

# 金森脑泰注射剂中葛根素在生理及病理状态下大鼠肝肾分布的比较

王莉<sup>1</sup>, 邢东明<sup>1</sup>, 孙虹<sup>2</sup>, 金文<sup>2</sup>, 炎彬<sup>2</sup>, 杜力军<sup>1</sup>

(1. 清华大学生物科学与技术系药物药理研究室, 北京 100084

2. 中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

**摘要:**目的: 研究脑血管药金森脑泰注射剂(CBN)中葛根素在大鼠肝肾分布的药物动力学。方法: 取正常和脑缺血再灌大鼠行股静脉给药。采血和肝肾。HPLC 测定葛根素含量。计算肝肾中葛根素含量变化。结果: 静脉给药后正常大鼠葛根素主要在肾脏分布。且分布较快。药后 15min 分布达峰值, 30min 迅速下降。肝脏分布量少, 但达峰时间及分布特点同肾脏。缺血再灌大鼠肝脏药物浓度明显升高。为正常鼠的 2 倍强。肾脏达峰时间明显延迟为 30min。结论: CBN 中葛根素主要在肾脏分布。缺血再灌时经肾分布时间延迟。肝脏含量明显升高。生病理状态下肝肾二脏中葛根素存在着明显的药物动力学差异。

**关键词:** 金森脑泰注射剂; 葛根素; 药代动力学

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)03-0041-03

## Comparison of Puerarin of CBN Injection in the Liver and Kidney of Normal and Ischemia-reperfusion Rats

WANG Li<sup>2</sup>, XING Dong-ming<sup>1</sup>, SUN Hong<sup>2</sup>, JIN Wen<sup>2</sup>, YAN Bin<sup>2</sup>, DU Lijun<sup>1</sup>

(1. Lab of Pharmacy and Pharmacology, Department of Biological Science and

Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 10084, China

2. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical

Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

**Abstract:** To study puerarin in CBN injection on the active distribution in rat's liver and kidney, CBN injection was given (iv, 100mg/kg) by femoral vein on both normal and cerebral ischemia reperfusion rats, then the blood by abdominal aorta and the liver and kidney were collected, and then puerarin from them was prepared. The concentration of puerarin from the samples was determined by HPLC and the active distribution of puerarin in both liver and kidney was determined at last. Results showed puerarin distributed quickly in liver and kidney after iv CBN injection in normal rats. The peak-time of concentration in kidney was at 15 min after injection, and downwards quickly at 30 min. In model rats, the concentration in liver was higher than normal rat 2 times as many as. The peak time was obviously delayed at 30 min after the injection. The results indicated the kidney was a major organ for puerarin distribution after CBN injection. But in model rats, the concentration of puerarin in kidney decreased, while increased in liver.

**Key words:** cerebral blood nutrition; Puerarin; Pharmacokinetics

金森脑泰注射剂(CBN)为脑血管注射剂。由三七皂甙和葛根黄酮组成。其含量分别为 92% 和 82%。研究表明, 该药具有改善脑缺氧, 保护神经元, 改善脑血流等作用<sup>[1]</sup>。其中葛根素为其主要活性成分之一。葛根素及葛根黄酮的药代研究较多<sup>[2]</sup>但在有效部位复方内, 葛根素的体内分布如何, 尤其

是在主要排泄器官肝肾的分布如何, 尚无报道。对 CBN 中主要活性成分之一葛根素肝肾分布进行研究, 将有助于阐明该药体内过程, 为临床更好地使用该药提供理论依据。同时对于中药复方药代动力学的研究提供有益地尝试。

### 1 实验材料

**1.1 实验动物** 雄性 Wistar 大鼠 110 只。体重 200 ± 12g。购自中国预防医学科学院流行病微生物研究所。合格证号: 京动管质字: SCXK11-00-0006。

**1.2 实验仪器** WATERS 高效液相色谱仪, MOD-

收稿日期: 2001-08-24

基金项目: 国家科技部 95 攻关项目: No96-901-05-105; 清华大学基础研究基金 No. JC2000061

EL490 紫外检测器, MODEL600 泵。BASELINE 色谱工作站。色谱柱: SUPELCOSILL G-18(15cm × 4.6mm, 5μm)。WH 漩涡混合器(江苏太仓通唐朝器材厂)。TGL-16C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

**1.3 药品与试剂** CBN 水针 (100mg/ml), 由药植所药剂室提供, 批号: 970910。葛根素含量 5mg/ml。葛根素标准对照品(纯度 98%), 批号: 0752-9806, 购自中国药品生物制品检定所。无水甲醇(分析纯, 批号: 980426), 解放军第 9066 工厂生产。色谱用水和甲醇在使用前均重蒸。

### 2 实验方法<sup>[3]</sup>

**2.1 肝脏样品预处理** 取全肝, 将其分为几部分转入烧杯中, 分别按 1: 4(G/V) 加入生理盐水。匀浆后, 按 1: 13.5(g/v) 加入无水甲醇, 沉淀蛋白。混匀后, 4000rpm 离心 20min。将上清液转至试管中, 残渣用 2ml 甲醇洗涤两次, 一并转入试管中, 于 40℃水浴挥发。等挥发至一定程度, 将几支试管中液体合并, 残渣用 2ml 甲醇洗涤两次, 洗液全部转入一试管中, 再于 40℃水浴挥发至干。最后用 0.3ml 甲醇定量溶解残渣, 3000rpm 离心 15min, 取上清液, 作为样品液, 进样 20μl。

**2.2 肾脏样品预处理** 取肾样品于烧杯中, 按 1: 4(G/V) 加入生理盐水, 组织匀浆。按 1: 13.5(G/V) 加入无水甲醇, 沉淀蛋白, 混匀后, 3000rpm 离心 15min, 将上清液转移至试管中, 残渣用 2ml 无水甲醇洗涤两次, 合并入试管中, 于 40℃水浴挥发。定量加入 0.4ml 无水甲醇溶解残渣, 3000rpm 离心 10min, 取上清转移至 appendorff 管, 进样 20ul。

**2.3 高效液相色谱条件及方法学考察** 流动相: 甲醇: 水(25: 75, V/V)。流速: 1.0ml/min。检测波长: 250nm。系统温度: 室温。进样体积: 20μl。外标法峰面积定量。

上述色谱条件下, 肝脏中葛根素的保留时间为 13.00min(生理), 13.19min(病理)。葛根素标准品的保留时间为 13.67min。取空白肝脏各 0.2g, 加入 0.5ml 生理盐水, 匀浆后加入不同浓度的葛根素标准液, 做线性范围。以峰面积(S)对浓度(C)作图, 加权处理, 得标准曲线  $S = 2.428 \times 10^6 C + 1.157 \times 10^5$ , 相关系数  $r = 0.990$ , 线性范围 0.5-50μg/ml。最低检测量 0.31μg/ml。配制三个浓度的葛根素依肝组织样品处理法处理, 得萃取回收率分别为 83.1, 83.5, 73.9%。日内精密加入量分别为 0.01, 0.6, 1.0ug, 其测出量的 RSD 分别为 35, 7.8, 9.6%, 日间精密

RSD 分别为 8.3, 8.9, 23.4%。

上述色谱条件下, 肾脏中葛根素的保留时间为 9.35min(生理), 10.78min(病理)。葛根素标准品的保留时间为 8.63min。取空白肾脏 5 个, 各 0.5g, 加入 13ml 生理盐水, 匀浆后加入不同浓度的葛根素标准液, 做线性范围。以峰面积(S)对浓度(C)作图, 加权处理, 得标准曲线  $S = 1.566 \times 10^6 C + 1.168 \times 10^5$ ,  $r = 0.993$ , 线性范围 0.002-0.12μg/ml。最低检测量 0.0021μg/ml。配制三个浓度的葛根素依肾脏样品处理法处理, 得萃取回收率分别为 95.4, 86.7, 86.6%。日内精密加入量分别为 0.01, 0.6, 1.0μg, 其测出量的 RSD 分别为 1.3, 4.5, 6.7%, 日间精密 RSD 分别为 5.1, 7.8, 3.7%。

**2.4 对正常大鼠的肝肾分布** 取大鼠随机分为 11 组, 每组 5 只。将大鼠以 10% 乌拉坦麻醉, 背位固定, 股静脉给 CBN 注射液(100mg/kg), 给药持续时间 30s, 给药体积 1ml/kg。于给药后 5, 10, 15, 30, 35, 60min 分别腹主动脉取血, 取肝和肾脏。即入-30℃冰箱冻存。备测。每个时间点取鼠 5 只。

**2.5 对脑缺血再灌大鼠的肝肾分布** 取大鼠随机分为 11 组, 每组 5 只。取大鼠以 10% 乌拉坦麻醉。分离颈总动脉, 结扎造成全脑缺血 30min。复灌 0min 随即股静脉给药(100mg/kg), 分别于给药后 5, 10, 15, 30, 45, 60min 腹主动脉取血, 并取肝肾。即入-30℃冰箱贮存。

**2.6 指标表达** 葛根素含量以每克组织含葛根素(μg)表示。所占总给药量百分比=葛根素含量(μg/g)/葛根素总给药量(2mg/200g 体重) × 100%。

**2.7 所得数据** 以 EXCEL 软件处理。组间 t 检验。

### 3 结果

表 1 单剂量注射 CBN 后大鼠肾脏中葛根素浓度( $\bar{x} \pm s$ ; n = 5)

时间 (min)	葛根素浓度(ug/g)	
	正常大鼠	缺血再灌大鼠
5	0.266 ± 0.023 <sup>#</sup>	0.135 ± 0.013
10	0.631 ± 0.051 <sup>#</sup>	0.213 ± 0.054
15	3.165 ± 0.549 <sup>***#</sup>	1.541 ± 0.148 <sup>**</sup>
30	2.541 ± 0.863 <sup>**</sup>	3.107 ± 0.521 <sup>*</sup>
45	1.139 ± 0.124 <sup>*</sup>	1.109 ± 0.167 <sup>*</sup>
60	0.302 ± 0.116	0.347 ± 0.105

与给药后 5、10 和 60min 组葛根素浓度相比<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ; 与同一时间缺血再灌大鼠相比<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ 。

分别计算各大鼠肝肾不同时间药物浓度曲线下面积 AUC<sup>[4]</sup>, 得正常大鼠肾肝 AUC<sub>葛根素</sub> 分别为

( $7.759 \pm 0.853$ ) 和 ( $0.062 \pm 0.005$ )  $\mu\text{g/g}$ , 缺血再灌鼠肾肝  $AUC_{\text{葛根素}}$  分别为 ( $6.211 \pm 0.523$ ) 和 ( $0.149 \pm 0.018$ )  $\mu\text{g/g}$ , 两组相应肾肝  $AUC_{\text{葛根素}}$  相比, 均有明显差异 ( $P < 0.01, n = 5$ )。

表 2 单剂量注射 CBN 后大鼠肝脏中葛根素浓度 ( $\bar{x} \pm s; n = 5$ )

时间 (min)	葛根素浓度 ( $\mu\text{g/g}$ )	
	正常大鼠	缺血再灌大鼠
5	$0.004 \pm 0.002^{*#}$	$0.02 \pm 0.002$
10	$0.016 \pm 0.002^{*#}$	$0.022 \pm 0.002$
15	$0.034 \pm 0.005^{*##}$	$0.067 \pm 0.018^{\Delta\Delta}$
30	$0.009 \pm 0.001^{\#}$	$0.044 \pm 0.012^{\Delta}$
45	0	$0.014 \pm 0.005$

与正常大鼠 5、10 和 30min 相比\*\*  $P < 0.01$ ; 与正常大鼠 5 和 30min 相比\*  $P < 0.05$ ; 与同一时间缺血再灌大鼠相比#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , 与缺血再灌大鼠 5、10、30、45min 相比 $\Delta\Delta$   $P < 0.01$ ; 与缺血再灌大鼠 5、10、45min 相比 $\Delta$   $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

**4.1 生理状态下葛根素在肾肝脏中的分布** 实验结果表明, 静脉注射 CBN 15min 后, 葛根素在肾中的浓度达到最高, 占总给药量的 31.7%。并随静脉注射后时间的延长而很快下降, 1h 后肾内的药量为 15min 时 9.5%, 占总给药量的 3%。提示该药在肾脏内不易蓄积。静脉注射 CBN 15min 后, 葛根素在肝中的浓度达最高, 占总给药量的 0.3%, 同其在肾中分布规律相似。其后药物浓度迅速下降, 至 30min 仅为给药量的 0.09%。静脉给药后 45、60min 在肝中已经检测不出药物, 说明该药在肝内的药物含量很少, 而且消除相当快, 不易形成蓄积。

通过比较葛根素在大鼠肾肝二脏中的含量, 可知该药主要在肾脏分布, 二者存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。1h 内肝脏药物总含量仅占相同时间内肾脏药物总含量的 0.8%。

**4.2 在缺血再灌大鼠中肾脏肝脏中的分布** 病理

状态下, 葛根素在大鼠肾脏分布与其在生理状态下有所不同, 主要表现在药物浓度达峰时间的不同, 分别为 15min(生理) 和 30min(病理)。其峰值浓度分别为  $7.78\mu\text{g/g}$ (生理) 和  $6.32\mu\text{g/g}$ (病理)。比较不同状态下药物在肝脏的分布, 发现虽然其达峰时间一样, 但在缺血再灌大鼠肝脏药物浓度要明显偏高, 为生理状态下的 2 倍强 [ $(0.149/0.062)\mu\text{g/g}$ ]。但仍远远低于肾脏药物浓度。与此同时, 其在肾脏的分布也有明显的滞后及延迟, 而且药物浓度比生理状态下明显降低, 表明葛根素在缺血再灌状态下向组织灌注速率减慢, 分布的药物浓度也有一个再调整。这种再调整有什么病理生理学意义, 尚有待进一步研究。上述这种药物浓度的变化与本室所做 CBN 中葛根素在正常及缺血再灌大鼠体内血药浓度变化所得出结果可以相互印证: 缺血再灌大鼠平均滞留时间(MRT)、中心室表观分布容积( $V_c$ )和分布相半衰期( $t_{1/2\alpha}$ ) 分别为 ( $40.00 \pm 2.95$ )、( $0.071 \pm 0.039$ ) 和 ( $7.74 \pm 2.29$ ) min。正常大鼠中葛根素的上述三项指标分别为 ( $25.99 \pm 3.10$ )、( $0.217 \pm 0.016$ ) 和 ( $17.85 \pm 0.55$ ) min。二者相比, 有明显差异 ( $P < 0.05$ )<sup>[5]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 孙虹, 杜力军, 李敏, 等. CBN 对小鼠耐缺氧作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5): 23-25.
- [2] 朱秀媛. 葛根有效成分的代谢研究 III 葛根素的代谢及其药代动力学分析 [J]. 药学学报, 1979; 14: 339-341.
- [3] 曾经泽. 生物药物分析的质量控制 [J]. 中国药学杂志, 1995, 30(11): 692-5.
- [4] 刘昌孝, 孙瑞元. 药物评价实验设计与统计学基础 [M]. 北京. 军事医学科学出版社, 1999. 119-129.
- [5] 卢弘, 邢东明, 孙立红, 等. CBN 中葛根素、人参皂苷 Rg1 的高效液相色谱测定法及其在脑缺血再灌大鼠体内的药代动力学 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(5): 591-2.