

· 药物代谢 ·

## 秦艽总苷中龙胆苦苷在大鼠体内的药动学

崔春利\*, 唐志书, 郭东艳, 邓翀, 王斌  
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

**[摘要]** **目的:**建立 HPLC 快速测定大鼠血浆中龙胆苦苷浓度的方法,研究秦艽总苷(total iridoid glucosides, TIG)中龙胆苦苷的药动学特点,评价秦艽总苷中其他组分对龙胆苦苷药动学的影响。**方法:**大鼠灌胃给予秦艽总苷,眼眶采血于肝素化试管,离心,取血浆适量用 5 倍量乙腈沉淀蛋白,取上清液过滤,用 HPLC 测定龙胆苦苷血药浓度,以  $C_{18}$  为固定相,流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(20:80),于 272 nm 处检测,Kinetic 程序软件处理数据。**结果:**龙胆苦苷血浆质量浓度在 33.5 ~ 4 020.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  线性良好,最低检出质量浓度为 6.7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,高、中、低浓度样品的提取回收率分别为 80.82%, 97.38%, 89.10%。给大鼠灌胃 TIG 后药-时曲线符合非房室模型,主要药动学参数  $t_{1/2}$ ,  $T_{\max}$ ,  $C_{\max}$ , MRT, HVD,  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$  和 CL 相对稳定。**结论:**方法快速简便,准确灵敏,能较好地满足龙胆苦苷在大鼠体内的药动学研究。

**[关键词]** 龙胆苦苷; 药动学; 高效液相色谱法; 秦艽总苷

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0176-04

## Pharmacokinetics of Gentiopicroside in Total Iridoid Glucosides Extracted from *Gentiana macrophylla* in Rats

CUI Chun-li\*, TANG Zhi-shu, GUO Dong-yan, DENG Chong, WANG Bin  
(Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a rapid RP-HPLC method for the determination and to study the pharmacokinetics of gentiopicroside after ig the total iridoid glucosides (TIG) extracted from *Gentiana macrophylla* in rats and to assess the effect of other component in the TIG extracted from *Gentiana macrophylla*. **Method:** The rats were orally treated with the TIG extracted from *Gentiana macrophylla*. Plasma in centrifuge tube heparinized was separated by centrifugation at 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  for 10 min, and five times acetonitrile in volume was added to deposit proteins. After centrifugalized, the concentration of gentiopicroside in plasma was determined by RP-HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated with Kinetic software. **Result:** A good linear relationship was obtained between the peak area and the concentration of gentiopicroside from 33.5 to 4 020.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the lowest limit of detection of gentiopicroside in plasma was 6.7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The mean extraction recoveries were 80.82%, 97.38% and 89.10% for high, middle, low concentrations of the samples respectively. The concentration-time profiles of gentiopicroside were fit with noncompartment model. The main pharmacokinetics parameters  $t_{1/2}$ ,  $T_{\max}$ ,  $C_{\max}$ , MRT, HVD,  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ , CL (s) were relatively stable. **Conclusion:** The method applied for determination of gentiopicroside content in blood was quick, simple, accurate, sensitive and feasible for the study of the gentiopicroside pharmacokinetics in rats.

**[Key words]** gentiopicroside; pharmacokinetics; HPLC; the TIG extracted from *Gentiana macrophylla*

**[收稿日期]** 20120406(001)

**[基金项目]** 国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2011ZX09401-308-036);陕西省教育厅项目(JK388)

**[通讯作者]** \* 崔春利, 硕士, 实验师, 从事中药新制剂新技术研究, Tel: 029-38185180, E-mail: ccl906@163.com

秦艽为龙胆科多年生草本植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.、粗茎秦艽 *G. erassicaulis* Duthie ex Burk. 或小秦艽 *G. dahurica* Fisch. 的干燥根<sup>[1]</sup>。其功效为祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热,临床用于风湿痹痛,中风半身不遂,筋脉拘挛,骨节酸痛,湿热黄疸,骨蒸潮热,小儿疳积发热等症。秦艽经提纯得秦艽总苷是以龙胆苦苷为代表的裂环环烯醚萜苷。龙胆苦苷作为秦艽总苷总 TIG 主要有效成分,具有抗炎、保肝、清热等作用<sup>[2]</sup>,但龙胆苦苷单体不能代表秦艽整体作用,TIG 更能体现秦艽总体疗效。有关 TIG 中龙胆苦苷药动学未见文献报道,为此本实验研究 TIG 大鼠体内龙胆苦苷药动学特征,在前人研究基础上初步评价 TIG 中其他成分对龙胆苦苷药动特征的影响,为 TIG 新药的开发利用提供实验基础和理论依据。

## 1 仪器与试剂

日本 HITACH L-2000 型单泵高效液相色谱仪(配 L-2130 型泵,L-2400 型紫外检测器,EZStart 色谱工作站),XYJ-2 型台式高速离心机(江苏金坛恒丰仪器厂),MTN-2800W 型氮吹浓缩装置(天津奥特恩斯仪器有限公司),Forma-86G ULT 型 Freezer (Thermo Electron Corporation),MS2 minishaker 型螺旋混合振荡器(广州仪科实验室技术有限公司,德国 IKA 广州),BT25S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

龙胆苦苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110770-201013),秦艽 TIG(自制,经 Waters 2996 HPLC 检测龙胆苦苷质量分数为 46.14%;经 UV2550 检测总裂环环烯醚萜苷质量分数为 72%),甲醇、乙腈均为色谱纯,生理盐水(批号 1202044802,石家庄四药制药有限公司),肝素钠(批号 1108119,江苏万邦生化医药有限公司),10% 乌来糖溶液(临用前自配,麻醉剂量 1 mL/100 g),水为娃哈哈饮用纯净水,SD 雄性实验大鼠[西安交通大学医学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK(陕)2011-001]。

## 2 方法与结果

**2.1 秦艽总苷的制备** 取秦艽药材(经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为龙胆科植物秦艽 *G. macrophylla* P. 的干燥根,经测定总苷质量分数为 0.313%,龙胆苦苷质量分数为 3.52%) 2 kg,粉碎,粗粉加 7 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,每次 2.5 h,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,加蒸馏水配制成含生药量 0.05 g·mL<sup>-1</sup> 的溶液后上 HPD-100 型大

孔树脂,先以蒸馏水洗至可以检出龙胆苦苷为止,再以 30% 乙醇洗脱,合并洗脱液,回收乙醇,减压浓缩至干膏,干膏提取物,真空减压干燥,粉碎成 100 目细粉,即得。

**2.2 色谱条件** Thermo Electron Hypersil GOLD aQ C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)配 850-00 型保护柱套配柱芯 Thermo, Hypersil C<sub>18</sub> (4 mm × 10 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(20:80),检测波长 272 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 15.0 μL,柱温为室温。

**2.3 对照溶液的配制** 取龙胆苦苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释至 50 mL 量瓶中,制得质量浓度为 42.8 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品贮备液,密封,低温保存,备用。

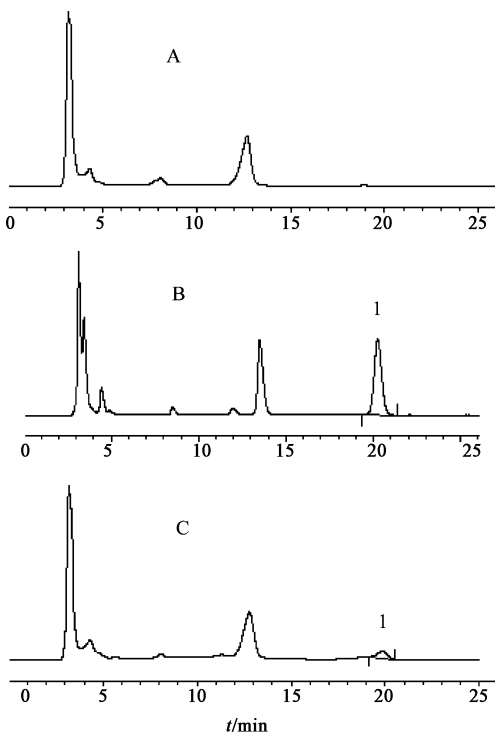
**2.4 血浆样品的采集** 取健康 SD 大鼠 5 只,雄性,体重(250 ± 20) g,给药前,禁食 14 h,自由饮水,TIG 加蒸馏水混悬后灌胃给药,给药剂量 520 mg·kg<sup>-1</sup>,相当于龙胆苦苷 240 mg·kg<sup>-1</sup>,并于给药后 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480 min 用肝素化的毛细管从大鼠眶后静脉丛采血 0.5 mL,采集的血液置于肝素化的 1.5 mL 的尖嘴试管中,摇匀,以 4 000 r·min<sup>-1</sup> 转速离心 10 min,分离血浆 200 μL 至另一 1.5 mL 的尖嘴试管中,置 -80 °C 冰箱保存。

**2.5 血浆样品的预处理** 精密吸取血浆样品 200 μL 于 1.5 mL 离心试管中,加入乙腈 1 000 μL 沉淀蛋白,涡旋 1 min,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,分离上清液,40 °C 水浴上氮气吹干,残渣用 50 μL 流动相旋涡溶解,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,吸取上清液进样 15 μL。

**2.6 空白血浆样品的制备** 精密量取空白血浆 200 μL 至 1.5 mL 的离心试管中,按 2.5 项下“加入乙腈 1 000 μL”起操作得空白血浆样品。

**2.6 色谱行为** 上述色谱条件下,空白血浆、空白血浆中加入龙胆苦苷对照品及灌胃 TIG 2 h 后血浆样品色谱图见图 1。空白血浆的内源性物质对 TIG 中龙胆苦苷的测定无干扰。从图中可知,龙胆苦苷与其他干扰组分分离效果良好,无杂质峰干扰,血浆样品中龙胆苦苷的理论塔板数 > 5 000, *t<sub>R</sub>* 20 min 左右,与相邻色谱峰分离度均 > 1.5。

**2.7 线性范围和灵敏度** 精密移取质量浓度为 42.8 mg·L<sup>-1</sup> 龙胆苦苷对照品溶液适量,40 °C 水浴上氮气吹干后加入空白血浆 1 000 μL,涡旋混匀,配制成质量浓度为 33.5, 67.0, 670.0, 1 340.0, 2 680.0 和 4 020.0 μg·L<sup>-1</sup>,按照血浆样品制备方法



A. 空白血浆; B. 血浆中加入龙胆苦苷对照品;  
C. 灌胃 TIG 2 h 后的血浆样品; 1. 龙胆苦苷  
图 1 大鼠血浆中龙胆苦苷的 HPLC

制成供试品溶液,在既定色谱条件下,进样 5.0  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积。以龙胆苦苷血药浓度  $C$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对色谱峰面积 ( $A$ ) 进行线性回归,得标准曲线方程:  $A = 969.42C - 69\ 580$  ( $r = 0.998\ 1$ ),线性范围 33.5 ~ 4 020.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,最低定量质量浓度 (LOD) 8.375  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,最低检出质量浓度为 6.70  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $S/N = 3$ )。

**2.8 精密度试验** 取空白血浆加入适量龙胆苦苷对照品溶液,配制成低、中、高质量浓度分别为 67.0, 1 340.0, 2 680.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  血浆样品,在 1 d 内按样品测定法重复测定 6 次,求得日内 RSD 分别为 4.24%, 6.74%, 9.18%;将上述 3 个质量浓度的样品在 6 d 内陆续各重复测定 6 次,计算每天的平均值,以 6 d 的平均值求得日间 RSD 分别为 5.28%, 7.52%, 5.78%。

**2.9 回收率试验** 按 2.5 项下方法制备质量浓度为 67.0, 1 340.0, 2 680.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 3 个质控血浆,各平行 3 份,将给药后对照品峰面积与同浓度对照品甲醇溶液峰面积比较计算绝对回收率,结果各测定 6 次的平均绝对回收率依次分别为 (80.82  $\pm$  3.12)%, (97.38  $\pm$  5.26)%, (89.10  $\pm$  4.11)%;另将给药后对照品峰面积代入标准曲线,计算测得浓

度,与所配制实际浓度比较,考察样品的方法回收率,按样品测定方法测定平均回收率依次为 (98.64  $\pm$  3.81)%, (103.56  $\pm$  5.59)% 和 (97.43  $\pm$  4.49)%。

**2.10 冻-融稳定性试验** 将低、中、高 3 个质量浓度 67.0, 1 340.0, 2 680.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的龙胆苦苷血浆样品分别置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰冻 24 h 后自然解冻,按前述方法测定龙胆苦苷血浆浓度变化,完全解冻后将样品重新冷冻 24 h。重复 6 次,计算冻融 1 周及冻融对样品稳定性的影响。记录龙胆苦苷峰面积,计算龙胆苦苷的浓度。低、中、高浓度 RSD 分别为 6.55%, 5.35%, 7.31%。结果表明龙胆苦苷的含药血浆冷冻保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱里 1 周内是稳定的。

**2.11 大鼠血浆中龙胆苦苷药代动力学** 测得血药浓度数据用 Kinetica 程序软件拟合计算,结果表明秦艽总苷在大鼠体内的药代过程符合非房室模型,主要药动学参数见表 1,其平均药-时曲线见图 2。

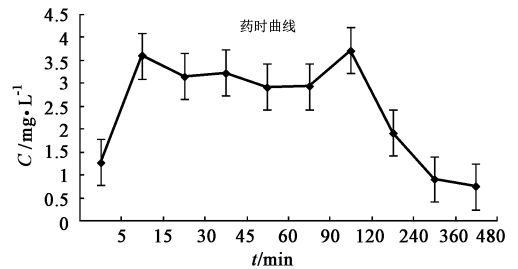


图 2 大鼠血药浓度-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

表 1 大鼠血浆中龙胆苦苷药动学参数值 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

药动学参数	秦艽总苷 (520 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 相当龙胆苦苷 240 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
$T_{1/2}/\text{min}$	139.61 $\pm$ 58.88
$T_{\text{max}}/\text{min}$	120 $\pm$ 47.91
$C_{\text{max}}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	3.71 $\pm$ 2.05
$\text{CL}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0.62 $\pm$ 0.40
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{min}$	176.51 $\pm$ 18.60
$\text{AUC}_{0-1}/\text{min}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	974.38 $\pm$ 336.08
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{min}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 124.00 $\pm$ 442.45
HVD/min	216.48 $\pm$ 54.85

### 3 讨论

以往有关龙胆苦苷药动学研究主要以血清样品为研究,而王长虹<sup>[3]</sup>采用超滤法测定龙胆苦苷的血浆蛋白结合率,结果显示龙胆苦苷与小鼠血浆、正常人血浆平均蛋白结合率分别为 64.67%, 77.08%,提示龙胆苦苷在血液中与蛋白结合率较高,测定血

清并不能真实反映龙胆苦苷的血药浓度。因而笔者给大鼠灌胃秦艽总苷后,进行血浆中龙胆苦苷的体内药动学研究,经方法学考察能满足研究要求。可见选用大鼠血浆进行秦艽总苷中龙胆苦苷药代动力学研究较血清更为合适。

以往龙胆苦苷药动学研究多以房室模型解析:李向阳<sup>[4]</sup>以秦艽提取液给家兔灌胃,结果血浆中主要代谢参数  $T_{1/2} = (1.66 \pm 0.32) \text{ h}$ ,  $\text{MRT} = (2.88 \pm 0.16) \text{ h}$ ,其  $C-T$  曲线呈一房室模型;姜少灏<sup>[5]</sup>以  $78.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  龙胆苦苷对照给 SD 大鼠灌胃,结果其血清  $C-T$  曲线符合二房室模型;冯英菊<sup>[6]</sup>以 Beagle 犬和大鼠静脉注射龙胆苦苷后,其药动学过程符合一房室模型;郜尽<sup>[7-8]</sup> 研究结果显示大鼠肌肉注射龙胆苦苷后,龙胆苦苷以原型形式代谢,龙胆苦苷在体内  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  符合二房室模型,而  $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  符合一房室模型。高兰月<sup>[9]</sup>以秦艽水煎醇沉液家兔耳静脉注射后, $C-T$  曲线符合三房室模型。该研究参考文献[10-12],鉴于体内数据和房室模型经典理论吻合不太理想,故采用统计矩分析数据,首次得到了有关龙胆苦苷的血浆  $C-T$  曲线符合非房室模型,再者目前体内数据解析中非房室模型已经成为主流处理的方法,因为非房室模型不受经典房室模型的限制,适用于任何房室。

血浆样品处理时,通过甲醇除血清蛋白与乙腈除血清蛋白平行对比,结果乙腈沉淀蛋白后龙胆苦苷提取回收率比甲醇高很多,故选择乙腈作为除蛋白试剂。其次,对含药血浆中乙腈常用量(3,4,5倍)进行了考察,结果显示含药血浆5倍量的乙腈沉淀后龙胆苦苷的提取回收率最高,故该研究选用1 mL的乙腈作为0.2 mL含药血浆的沉淀试剂。

研究开始时试图采用 Waters600 HPLC 配 Waters 2487 紫外-可见分光光度检测器,以 233,272 nm 2 个波长同时对山茱萸总苷中的马钱苷酸和龙胆苦苷 2 个指标进行分析测定,结果给药后 5,15,30,45,60 min 大鼠血浆样品统一显示出龙胆苦苷保留时间对应性很好,而马钱苷酸对照品出峰( $t_{\text{R}} = 12.46$ )介乎于血浆样品该出峰位置前( $t_{\text{R}} = 11.73$ )后( $t_{\text{R}} = 13.22$ )2 色谱峰中间位置,采用峰面积加大法,与  $t_{\text{R}} = 11.73$  峰相对应,但与空白血浆干扰难以

完全消除,为此放弃对马钱苷酸的检测。随代谢时间其前峰与后峰变化似乎呈规律性变化,前峰面积由小增大再变小,后峰峰面积变化恰好相反,似乎两者存在一定的转化关系。为此,课题组选择相对稳定的龙胆苦苷作为该研究的指标进行考察。对于秦艽总苷中马钱苷酸的体内代谢规律有待今后进一步深入探究。

## 【参考文献】

- [1] 中国药典.一部[S].2010:253.
- [2] 南京中医药大学.中药大辞典.下册[M].上海:上海科技出版社,1976:1764.
- [3] 王长虹,王峥涛.超滤法测定龙胆苦苷的血浆蛋白结合率[J].中国药学杂志,2005,40(3):232.
- [4] 李向阳,冯伟力,袁明,等.藏药佐太对秦艽中龙胆苦苷药动力学的研究[J].华西药学杂志,2008,23(6):668.
- [5] 姜少灏,康丽娟,蒋晔,等.龙胆及其复方中龙胆苦苷在大鼠体内的药动学研究[J].中国药学杂志,2005,40(3):212.
- [6] 冯英菊,杨甫昭,郭五保,等.龙胆苦苷在 Beagle 犬体内药代动力学研究[J].中药新药与临床药理,2004,15(5):333.
- [7] 郜尽.龙胆苦苷的制备及药动动力学研究[D].西安:西北大学,2006.
- [8] 郜尽,冯英菊,杨甫昭,等.RP-HPLC 法测定大鼠血清中龙胆苦苷的含量[J].西北药学杂志,2002,17(2):51.
- [9] 高兰月,王乾,高亦珑,等.宁夏栽培秦艽龙胆苦苷含量测定及药动学研究[J].现代医院,2011,11(5):29.
- [10] 韩刚,肖倩,索炜,等.大承气汤中大黄酸在大鼠体内的药动学研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):137.
- [11] 王瑛兰,李凌军,张微.天钩降压胶囊中丹皮酚在大鼠体内药代动力学[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):114.
- [12] 杨肖锋,宋纯清.龙胆苦苷的肠内菌群代谢研究[J].中国中药杂志,2000,25(11):673.

[责任编辑 邹晓翠]