

· 药物代谢 ·

吴茱萸对黄连有效成分在大鼠体内组织分布的影响

梁瑞峰¹, 张峰¹, 李更生^{1*}, 时丽菲^{1,2}

(1. 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 考察吴茱萸对左金丸中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱在大鼠组织中分布动力学的影响, 探讨吴茱萸的引经作用机制。方法: 大鼠分别灌胃给予黄连、黄连吴茱萸合煎液, 于给药后不同时间点采集组织样本, 利用 UPLC-MS/MS 测定组织中 3 种黄连生物碱类成分的经时变化, 采用 DAS 2.0 软件计算组织分布动力学参数、相对摄取率 (Re) 和峰浓度比 (Ce)。结果: 左金丸组大鼠肝组织中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的药-时曲线下面积分别为 (7 051. 268 ± 518. 354), (2 179. 139 ± 195. 617) ng·g⁻¹·h, 药峰浓度分别为 (1 645. 961 ± 129. 862), (383. 889 ± 19. 526) ng·g⁻¹, 与黄连组比较显著增加。3 种生物碱类成分的在肝中 Re 分别为 1. 338, 1. 475 和 1. 065, Ce 分别为 1. 548, 1. 751 和 1. 369; 肺中 Re 分别为 0. 985, 0. 780 和 0. 930, Ce 分别为 0. 834, 1. 051 和 0. 905。结论: 吴茱萸可能是通过增加黄连生物碱类成分在大鼠肝中分布和减少其在肺中分布来发挥引经作用。

[关键词] 吴茱萸; 黄连; 引经; 组织分布; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马汀; 盐酸药根碱

[中图分类号] R969. 1; R284. 1; R945; R284. 2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0089-05

[doi] 10. 13422/j. cnki. syfjx. 2016230089

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0909.006.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:09

Effect of Euodiae Fructus on Tissue Distribution of Active Components from Coptidis Rhizoma in Rats

LIANG Rui-feng¹, ZHANG Feng¹, LI Geng-sheng^{1*}, SHI Li-fei^{1,2}

(1. Henan Province Chinese Medicine Research Institute, Zhengzhou 450004, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Euodiae Fructus on tissue distribution kinetics of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and jatrorrhizine hydrochloride from Coptidis Rhizoma in rats. **Method:** Rats were administered respectively by Coptidis Rhizoma and decoction of Coptidis Rhizoma and Euodiae Fructus. Tissue samples were collected at different time after administration. The variation of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and jatrorrhizine hydrochloride with time was determined by UPLC-MS/MS. The kinetic parameters, relative uptake rate (Re) and peak concentration ratio (Ce) were calculated by DAS 2.0 software. **Result:** In group of decoction of Coptidis Rhizoma and Euodiae Fructus, AUC_{0-∞} of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride distributed in the liver tissues were (7 051. 268 ± 518. 354), (2 179. 139 ± 195. 617) ng·g⁻¹·h, C_{max} were (1 645. 961 ± 129. 862), (383. 889 ± 19. 526) ng·g⁻¹; compared with the Coptidis Rhizoma group, they were increased significantly. Re of these three alkaloids in liver were 1. 338, 1. 475 and 1. 065, Ce of them in liver were 1. 548, 1. 751 and 1. 369, Re of them in lung were 0. 985,

[收稿日期] 20160111(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403124)

[第一作者] 梁瑞峰, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理及中药药性研究, Tel:13523599546, E-mail:hnsxm009@163.com

[通讯作者] *李更生, 博士, 研究员, 从事中药物质基础和药性研究, Tel:13663838889, E-mail:lgshn1962@163.com

0.780 and 0.930, Ce of them in lung were 0.834, 1.051 and 0.905. **Conclusion:** Euodiae Fructus has properties of reducing the distribution of alkaloids from Coptidis Rhizoma in the lung and increasing their distribution in the liver.

[**Key words**] Euodiae Fructus; Coptidis Rhizoma; leading action; tissue distribution; berberine hydrochloride; palmatine hydrochloride; jatrorrhizine hydrochloride

左金丸仅由黄连、吴茱萸 2 味药组成,功效清泻肝火、降逆止呕。方中吴茱萸除了有疏肝下气、反制黄连寒性的作用外,还有引药入肝的引经作用。药效学实验研究表明吴茱萸可增强左金丸整方的疗效^[1]。目前有关黄连与吴茱萸配伍的研究主要集中在寒热药性、药效及配伍引起的化学成分变化等方面^[2-4],关于吴茱萸引经作用对黄连的影响则未见报道。

中医理论认为,引经药可改变其他药物的作用方向,使其作用侧重或集中于特定的部位,使药效靶向集中,从而提高疗效。有关引经药的研究存在着截然相反的观点,支持者认为引经药经历代医家临床验证形成的中医理论,常作为方剂的组成,不应轻易予以否决;而反对者则认为方中加入 1 味引经药难以改变其他药物在各经络脏腑中的药效,是不可取的理论^[5]。现代药物研究认为,在一定范围内,药物的效应与靶组织中分布浓度成正相关。故本实验拟通过比较吴茱萸与黄连配伍前后大鼠组织中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱的分布动力学变化,研究吴茱萸对黄连中生物碱类成分在组织内动态分布的影响,从药物组织分布的角度认识吴茱萸的引经作用及其机制。

1 材料

ACQUITY 型超高效液相色谱仪和 Xevo TQS 型三重四级杆串联质谱仪(美国 Waters 公司),T18 型匀浆机(德国 IKA 公司),BF2000M 型氮吹仪(北京八方世纪科技有限公司),2K15 型高速离心机(美国 Sigma 公司)。吴茱萸、黄连均购自河南省顺康医药有限公司,经河南省中医药研究院中药研究所马开副研究员鉴定分别为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* 的干燥未成熟果实和毛茛科植物黄连 *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,批号分别为 110713-201212,10733-201108,110732-201108),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠,180 ~ 200 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)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 药液的制备^[6-7] 称取黄连适量,加 8 倍量 50% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并滤液,减压回收乙醇,浓缩成 $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄连提取液(以生药量计,下同)。按黄连-吴茱萸(6:1)称取药材适量,加 8 倍量 50% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并滤液,减压回收乙醇,浓缩成黄连质量浓度 $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和吴茱萸质量浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的左金丸提取液。

2.2 动物分组与给药 SD 大鼠 80 只,随机分为黄连组、左金丸组,每组 40 只,分别按 $6, 7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予黄连提取液、左金丸提取液,每天给药 1 次,连续给药 5 d,各组大鼠于末次给药后 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 420 min 每个时间点随机取 5 只水合氯醛麻醉后取心、肝、肺、肾、胃、小肠。

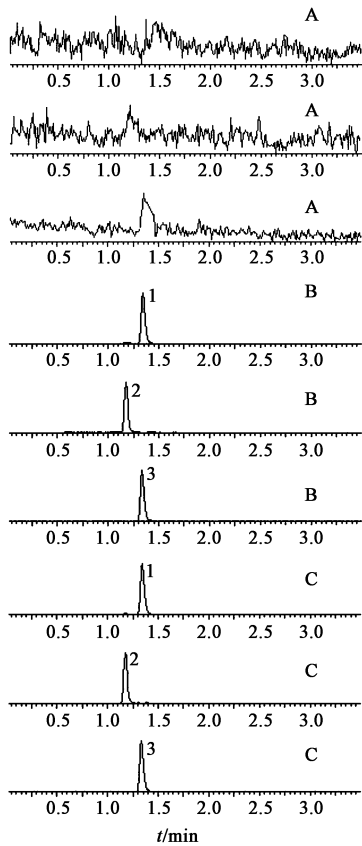
2.3 组织样品处理 称取大鼠心、肝、肺、肾、胃、小肠样品 0.2 g,加入含 10% 氨水的生理盐水 0.6 mL,冰浴中匀浆,取组织匀浆液 100 μL ,加乙腈 1.5 mL 沉淀蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心($12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min,下同),取上清液 1.2 mL,25 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,残渣用 20% 乙腈 500 μL 复溶,离心,取上清液进样分析。

2.4 指标成分的含量测定

2.4.1 检测条件 ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样器温度 10 $^{\circ}\text{C}$,流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液(20:80),流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 5 μL 。离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子模式扫描,检测方式为多离子反应监测(MRM),毛细管电压 3.2 kV,去溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$,去溶剂气流速 1 000 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$,锥孔气流速 150 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱的 m/z 分别为 336.14 ~ 320.22, 352.17 ~ 308.10, 338.20 ~ 322.29。

2.4.2 对照品溶液的配制 精密称取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱对照品适量,加甲醇溶解,配制质量浓度分别为 0.768, 0.128, 0.128 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合储备液,经逐级定量稀释成系列对照品溶液。

2.4.3 专属性考察 取大鼠空白组织样品、大鼠空白组织 + 混合对照品溶液、大鼠给药后收集的组织样品,按 2.4.1 项下条件检测,结果表明组织中内源性物质不干扰指标成分的测定,见图 1。



A. 空白组织样品;B. 空白组织样品 + 对照品;C. 供试品;1. 盐酸巴马汀;2. 盐酸药根碱;3. 盐酸小檗碱

图 1 大鼠灌胃给予黄连 2 h 后肝组织样品 UPLC-MS
Fig. 1 UPLC-MS chromatograms of rat liver samples after administration of Coptidis Rhizoma for 2 h

2.4.4 标准曲线和线性范围 精密吸取大鼠空白心、肝、肺、肾、胃、小肠的组织匀浆液 100 μL ,分别精密加入不同质量浓度的混合对照品溶液 10 μL ,

表 1 盐酸小檗碱在大鼠组织中的药动学参数、相对摄取率和峰浓度比

Table 1 Pharmacokinetic parameters, relative uptake rate and peak concentration ratio of berberine hydrochloride in rat tissues

组织	$AUC_{0-\infty} (\bar{x} \pm s, n=5) / \text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$		$C_{\max} (\bar{x} \pm s, n=5) / \text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$		Re	Ce
	黄连组	左金丸组	黄连组	左金丸组		
心	548.516 \pm 63.358	573.487 \pm 58.694	117.648 \pm 20.309	119.983 \pm 23.164	1.046	1.020
肝	5 271.935 \pm 432.725	7 051.268 \pm 518.354 ²⁾	1 063.176 \pm 86.524	1 645.961 \pm 129.862 ²⁾	1.338	1.548
肺	1 716.614 \pm 124.364	1 690.318 \pm 136.286	366.975 \pm 27.028	306.018 \pm 21.633 ¹⁾	0.985	0.834
肾	2 783.933 \pm 209.654	3 027.797 \pm 249.364	272.716 \pm 30.289	256.286 \pm 30.856	1.088	0.940
胃	10 527.933 \pm 492.364	11 361.993 \pm 562.321	3 238.836 \pm 336.378	3 277.916 \pm 387.509	1.079	1.012
小肠	2 933.716 \pm 188.364	3 168.081 \pm 239.329	455.466 \pm 31.967	554.866 \pm 36.954 ¹⁾	1.080	1.218

注:与黄连组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

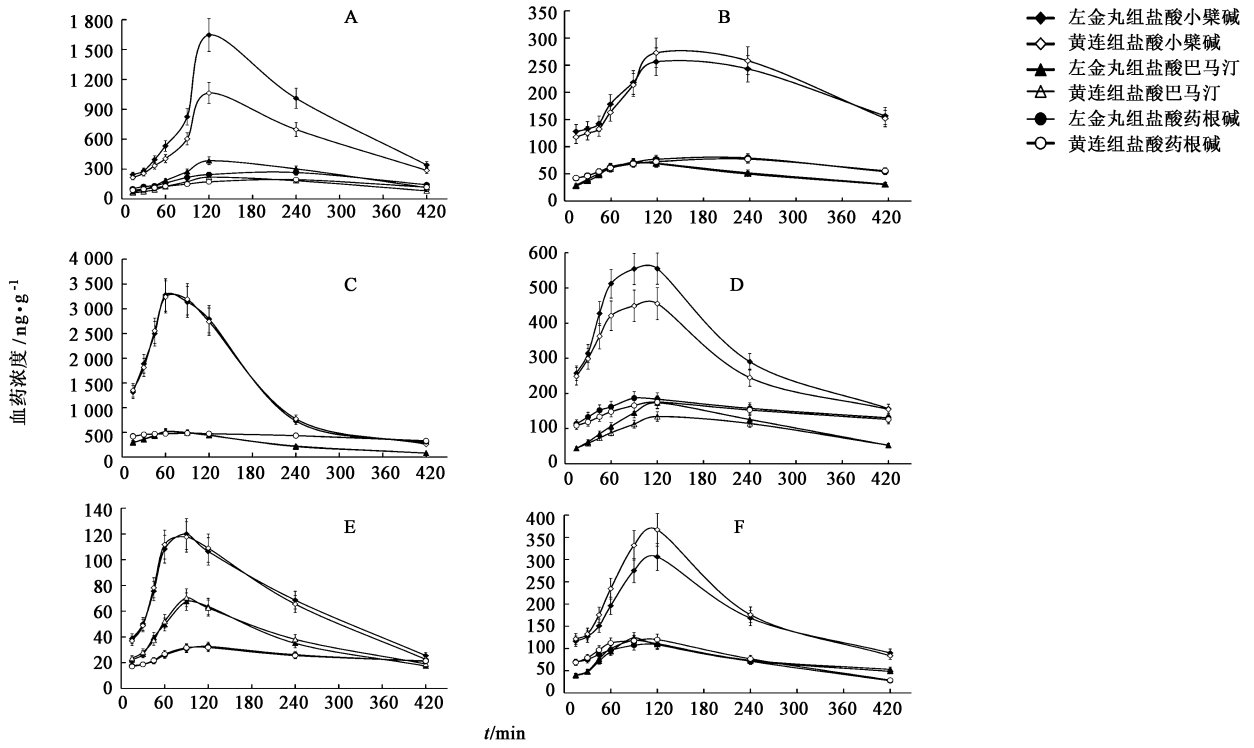
涡旋 30 s,制成系列样品溶液,按 2.3 项下方法处理 ($n=5$),以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,结果各组织回归方程的相关系数均 >0.999 ,盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱线性范围分别为 15 ~ 3 840,5 ~ 1 280,5 ~ 1 280 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.5 精密度试验 分别配制 3 个成分各组织匀浆液高、中、低质量浓度(盐酸小檗碱分别为 30, 120, 1 920 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;盐酸药根碱分别为 10, 40, 640 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;盐酸巴马汀分别为 10, 40, 640 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的质量控制(QC)样品($n=5$),连续测定 3 d,计算各成分日内和日间精密度的 RSD 均 $<15\%$,说明本方法符合生物样品精密度的要求。

2.4.6 稳定性试验 取 2.4.5 项下 QC 样品($n=5$),考察室温下放置 24 h,经 3 次冻融循环及 -70°C 存放 30 d 后的稳定性,结果 3 种成分的质量浓度无明显降低,RSD 均 $<10\%$ 。

2.4.7 提取回收率 取 2.4.5 项下 QC 样品($n=5$),按 2.3 项下方法操作,按 2.4.1 项下条件检测,计算提取回收率 79.26% ~ 90.36%,结果表明本方法的回收率达到生物样品的测定要求。

2.5 组织分布考察 利用 DAS 2.0 软件对数据进行处理,以统计矩法计算药代动力学参数。采用相对摄取率(Re)和峰浓度比(Ce)考察吴茱萸对黄连在大鼠各组织器官的靶向性^[8-9]。计算公式分别为 $Re = AUC_{\text{左金丸组}} / AUC_{\text{黄连组}}$, $Ce = C_{\text{左金丸组}} / C_{\text{黄连组}}$,式中 AUC 为药-时曲线下面积, C 为药峰浓度。 $Re > 1$ 表示该组织有靶向性, Re 愈大靶向效果愈好。 Ce 表明合用吴茱萸后改变药物分布的效果, Ce 愈大表明改变药物分布的效果愈明显。药-时曲线见图 2,药动学参数见表 1 ~ 3。结果表明合用吴茱萸后,大鼠肝组织中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱的分布明显增加,肺中这 3 个生物碱类成分的分布减少,提示吴茱萸可改变黄连中生物碱类成分在大鼠



A. 肝脏; B. 肾脏; C. 胃; D. 小肠; E. 心; F. 肺

图 2 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱在大鼠组织内的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Concentration-time curves of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and jatrorrhizine hydrochloride in rat tissues ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 2 盐酸巴马汀在大鼠组织中的药动学参数、相对摄取率和峰浓度比

Table 2 Pharmacokinetic parameters, relative uptake rate and peak concentration ratio of palmatine hydrochloride in rat tissues

组织	$AUC_{0-\infty} (\bar{x} \pm s, n = 5) / h \cdot ng \cdot g^{-1}$		$C_{max} (\bar{x} \pm s, n = 5) / ng \cdot g^{-1}$		Re	Ce
	黄连组	左金丸组	黄连组	左金丸组		
心	359.075 ± 24.598	337.407 ± 23.081	70.368 ± 10.312	67.499 ± 9.024	0.940	0.959
肝	1 477.029 ± 136.325	2 179.139 ± 195.617 ²⁾	219.189 ± 17.225	383.889 ± 19.526 ²⁾	1.475	1.751
肺	897.270 ± 80.351	700.087 ± 62.325 ¹⁾	117.970 ± 12.469	123.948 ± 11.208	0.780	1.051
肾	526.140 ± 62.864	542.724 ± 49.876	71.417 ± 8.509	69.306 ± 7.167	1.032	0.970
胃	2 226.083 ± 284.015	2 198.483 ± 296.339	524.023 ± 61.551	512.517 ± 63.350	0.988	0.978
小肠	948.178 ± 156.303	987.704 ± 172.258	134.194 ± 14.187	173.333 ± 21.361 ¹⁾	1.042	1.292

表 3 盐酸药根碱在大鼠组织中的药动学参数、相对摄取率和峰浓度比

Table 3 Pharmacokinetic parameters, relative uptake rate and peak concentration ratio of jatrorrhizine hydrochloride in rat tissues

组织	$AUC_{0-\infty} (\bar{x} \pm s, n = 5) / h \cdot ng \cdot g^{-1}$		$C_{max} (\bar{x} \pm s, n = 5) / ng \cdot g^{-1}$		Re	Ce
	黄连组	左金丸组	黄连组	左金丸组		
心	462.007 ± 45.309	472.455 ± 51.965	31.814 ± 3.691	32.620 ± 4.029	1.023	1.025
肝	3 025.875 ± 298.327	3 223.346 ± 254.540	194.404 ± 16.354	266.060 ± 18.501 ¹⁾	1.065	1.369
肺	653.122 ± 75.364	607.574 ± 61.368	119.942 ± 12.387	108.575 ± 10.085	0.930	0.905
肾	1 718.265 ± 152.397	1 398.195 ± 103.694 ¹⁾	77.021 ± 8.054	79.135 ± 8.269	0.814	1.027
胃	10 688.334 ± 851.240	9 074.118 ± 784.366	485.094 ± 52.362	482.615 ± 55.964	0.849	0.995
小肠	2 914.728 ± 224.369	3 060.374 ± 236.935	175.232 ± 18.025	186.483 ± 16.854	1.050	1.064

体内的组织分布。

3 讨论

本研究计算组织分布动力学参数时采用了非房室模型统计矩法,因为非房室模型统计矩法不必考虑药物的体内隔室模型特征,是处理药物在体内分布的主要手段。在效果评价时引入了现代生物药剂学中 Re 和 Ce ,这 2 个参数本是反映靶向制剂在某一组织分布中的靶向性,故本研究以 Re 和 Ce 为指标,评价吴茱萸对黄连组织分布的影响。结果 3 种黄连生物碱类成分在大部分组织中的 Re 和 Ce 均 >1 ,但只有肝中的 Re 和 Ce 远大于 1,提示吴茱萸通过增加黄连生物碱类成分在肝脏的分布来发挥引经作用。

现代研究表明引经药可能通过提高靶部位的药物浓度发挥引经作用。冰片具有“芳香走窜,引药上行”、“独行则势弱,佐使则有功”的特性,常与其他中药配伍使用治疗脑部疾病。研究发现冰片可增强羟基红花黄色素 A 等药物在脑内的浓度,证实了冰片的脑靶向增强作用^[10];桔梗可增加肺中芍药苷的浓度,从组织分布角度验证了桔梗引药入肺的作用^[11];“性善下行”的牛膝能够提高盐酸小檗碱在下肢关节组织的靶向分布,具有靶向引导作用^[12]。本文研究结果表明引经药可能通过增加特定组织的药物浓度来发挥引经作用,与药物组织分布具有高度的相关性。虽然研究发现吴茱萸的引经作用对黄连生物碱类成分在组织中的分布有一定影响,但是药物的分布还受药物理化性质、机体生理状况、药物之间相互作用等因素影响,吴茱萸究竟通过何种途径增加黄连生物碱类成分在肝中的分布尚不明确。

[参考文献]

[1] 李晓红,史瑞,刘礼剑,等.左金丸及其拆方治疗萎缩性胃炎模型大鼠的疗效观察[C].昆明:中华中医药学会脾胃病分会第二十四次全国脾胃病学术交流会,2011.
[2] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.左金丸及类方药性差异

的生物热动力学研究[J].中成药,2008,30(12):1762-1767.

[3] Wang Q S, Ding S L, Mao H P, et al. Antidepressant-like effect of ethanol extract from Zuojin Pill, containing two herbal drugs of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae, is explained by modulating the monoaminergic neurotransmitter system in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(2):603-609.
[4] 彭求贤,蔡红兵,史珏,等.黄连配伍吴茱萸后生物碱类成分的含量变化[J].中药材,2012,35(5):742-744.
[5] 任钧国,刘建勋.肉桂对滋肾丸盐酸小檗碱在正常大鼠前列腺分布动力学的影响[J].北京中医药,2013,32(11):826-829.
[6] 刘陶世,赵新慧,黄耀洲.不同溶媒对左金丸小檗碱和吴茱萸碱等 5 种生物碱溶出行为的影响[J].南京中医药大学学报,2007,23(3):172-174.
[7] 丁世兰,崔元璐,张叶,等.切换波长 HPLC 同时测定左金丸乙醇提取物中 7 种生物碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15):66-70.
[8] 于莲,杜妍,平洋,等.叶酸修饰的水飞蓟宾固体脂质纳米粒体内药动学及靶向性研究[J].中草药,2014,45(8):1110-1114.
[9] Chow T H, Lin Y Y, Hwang J J, et al. Improvement of biodistribution and therapeutic index via increase of polyethylene glycol on drug-carrying liposomes in an HT-29/luc xenografted mouse model[J]. Anticancer Res, 2009, 29(6):2111-2120.
[10] 吴雪,欧阳丽娜,向大位,等.冰片及石菖蒲促进羟基红花黄色素 A 透过血脑屏障的实验研究[J].中草药,2011,42(4):734-737.
[11] 黄巍,熊伟,唐灿,等.血府逐瘀汤中桔梗和牛膝对芍药苷组织分布的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(18):85-88.
[12] 孙备,吕凌,陆忠祥,等.三妙丸中牛膝对关节炎大鼠引药作用的机制研究[J].中国中药杂志,2008,33(24):2946-2949.

[责任编辑 刘德文]