

赶黄草的指纹药动学

陀扬凌, 刘宇, 娄涛涛, 欧小洪, 张旭*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611175)

[摘要] 目的:通过研究赶黄草的指纹药动学,为揭示中药血清指纹成分群吸收、分布和代谢规律提供参考。方法:大鼠灌胃给药,眼静脉丛采血,用甲醇沉淀蛋白,采用 HPLC 分析血清样品,流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)梯度洗脱(0~70 min,10%~50% A;70~75 min,50%~10% A),检测波长 280 nm,柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹。建立赶黄草给药后血清样品的指纹图谱,确定入血成分。结果:发现 6 个入血成分,连续灌胃给药 3 d 后总入血成分浓度达到饱和,停药 36 h 后,基本代谢完全。结论:给药后血清中 6 个移行成分可能为赶黄草的药效物质基础;总入血成分药-时曲线变化规律与药物代谢动力学的吸收、分布、代谢过程类似,血清指纹成分群达到饱和时间较长,与中药起效慢、作用时间久的特点吻合,为中药的指纹药动学、药效物质基础及半衰期研究提供新思路。

[关键词] 赶黄草;血清指纹图谱;指纹药动学;药-时曲线;灌胃给药

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0085-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016030085

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151214.1609.002.html>

[网络出版时间] 2015-12-14 16:09

Fingerprint Pharmacokinetics of Aerial Part of *Penthorum chinense*

TUO Yang-ling, LIU Yu, LOU Tao-tao, OU Xiao-hong, ZHANG Xu*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province-Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611175, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal absorption, distribution and metabolic rule of serum fingerprint component group of traditional Chinese medicine by investigating fingerprint pharmacokinetic of *Penthorum chinense*. **Method:** Rats were administered orally, blood sampling by ophthalmic venous plexus, serum was separated by centrifugation. HPLC was employed to analyze serum samples with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid for gradient elution, flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 280 nm. Based on establishment of serum fingerprints of *P. chinense*, total constituents absorbed into blood were determined by comparing fingerprints of ethanol extract, medicated serum sample and blank serum sample. **Result:** Six components were found into the blood including three prototype components and three metabolic components. Concentration-time curves revealed that total concentration had reached saturation after 3 days and removed all components after 36 h. **Conclusion:** Six components may be basis for efficacy substances in *P. chinense*, change law of total concentration-time curves is similar with absorption, distribution and metabolism process in

[收稿日期] 20150623(009)

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(2010A036)

[第一作者] 陀扬凌,在读硕士,从事中药化学和中药质量控制研究,Tel:18384255763,E-mail:837920817@qq.com

[通讯作者] *张旭,博士,副教授,从事中药化学和中药质量控制研究,Tel:028-61800231,E-mail:16429511@qq.com

pharmacokinetics. Components group of serum fingerprint reaches saturation with long time, which is the same as traditional Chinese medicine (TCM) takes a slower effect and keep a long time. It can provide new ideas for fingerprint pharmacokinetics, pharmacodynamics material base and half-life study of TCM.

[Key words] *Penthorum chinense*; serum fingerprint; fingerprint pharmacokinetics; concentration-time curve; intragastrical administration

赶黄草功能清热、利尿、健脾、祛黄疸等,具有抗氧化^[1]、保肝^[2]、抑菌^[3]、抗突变^[4]、降血糖^[5]和降血脂^[6]等作用。临床用于治疗病毒性肝炎^[7-11]、肝纤维化^[12-13]、脂肪肝^[14]等疾病,疗效显著。现民间流行日常饮用赶黄草茶以预防酒精肝、脂肪肝等肝病。关于赶黄草的化学成分、含量测定及药理作用等研究已有文献报道^[1-6,15-16],但尚无其指纹药动学的研究报道。

中药指纹药动学即指纹药物动力学,是借助于动力学原理和现代分析手段,通过定性、定量解析药物指纹图谱,将可知化学成分的指纹和体内代谢过程从数量上联系起来,研究药物活性成分和有效部位在体内吸收、分布、代谢、排泄的动态变化规律^[17-18]。中药指纹药动学适合于研究中药或中药复方整体有效物质在体内的变化过程,追踪中药药效物质群。由于中药指纹药动学技术尚处于起步阶段,各方面有待探索与充实,本实验以赶黄草为例,对其指纹药动学进行研究,为寻找和追踪中药药效物质群提供新思路和方法。

1 材料

AnkeTDL-60C 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),H2020R 型台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司),MTN-2800W 型氮气吹干仪(上海巴玖实业有限公司),1500 系列高效液相色谱仪(美国 SSI 公司),DV215CD 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

赶黄草购买于荷花池药材市场,经成都中医药大学马俞英教授鉴定系赶黄草 *Penthorum chinense* 的地上部位,样本保存于成都中医药大学科技楼 606 实验室。试验用水为乐百氏纯净水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SFP 级 SD 大鼠,体重(250 ± 20) g,雄性,由成都达硕实验动物中心提供,合格证号 SCXK(川)2009-124 空调控制室温约 22 ℃,相对湿度 40% ~ 50%,通风条件良好,环境相对安静。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)

梯度洗脱(0 ~ 70 min, 10% ~ 50% A; 70 ~ 75 min, 50% ~ 10% A),检测波长 280 nm,柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备

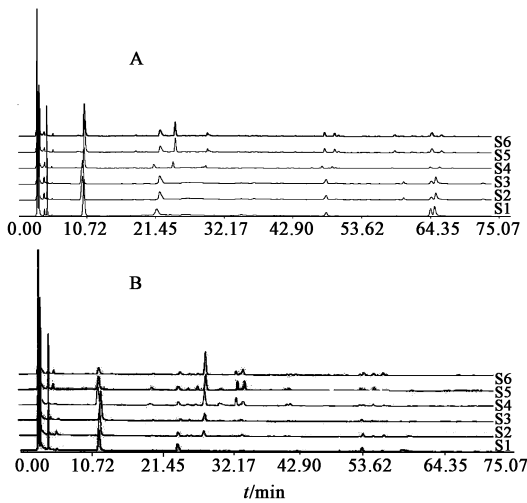
2.2.1 灌胃液的制备^[19] 精密称定赶黄草粉末(过 60 目筛)适量,分别加 10, 8, 8 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,提取时间分别为 2, 1, 1 h,过滤,减压浓缩得浸膏。配成 1 g·mL⁻¹ 赶黄草醇提物混悬液,供灌胃用。

2.2.2 供试液的制备 取赶黄草醇提物浸膏,用甲醇配成 0.1 g·mL⁻¹ 溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 采血方法及血清供试液的制备 从大鼠眼静脉丛取血约 0.5 mL 置于 1.5 mL 离心管中,置 37 ℃ 水浴加热 10 min,离心(3 500 r·min⁻¹, 10 min, 下同),分离血清。取血清 0.2 mL 置于 1.5 mL 离心管中,加入甲醇 0.3 mL,涡旋震荡 60 s,离心,分离上清液;沉淀物加甲醇 0.3 mL 重复处理 1 次。合并上清液,氮气吹干。加甲醇 40 μL,涡旋震荡 60 s,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液供 HPLC 分析用。

2.3 灌胃给药方案考察 取同批大鼠 6 只,随机分为低、中剂量组,大鼠给药量按动物与人体表比换算法,大鼠日服量 = 人日服量 × 大鼠与人的体表比 = 30 × 0.018 ≈ 0.5 g^[20]。低、中剂量组分别相当于成人临床最大剂量的 10, 20 倍,灌胃剂量分别为 5, 10 mL·kg⁻¹。未灌胃给药前取空白血。连续灌胃给药 5 d,每天 1 次,每天在灌胃后 0.5 h 从大鼠眼静脉丛处取血并检测,见图 1。低剂量组在第 3 天检测出移行成分,第 5 天成分最多;中剂量组在第 1 天检测出移行成分,第 3 天成分最多,至第 5 天成分数量不变,说明给药 3 d,赶黄草入血成分到达饱和状态。故灌胃给药方案为按 10 mL·kg⁻¹ 连续灌胃大鼠 3 d,每天 1 次。

2.4 血清指纹图谱研究 取同批大鼠 6 只,未灌胃给药前取空白血。按 2.3 项下方法灌胃,于最后一次灌胃给药 1 h 后按 2.2.3 项下方法取血及制备血清样品,照 2.1 项下色谱条件测定,建立血清指纹图



S1. 空白血清; S2 ~ S6 分别为第 1, 2, 3, 4, 5 天的含药血清
图 1 赶黄草低剂量组(A)和中剂量组(B)血清样品的 HPLC
Fig.1 HPLC chromatograms of serum sample with low (A) and middle (B) dose group of *Penthorum chinense*

谱,见图 2,3。结果血清指纹图谱有 13 个共有峰,7 个内源性成分(峰号分别为 1, 2, 5, 8, 10, 12, 13), 6 个移行成分(峰号分别为 3, 4, 6, 7, 9, 11), 其中 6, 9, 11 号峰为药材原型成分。

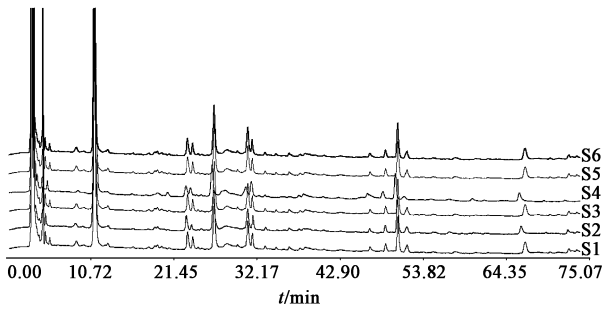


图 2 6 批赶黄草血清样品指纹谱
Fig.2 Fingerprint chromatograms of rat serum samples after being administrated 6 batches of *Penthorum chinense*

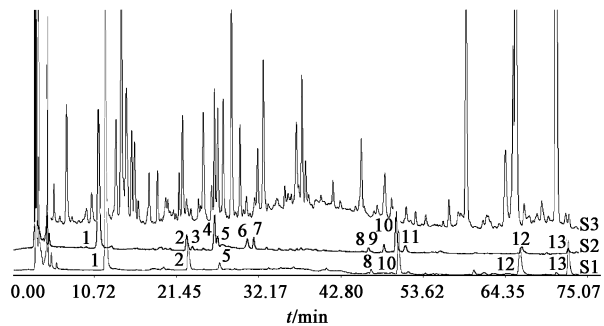
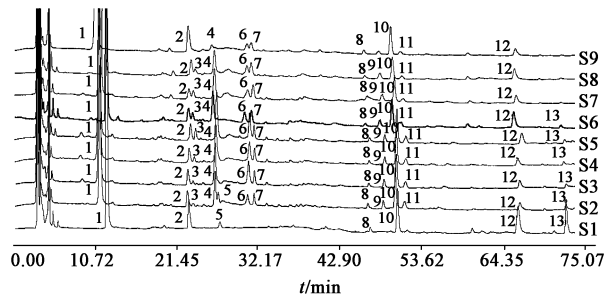


图 3 空白血清(S1),赶黄草血清样品(S2)及药材(S3)的 HPLC
Fig.3 HPLC fingerprint of rat serum after being administered *Penthorum chinense* (S2) and blank serum (S1) and *Penthorum chinense* (S3)

2.5 赶黄草指纹药动学的研究

2.5.1 给药过程中入血成分群总峰面积相对平稳的时间 取同批大鼠 6 只,未灌胃给药前取空白血。按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续灌胃 7 d,每天灌胃后 0.5 h 于大鼠眼静脉丛按 2.2.3 项下方法取血及制备血清样品,按 2.1 项下色谱条件测定,采集数据,绘制 6 个人血成分色谱峰总面积的药-时曲线,结果显示在第 1 ~ 3 天逐渐增长,第 3 ~ 7 天曲线相对平稳,说明第 3 天时赶黄草入血成分被吸收达饱和状态。

2.5.2 停药后入血成分群代谢变化研究 取同批大鼠 6 只,未灌胃给药前取空白血。按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续灌胃 3 d,每天 1 次。于最后 1 次灌胃给药后按不同时间点(0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h)从大鼠眼静脉丛取血并测定,观察入血成分峰面积变化情况。结果停药后 24 h 内检测到 6 个人血成分(峰号分别为 3, 4, 6, 7, 9, 11), 六者在不同时间点的总峰面积分别为 240 304, 276 897, 288 212, 369 655, 257 135, 240 616, 187 569, 57 276。见图 4。说明停药后 4 h 达最大血药浓度,36 h 仅检测出 4 个移行成分,且总峰面积较小。赶黄草指纹药动学研究显示其规律与药物代谢动力学的吸收、代谢相似。



S1. 空白血清; S2 ~ S9 分别为停药后 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h 的含药血清
图 4 赶黄草停药后不同时间点的含药血清 HPLC 指纹谱
Fig.4 HPLC fingerprints of drug-containing serum at different time after stopping administration of *Penthorum chinense*

3 讨论

实验动物未曾禁食,采用多次灌胃给药方式,以便与人体用药方式相同。预试验设计了高、中、低 3 个剂量组,但由于高剂量组在实验第 2 天便出现了动物死亡现象,故撤销高剂量组。采用 HPLC 对比含药血清、空白血清和药材的指纹图谱,确定了入血成分,由于采用 UV 检测器,有遗漏入血成分检出之虑,后续将采用 UPLC-MS 研究中药指纹药动学。

通过建立赶黄草在大鼠血清中移行成分的指纹图谱,考察血清化学成分色谱峰的总面积与时间的

关系,从而揭示中药入血成分群的吸收代谢规律,为中药半衰期研究提供新思路。中药成分复杂,其疗效的发挥是多种成分协同作用的结果,中药口服给药形式注定入血成分才能产生作用,而通过指纹药动学揭示中药整体入血成分在体内的吸收分布代谢规律,可更客观和全面地反映了中药有效成分群在体内的药动学过程,可对入血化学成分进行分离与鉴定,明确入血成分化学结构后,再作相应的药理学筛选,为追踪和研究中药药效物质群提供新方法,并大大提高寻找中药药效物质的效率,为指导中药临床用药提供参考。

[参考文献]

[1] Kapoor S. Comment on isolation and identification of compounds from *Penthorum chinense* Pursh with antioxidant and antihepatocarcinoma properties; pinocembrin and its rapidly emerging neuroprotective effects[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(6):1416.

[2] Zhang T T, Xu X L, Jiang M H, et al. Hepatoprotective function of *Penthorum chinense* Pursh[J]. *Food Funct*, 2013, 4(11):1581-1585.

[3] 雷娇,肖茂,朱锐,等. 赶黄草不同溶剂提取物抑菌活性的初步探讨[J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(8):29-30.

[4] 丁庆. 扯根菜总皂苷及其抗肝炎和抗突变作用:中国, CN1657534[P]. 2005-08-24.

[5] 孙连娜,黄豆豆,李君丽,等. 赶黄草提取物在制备降血糖药物中的应用:中国, CN103638073A[P]. 2014-03-19.

[6] 郭美丽,王燕. 一种扯根菜提取物及其制备方法和用途:中国, CN1102093459A[P]. 2011-06-15.

[7] 余光开,刘声隆,彭建一,等. 赶黄草治疗小儿急性黄疸型肝炎 54 例临床疗效观察[J]. *泸州医学院学报*, 1988, 11(2):11.

[8] 余光开,彭建一,江南. 肝酶灵对病毒性肝炎血清谷丙转氨酶作用的临床观察[J]. *泸州医学院学报*, 1989, 12(4):250-253.

[9] 四川省赶黄草治疗急性黄疸型肝炎临床协作组. 赶黄草治疗急性黄疸型肝炎 117 例临床疗效观察[J]. *泸州医学院学报*, 1985, 8(3):187-191.

[10] 陈建芳,杨志贤,张国朝. 肝苏颗粒治疗慢性乙型肝炎 64 例[J]. *四川医学*, 2002, 23(12):3.

[11] 刘以霞,俞文军. 肝苏颗粒治疗慢性乙型肝炎临床观察[J]. *山西中医*, 2011, 27(12):16.

[11] 洪定玲. 肝苏颗粒治疗黄疸性肝病临床效果观察[J]. *中国医师杂志*, 2002, 4(5):550.

[12] 吴圣东,邹波. 肝苏颗粒治疗慢性肝病纤维化 56 例疗效观察[J]. *青岛医药卫生*, 2003(1):15-16.

[13] 陈英杰. 赶黄草对乙肝肝纤维化的疗效及对 HSC 影响的研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2008.

[14] 陈朝俊,李淑英. 肝苏颗粒合脂必妥胶囊治疗脂肪肝 32 例[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2003, 11(4):235-236.

[15] 冯浩,王智民,董歌扬,等. 赶黄草化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 2001, 26(4):260-262.

[16] 肖丽萍,宋洋洋,周彦希,等. 赶黄草抗非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(10):125-129.

[17] 杨义芳,萧伟. 基于多成分多靶点的中药药动药效相关性研究解读与策略[J]. *中草药*, 2013, 44(12):1521-1528.

[18] 孙国祥,毕开顺. 中药指纹图谱学体系在中药创制中的作用[J]. *色谱*, 2008, 26(2):172-179.

[19] 田秀峰,杨建,杜守颖,等. 肝苏泡腾片中有效成分提取工艺优选[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(7):603-605.

[20] 肖秋元. 大承气汤的血清药物化学研究[D]. 成都:西南交通大学, 2010.

[责任编辑 刘德文]