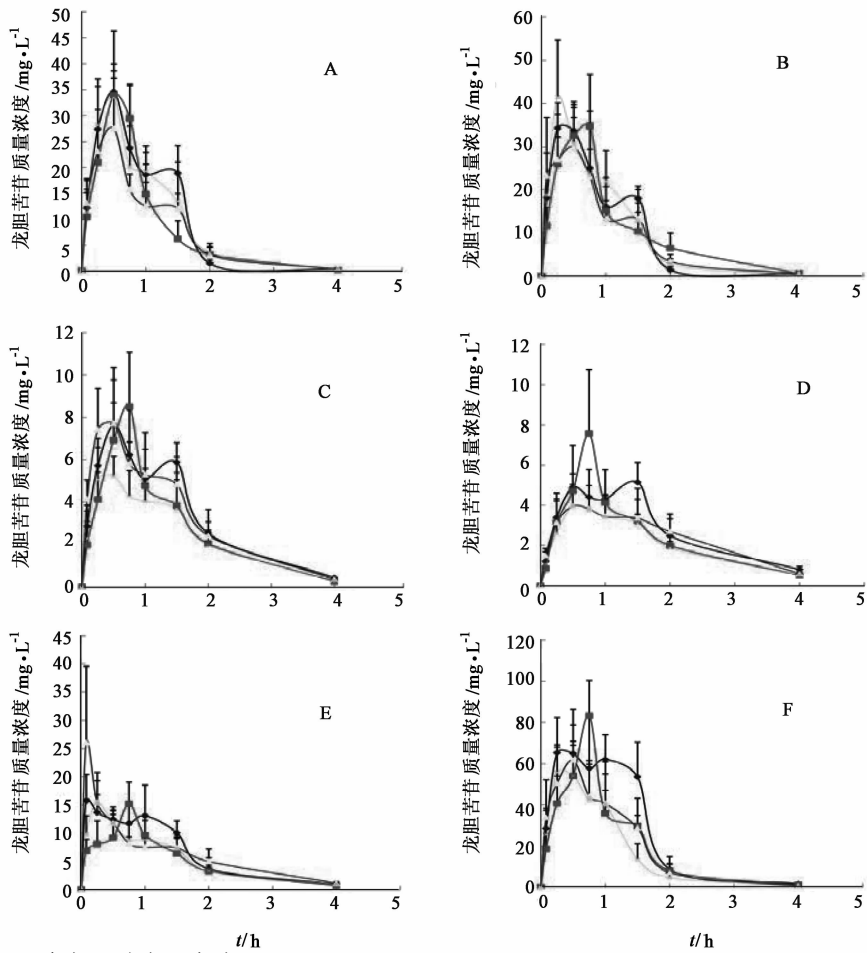
2.3 动物处置和血浆、组织样品的收集 动物禁食24h后,按2.2项下方法分组,各组分别于给药后0.08,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,4h摘眼球取血,置肝素钠抗凝离心管内。颈椎脱臼处死后迅速取出肝、心、脾、肺、肾组织,用生理盐水洗净残血,吸干水分于-80℃冰箱中冻存待处理。血液经30000r·min⁻¹离心15min,分离血浆,于-80℃冰箱中冷冻保存。

2.4 检测条件^[7] 色谱条件为Kromasil C₈色谱柱(2.1mm×150mm,3.5μm),流动相甲醇-1%甲酸溶液-乙腈(60:30:10),流速170μL·min⁻¹,柱温20℃,进样量20μL。质谱条件为电喷雾离子化,正离子多离子反应监测(MRM)方式,定量离子对龙胆苦苷m/z374.1~195.2,扑热息痛m/z152.0~110.1。

2.5 样品预处理及测定^[7] 取肝、心、脾、肺、肾样品,去尽脂肪组织和结缔组织等杂物,心、肺、脾分别剪碎精密称取全部,肝、肾剪碎分别混合后随机精密称取碎片约0.2g,加水匀浆。加甲醇1.0mL活化固相萃取小柱,用水1.0mL平衡,吸取浆液200μL(血浆直接取200μL),加水200μL和内标(扑热息痛)溶液50μL,漩涡混匀后上样,过柱后用水1.0mL洗涤,抽干并弃去洗涤液,加甲醇1.0mL洗脱,取洗脱液200μL加入适当溶剂,调整为流动相比例,混匀后用0.22μm微型滤器过滤,量取20μL进样测定。

2.6 醋柴胡对龙胆苦苷药代动力学的影响 龙胆苦苷与醋柴胡各剂量组联用后,血浆及各组织药物浓度-时间曲线见图1。结果显示龙胆苦苷单独给药后分布迅速且广泛,组织达峰时间与血浆相近,约0.5h。肾脏和肝脏中药物峰浓度(C_{max})较高,并且给药后4h血浆、肝脏、肺脏和肾脏中药物浓度已接近零,体内消除较快,不易蓄积。联用醋柴胡后,高剂量醋柴胡显著增加了肝内龙胆苦苷的C_{max},增加幅度21.03%,同时还降低除肝脏外其他组织内龙胆苦苷的C_{max},以心、脾中降低最为显著,分别较空白组降低34.95%和34.27%;中剂量醋柴胡对心脏和肺脏内龙胆苦苷的C_{max}影响较小,降低了其他组织的C_{max};低剂量醋柴胡对血浆、心脏和肺脏影响微弱,增加了肝脏、脾脏和肾脏中龙胆苦苷的C_{max}。

2.7 靶向性评价 评价药物的靶向性可用靶向效



A. 血浆; B. 肝脏; C. 心脏; D. 脾脏; E. 肺脏; F. 肾脏

图 1 龙胆苦苷与醋柴胡各剂量组联用后小鼠血浆及各组织的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Drug concentration-time curves of gentiopicroside coadministered with different doses of vinegar-baked Bupleuri Radix in plasma and tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

率 (drug targeting efficiency, DTE), 总靶向系数 (overall targeting efficiency, Te), 相对摄取率 (relative uptake ratio, Re), 峰浓度比 (ratio of peak concentration, Ce) 和相对综合靶向效率 (relative targeting efficiency, RTE) 等表示, 基于上述一些指标之间存在数据交叉, 选择 Re 和 RTE 评价醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内不同组织中的靶向性。试验数据处理及作图应用 Excel 软件, 药动学分析程序为 DAS2.0, 药代动力学参数计算采用统计矩方法。结

果见表 1, 2。

$$Re = \frac{AUC_{\text{醋柴胡样品组}}}{AUC_{\text{空白组}}}$$

$$RTE = \frac{\left(\frac{AUC_{\text{某组织}}}{AUC_{\text{总}}}\right)_{\text{醋柴胡样品组}} - \left(\frac{AUC_{\text{某组织}}}{AUC_{\text{总}}}\right)_{\text{空白组}}}{\left(\frac{AUC_{\text{某组织}}}{AUC_{\text{总}}}\right)_{\text{空白组}}}$$

$$AUC_{\text{总}} = AUC_{\text{血浆}} + AUC_{\text{肝脏}} + AUC_{\text{心脏}} + AUC_{\text{脾脏}} + AUC_{\text{肺脏}} + AUC_{\text{肾脏}}$$

表 1 龙胆苦苷与醋柴胡各剂量组联用后小鼠血浆及各组织的相对摄取率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Re values of gentiopicroside coadministered with different doses of vinegar-baked Bupleuri Radix in plasma and different tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Re					
		血浆	肝脏	心脏	脾脏	肺脏	肾脏
醋柴胡	400	0.851 ± 0.114	1.043 ± 0.108	0.853 ± 0.116	0.883 ± 0.103	0.765 ± 0.173	0.762 ± 0.152
	800	0.801 ± 0.129	0.920 ± 0.115	0.983 ± 0.110	0.859 ± 0.121	0.962 ± 0.148	0.725 ± 0.127
	1 200	0.974 ± 0.151	1.037 ± 0.131	0.732 ± 0.084	0.737 ± 0.126	0.820 ± 0.135	0.608 ± 0.149

表 2 龙胆苦苣与醋柴胡各剂量组联用后小鼠血浆及各组织相对综合靶向效率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 RTE values of gentiopicroside coadministered with different doses of vinegar-baked Bupleuri Radix in plasma and different tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	RTE					
		血浆	肝脏	心脏	脾脏	肺脏	肾脏
醋柴胡	400	0.018 ± 0.015	0.248 ± 0.038	0.021 ± 0.025	0.058 ± 0.049	-0.084 ± 0.050	-0.088 ± 0.026
	800	-0.020 ± 0.009	0.125 ± 0.049	0.203 ± 0.021	0.051 ± 0.030	0.177 ± 0.012	-0.112 ± 0.011
	1 200	0.253 ± 0.050	0.333 ± 0.034	-0.058 ± 0.043	-0.052 ± 0.031	0.055 ± 0.037	-0.218 ± 0.039

由表 1 可知,醋柴胡对龙胆苦苣摄入量的影响作用受其剂量影响。低高剂量醋柴胡对肝脏龙胆苦苣摄入量影响不显著,但显著降低了除肝脏外其他组织中药物的分布,其中以肺脏和肾脏摄入降低最明显,均较空白组约降低 24%;醋柴胡高剂量组中脾脏、心脏和肾脏的药物摄入量均显著降低,肾脏最为突出,较空白组减少 39.2%;醋柴胡中剂量组小鼠各组织中药物的 Re 均 < 1,以肾脏分布降低最显著,摄入量降低达 27.5%。非靶向部位药物量的降低可降低药物的毒性,提示醋柴胡可降低药物在这些脏器的毒性。

由表 2 可知,醋柴胡 3 个剂量组均增加龙胆苦苣在小鼠肝脏内的分布,以低、高剂量组的肝靶向增强作用较明显。醋柴胡还显著降低了龙胆苦苣在肾脏的分布。此外,高剂量醋柴胡降低了心脏、脾脏中龙胆苦苣的分布,低剂量醋柴胡降低了肺脏中龙胆苦苣的 RTE,显示出一定的减毒效应。

3 讨论

《难病奇方系列丛书第二辑:龙胆泻肝汤》^[8]中提到:“龙胆草大苦大寒,为‘凉肝猛将’,本药泻火除湿,两善其功,故为方中主药。……肝者体阴而用阳,性喜舒泄条达而恶抑郁,火邪内郁则肝气不舒,若更以大剂苦寒降泄于下,则恐肝气被抑,故又用柴胡舒畅肝胆之气,并能引诸药归于肝经。”柴胡与龙胆草合用治疗肝病早已被广泛应用,但关于其引经作用尚无现代实验基础。本文以龙胆苦苣为研究对象,考察柴胡醋制后对药物在小鼠体内分布的影响,结果表明醋柴胡主要通过减少龙胆苦苣在其他组织分布而增加肝的 RTE,发挥其引经作用。

龙胆苦苣属环烯醚萜类成分,醋柴胡对其肝靶向性作用的结果与课题组前期研究醋柴胡对二苯乙烯类成分白藜芦醇、生物碱类成分氧化苦参碱和萜醌类成分大黄酸肝靶向增强作用的结果相似^[2-4],但醋柴胡对大黄酸、氧化苦参碱的作用显著强于龙胆苦苣和白藜芦醇,这主要与这 4 种药物本身体内分布情况不同有关。大黄酸、氧化苦参碱单独给药时在肝内分布少,而龙胆苦苣和白藜芦醇单独给药

时在肝内分布较多,醋柴胡对其影响便较小,提示醋柴胡的引经作用机制可能与药物转运蛋白有关。并且醋柴胡对龙胆苦苣的这种肝靶向增强作用受剂量影响,低、高剂量醋柴胡肝靶向增强作用明显。这一趋势与醋柴胡对大黄酸的影响一致,但与其对氧化苦参碱和白藜芦醇影响的剂量不同。醋柴胡作用于白藜芦醇时,中剂量醋柴胡对白藜芦醇的肝靶向增强效果显著;作用于氧化苦参碱时,则中、高剂量醋柴胡对其影响更显著,与本文结果有差异,由于 4 种药物结构各异,醋柴胡剂量的影响可能与药物本身性质、药物与机体亲和性等环境因素有关。醋柴胡的肝靶向增强作用证实了引经药的靶向效果。本文结果提示引经理论可能为靶向给药系统提供新思路,为传统中医药理论的继承创新提供理论依据,但其引药入肝的相关作用机制尚需深入研究。

[参考文献]

- [1] 太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 北京:人民卫生出版社,1985:308.
- [2] Zhao R Z, Liu S J, Mao S R, et al. Study on liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on resveratrol in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126(3):415-420.
- [3] Zhao R Z, Yuan D, Liu S J, et al. Liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on rhein in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(2):421-428.
- [4] Zhao R Z, Chen Y J, Cai J X. Liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on oxymatrine in mice[C]. Atlanta: International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops, 2011:740-745.
- [5] 刘古文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苣的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1):47-50.
- [6] 霍秀贞, 孙严彤, 朱盛山. 柴胡有效成分提取条件的研究[J]. 广东药学, 2005, 15(4):1-2.
- [7] 赵莹, 冯怡, 赵瑞芝. 小鼠组织中龙胆苦苣含量的液相色谱-串联质谱测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7):1580-1582.
- [8] 田峰, 王琳. 难病奇方系列丛书第二辑:龙胆泻肝汤[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2009:1-4.

[责任编辑 刘德文]