

微细化工艺制备的葛根微粉抗氧化抗凝血及其体内吸收动力学研究*

王雪莉, 苏 慧, 邢东明, 陈芸芸, 陶佳林, 丁 怡, 杜力军
(清华大学生物科学与技术系药物药理研究室, 北京 100084)

摘要: 目的: 探讨葛根微粉在药效和体内吸收动力学的特点, 为微细化工艺在中药中的正确应用提供实验依据。方法: 以凝血时间和脑中 MDA 的含量, 来观察葛根微粉的药效。给大鼠灌胃葛根微粉, 通过用 HPLC 测定血浆中葛根素的浓度, 研究其在大鼠体内的吸收动力学过程。结果: 中剂量的葛根微粉显著延长小鼠的出凝血时间。大中小剂量(1.2, 0.6, 0.3g·kg⁻¹)的微粉均可以显著降低脑中 MDA 的含量。灌胃葛根微粉后, 血中葛根素达峰时间为 0.344 ± 0.085h, 峰浓度为 2.23 ± 0.32μg·mL⁻¹。结论: 葛根制成微粉后灌胃, 在大鼠体内释放和吸收较快, 并在一定程度上保持了原有的活性。

关键词: 葛根; 微粉; 葛根素; 药效; 药代动力学

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2005)03-0032-03

通过微细化工艺制备的中药, 又称微米中药, 在中医药行业中的应用已经引起了广泛的关注。已有文献报道, 经过超细粉碎技术制成的中药制剂在药效指标上明显优于传统制剂, 并认为其作用的关键在于微粉中药吸收能力有了较大的提高^[1-2]。但是这种微细化制备方法对中药的药效和吸收及其体内动力学过程究竟有多大地影响, 是不是每一味中药都适应这种微粉的形式, 对其进行研究将有助于我们更全面深入地认识这种技术。目前将药效与药代结合对微细化工艺制备的中药进行研究的报道较少, 因此我们选择了在药效和药化研究比较充分的常用中药葛根作为研究对象, 将其制成微粉后, 从相关活性和口服后体内吸收动力学过程等方面进行了考察。

1 材料和方法

1.1 葛根微粉药效试验

1.1.1 材料和仪器 葛根购自同仁堂药店, 由本室向兰博士鉴定为 Radix Puerariae, 制成微粉(由清华大学材料系制备, 批号: 020331, 微粉中约 95% 以上的微粒长度和直径均在 20μm 以内); 阿司匹林片(25mg·片⁻¹, 北京市曙光制药厂, 批号: 010205); 葛根黄酮(总黄酮含量为 82%, 本室植化组提供, 批号

980812); 752 紫外光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂); ICR 小鼠, 体重 19.2 ± 1.8g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK(京)2002-0003; 其余试剂为国产分析纯。

1.1.2 小鼠凝血时间和脑中过氧化脂质 MDA 含量测定 取雄性小鼠 60 只随机分 6 组, 每组 10 只, 分别给予蒸馏水, 阿司匹林(20mg·kg⁻¹), 葛根黄酮(100mg·kg⁻¹), 葛根微粉(1.2, 0.6, 0.3g·kg⁻¹)等药物。每天灌胃给药 1 次, 连续给药 28d。于最后一次给药 1h 后, 眼眶取血, 玻片法^[3]测定凝血时间, 并立即处死小鼠, 取脑测定 MDA 含量^[4]。数据用 Student's *t* test 进行统计学分析。

1.2 葛根微粉体内药代动力学试验

1.2.1 材料和仪器 葛根微粉同 1.1.1; Waters 高效液相色谱仪(515 泵, 7725 进样器, 996 二极管阵列检测器, Millennium³² 色谱工作站)(Waters 公司); 色谱柱: 依利特 Hypersil ODS2 5μm, 4.6 × 150mm; 葛根素对照品(批号 752-200108; 中国药品生物制品检定所); 雄性 Wistar 大鼠, 体重(238 ± 14g), 购自中国医学科学院实验动物研究所, 合格证号: SCXK11-00-0006。随机区组法按采样点分组, 每组 5 只鼠, 共 35 只, 每只鼠采血一次; 甲醇(色谱纯, 天津市康得科技有限公司, 020612); 其余试剂为分析纯。

1.2.2 经 HPLC 测定, 葛根微粉中葛根素的含量为 3.43%, 按照葛根素 100mg·kg⁻¹ 体重给大鼠灌胃微粉。

收稿日期: 2004-04-23

基金项目: 清华大学基础研究基金课题(No. JC2001050)

通讯作者: 杜力军, Tel: (010) 62773630, Fax: (010) 62773630, E-mail: pham@mail.tsinghua.edu.cn

1.2.3 色谱条件 流动相甲醇-水-醋酸(20:80:0.4), 流速: $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 250nm, 进样量: 10 μL , 系统温度: 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.4 血浆样品处理方法 取 2mL 血浆样品于具塞玻璃试管中, 加入 1mL $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液, 混匀后, 加入 8mL 无水甲醇沉淀蛋白, 再次混匀后, $2000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min。将上清液转移置蒸发皿中, 残渣用 2mL 甲醇洗涤三次, 合并上清液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干。用 1mL 甲醇溶解残渣, 转移至 eppendorf 管中, 挥干甲醇, 定量加入 100 μL 甲醇溶解残渣, 作为样品液。

1.2.5 分析方法考察 线性范围及检测限 精密称取葛根素对照品适量, 加甲醇配制成 $1.21\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的贮备液。取贮备液用水按比例稀释, 得到不同浓度葛根素标准溶液。分别取 7 份空白血浆各 2mL, 置具塞试管中, 加入不同浓度葛根素标准溶液 0.605, 1.21, 2.42, 3.63, 4.84, 7.26, 12.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 100 μL , 按照血浆样品处理方法操作, 每份平行 3 份, 以峰面积(A)对浓度(C)作线性回归, 在 0.605~12.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间呈良好的线性关系, 回归方程为: $A = 40501C - 12253$, 相关系数 $R = 0.994$ 。方法特异性良好, 在待测药物出峰处无干扰。最低检测限为 $0.101\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

萃取回收率 将不同浓度葛根素标准溶液 0.605, 7.26, 12.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 按上述方法制备为血浆样品, 每份重复 3 份, 用 HPLC 测定峰面积, 与同浓度标准溶液样品峰面积比值分别为 90.36%, 101.0%, 97.35%。

精密度 将不同浓度葛根素标准溶液 0.605, 7.26, 12.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 按上述方法制备为血浆样品, 每份重复 3 份, 用 HPLC 测定峰面积, 日内精密度分别为 2.78%, 1.15%, 1.82%。三日内日间精密度分别为 5.78%, 2.61%, 2.48%。

1.2.6 采样 葛根微粉用蒸馏水配制成混悬液, 大鼠口服后, 于时间点 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4h 经乙醚麻醉, 每只鼠眼眶采血 5~6mL, 肝素钠抗凝分离血浆, -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.2.7 血药浓度测定 冻存血浆, 临用前置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴融化, 按血浆样品处理方法操作制得样品液, 进样 10 μL , 用 HPLC 测定, 并计算各时间点的血药浓度。

1.2.8 数据处理 血药浓度数据采用 3P87 药动学计算程序, 计算药动参数。

2 结果

2.1 小鼠凝血时间和脑中过氧化脂质 MDA 的测定结果, 见表 1。

表 1 葛根微粉灌胃给药对小鼠对凝血时间和脑 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

药物	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	凝血时间 /s	MDA(脑) / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
蒸馏水	—	98 \pm 25	35.8 \pm 7.8
阿司匹林	0.02	116 \pm 27	27.3 \pm 3.9 ¹⁾
葛根黄酮	0.1	113 \pm 36	26.6 \pm 3.3 ¹⁾
葛根微粉	1.2	112 \pm 28	24.9 \pm 6.6 ¹⁾
葛根微粉	0.6	167 \pm 41 ¹⁾	27.9 \pm 5.7 ¹⁾
葛根微粉	0.3	136 \pm 48	23.6 \pm 2.9 ¹⁾

注: 1) 与蒸馏水组相比较, $P < 0.01$ 。

2.2 体内药代动力学 在本试验的色谱条件下, 葛根素和其它组分得到很好的分离, 保留时间约为 18min。葛根微粉体内药时曲线如图 1, 药动学参数如表 2。

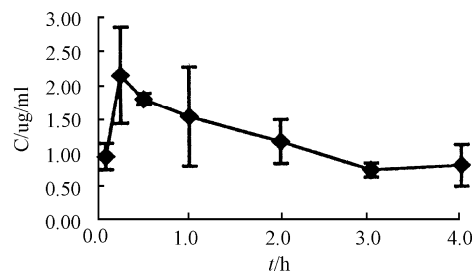


图 1 大鼠灌胃葛根微粉后体内葛根素血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 2 灌胃葛根微粉后葛根素在大鼠体内的药动学参数($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	数值	参数	数值
A($\mu\text{g}/\text{mL}$)	6.31 \pm 4.33	$T_{1/2\alpha}$ (h)	0.572 \pm 0.122
α (h^{-1})	2.18 \pm 1.17	$T_{1/2\beta}$ (h)	5.16 \pm 1.17
B($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.14 \pm 0.11	$T_{1/2k_a}$ (h)	0.104 \pm 0.044
β (h^{-1})	0.155 \pm 0.024	K_{21} (h^{-1})	0.624 \pm 0.061
K_a (h^{-1})	12.6 \pm 4.18	K_{10} (h^{-1})	0.362 \pm 0.053
AUC($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	9.09 \pm 1.27	K_{12} (h^{-1})	1.35 \pm 1.04
CL(s)($\text{mL}/\text{h}\cdot\text{kg}$)	11.9 \pm 1.59	Lag Time(h)	0.032 \pm 0.011
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.23 \pm 0.32	T(peak)(h)	0.344 \pm 0.085
V/F(c)(L/kg)			

注: 给药剂量以葛根素计为 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

3 讨论

文献报道, 葛根黄酮具有抗凝血^[5]和抗氧化^[6]的作用, 所以我们选择这两个指标来评价葛根微粉的活性。本试验表明, 中剂量的葛根微粉显著延长小鼠的凝血时间, 大小剂量均有延长的趋势。大中小剂量(1.2, 0.6, 0.3 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的微粉均可以显著降低脑中 MDA 的含量。在这些试验结果中, 葛根微粉的活性优于或与阳性对照药相当。

给大鼠灌胃葛根微粉后, 血中葛根素达峰时间为 $0.344 \pm 0.085\text{h}$, 表明葛根微粉在大鼠体内释放和吸收较快。血药浓度在大鼠体内分布相半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 为 $0.572 \pm 0.122\text{h}$ 。文献报道^[7] 给大鼠口服葛根黄酮(其中葛根素占 32%), 剂量为 $1.2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 其 $t_{1/2\alpha}$ 为 $47.4 \pm 17.4\text{min}$ ($n=5$), 与葛根微粉相比, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。口服葛根微粉后峰值浓度 (C_{max}) 为 $2.23 \pm 0.32\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而口服葛根黄酮后 C_{max} 为 $110 \pm 50\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 如果以 C_{max} 占口服药中葛根素绝对含量的百分比来反应其吸收率, 葛根微粉吸收率为 0.022% ($2.23/100000$), 葛根黄酮则为 0.286% ($110/384000$), 可以看出葛根黄酮的吸收率是葛根微粉的 13 倍 ($0.286/0.022$)。以所给药物中葛根素绝对量计算, 葛根黄酮中葛根素量 ($384\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 为葛根微粉中葛根素量 ($100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 3.84 倍 ($384/100$), 但灌胃后葛根黄酮中葛根素的吸收率是葛根微粉的 13 倍, 给予葛根黄酮后, 血中葛根素的浓度增强了 3.4 倍 ($13/3.84$), 表明葛根黄酮的吸收率较葛根微粉强。由上表明, 葛根微粉中葛根素的吸收特性(如达峰时间短)与葛根黄酮中葛根素的基本相近, 只是其吸收的绝对量或生物利用度不及葛根黄酮。

由于我们在做葛根微粉药代预试中发现葛根素血药浓度低, 检测困难, 所以药代试验中我们将葛根

微粉的剂量加大, 按葛根素计 $100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药。药效试验中, 葛根微粉大剂量为 $1.2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其中含葛根素 $41.2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 按照剂量换算, 葛根微粉药效的大剂量远小于药代动力学的给药剂量 ($100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 药代的给药剂量为药效试验用量的 2 倍强 ($100/41.2$)。葛根微粉药效和药代的这种剂量的大小差异, 提示葛根微粉的药理活性除葛根素外, 尚可能有其它成分参与, 即葛根素不是唯一的活性成分; 同时也表明药物体内作用具有其复杂性。关于葛根微粉药理活性, 还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 杜晓敏, 刘璐, 何煜. 原生药材超细微粉制剂的药效学研究[J]. 中草药, 1999, 30(9): 680.
- [2] 杜晓敏, 郭琪, 何煜. 中成药传统制剂与超细微粉制剂的药效学比较[J]. 中成药, 2000, 22(4): 307.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 481.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996. 1225.
- [5] 杜力军, 徐治国, 於兰, 等. 从葛根黄酮的药理作用探讨其中药药性[J]. 中医杂志, 1998, 39(10): 626.
- [6] 卢弈, 娄建石, 李会强, 等. 葛根素对乳鼠心肌细胞缺氧-复氧时脂质过氧化物损伤的保护作用[J]. 中草药, 2002, 33(4): 343.
- [7] 杜力军, 於壮, 常琪, 等. 新工艺制备的葛根黄酮的药代动力学研究[J]. 中药药理与临床, 1997, 13(2): 19.