

地格达-4 味汤中獐牙菜苦苷 在急性肝损伤模型大鼠体内药代动力学研究

白梅荣*, 巴根那, 拉喜那木吉拉, 高玉峰
(内蒙古民族大学, 内蒙古 通辽 028000)

[摘要] 目的: 建立急性肝损伤模型大鼠血清中獐牙菜苦苷的 HPLC 血药浓度测定方法, 并对其药代动力学进行研究。方法: SD 大鼠腹腔注射 *D*-半乳糖胺 (*D*-GalN) (400 mg·kg⁻¹), 制备急性肝损伤模型, 按高、中、低 (0.39, 0.77, 1.54 g·kg⁻¹) 剂量灌胃给予地格达-4 味汤, 收集不同时间点含药血清, HPLC 测定血药浓度, 采用 Winnonlin 5.1 药动学软件拟合房室模型, 计算其药动学参数。结果: 獐牙菜苦苷在 0.000 6~0.019 2 mg·L⁻¹ ($r=0.998\ 9$) 线性关系良好, 平均回收率均在 80% 以上, 方法学考察其他项均符合实验要求。地格达-4 味汤高、中、低剂量组吸收半衰期基本一致, 药时曲线下面积 (AUC) 与给药剂量之间呈现良好的线性关系, 属于线性动力学过程。结论: 獐牙菜苦苷在急性肝损伤模型大鼠体内的药时曲线符合二室模型特征; 所建立的方法准确, 灵敏度高, 专属性好, 可作为獐牙菜苦苷体内血清药物浓度分析方法。

[关键词] 地格达-4 味汤; 獐牙菜苦苷; 急性肝损伤模型大鼠; 药代动力学

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0125-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120113.1031.005 **[网络出版时间]** 2012-01-13 10:31

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120113.1031.005.html>

Pharmacokinetics Study of Swertiamain of Mongolian Medicine DIGEDA-4 Decoction in Acute Liver Lesion Rat

BAI Mei-rong*, BA-GEN Na, LA XINA Mujila, GAO Yu-feng

(Inner Mongolia University for Nationalities, Inner Mongolia, Tongliao 028000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the serum concentration of swertiamain in acute liver damage rat and to investigate pharmacokinetics of swertiamain. **Method:** The model of acute liver damage rat was established by *D*-galactosamine (*D*-GalN) 400 mg·kg⁻¹ intraperitoneal injection. After the rats were administered by DIGEDA-4 decoction, HPLC was used to determine the serum concentration of swertiamain at different times; Winnonlin 5:1 procedure was used to calculate concentration-time data and pharmacokinetic parameters. **Result:** The linearity were ranged from 0.15-4.8 μg·L⁻¹ ($r=0.998\ 9$) and the average recovery was higher than 80%. Methodology investigation was all complied with the requirements. After oral administration of DIGEDA-4 decoction, the $T_{1/2}$ was similar, the relationship between dose and AUC showed good linearity. **Conclusion:** The swertiamain was fitted to be a two-compartment model in acute liver damage rat. The method described in this report was accurate and has high sensitivity and selectivity which can be used to analyze quantitatively the serum concentration of swertiamain of the DIGEDA-4 decoction.

[Key words] DIGEDA-4 decoction; swertiamain; acute liver damage rat; pharmacokinetics

[收稿日期] 20110922(00202)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960524)

[通讯作者] *白梅荣, 副教授, 研究生导师, 博士, 从事蒙药药理毒理及药物代谢研究, Tel: 15804758404, E-mail: baimeirong@126.com

地格达-4 味汤始载于《诊治明医典》, 1998 年被载入《中华人民共和国药品标准》(蒙药分册), 由肋柱花、胡黄连、栀子、瞿麦等 4 味药组成, 具有清血热、分解精华和糟粕之功效^[1], 主要用于肝炎等“希拉”和“热”过盛而引起的疾病。地格达-4 味汤中君

药肋柱花主要含有吡啶类化合物、獐牙菜苦苷、木犀草素、齐敦果酸等有效成分,具有利胆、保肝作用^[2]。本文以獐牙菜苦苷为指标性成分,建立急性肝损伤模型大鼠血清中獐牙菜苦苷的 HPLC 血药浓度测定方法,并对其进行药代动力学研究,为地格达-4 味汤临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂 地格达-4 味汤(内蒙古民族大学提供),獐牙菜苦苷对照品(110785-200203),甲醇(Fisher 公司,色谱纯),纯净水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 高效液相色谱仪(SHIMADZU SPD-M10A LC-10AT)(日本),NA-5L 型氮气空气一体机(北京中西泰安技术服务有限公司),DD-5I 型离心机(济南福的机械有限公司),FA1104N 型分析天平(苏州中泽仪器有限公司)。

1.3 动物 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重(250 ± 10)g,北京维通利华实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京)2006-0009。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药^[3] SD 大鼠随机分为模型组、空白对照组和地格达-4 味汤高、中、低 3 个剂量组,各组每时间点为 10 只。用药前大鼠禁食 12 h,自由饮水,按 400 mg·kg⁻¹剂量腹腔注射 D-半乳糖胺(D-GIaN)制备急性肝损伤模型大鼠,24 h 后尾静脉取血,以全自动生化仪测定血清谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活性,模型组含量明显高于空白对照组,则认为模型成功。模型成功后给药组灌胃含 0.39,0.77,1.54 g·kg⁻¹地格达-4 味汤的 0.5% CMC-Na 药物溶液。

2.2 取样 分别于给药后 5,15,30,45,60,90,120,180,240,480 min 时,以 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉,从腹主动脉取血,4 °C 以下 4 000 r·min⁻¹离心 15 min,分离血清,于 -20 °C 保存备用。

2.3 血清样品预处理^[4] 精密吸取待测血清 300 μL,置 2 mL 试管内,加入 3 倍体积甲醇,涡旋混匀 2 min,以 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液,另置于 1 mL 试管内,氮气吹干样品,加入 100 μL 甲醇,涡旋混匀 2 min,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,微孔滤膜滤过,进样分析,样品进样量为 10 μL。

2.4 分析方法

2.4.1 色谱条件 Dimaonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(B)-0.1% 磷酸水

(A)(22:78),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 238 nm。

2.4.2 专属性试验 分别进样大鼠空白血清、含獐牙菜苦苷对照品血清和灌胃地格达-4 味汤水提取物后大鼠血清样品,比较獐牙菜苦苷出峰位置是否存在干扰。

2.4.3 标准曲线的制备 在空白血清中加入适量獐牙菜苦苷对照品溶液,精确配制成 2.5,10,25,50,100,200,500 mg·L⁻¹ 系列质量浓度溶液,按样品处理方法操作,进行分析。以样品中对照品的质量浓度(C)为横坐标,对照品峰面积(A)为纵坐标,建立回归方程。

2.4.4 精密度试验 配制高、中、低浓度的质控样品,按样品的处理方法平行操作,于日内不同时间处理 5 份样品,用工作曲线计算浓度,考察日内精密度;每天各测定 1 份样品,连续 5 d,考察日间精密度。

2.4.5 回收率试验 在空白血清中加入适量獐牙菜苦苷对照品溶液,准确配制高、中、低 3 个浓度的质控样品各 5 份,同上处理方法操作,记录峰面积,计算其回收率。

3 结果

3.1 专属性 由图 1 可知,在对照品溶液和含药血清供试品溶液色谱图相应位置上,有相同保留时间的色谱峰且空白血清样品及空白甲醇无干扰。

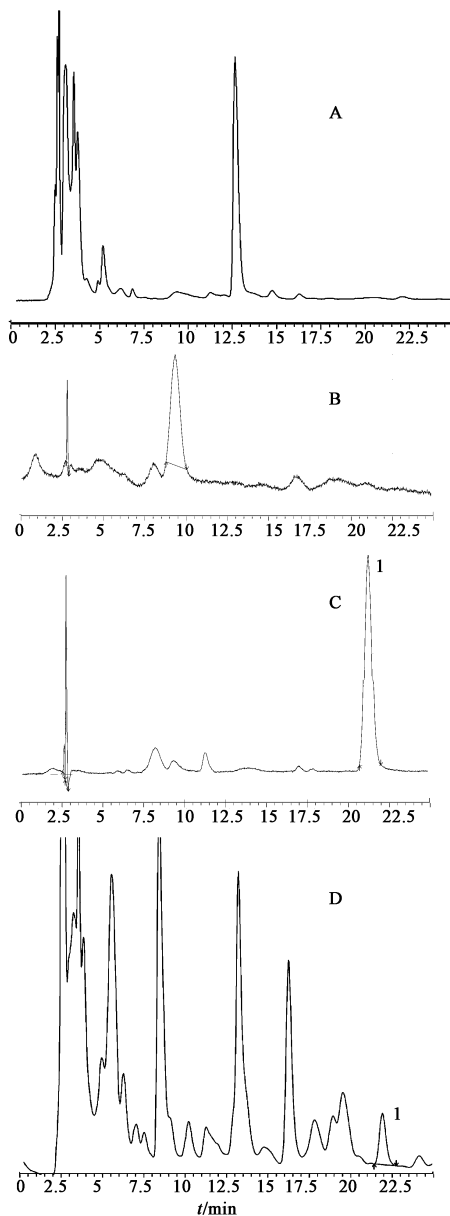
3.2 标准曲线 以峰面积(A)为纵坐标,样品质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 5\ 863\ 182.895\ 0X + 310.781\ 1$ ($R^2 = 0.993\ 4$),獐牙菜苦苷在 0.000 6 ~ 0.019 2 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

3.3 回收率与精密度 獐牙菜苦苷在血清中回收率稳定,平均回收率均达 80% 以上,精密度 RSD 均 < 7%,均符合实验要求。见表 1 ~ 2。

表 1 獐牙菜苦苷血清样品回收率考察($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度 /mg·L ⁻¹	獐牙菜苦苷/%	
	$\bar{x} \pm s$	RSD
0.000 6	81.71 ± 1.16	2.07
0.004 8	88.00 ± 0.94	2.88
0.019 2	88.48 ± 1.07	3.23

3.4 稳定性试验 在空白血清中加入适量獐牙菜苦苷对照品溶液,准确配制高、中、低 3 个质量浓度的质控样品各 5 份,按照 2.3 项下血清样品处理方法处理,分别室温放置、冻融 2 次,发现獐牙菜苦苷血清样品在 -20 °C,冰箱内冷冻保存,7 d 内样品稳



A. 空白血清; B. 空白甲醇; C. 对照品;
D. 血清样品; 1. 獐牙菜苦苷

图1 地格达-4味汤血清样品色谱

定,血清样品在室温下 24 h 内稳定。血清样品反复

冻融 2 次后测定獐牙菜苦苷的浓度无明显降低 (RSD < 10%), 结果稳定。

表 2 獐牙菜苦苷血清样品精密度考察 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度 /mg·L ⁻¹	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
0.000 6	3.408 0 ± 0.248 1	5.66	3.501 2 ± 0.115 2	3.78
0.004 8	2.553 6 ± 0.189 4	6.95	2.423 1 ± 0.208 5	5.61
0.019 2	93.498 4 ± 11.023 5	3.72	94.506 7 ± 15.047 2	8.95

3.5 獐牙菜苦苷在急性肝损伤模型大鼠体内药代动力学参数 采用 Winnonlin 5.1 药动学软件对血药浓度随时间变化的趋势进行拟合, 根据最小 AIC 法和曲线拟合优度判别标准, 建立房室模型并估算在大鼠体内的主要药动学参数, 獐牙菜苦苷血液浓度-时间曲线结果见图 2, 药代动力学参数见表 3。结果表明, 獐牙菜苦苷体内的药时过程基本上符合一级吸收的二室开放模型。獐牙菜苦苷的药时曲线下面积 (AUC) 增加与剂量之间具有较好的线性关系, 半衰期基本一致。因此可以判断獐牙菜苦苷在大鼠体内属于线性动力学过程。

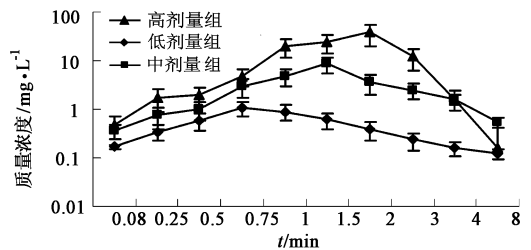


图 2 地格达-4味汤中獐牙菜苦苷
血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

本实验表明, 在甲醇-0.1% 磷酸水 (22:78) 的流动相条件下, 大鼠血清中獐牙菜苦苷峰形态良好, 保留时间适中; 并选用了甲醇沉淀法对血清样品进行处理, 效果较好。一级速率的判断标准是 AUC 随剂

表 3 獐牙菜苦苷在急性肝损伤模型大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

药动学参数	0.000 6/mg·L ⁻¹	0.004 8/mg·L ⁻¹	0.019 2/mg·L ⁻¹
T_{max}/h	0.84 ± 0.13	1.60 ± 0.62 ²⁾	1.87 ± 0.81 ⁴⁾
$C_{max}/mg·L^{-1}$	1.072 5 ± 0.12	8.587 9 ± 1.27 ²⁾	37.680 2 ± 14.01 ^{2,3)}
$T_{1/2}/h$	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.41 ± 0.05 ^{1,3)}
K_e/h^{-1}	35.01 ± 13.09	40.12 ± 12.32	42.68 ± 15.30
$CL/F/L·h^{-1}·kg^{-1}$	0.365 ± 0.19	0.287 ± 0.04	0.398 ± 0.08 ³⁾
$V_d/F/L·kg^{-1}$	0.130 ± 0.08	0.106 ± 0.05	0.115 ± 0.08
$AUC_{0 \rightarrow t}/\mu g·h^{-1}·mL^{-1}$	2.263 8 ± 0.28	18.126 4 ± 1.78 ²⁾	60.221 6 ± 6.89 ^{2,4)}
$AUC_{0 \rightarrow \infty}/\mu g·h^{-1}·mL^{-1}$	2.267 3 ± 0.27	17.138 4 ± 1.52 ²⁾	65.330 2 ± 8.36 ^{2,4)}

注: 与低剂量组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

量线性增加,半衰期保持相对稳定,尿药排泄量随剂量增加而增加。根据本研究结果,符合前 2 条,说明獐牙菜苦苷在体内过程具有一级速率的线性药代特征。本实验建立 HPLC 检测獐牙菜苦苷的方法具有较高的准确度、灵敏度和专属性,适合獐牙菜苦苷的体内分析及药动学研究,具有较好的借鉴价值。

本实验特点是,从药物的临床应用角度切入,选择疾病状态的急性肝损伤模型大鼠为研究对象,以地格达-4 味汤为示例药物,以 HPLC 观察地格达-4 味汤中獐牙菜苦苷在模型动物体内药代动力学过程,以期明确病理状态下獐牙菜苦苷的体内变化,确切指导地格达-4 味汤临床应用。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国

卫生部药品标准:蒙药分册[S]. 北京:化学工业出版社,1998:103.

[2] 吴柒柱,包巴特尔,白海花. 蒙药肋柱花的研究进展[J]. 时珍国医国药,2004,15(6):366.

[3] 刘立昌,张磊,张永和. 愈肝片对 D-氨基半乳糖小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 广州中医药大学学报,2003,20(1):57.

[4] 罗焕敏,李晓光,肖飞,等. 当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的药代动力学研究[J]. 中药材,2003,26(3):189.

[5] 刘东锋,张莉,陈婷. 四逆散有效成分芍药苷药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(2):36.

[责任编辑 邹晓翠]

欢迎订阅 2012 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,288 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2012 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjzz.com。