

夏天无饮片超微粉碎前后镇痛作用 及其血药浓度相关性研究

黄一科, 张水寒*, 冯小燕, 刘才英

(湖南省中医药研究院, 湖南省中药粉体与创新药物省部共建重点实验室,
湖南省教育厅中药粉体技术创新团队, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 考察夏天无饮片超微粉碎前后对小鼠口服生物利用度的影响。方法: 样品为夏天无超微饮片和普通饮片各 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药, 1次/天, 共7d, 研究醋酸所致小鼠扭体反应的镇痛作用及血液中所含生物碱量的相关性。结果: 夏天无超微粉碎后, 对醋酸所致小鼠扭体反应的抑制作用强于普通饮片 ($P < 0.05$), 超微粉组镇痛作用强于普通饮片约4%, 同时血液中生物碱的含量高于普通饮片约5%。结论: 夏天无超微粉碎后提高了生物利用度。

[关键词] 夏天无普通饮片; 夏天无超微饮片; 生物碱; 镇痛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0231-04

Study on Correlation of Plasma Concentration before and after Ultrafine Grinding and Analgesic Effect of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

HUANG Yi-ke, ZHANG Shui-han*, FENG Xiao-yan, LIU Cai-ying

(Hunan Province Teaches Hall Medicine Powder Technology Innovation Team, Hunan Chinese Medicine Powder and Innovation Drug Province Department Co-construction and Key Laboratories, Ministry of Education, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** To study the correlation of plasma concentration before and after ultrafine grinding and *Corydalis Decumbentis Rhizoma* bioavailability by oral administration in mice. **Method:** Acetic acid induced writhing response was used to observe analgesic effect in mice and the blood contained in the amount of alkaloids. **Result:** By ultrafine grinding of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*, stronger inhibitory effect on acetic acid induced writhing response was found compared with the ordinary pieces, alkaloid content in the blood was higher than ordinary pieces. **Conclusion:** Ultrafine grinding can improve the bioavailability of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*.

[Key words] ordinary pieces of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*; ultrafine powder of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*; alkaloid; analgesic

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇的干燥块茎, 具有活血通络、行气止痛之功效, 主要用于治疗中风偏

瘫、跌扑损伤、风湿性关节炎、坐骨神经痛。其主要含有原阿片碱、盐酸巴马汀、延胡索乙素等生物碱, 具有镇痛、抗炎的功效^[1-2]。《中国药典》2010年版I部中以原阿片碱、盐酸巴马汀为其质量控制指标。结合近年来对夏天无镇痛作用及镇痛有效成分的研究, 本实验拟比较夏天无超微饮片与普通饮片的镇痛作用及血液中生物碱含量的相关性^[3]。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 体质量 $18 \sim 22 \text{ g}$, 由湖南

[收稿日期] 20120311(005)

[基金项目] 中医药行业科研专项项目(200807054)

[第一作者] 黄一科, 硕士, 从事中药新制剂与新工艺研究, Tel: 15243668984, E-mail: huangyike318@163.com

[通讯作者] *张水寒, 博士, 研究员, 从事中药新制剂与新工艺研究, Tel: 0731-88881651, E-mail: zhangshuihan0220@126.com

中医药大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(湘)2011-0004。

1.2 药品 夏天无饮片, 由湖南省中医药研究院附属医院中药房提供, 经湖南省中药研究所温俊达研究员鉴定为正品 *Coydalis Decumbentis Rhizoma*, 夏天无超微饮片(由本实验室粉碎制得, 粒径 10 ~ 75 μm), 阿司匹林片[由舒泰神(北京)生物制药股份有限公司生产, 批号 20110802]。原阿片碱(批号 110853-200402)、延胡索乙素(批号 110726-201011)、盐酸巴马汀(批号 110732-200907)均由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 仪器 BFM-T6BI 型贝利微粉机(济南倍力粉体技术工程有限公司), 高效液相色谱仪(岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, 紫外检测器 SPD-20 AVP, 岛津色谱工作站), T-214 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 恒温水浴锅, HS-3120 超声清洗器(江苏汉邦科技有限公司), 美国 MILLIPORE 超纯水机(美国 Millipore 公司), 旋涡混合器(金坛市大地自动化仪器厂)。

1.4 试剂 乙腈(色谱纯, Tedia 公司生产), 冰乙酸(色谱纯, 天津光复精细化工研究所), 其他均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果^[4]

2.1 样品配制 夏天无超微饮片冲泡组: 称取夏天无超微饮片 20 g 加沸水 100 mL 冲泡并搅拌, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水中水浴保温 30 min, 待冷却后离心, 分离上清液浓缩定容于 20 mL 量瓶中, 制成含生药量 1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混悬液。夏天无超微饮片回流组: 称取夏天无超微饮片 20 g, 加纯水 100 mL 加热回流 1 h, 待冷却后离心, 分离上清液浓缩定容于 20 mL 量瓶中, 制成每毫升含 1 g 生药量的混悬液。夏天无饮片回流组: 称取夏天无饮片 20 g, 加纯水 100 mL 加热回流 1 h, 待冷却后离心, 分离上清液浓缩定容于 20 mL 量瓶中, 制成每毫升含 1 g 生药量的混悬液。阿司匹林对照组: 按成人给药剂量换算小鼠给药剂量, 制得含阿司匹林 27 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.2 对醋酸所致小鼠扭体反应的影响^[5-6] 取小鼠 75 只, 雌雄兼有, 按体质量大小排序, 编号, 用随机分组法分成 5 组, 每组 15 只, 设空白对照组、阿司匹林组、夏天无超微饮片回流组、夏天无超微饮片冲泡组、夏天无饮片回流组。小鼠自由进食进水, 各组按 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig, 1 次/d, 共 7 d, 其中空白对照组给予等容积空白对照溶液。实验前禁食不禁水 12 h, 末次给药 30 min 后, 每只小鼠 ip 0.6% 醋酸溶液 0.2

mL, 记录小鼠 20 min 内扭体反应次数, 计算镇痛率。采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2.3 对醋酸所致小鼠疼痛的抑制作用 夏天无饮片回流组、夏天无超微饮片回流组、夏天无超微饮片冲泡组和阿司匹林组与空白组比较, 均能明显减少醋酸所致的扭体次数 ($P < 0.05$)。夏天无超微饮片回流组和夏天无超微饮片冲泡组止痛作用优于夏天无饮片回流组, 见表 1。

表 1 夏天无 2 种饮片对醋酸所致小鼠疼痛的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	20 min 内 扭体数/次	镇痛率 /%
空白对照	-	25.1 \pm 10.2	-
夏天无饮片回流	10	9.7 \pm 4.3 ¹⁾	65.7
夏天无超微饮片回流	10	8.9 \pm 4.8 ^{1,2)}	69.3
夏天无超微饮片冲泡	10	7.9 \pm 3.7 ^{1,2)}	70.2
阿司匹林	0.27	8.5 \pm 5.1 ¹⁾	68.9

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与夏天无饮片回流组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3 血样测定^[7]

3.1 色谱条件^[8-9] Diamonsil BDS C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相 A 乙腈-B 水(每 1 000 mL 水中加入冰乙酸 30 mL, 三乙胺 8 mL); 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 280 nm; 梯度洗脱 0 min-30 min-65 min-75 min, 流动相 A:B 比例为 12:88-12:88-30:70-12:88; 进样量 20 μL 。

3.2 试液配制 氨-氯化铵缓冲液(pH 10.0): 取氯化铵 5.4 g 加水 20 mL 溶解后, 加浓氨试液 35 mL, 再加水稀释至 100 mL, 即得。

硫酸溶液($0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$): 取浓硫酸溶液 30 mL 缓缓注入适量水中, 冷却至室温, 加水定容至 1 000 mL, 摇匀, 得 ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 硫酸滴定液。取上述硫酸滴定液 1 mL 加水定容到 25 mL 量瓶得 ($0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 硫酸溶液。

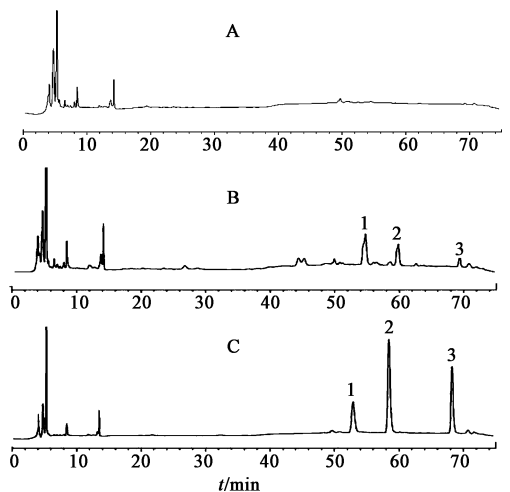
混合对照品: 取原阿片碱对照品 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 1% 盐酸溶液 5 mL 使溶解, 再加甲醇至刻度, 摇匀。取盐酸巴马汀对照品 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。取延胡索乙素对照品 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 1% 盐酸溶液 5 mL 使溶解, 再加甲醇至刻度, 摇匀。精密量取上述 3 种溶液各 5 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 含原阿片碱 40 μg 、延胡索乙素 40 μg 、盐酸巴马汀 20 μg)。

3.3 血样处理 小鼠眼眶取血,将血液转移至肝素钠管中,轻轻摇匀,将肝素钠管放入离心机中,在 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,上层血浆用移液枪转移至清洁的试管中,备用。用移液枪吸取血浆 0.5 mL,加入氨-氯化铵缓冲液 (pH 10.0) 0.5 mL 混匀,乙醚提取 2 次,第 1 次 4 mL,第 2 次 3 mL,每次振荡 4 min,振荡后离心 10 min,吸取上层乙醚液,合并乙醚提取液于尖底试管中,在 $40\ ^\circ\text{C}$ 水浴中加热浓缩至 1 mL,加入 $0.02\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液 $50\ \mu\text{L}$ 振荡 5 min 后,在 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取下层硫酸液 $25\ \mu\text{L}$,进样分析。

3.4 血样结果分析^[10]

3.4.1 色谱结果 在上述色谱条件下,分别精密吸取空白血浆、含药血浆和空白血浆加混合对照品进行分析,色谱图分离度良好,不受杂质峰干扰,见图 1。

3.4.2 标准曲线的制备 精密移取空白血浆 5 份,每份 0.5 mL 分别加入 2, 4, 6, 8, 10 μL 混合对照品溶液,按上述血样样品处理方法和色谱条件,进样分析,以峰面积为纵坐标,以血药浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程和相关系数。原阿片碱、延胡索乙素、盐酸巴马汀回归方程和相关系数分别为:
 $Y = 4\ 548.5X + 401.2 (r = 0.998)$; $Y = 5\ 238.2X +$



1. 原阿片碱; 2. 延胡索乙素; 3. 盐酸巴马汀

图 1 空白血样(A), 含药血样(B), 空白血样加混合对照(C)的 HPLC

$605.1 (r = 0.997)$; $Y = 6\ 916.5X + 402.5 (r = 0.998)$ 。表明血浆样品在标准曲线范围内,线性关系良好。

3.4.3 各组血样生物碱含量测定 分别精密移取空白对照组、夏天无饮片组、夏天无超微饮片回流组、夏天无超微饮片冲泡组血浆各 0.5 mL,按 3.3 项下样品处理方法及 3.1 项下色谱条件,进样分析,测定结果见表 2。

表 2 血浆中夏天无生物碱的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	原阿片碱/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	延胡索乙素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	盐酸巴马汀/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
空白对照	-	0	0	0
夏天无饮片	10	8.9 ± 0.23	2.1 ± 0.14	0.9 ± 0.08
夏天无超微饮片回流	10	12.5 ± 0.25	2.7 ± 0.17	1.3 ± 0.08
夏天无超微饮片冲泡	10	14.0 ± 0.25	2.5 ± 0.16	1.1 ± 0.07

4 讨论

夏天无超微饮片组对小鼠由醋酸所致疼痛的抑制作用优于夏天无饮片组,其主要有效成分原阿片碱、延胡索乙素、盐酸巴马汀,在小鼠体内的吸收、分布也同样优于夏天无饮片组,而夏天无超微饮片冲泡组与回流组的镇痛作用和血药浓度相近。

综合以上分析讨论,夏天无饮片超微粉碎后,破壁细胞中的可溶物直接接触溶媒,其生物利用度^[11]有明显的提高,夏天无超微饮片具有快速溶出,高效溶出有效成分的特点。超微粉直接冲泡用药为夏天无临床应用开拓了新的合理的用药形式,提高夏天无的生物利用度,降低临床应用剂量,方便患者服用,促进夏天无传统饮片改造和利用,具有参考作用。

[参考文献]

- [1] 梁素英. 夏天无的成分及药理研究概况[J]. 华夏医学, 2007, 20(2): 419.
- [2] 刘梅, 王永刚, 张文惠. 夏天无的研究概况[J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(1): 57.
- [3] 罗芬, 池玉梅, 吴皓. 中药代谢动力学研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 285.
- [4] 李建绪, 李秀红. 小鼠口服延胡索与夏天无的镇痛作用比较[J]. 中药材, 2009, 3: 32.
- [5] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 886.
- [6] 海丽娜, 张志伟, 王金华, 等. 复方苦参注射液对小鼠的镇痛止血和抗应激作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 200.

桑葚多糖抗疲劳作用及其机制

王忠¹, 厉彦翔², 骆新^{2*}

(1. 新疆医科大学医学实验动物中心, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学药学院药理教研室, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 探讨桑葚多糖抗疲劳作用及其机制。方法: 雄性 SPF 级昆明种小鼠 224 只, 随机分为 4 批, 每批 56 只, 分别进行负重游泳、血清尿胆素测定、血乳酸含量测定和肝糖原含量测定。每批动物再随机分为正常对照组、桑葚多糖高、中、低剂量组(900, 300, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 连续 ig 35 d 后, 分别测定游泳时间、血清尿胆素含量、血乳酸含量和肝糖原含量。结果: 桑葚多糖高剂量组小鼠游泳时间(31.3 ± 15.13) min 较正常对照组(7.15 ± 2.91) min 明显延长; 桑葚多糖高剂量组肝糖原含量(26.23 ± 6.08) mg·g⁻¹ 较正常对照组(18.75 ± 3.12) mg·g⁻¹ 明显增加, 血清尿素氮含量(9.66 ± 1.35) mmol·L⁻¹ 较正常对照组(12.07 ± 1.64) mmol·L⁻¹ 明显减少(P < 0.05)。结论: 桑葚多糖具有抗疲劳作用。

[关键词] 桑葚多糖; 抗疲劳; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0234-03

Anti-fatigue Effect and Mechanism of Mulberry Amylose Extracts in Mice

WANG Zhong¹, LI Yan-xiang², LUO Xin^{2*}

(1. Medical Laboratory Animal Center of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;
2. College of Pharmacy of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-fatigue effect and mechanism of polysaccharides from mulberry amylose (MA). **Method:** A total of 224 Kunming mice were randomly divided into 4 batches, each of which consisted of 4 groups: MA groups at the dosages of low (100 mg·kg⁻¹), middle (300 mg·kg⁻¹) and high (900 mg·kg⁻¹), and the control group. Each mouse was administered once a day for 35 days. After the end of the administration, all the mice were evaluated for their weight-loaded swimming duration and the contents of hepatic glycogen, blood urea nitrogen (BUN) and blood lactic acid. **Result:** MA at the high dosages could prolong weight-loaded swimming duration (31.3 ± 15.13) min, compared with (7.15 ± 2.91) min. In addition, an increase of hepatic glycogen (26.23 ± 6.08) mg·g⁻¹, compared with (18.75 ± 3.12) mg·g⁻¹ and a decline of BUN (9.66 ± 1.35) mmol·L⁻¹, compared with (12.07 ± 1.64) mmol·L⁻¹ were observed in mince

[收稿日期] 20111108(013)

[基金项目] 新疆医科大学校企联合项目

[第一作者] 王忠, 实验师, 从事动物营养与毒理研究

[通讯作者] * 骆新, 硕士, 讲师, 从事心血管药理和新药研发, E-mail: luox8093@gmail.com

[7] 马宏达, 郭涛, 何进. 夏天无提取物中原阿片碱和延胡索乙素的大鼠肠吸收特征[J]. 医药导报, 2011, 30(9): 1125.
[8] 徐发红, 罗跃华, 陈伟康, 等. HPLC 法同时测定夏天无注射液 3 个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(9): 1494.
[9] 桂婵, 吴安明, 何雁, 等. 夏天无提取工艺优化[J]. 中

国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 5.
[10] 杨丹莉, 黄燮南, 孙安盛, 等. RP-HPLC 法测定大鼠血浆的普鲁托品浓度及其药代动力学研究[J]. 药学学报, 2001, 36(10): 790.
[11] 赖珺, 廖正根, 杨明福, 等. 生物利用度的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 228.

[责任编辑 聂淑琴]