

葛根与复方脑脉通给药后大豆苷元在大鼠体内的药动学比较

刘冬云¹, 朱国雪¹, 吴纯伟¹, 容悦莹¹, 朱婉婷¹, 冯素香², 王淑美^{1*}

- (1. 广东药学院 中药学院, 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广东高校中药质量工程技术研究中心, 广州 510006;
2. 河南中医学院, 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046)

[摘要] 目的:比较复方脑脉通和葛根药材提取物中大豆苷元在大鼠体内的药代动力学参数,评价复方脑脉通提取物中其他成分对大豆苷元药动学的影响。方法:将 12 只大鼠随机分成 2 组,按大豆苷元 $1.002\ 5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 分别灌胃给予复方脑脉通提取物和葛根提取物,不同时间点采血后进行 UPLC-MS 分析,测定血浆中大豆苷元浓度,采用 DAS 2.0 软件计算主要药动学参数,通过 SPSS 16.0 软件对不同药动学参数进行单因素方差分析。结果:大豆苷元线性范围 $6.175\sim 741.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限 $6.175\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,最低检测限 $1.235\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。复方脑脉通和葛根药材提取物中大豆苷元的达峰浓度和清除速率有显著性差异,其他参数则均无显著性差异。结论:建立的 UPLC-MS 专属性强、准确、灵敏,适用于以大豆苷元为主要成分的药物的体内血药浓度测定。复方脑脉通中其他药材对大豆苷元的吸收及清除有较大影响,使大豆苷元的达峰浓度及清除速率降低。

[关键词] 复方脑脉通; 葛根; 大豆苷元; 橙皮苷; 药物代谢

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0081-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030081

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151214.1611.006.html>

[网络出版时间] 2015-12-14 16:11

Comparison on Pharmacokinetics of Daidzein in Rats After Gavage of Puerariae Lobatae Radix and Compound Naomaitong

LIU Dong-yun¹, ZHU Guo-xue¹, WU Chun-wei¹, RONG Yue-ying¹,
ZHU Wan-ting¹, FENG Su-xiang², WANG Shu-mei^{1*}

- (1. Guangdong Academies Traditional Chinese Medicine (TCM) Quality Engineering Technology Research Center, Key Laboratory of State Administration of TCM for Digital Quality Evaluation Technology of TCM, School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an UPLC-MS method for determining the content of daidzein in rat plasma, and compare pharmacokinetic parameters of daidzein in rats after gavage of compound Naomaitong and Puerariae Lobatae Radix extract for evaluating effects of other ingredients in compound Naomaitong extract on pharmacokinetics of daidzein. **Method:** Twelve rats were randomly divided into two groups, gastric gavage of compound Naomaitong and Puerariae Lobatae Radix extract according to $1.002\ 5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of daidzein, plasma samples collected at different time, and then using UPLC-MS to determine plasma concentrations of daidzein, pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 software, and its one-way ANOVA with SPSS 16.0 software. **Result:** There was a good linearity over concentration ranges of $6.175\sim 741.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, limit of quantitation was

[收稿日期] 20150701(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073024,81050019)

[第一作者] 刘冬云,在读硕士,从事中药质量控制研究,Tel:15838224379,E-mail:dongyunyw@163.com

[通讯作者] *王淑美,博士,教授,从事中药质量控制研究,Tel:020-39352559,E-mail:shmwang@sina.com

6.175 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, the lowest detection limit was 1.235 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. C_{max} and CL/F of daidzein from compound Naomaitong and Puerariae Lobatae Radix extract were significantly different, the other parameters were not significantly different. **Conclusion:** This UPLC-MS is sensitive, accurate, specific and applicable to determine *in vivo* plasma concentration of drug with daidzein as a main ingredient. Other ingredients in compound Naomaitong extract have a great impact on absorption and removal of daidzein, so that C_{max} and CL/F of daidzein decrease.

[**Key words**] compound Naomaitong; Puerariae Lobatae Radix; daidzein; hesperidin; drug metabolism

脑中风是严重危害人类健康和生命安全的常见难治性疾病,具有发病率高、致残率高、死亡率高的特点^[1]。中医认为中风病的病机可表现在“风”、“火”、“痰”、“虚”、“瘀”等多方面^[2]。复方脑脉通是河南中医学院李建生教授根据多年的中医临床用药实践经验并结合中医药配伍理论,以降浊通腑、益气活血、解毒祛瘀为法则,由大黄、人参、川芎、葛根按 9:9:6:6 组成,前期经临床和药理实验表明该方抗脑缺血损伤的效果很好^[3-5],用于治疗缺血性脑中风的疗效确切且安全。方中葛根与大黄相配,一升一降,调畅气机,其气升,则引诸药上行而化脑脉之瘀,并使脑窍得养;其气降,则浊气下行而瘀毒得以下排出。大豆苷元是葛根的有效活性成分之一,具有明显改善心血管功能、降低胆固醇、抗骨质疏松、抗肿瘤等作用^[6-8]。另有研究表明大豆苷元具有脑缺血再灌注损伤的保护作用^[9],药用价值较高。大豆苷元的测定方法有薄层荧光扫描法、反相高效液相色谱法、高效液相色谱-柱后修饰荧光检测法等^[10-14]。本实验建立了大鼠血浆中大豆苷元浓度的液质联用测定方法,通过对比研究单方葛根与复方脑脉通给药后大豆苷元的体内药动学参数变化,揭示配伍用药后复方中其他成分对大豆苷元的体内药动学特征的影响,为复方脑脉通的配伍规律研究奠定基础。

1 材料

Q-Exactive 型质谱仪和 Multifuge X1R 型高速低温离心机(美国 Thermo Fisher 公司),ME 204E/02 型电子分析天平和 AB135-S 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),L-128 型氮吹浓缩仪(北京来亨科贸有限责任公司)。

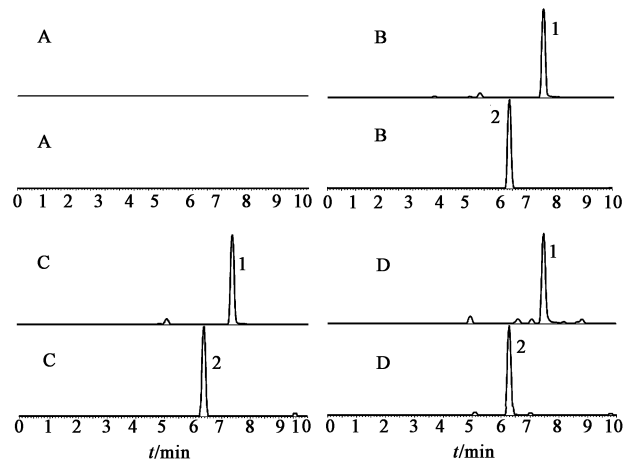
大豆苷元、橙皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111502-200402, 110702-201316),甲醇为色谱纯,乙酸铵为质谱纯。大黄、人参、川芎、葛根均购于广州致信药业有限公司,经广东药学院刘基柱副教授鉴定分别为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* 的干燥根和根茎,五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根和根茎,伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎,豆科植物野葛

Pueraria lobata 的干燥根。

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重(250 ± 20) g,购于山东鲁抗医药股份有限公司质控中心,合格证号 SCXK(鲁)2013-0001。实验前至少饲养 7 d 以适应环境。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与质谱条件 色谱条件为 Venusil MP C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相甲醇(A)-3 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 30% ~ 60% A; 5 ~ 10 min, 60% ~ 30% A),流速 0.3 mL·min⁻¹。质谱条件为离子源为电喷雾离子化源(ESI),载气为氮气,鞘气压力 3.5 × 10⁶ Pa,辅助气压力 1.0 × 10⁶ Pa,喷雾电压 3.50 kV(+)和 2.80 kV(-),毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,辅助气加热温度 200 $^{\circ}\text{C}$,分辨率 70 000,扫描方式为全扫(fullscan)模式,正离子和负离子方式同时检测。待测成分及内标用于定量分析的离子分别为 m/z 253.050 6(大豆苷元)和 m/z 609.182 4(橙皮苷)。见图 1。



A. 空白血浆; B. 加入大豆苷元和内标的模拟血浆; C. 单方给药后 15 min 的血浆; D. 复方给药后 15 min 的血浆; 1. 大豆苷元; 2. 橙皮苷

图 1 葛根与复方脑脉通提取物给药后血浆样品 UPLC-MS
Fig. 1 UPLC-MS chromatograms of plasma samples after intragastric administration of compound Naomaitong and Puerariae Lobatae Radix extract

2.2 溶液的配制 精密称取大豆苷元对照品适量,

置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得 247.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品储备液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用。精密称取橙皮苷适量,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解配制 194.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标储备液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用。

2.3 复方与单方灌胃液的制备^[15-17] 精密称取葛根单味药 4.8 g,置于 100 mL 量瓶中,加 10 倍量 60% 乙醇水浴回流 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,浓缩至 20 mL,得葛根单味药灌胃液(大豆苷元 100.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。按处方比例分别精密称取大黄 3.6 g,人参 3.6 g,葛根 2.4 g,川芎 2.4 g,置于 250 mL 量瓶中,加 10 倍量 60% 乙醇水浴回流 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,浓缩至 20 mL,得复方脑脉通灌胃液(大豆苷元 100.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.4 给药及采血 12 只大鼠随机分成 2 组,给药前禁食 12 h,自由饮水。分别按 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给予复方灌胃液和葛根灌胃液,分别于给药后 5, 15, 30, 45 min 和 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 尾静脉取血 0.5 mL,置于肝素化离心管中,轻轻混匀,5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血浆, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待测。

2.5 血浆样品预处理 取血浆样品 200 μL 置于 2.0 mL 离心管中,加入内标溶液 50 μL ,混匀后加甲醇 800 μL ,涡旋 1 min,振荡 10 min,在 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离上清液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加流动相 100 μL 充分溶解试管中的残留物,涡旋 1 min,振荡 10 min,15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 次,每次 10 min,取上清液 80 μL 进样分析。

2.6 方法学验证

2.6.1 线性关系考察 取空白血浆 200 μL 加入大豆苷元对照品溶液,配成质量浓度为 1.235, 6.175, 24.7, 98.8, 185.25, 555.8, 741.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆标准曲线样品,其余按 2.5 项下方法操作,按 2.1 项下色谱条件分析,以大豆苷元与内标物峰面积的比值为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.186X + 0.182 (R^2 = 0.9924)$ 。线性范围 6.175 ~ 741.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限 6.175 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,最低检测限 1.235 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6.2 精密度与准确度 取空白血浆加入大豆苷元对照品溶液,制备质量浓度分别为 49.4, 247.0, 494.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆质控样品,按 2.5 项下方法处理,按 2.1 项下色谱条件分析 ($n = 6$),连续测定 3 d,计算日间和日内精密度;将实测值与真实值相比,计算准确度,结果 RSD 均 $< 6.0\%$ 。

2.6.3 提取回收率 取 2.6.2 项下质控样品 ($n = 6$),按 2.5 项下方法处理;另取大鼠空白血浆 200 μL ,除不加对照品溶液和内标溶液外,其他操作同 2.5,向上清液中加入大豆苷元对照品溶液,使其质量浓度分别为 49.4, 247.0, 494.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,各加入内标溶液 50 μL ,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干,残渣用 100 μL 流动相溶解,经涡旋、振荡、离心后进样分析,计算提取回收率分别为 94.2%, 95.5%, 97.8%, RSD 依次为 7.1%, 5.4%, 2.6%。

2.6.4 基质效应 取大鼠空白血浆 200 μL ,除不加对照品溶液和内标溶液外,其他按 2.5 项下同样方法处理,向上清液中加入大豆苷元对照品溶液,使其质量浓度分别为 49.4, 247.0, 494.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,各加入内标溶液 50 μL ,涡旋混合,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加流动相 100 μL 溶解后进样分析 ($n = 6$);同时另取相应浓度的大豆苷元对照品溶液 100 μL 和内标溶液 50 μL ,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加流动相 100 μL 溶解后进样分析。计算基质效应分别为 98.9%, 107.1%, 97.9%, RSD 依次为 10.5%, 4.2%, 5.1%。

2.6.5 稳定性考察 取空白血浆加入大豆苷元对照品溶液,制备质量浓度为 49.4, 247.0, 494.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆质控样品 ($n = 3$),考察室温放置 12 h, 3 次冻融循环和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏 15 d 的稳定性,按 2.1 项下色谱条件测定,结果 RSD 均 $< 10.0\%$ 。

2.7 药动学研究 大鼠 1 次灌胃复方脑脉通和葛根单味药提取物的血药浓度数据用 DAS 2.0 软件进行处理,得大豆苷元的主要药动学参数见表 1,药时曲线见图 2。采用 SPSS 16.0 统计学程序进行单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时表明 2 组参数具有显著性差异。结果表明灌胃复方脑脉通提取物与葛根单味药提取物相比,达峰浓度 (C_{max}) 与清除速率 (CL/F) 显著降低,其他参数则无显著性差异。

表 1 大鼠血浆中大豆苷元的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of daidzein in rat plasma ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	葛根单味药	复方脑脉通
$T_{1/2}/\text{h}$	7.339 \pm 6.436	9.875 \pm 1.815
T_{max}/h	5.000 \pm 1.095	6.000 \pm 2.191
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	118.003 \pm 81.293	32.922 \pm 8.210
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	670.881 \pm 321.965	468.484 \pm 132.696
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{h}$	11.754 \pm 10.945	16.430 \pm 2.419
$\text{CL}/F/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	4.619 \pm 2.384	2.158 \pm 0.762

3 讨论

大鼠的采血方法有心脏采血、鼠尾刺血法、眼眶

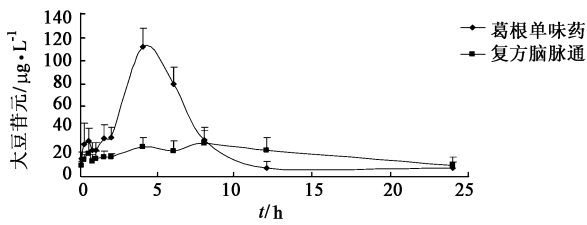


图 2 大鼠灌胃葛根和复方脑脉通提取物后大豆苷元的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves of daidzein in rats after administering extract of compound Naomaitong and Puerariae Lobatae Radix ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

后动、静脉取血法、腹主动脉取血等。但这些方法首先需要麻醉大鼠,其次操作比较复杂,对大鼠的损伤较大,易导致大鼠死亡,且采血次数有限。根据实验采血点的要求,查阅相关文献^[18-19],最终确定断尾取血。与其他采血方法相比,断尾取血不需要麻醉大鼠直接取血,操作简单;鼠尾可充分消毒,保证血液样本的清洁;不经麻醉取血使实验更趋真实、准确可靠。

本文采用 LC-MS 测定,扫描方式为 fullscan 模式,正离子和负离子方式同时检测。最终选定 m/z 253.050 6 [M - H]⁻ 作为大豆苷元的检测离子, m/z 609.182 4 [M - H]⁻ 作为内标的检测离子。考察了 3 种不同系统的梯度洗脱,结果表明大豆苷元及内标的峰形和响应在甲醇-3 mmol·L⁻¹ 乙酸胺条件下均比甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水条件下好。

生物样品要经过复杂的前处理过程,在前处理过程中加入内标物,可减小处理过程中引起的误差,因此选择内标十分必要而且重要。复方脑脉通中化合物成分主要有大黄蒽醌类、葛根黄酮类、人参皂苷类等,预试验分别考察了对乙酰氨基酚、橙皮苷、苯甲酸等。最终发现选用橙皮苷时基质效应和提取回收率均符合要求,不影响被测成分的含量测定,且保留时间适宜,峰形较好,故确定橙皮苷为内标。

本文探索了直接沉淀法,采用的沉淀试剂为甲醇和乙腈,用量均为 1:4,加入沉淀试剂后涡旋、振荡、离心,通过考察基质效应和提取回收率,结果表明采用甲醇沉淀蛋白,杂质干扰较小,基质效应及回收率符合生物样品的检测要求。

C_{max} 和 CL/F 显著变化表明复方配伍后大豆苷元的体内过程发生了一定的变化,表明复方中其他成分会影响大豆苷元在大鼠体内的吸收,致使大鼠体内大豆苷元血药浓度降低;配伍后清除速率降低,延长了大豆苷元体内作用时间,但引起配伍变化的具体因素还有待进一步研究证实。提示复方脑脉通

中其他成分对大豆苷元的药动学变化有较大影响,为该方的配伍规律研究奠定了一定基础。

[参考文献]

[1] 韩旭,刘黎青. 中医药治疗脑卒中的研究进展[J]. 中医药信息, 2014, 7(31): 193-195.

[2] 林森. 缺血性中风的中西医结合治疗研究进展[J]. 中医药导报, 2011, 17(3): 119-121.

[3] 王明航,李建生,刘轲,等. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血再灌注血-脑脊液屏障损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(9): 1211-1212.

[4] 任小巧,李建生. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血/再灌注损伤脑保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(1): 66-69.

[5] 李建生,刘敬霞,张新峰,等. 脑脉通对骨髓干细胞动员保护大鼠脑缺血损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 7(30): 1832-1836.

[6] 韩静,王伟,王绿娅,等. 葛根素与大豆苷元对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 437-440.

[7] 李培恒,王继峰,牛建昭,等. 染料木素和大豆苷元对去卵巢大鼠甘油三酯代谢的作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 72-74.

[8] 李湘辉,张金超,肖培根,等. 豆异黄酮类防治骨质疏松的作用机制[J]. 国外医药·植物药分册, 2006, 21(1): 1-5.

[9] 钟声,李泽玲,钟星明,等. 大豆苷元对异丙肾上腺素所致心肌肥厚与抗氧化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 204-206.

[10] 周晓霞. 葛根、粉葛药材中大豆苷元含量的测定[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2732-2734.

[11] 周红英,王建华,闫风云. RP-HPLC 分离测定甘葛藤茎叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 937-939.

[12] 白永涛,文红梅,周华,等. UPLC 法测定大鼠血浆中大豆苷元浓度及药代动力学研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(11): 1512-1515.

[13] 师永晶,王荣顺. 大豆苷元固体分散体在小鼠体内的药动学研究[J]. 北方药学, 2014, 11(4): 82.

[14] 李力,翟学佳,陈东生. 通脉方中葛根素和大豆苷元在大鼠体内药动学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(15): 1258-1261.

[15] 国海东,上官新晨,尹忠平. 葛根异黄酮提取工艺研究[J]. 工艺技术, 2014, 35(6): 87-90.

[16] 梁丽谊,王汝上. 葛根总黄酮提取工艺优化研究[J]. 今日药学, 2014, 24(12): 866-872.

[17] 杨帆,王淑美,林捷欣. 葛根总黄酮提取工艺的考察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(3): 156-157.

[18] 田顺亮,钱学华. 大鼠断尾取血固定装置的设计及取血的方法[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(7): 419-421.

[19] 李侠,李绍平. 实验大鼠连续断尾取血法的报告[J]. 医学综述, 2007, 13(24): 2046.

[责任编辑 刘德文]