

大鼠灌服青连宁心胶囊后盐酸小檗碱的组织分布研究^Δ

陈倩倩^{1*}, 司席席¹, 刘丹¹, 孙洪胜^{2#}, 曹广尚²(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院药剂科, 济南 250011)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1785-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.16

摘要 目的: 研究大鼠灌服青连宁心胶囊后盐酸小檗碱的组织分布规律。方法: 取36只大鼠ig青连宁心胶囊(4 g/kg), 分别于给药后1、3、5、7、9、11 h各取6只大鼠解剖取心脏、肝、脾、肺、肾等组织, 另取6只大鼠空白组织为对照。采用高效液相色谱法测定各组织中盐酸小檗碱的浓度, 色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, 流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾(25:75, pH=3.17), 检测波长为345 nm, 流速为1.0 ml/min, 柱温为25 ℃。结果: 各组织中盐酸小檗碱检测线性范围均为0.404 8~404.800 0 μg/ml($r=0.999\ 5\sim 0.999\ 7$), 方法回收率为90%~102%(RSD均不大于6.49%, $n=6$), 提取回收率为87%~101%(RSD均不大于5.45%, $n=6$)。给药1 h后, 各组织中均能检测到盐酸小檗碱, 其中以肝中浓度最高; 给药3 h后, 心脏中盐酸小檗碱的浓度即达到最大值; 给药5 h后, 肾中盐酸小檗碱浓度最高, 但肝中浓度不断升高, 且在给药7、9、11 h后检测浓度均最高; 给药11 h后, 肝中盐酸小檗碱浓度达365.263 4 μg/ml。结论: 大鼠ig青连宁心胶囊后盐酸小檗碱能较快分布到各组织, 其中在肝和心脏中分布较快、较多。

关键词 青连宁心胶囊; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法; 组织分布; 大鼠

Study on Tissue Distribution of Berberine Hydrochloride in Rats after Intra-gastric Administration of Qinglian Ningxin Capsules

CHEN Qianqian¹, SI Xixi¹, LIU Dan¹, SUN Hongsheng², CAO Guangshang²(1. College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the tissue distribution regularity of berberine hydrochloride in rats after intragastric administration of Qinglian ningxin capsules. **METHODS:** 36 rats were given Qinglian ningxin capsules (4 g/kg) intragastrically, and the heart, liver, spleen, lung, kidney tissues were collected 1, 3, 5, 7, 9, 11 h after medication, 6 rats each. Other 6 rats were selected to collect blank tissue as control. The concentration of berberine hydrochloride in each tissue was determined by HPLC. Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column was used with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05 mol/l potassium dihydrogen phosphate (25:75, pH=3.17) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 345 nm and column temperature was 25 ℃. **RESULTS:** The linear range of berberine hydrochloride in each tissue were 0.404 8-404.800 0 μg/ml ($r=0.999\ 5\sim 0.999\ 7$); method recovery was 90%-102% (all RSDs \leq 6.49%, $n=6$) and extraction recovery was 87%-101% (all RSDs \leq 5.45%, $n=6$). 1 h after medication, berberine hydrochloride was found in each tissue, and its concentration was the highest in liver. The concentration of berberine hydrochloride in heart reached the maximum 3 h after medication; that in kidney reached the maximum 5 h after medication; that in liver was increasing and reached the maximum 7, 9 and 11 h after medication; that in liver reached 365.263 4 μg/ml 11 h after medication. **CONCLUSIONS:** Berberine hydrochloride can be delivered in each tissue of rats rapidly after intragastric administration of Qinglian ningxin capsules. The distribution of it is higher and faster in liver and heart.

KEYWORDS Qinglian ningxin capsules; Berberine hydrochloride; HPLC; Tissue distribution; Rats

青连宁心胶囊是由山东中医药大学附属医院研制的院内制剂, 主要用于治疗快速性心律失常。其中的黄连是青连宁心胶囊中的君药, 黄连中所含盐酸小檗碱是本制剂主要活性成分之一^[1]。目前, 对黄连的现代研究多集中在传统药用价值及抗菌、抗炎方面^[2], 而近年研究发现黄连在治疗心血管疾病等方面疗效显著^[3-5]。本课题组在抗快速心律失常中药新药(快速宁胶囊、青山健心片等)的研究基础上, 经前期深入研究, 以效价比相对较高的抗心律失常中药黄连、青蒿为突破口, 研制了中药现代组分医院制剂——青连宁心胶囊, 并已开展了该

制剂的药效学研究。为进一步探究其药效基础, 现对青连宁心胶囊中主要活性成分盐酸小檗碱在大鼠体内的组织分布进行研究, 建立其在大鼠心脏、肝、脾、肺、肾中的含量测定方法, 观察ig青连宁心胶囊后大鼠体内不同时间点和主要脏器组织中盐酸小檗碱的分布经时变化规律。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Agilent 公司); KEJJ-2B 匀浆机(上海科哲生化科技有限公司); d-37520 osterode 超高速低温离心机(德国 Heraeus, 离心半径为60 mm); XMTD-4000 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司); KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); VG3S25 旋涡混合仪(德国 IKA 公司)。

1.2 药品与试剂

Δ 基金项目: 山东省重点研发计划项目(No.2014GGH219001)

* 硕士研究生。研究方向: 药物新剂型、新技术与新药研发。

E-mail: 925919255@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 中药制剂工艺与质量标准。E-mail: shs7777@163.com

盐酸小檗碱对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-15010411,纯度: 98.95%);水合氯醛、磷酸二氢钾、磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司);乙腈为色谱纯,水为纯净水(可用于HPLC分析),其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康SD大鼠,42只,♀♂各半,体质量(200±20)g,由中国科学院动物研究所提供,动物许可证号为SYXK(京)2012-0008。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(25:75,用磷酸调pH为3.17);流速: 1.0 ml/min;检测波长: 345 nm;柱温: 25 °C;进样量: 10 μl。

2.2 组织样品预处理^[6-7]

将给药不同时间后取出的各组织(心脏、肝、脾、肺、肾)用生理盐水冲洗表面的血液后,用滤纸吸干,称定组织质量,加生理盐水用高速匀浆机彻底匀浆,制成组织样品匀浆液。

量取大鼠各组织匀浆液200 μl,置于2.00 ml EP管中,加入3倍量甲醇,涡旋混合30 s,放置10 min,4 °C、10 000 r/min离心10 min,取上清蒸干(100 °C),加1 ml流动相溶解,4 °C、10 000 r/min离心5 min,取上清液,0.22 μm微孔滤膜过滤,取滤液备用。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取一定量的盐酸小檗碱对照品于10 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,制备成质量浓度为1.012 0 mg/ml的对照品贮备液。取4 ml贮备液于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制备成质量浓度为0.404 8 mg/ml的对照品溶液,平行制备2份,分别为对照品溶液A和对照品溶液B,于4 °C冰箱中避光保存,备用。

2.4 盐酸小檗碱浓度测定方法学考察

2.4.1 专属性 分别取大鼠空白组织(心脏、肝、脾、肺、肾)、空白组织+对照品、给药后组织样品,按“2.2”项下处理后,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。结果表明,被测物盐酸小檗碱不受组织(心脏、肝、脾、肺、肾)中内源性物质的干扰,保留时间约为11.3 min,基线平稳(本文中仅列出心脏组织的色谱图,其余图略)。色谱图见图1。

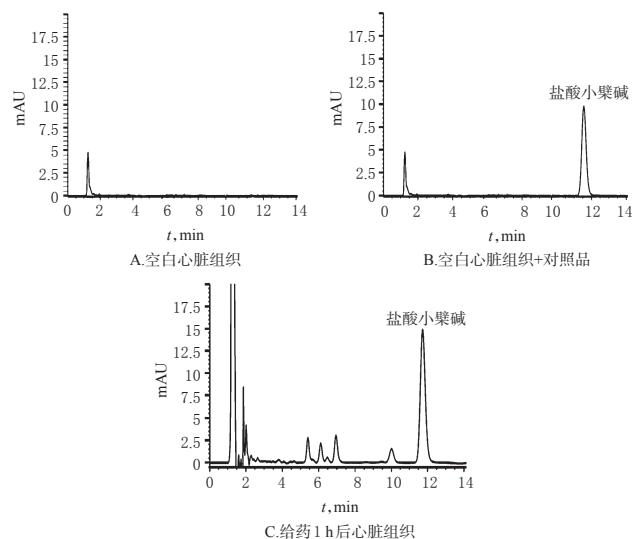


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4.2 线性关系 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液A,加流动相制备成质量浓度分别为4.048、20.240、80.960、202.400、404.800、809.600、1 619.200、3 238.400、4 048.000 μg/ml的盐酸小檗碱系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液100 μl置于盛有组织匀浆液的EP管中,按照“2.2”项下组织样品前处理方法操作,制得质量浓度分别为0.404 8、2.024 0、8.096 0、20.240 0、40.480 0、80.960 0、161.920 0、323.840 0、404.800 0 μg/ml的盐酸小檗碱各组织标准曲线样品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以盐酸小檗碱质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得各组织中盐酸小檗碱的标准曲线方程,见表1。结果显示,各组织中盐酸小檗碱检测质量浓度线性范围均为0.404 8~404.800 0 μg/ml。

表1 大鼠各组织中标准曲线方程和相关系数

Tab 1 Standard curve equations and related coefficients of berberine hydrochloride in each tissues of rats

组织	标准曲线方程	r
心	y=21.1x-35.102	0.999 5
肝	y=20.134x-26.411	0.999 6
脾	y=27.784x-95.99	0.999 7
肺	y=19.887x-1.680 9	0.999 6
肾	y=20.467x-33.57 1	0.999 5

2.4.3 定量下限与检测限 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液B,加流动相稀释,制备成不同质量浓度的盐酸小檗碱系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液100 μl置于盛有组织匀浆液的EP管中,按照“2.2”项下组织前处理方法操作,制得不同质量浓度的盐酸小檗碱样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各组织中盐酸小檗碱检测定量下限均为0.404 8 μg/ml(信噪比为10),检测限均为0.112 3 μg/ml(信噪比为3)。

2.4.4 精密度^[8] 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液B,加流动相稀释,制备成质量浓度分别为4.048、404.800、4 048.000 μg/ml盐酸小檗碱系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液100 μl置于盛有组织匀浆液的EP管中,按照“2.2”项下组织前处理方法操作,制得质量浓度为0.404 8、40.480、404.800 μg/ml的质控(QC)样品。精密吸取低、中、高质量浓度的QC样品(下同),同日内连续测定6次,考察日内精密度;另每天测定1次,连续测定3 d,考察日间精密度。结果显示,各组织样品检测日内RSD均不大于2.99%(n=6),日间RSD均不大于2.87%(n=3),表明该方法精密度良好。

2.4.5 稳定性^[9] 吸取经相应处理后的盐酸小檗碱低、中、高质量浓度的QC样品,于室温放置24 h,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱,考察室温稳定性;取低、中、高质量浓度的QC样品各6份,在-20 °C冰箱冷冻保存,反复冻融处理3次,每次冷冻-解冻循环组织样品均被冷冻12 h以上,考察样品的冻融稳定性。结果显示,在室温下24 h内各组织样品中盐酸小檗碱RSD均不大于5.19%(n=6),反复冻融3次下RSD均不大于5.75%(n=6),表明在室温下放置24 h以及反复冻融3次条件下样品稳定。

2.4.6 准确度 精密吸取经相应处理后的各组织盐酸小檗碱低、中、高质量浓度的QC样品,作为提取样品;精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液B,加流动相稀释,制备成质量浓度分别为0.404 8、40.480、404.800 μg/ml的盐酸小檗碱对照品溶液。分别按照“2.1”项下色谱条件进样测定,计算方法回收率和提取回收率。结果,各组织样品的提取回收率均在87%~101%范

围内(RSD均不大于5.45%, $n=6$),方法回收率均在90%~102%范围内(RSD均不大于6.49%, $n=6$),表明该方法准确度较好。

2.5 盐酸小檗碱的组织分布研究

取健康SD大鼠42只,先正常饲养10d,于实验前禁食24h、自由饮水。给药前(0h)取6只SD大鼠的空白组织(心、肝、脾、肺、肾),其余36只大鼠按4g/kg ig青连宁心胶囊(前期药理实验得出的有效剂量)。分别于给药后1、3、5、7、9、11h后用10%水合氯醛麻醉大鼠,立即解剖心脏、肝、脾、肺、肾组织(每个时间点取6只大鼠),按“2.2”项下方法处理后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。采用SPSS 17.0统计软件对实验结果进行统计分析。给药后盐酸小檗碱在各组织中不同时间点的浓度比较采用方差分析,各组织间两两比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。大鼠各组织中不同时间点盐酸小檗碱浓度测定结果见表2,平均药物浓度-时间曲线见图2。

表2 大鼠各组织中不同时间点盐酸小檗碱浓度测定结果($\bar{x} \pm s, n=6, \mu\text{g/ml}$)

Tab 2 The concentration of berberine hydrochloride in each tissue of rat at different time points ($\bar{x} \pm s, n=6, \mu\text{g/ml}$)

时间/h	心脏	肝	脾	肺	肾
0	0	0	0	0	0
1	18.824 9*	43.522 8**	18.296 9*	6.958 0*	2.315 8
3	230.654 9***	22.928 2**	6.548 8*	3.391 4*	3.821 6
5	37.273 1*	27.162 2**	5.363 5*	6.652 7*	122.765 4***
7	38.699 8*	118.742 0***	21.732 8*	89.263 1**	18.404 0
9	18.166 6*	114.854 9***	95.744 7**	8.879 4*	64.468 8*
11	34.212 3*	365.263 4***	11.308 5*	18.220 3*	66.615 8*

注:与肾相同时间点比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与给药1h后比较,*** $P<0.05$,**** $P<0.01$

Note: vs. kidney at the same time, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. 1 h after administration, *** $P<0.05$, **** $P<0.01$

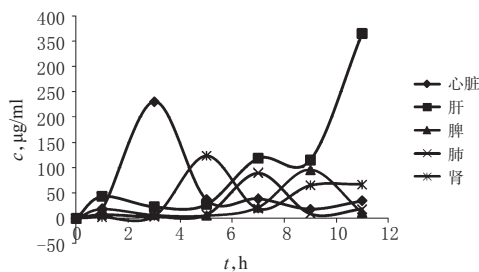


图2 大鼠各组织中盐酸小檗碱的平均药物浓度-时间曲线
Fig 2 Average concentration-time curves of berberine hydrochloride in each tissue of rats

由表2可见,各时间点盐酸小檗碱在各组织中浓度大小如下:给药1h,肝>心脏>脾>肺>肾;给药3h,心脏>肝>脾>肾>肺;给药5h,肾>心脏>肝>脾>肺;给药7h,肝>脾>心脏>脾>肾;给药9h,肝>脾>肾>心脏>肺;给药11h,肝>肾>心脏>脾>肺。由图2可见,给药1h后,各组织中均能检测到盐酸小檗碱,其中以肝中浓度最高;在心脏中,给药3h左右盐酸小檗碱的浓度即达到最大值;给药5h后,肾中盐酸小檗碱浓度最高,但肝中浓度不断升高,并在给药7、9、11h后检测浓度均最高。与肾比较,在不同时间点各组织中盐酸小檗碱含量差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。1h后各组织中均能检测到盐酸小檗碱,说明其分布较迅速且广泛,

推测其与血浆蛋白结合率低,所以游离型盐酸小檗碱浓度高,能迅速转移到组织;各组织各时间点盐酸小檗碱浓度不断发生变化,其受药物与组织亲和力等因素影响,也可能存在有效成分间相互转化的现象。

3 讨论

药物进入体内后分布于全身各组织、器官。药物在组织之间的血流灌注存在差异,药物在体内的吸收、代谢及生理因素、环境因素等都可导致药物在各组织间的分布不同^[10]。本研究采用ig给药的方式,初步探讨了盐酸小檗碱在大鼠体内的分布规律。在预实验中,笔者先采用内标法进行含量测定,但选择多个内标物质(黄芩苷、土的宁等)进行测定时发现出峰时间均太早,对被测物有一定干扰。因无合适内标,故最终选择外标法进行含量测定。实验结果表明,给药后盐酸小檗碱能较快地分布到各组织中,尤其以肝和心脏中分布较快、较多。在肝中,5h前趋于平稳且在低浓度范围,5h后浓度逐渐升高,初步推断其可能存在肝中蓄积,但需进一步实验证实。在心脏中,3h左右盐酸小檗碱的浓度达到最大值,此时在其他组织中分布相对较少;3h后心脏中浓度逐渐降低,并趋于平稳,提示其既能有效发挥治疗快速性心律失常的作用,又能避免在心脏中蓄积产生心脏毒性。

综上,大鼠ig青连宁心胶囊后,盐酸小檗碱能较快地分布到各组织中,其中在肝和心脏中分布较快、较多。本研究为青连宁心胶囊治疗快速性心律失常提供了一定的实验基础,在后续实验中本课题组将继续开展盐酸小檗碱在各组织中的代谢产物研究,以及研究其他有效成分(如巴马汀、黄连碱等)在组织中的代谢产物是否含有盐酸小檗碱,为盐酸小檗碱在大鼠体内的分布规律提供更合理的解释,为临床合理用药提供可靠的实验参考。

参考文献

- [1] Tang J, Feng Y, Tsao S, et al. Berberine and coptidis rhizoma as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 126(1):5.
- [2] 张春静. 黄连药理作用研究进展概述[J]. *科技创新与应用*, 2013, 2(5):101.
- [3] 王利红, 唐文照, 辛义周. 黄连中生物碱成分及药理作用研究进展[J]. *山东中医药大学学报*, 2015, 39(4):389.
- [4] 王春艳, 王桂茹, 李晶, 等. 盐酸小檗碱抗实验性心律失常的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(6):651.
- [5] 饶正良, 余小汉. 口服黄连素治疗小儿室性早搏36例疗效观察[J]. *儿科药学杂志*, 2010, 16(1):29.
- [6] 张玲非, 李向军, 王玉峰, 等. 白芍总苷在正常大鼠体内的组织分布研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(11):1040.
- [7] 叶肖粟, 宋莉, 任国飞, 等. HPLC-MS法测定虎杖活性成分在大鼠体内的药代动力学[J]. *中国药房*, 2013, 24(5):749.
- [8] 张洪, 闫士君, 张福明. 大黄素固体脂质纳米粒在小鼠体内的组织分布研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(7):583.
- [9] 张笑恺, 曹蔚, 谢艳华, 等. 欧前胡素在大鼠体内的药动学与组织分布研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(3):216.
- [10] 张爱杰, 刘克辛. 肝脏转运体介导药物相互作用的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(28):2655.

(收稿日期:2015-11-11 修回日期:2016-01-07)

(编辑:林静)