

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.008

## UPLC-HDMS 法测定大鼠灌胃栀子柏皮片后小檗碱与栀子苷的 药代动力学\*

徐艳丽<sup>1</sup> 蒲艳春<sup>1△</sup> 祝丽娣<sup>2</sup> 刘天娇<sup>1</sup> 孙向菊<sup>1</sup> 刘冬敏<sup>1</sup> 刘天富<sup>3</sup>

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院药学部 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 黑龙江农垦职业学院 黑龙江 哈尔滨 150001;

3 哈尔滨泰华药业股份有限公司 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要 目的:**通过 UPLC-HDMS 法测定小檗碱和栀子苷在大鼠灌胃栀子柏皮片后的药代动力学。**方法:**用固相萃取柱法处理血浆样本后,以正离子扫描方式,采用萃取离子监测(EIC)方式进行检测,采用 Winnolin 软件计算药物动力学参数。**结果:**小檗碱的达峰时间为  $1.89 \pm 0.56$  h,其 AUC 值为  $793 \pm 87$  ng/mL/h,药代参数显示该成分在体内浓度较低,消除较快;栀子苷的达峰时间为  $2.09 \pm 0.88$  h,其 AUC 值为  $4687 \pm 345$  ng/mL/h,药代参数显示该成分在体内表现分布容积较大,消除也较快。**结论:**利用高灵敏度的液质联用仪器在血中成功检测到了小檗碱及栀子苷,提示小檗碱及栀子苷为栀子柏皮片体内潜在药效作用物质。

**关键词:**栀子柏皮片;小檗碱;栀子苷;UPLC/HDMS

中图分类号:R-33;R285.5;R969.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)05-834-04

## A Pharmacokinetic Study of Berberin and Gardenoside in Rats after Oral Administration of Zhi-Zi-Bai-Pi Tablet\*

XU Yan-li<sup>1</sup>, PU Yan-chun<sup>1△</sup>, ZHU Li-di<sup>2</sup>, LIU Tian-jiao<sup>1</sup>, SUN Xiang-ju<sup>1</sup>, LIU Dong-min<sup>1</sup>, LIU Tian-fu<sup>3</sup>

(1 The 4th Hospital of Harbin Medical University Harbin, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2 Heilongjiang agricultural reclamation vocational college, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 3 Harbin Taihua Pharmaceutical Co., Ltd, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the pharmacokinetics of berberin and gardenoside after oral administration of Zhi-Zi-Bai-Pi tablet to rats. **Methods:** The plasma was disposed by solid phase extraction column and then analyzed in positive mode by EIC, and the pharmacokinetic parameters was analyzed by Winnolin software. **Results:** The T<sub>max</sub> of berberin was  $1.89 \pm 0.56$  h, and the AUC was  $793 \pm 87$  ng/mL/h which indicated that berberin was excreted rapidly and the concentration was very low; The T<sub>max</sub> of gardenoside was  $2.09 \pm 0.88$  h, and the AUC was  $4687 \pm 345$  ng/mL/h which indicated that gardenoside was widely distributed and then excreted rapidly. **Conclusions:** Berberin and gardenoside was successfully detected in rat plasma, suggesting that berberine and geniposide are potential pharmacodynamic substances of Zhi-Zi-Bai-Pi tablet.

**Key words:** Zhi-Zi-Bai-Pi tablet; Berberin; Gardenoside; UPLC/HDMS

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R285.5; R969.1 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2019)05-834-04

### 前言

栀子柏皮片源于张仲景《伤寒论》的栀子柏皮汤制备成片剂剂型,以提高制剂的稳定性。栀子柏皮片由栀子、黄柏、甘草三味药材经适当加工制备而成,主要用于治疗黄疸型肝炎,皮肤湿疹症<sup>[6]</sup>。目前对于栀子柏皮方的体内入血成分研究较少,只局限于栀子苷<sup>[8]</sup>,其他入血成分及其药动学尚未见有文献报道。我们前期试验证明<sup>[9]</sup>,栀子柏皮方的主要成分为栀子苷及小檗碱。采用药代动力学方法对中药配伍进行分析可以探讨中药配伍后的相关成分在体内的代谢过程,阐明在体内真正发挥药效的物质基础。考虑到中药复方成分通常较为复杂,研究时多选取主要活性成分分析其药代动力学<sup>[1-5]</sup>。本实验采用 UPLC-HDMS<sup>[10-11]</sup>方法检测大鼠血浆中栀子苷和小檗碱,同时分

析大鼠口服栀子柏皮片后体内相关指标的药代动力学特征,以期对栀子柏皮片的临床应用提供依据。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

超高效液相(安捷伦公司 1200),电子分析天平 BS600 型(上海友声衡器有限公司),高分辨质谱(安捷伦公司 6520),高功率数控超声波清洗器 KQ-400KDE 型(广州沪瑞明仪器有限公司)。

#### 1.2 试剂

栀子苷对照品(批号 0749-200007),盐酸小檗碱对照品(批号 110713 200609),均购自中国药品生物制品检定所;甲酸、乙腈为色谱纯;栀子柏皮片(自制)。

\* 基金项目:黑龙江省教育厅科研基金项目(12521338)

作者简介:徐艳丽(1975-),女,硕士研究生,副主任药师,主要研究方向:医院药学与中药制剂学,电话:13945670220,E-mail:13903658854@163.com

△ 通讯作者:蒲艳春(1957-),女,本科,主任药师,主要研究方向:西药学与中药制剂学,E-mail:13945670220@163.com

(收稿日期:2018-07-31 接受日期:2018-08-27)

### 1.3 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重为(220±20)g, 由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供。

### 1.4 给药与样品采集

12 只大鼠随机分为 6 组, 按 200 mg/kg、1.3 mL/次的剂量灌胃给予栀子柏皮片(片剂, 用水溶解, 给药前禁食不禁水), 给药后分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 经大鼠眼球后静脉丛采血 3 mL, 置于抗凝管中, 以 4000 r/min 的转速离心, 10 min 后取血浆待测。

### 1.5 血浆样品的处理

取大鼠血浆样品 200  $\mu$ L, 上样于用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化后的固相萃取柱(Waters 公司), 2 mL 水洗后, 2 mL 甲醇洗下待测物, 于 40℃ 氮气流下吹干, 用流动相 50  $\mu$ L 溶解残留物, 涡流 1 min, 15000 r/min 的转速离心, 10 min 后取上清液待测。

### 1.6 色谱条件

色谱柱为 Hypersil Gold C18 柱(50×2.1 mm, 1.9  $\mu$ m), 流动相为 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水, 梯度洗脱(0 min, 20% 0.1%甲酸乙腈; 2.5 min, 40% 0.1%甲酸乙腈; 4 min, 99% 0.1%甲酸乙腈; 5 min, 20% 0.1%甲酸乙腈)。流速为 0.40 mL/min, 柱温为 5℃。

### 1.7 质谱条件

离子喷射电压(IS)5.5 kV, 源内气体 1(GSI)为 41.4 kPa, 源内气体 2 (GS2)310.5 kPa, 气帘气体 103.5 kPa, 碰撞气(CAD) High, 源内温度 600℃。检测方式为正离子检测, 扫描方式为萃取离子扫描(EIC)方式, 栀子苷: 389.14 m/z, 小檗碱: 336.12 m/z。

### 1.8 数据处理

本研究数据均采用 Winnolin 药动学软件分析, 计算大鼠口服栀子柏皮片后体内相关指标的药代动力学特征。

## 2 结果

### 2.1 LC-MS 方法学验证

**2.1.1 方法的专属性** 取大鼠空白血浆, 按“血浆样品处理”项下方法操作, 获得大鼠空白血浆样品的色谱图(图 1A、B); 将栀子柏皮片灌胃给予大鼠, 血浆经处理后用 UPLC/HDMS 分析, 用 EIC 方式扫描后, 血浆中小檗碱和栀子苷的色谱图见图 1C、D。与空白血浆色谱图相对比, 大鼠血浆中内源性物质均不干扰小檗碱和栀子苷的测定。栀子苷与小檗碱的质谱图见图 2A、2B, 测得其准分子离子峰分别为 389.1445 与 336.1234, 测量误差均小于 5 ppm。

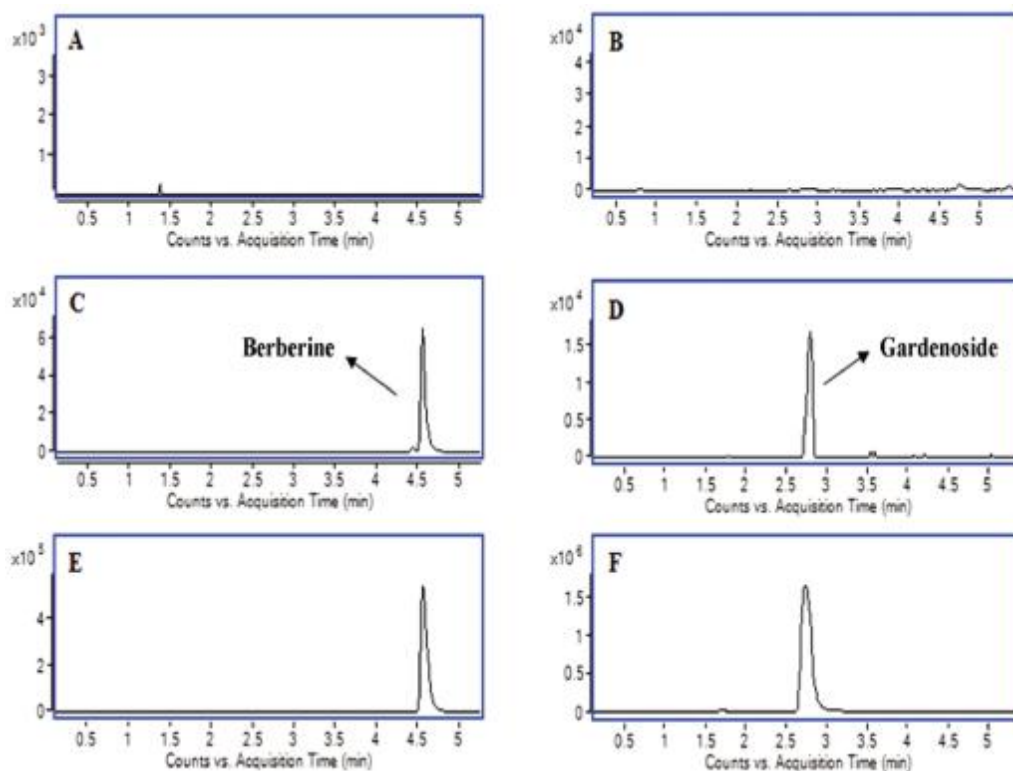


图 1 大鼠灌胃栀子柏皮汤后血浆中小檗碱和栀子苷的萃取色谱图

A: 空白血浆样品(m/z 336.12); B: 空白血浆样品(m/z 389.14); C: 血浆样品(m/z 336.12); D: 血浆样品(m/z 389.14); E: 小檗碱对照品; F: 栀子苷对照品。

Fig.1 Representative EIC chromatograms of berberine and gardenoside in rat plasma after oral administration of Zhizibaipi Tablet

A: Blank plasma sample at m/z 336.12; B: Blank plasma sample at m/z 389.14; C: Plasma sample at m/z 336.12; D: Plasma sample at m/z 389.14; E: Standard berberine; F: Standard gardenoside.

**2.1.2 方法学考察** 取大鼠空白血浆 160  $\mu$ L, 依次加入盐酸小檗碱对照品 40  $\mu$ L 和栀子苷对照品 40  $\mu$ L, 按“血浆样品处理”项下操作, 建立工作曲线。横坐标为待测物浓度, 纵坐标为峰面积, 采用加权最小二乘法, 计算直线回归方程。小檗碱的标

准曲线  $Y=137\,874.958+49\,134.926X$ ,  $r=0.994$  (权重  $W=1/c$ ), 线性范围 1.0~1000 ng/mL, 配制小檗碱的血浆样品浓度为 100 ng/mL, 求得精密度(RSD)为 2.11%, 准确度为 100%~118%, 该方法下小檗碱定量限可达到 0.1 ng/mL; 栀子苷的标准曲线

$Y=223\ 189.399+54\ 325.796X$ ,  $r=0.992$  (权重  $W=1/CC$ ), 线性范围  $1.0\sim1000\text{ ng/mL}$ 。配制栀子苷的血浆样品浓度为  $100\text{ ng/mL}$ , 求得栀子苷的精密性(RSD)为  $6.04\%$ , 准确度  $84\%\sim94\%$ , 该方法下栀子苷的定量限达到  $1.0\text{ ng/mL}$ 。

## 2.2 小檗碱和栀子苷的药代动力学

大鼠灌胃给药栀子柏皮片后,应用 UPLC/HDMS 研究了其

主要有效成分小檗碱和栀子苷在大鼠体内的药代动力学<sup>[12]</sup>, 药时曲线见图 3。小檗碱的达峰时间为  $1.89\pm 0.56\text{ h}$ , 其 AUC 值为  $793\pm 87\text{ ng/mL/h}$ , 药代参数显示该成分在体内浓度较低, 消除较快; 栀子苷的达峰时间为  $2.09\pm 0.88\text{ h}$ , 其 AUC 值为  $4687\pm 345\text{ ng/mL/h}$ , 药代参数显示该成分在体内浓度较大, 表观分布容积较大, 消除也较快。

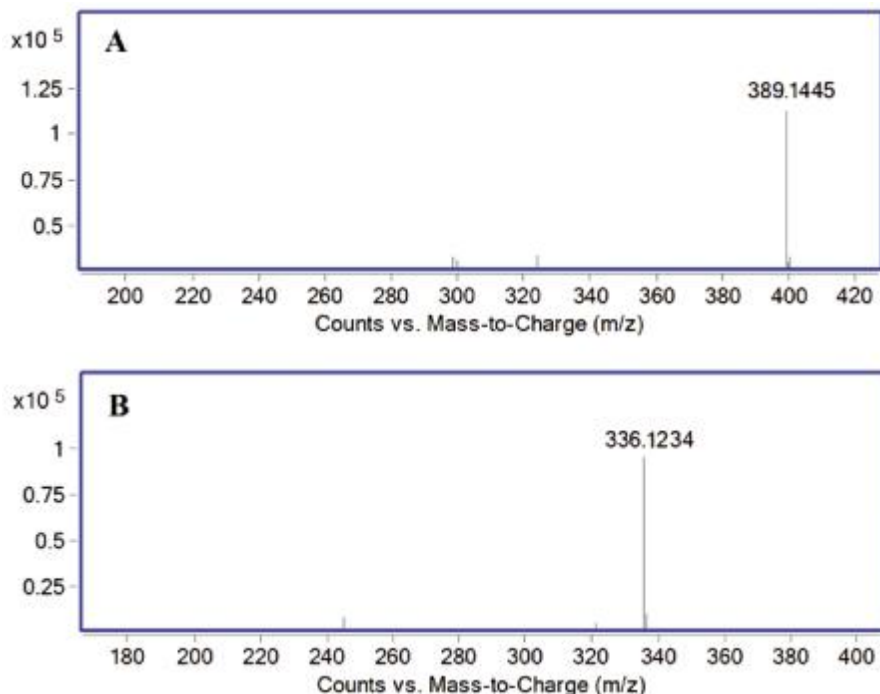


图 2 栀子苷(A)和小檗碱(B)的质谱图

Fig.2 Mass spectra of gardenoside(A)and berberin (B)

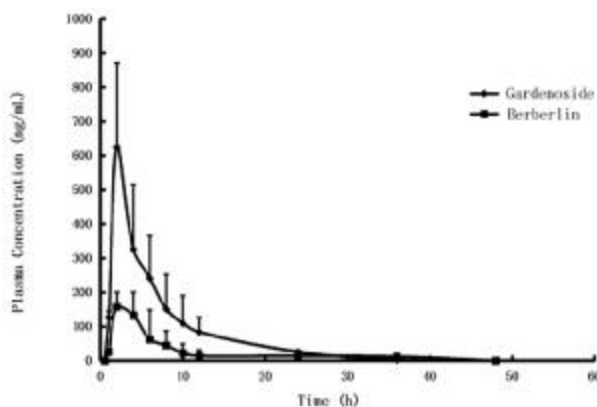


图 3 小檗碱及栀子苷的药时曲线

Fig.3 Mean plasma concentration-time curve of Berberin and Gardenoside

## 3 讨论

荆汉卫等<sup>[13]</sup>研究比较半仿生提取法、醇提取法、水提取法三种方法提取栀子柏皮的有效成分, 结果发现栀子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸、总生物碱等为栀子柏皮片的主要有效成分。本研究组前期实验中制定了主成分小檗碱、栀子苷的含量测定方法, 而中药中只有吸收入血的化学成分才为有效成分, 明确这些有效成分可用来有效控制栀子柏皮片的内在质量<sup>[13-15]</sup>。本实验利用高灵敏度的 UPLC-HDMS 建立了同时对两个入血有效

成分小檗碱和栀子苷进行检测的方法, 同时对其药物动力学进行了研究<sup>[16]</sup>。

本实验中, 小檗碱在大鼠体内血药浓度达峰时间约为 2 小时, 与文献报道相符<sup>[17]</sup>。但本研究中小檗碱的药时曲线为单峰, 这一点与一些其他含有小檗碱的复方体内行为报道并不一致<sup>[18]</sup>, 有研究显示, 小檗碱在大鼠体内血药浓度呈现 2 个峰值, 达到峰值时间分别为 2 h 和 5 h。小时据报道<sup>[19-22]</sup>, 由于小檗碱是季胺型生物碱, 小檗碱口服吸收较差, 易于生物体内的蛋白结合, 而且小檗碱在体内迅速被代谢, 主要代谢为脱甲基或脱亚甲基的一相代谢产物及相应地二相结合产物后经肾脏和胆汁排泄。本实验中检测到小檗碱的体内血药浓度很低, 消除较快, 结果与文献报道基本一致。且本研究在既往研究基础上, 采用加权最小二乘法绘制出小檗碱的标准曲线。

本研究所检测到的栀子苷的达峰时间为  $2.09\pm 0.88\text{ h}$ , 其 AUC 值较大, 药代参数显示该成分在体内浓度较大, 表观分布容积较大, 消除也较快。这可能与小檗碱的抗菌作用相关, 小檗碱在体外对革兰阳性菌、革兰阴性菌和真菌都有显著的抑制作用, 作用机制尚未完全阐明, 已有研究显示, 抑菌药物可以通过抑制肠道菌群的活性, 减少肠道细菌产生的 ATP 和 NADH, 影响药物的吸收<sup>[23-24]</sup>。黄柏中含具有抗菌作用的生物碱, 可以减少栀子苷的水解, 使血药浓度增高, 从而提高了其生物利用度<sup>[25]</sup>。

本研究中, 大鼠灌胃给予栀子柏皮片后利用高灵敏度的

UPLC-HDMS 在血中成功检测到了小檗碱及栀子苷并对其药动学行为进行了研究,提示小檗碱及栀子苷为栀子柏皮片体内潜在药效作用物质,为栀子柏皮片的内在质量控制提供了数据支撑,也为其他复方的体内药效物质研究及质量标记物的确定提供参考。

#### 参考文献(References)

- [1] 林立, 刘建勋, 张颖, 等. LC-MS/MS 法测定大鼠口服延胡索提取物后延胡索乙素和脱氢紫堇碱的药代动力学[J]. 药学报, 2008, 43(11): 1123-1127
- [2] Minor DR, Allen RE, Alberts D, et al. A clinical and pharmacokinetic study of isolated limb perfusion with heat and melphalan for melanoma[J]. Cancer, 2015, 55(11): 2638-2644
- [3] Hong RL, Tseng YL. Phase I and pharmacokinetic study of a stable, polyethylene-glycolated liposomal doxorubicin in patients with solid tumors: the relation between pharmacokinetic property and toxicity [J]. Cancer, 2015, 91(9): 1826-1833
- [4] Saba NF, Hurwitz SJ, Kono SA, et al. Chemoprevention of head and neck cancer with celecoxib and erlotinib: results of a phase Ib and pharmacokinetic study[J]. Cancer Preve Res, 2014, 7(3): 283-291
- [5] Hu PY, Yue PF, Zheng Q, et al. Pharmacokinetic Comparative Study of Gastrodin after Oral Administration of Gastrodia elata Bl. extract and its Compatibility with the Different Indigents of Ligusticum chuanxiong Hort. to Rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 191: 82-86
- [6] 吴梅, 张浩, 李荣. HPLC 测定栀子柏皮汤中甘草次酸的含量[J]. 华西药理学杂志, 2006, 21(4): 339-400
- [7] Tong J, Guo J, Hu J, et al. Correlation Between Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 Gene Polymorphisms and Liver Cirrhosis in a Chinese Han Population With Chronic Hepatitis B[J]. Hapat Mon, 2014, 14(8): e18943
- [8] 韩静文, 黄成, 宋钰, 等. 栀子柏皮汤不同配伍在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中药实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 110-113
- [9] 赫玉霞, 王中彦, 曹侃, 等. HPLC 法测定栀子柏皮软胶囊中栀子苷和小檗碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(12): 1913-1916
- [10] Miao H, Li MH, Zhang X, et al. The antihyperlipidemic effect of Fu-Ling-Pi is associated with abnormal fatty acid metabolism as assessed by UPLC-HDMS-based lipidomics [J]. Rsc Advances, 2015, 5(79): 64208-64219
- [11] Boix C, Ibáñez M, Sancho J V, et al. Investigating the presence of omeprazole in waters by liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry: degradation experiments [J]. J Mass Spectrom, 2013, 48(10): 1091
- [12] 史玉欢, 赵恒毅, 葛新星, 等. 新型乙酰胆碱酯酶抑制剂 Bis (9)-(-)-Meptazinol 的小鼠和大鼠药代动力学研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(6): 1001-1005
- [13] 王喜军. 中药药效物质基础研究的系统方法学 - 中医方证代谢组学[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 13-17
- [14] 曲文君. PAMAM Dendrimers 对中药有效成分促吸收作用、安全性及机理研究[D]. 江苏大学, 2017
- [15] 王慧卓, 彭代银, 陈卫东, 等. LC-MS/MS 鉴定大鼠血浆中桃红四物汤有效成分[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(3): 69-73
- [16] 吴芳芳, 王喜军, 韩莹, 等. 基于 UPLC-HDMS 技术的生脉散血清药物化学初步研究[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2010, 12(4): 657-664
- [17] 肖学风, 乔晓丽, 高岚, 等. 黄连解毒汤中三种成分在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国医药导报, 2008, 5(3): 13-16
- [18] 丁志平, 林力. 不同粒径黄连粉在大鼠体内药代动力学研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22(5): 835-836
- [19] 李艺, 游雪甫, 蒋建东. 小檗碱的药理学研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(9): 733-738
- [20] 杨庆珍, 郑司浩, 黄林芳. 小檗碱提取方法和药理活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 21(5): 519-525
- [21] Tillhon M, Lm G N O, Lombardi P, et al. Berberine: new perspectives for old remedies [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84 (10): 1260-1267
- [22] Xu M, Xiao Y, Yin J, et al. Berberine promotes glucose consumption independently of AMP-activated protein kinase activation [J]. Plos One, 2014, 9(7): e103702
- [23] Sun Yan-qing, Feng Fang, Yu Xiu-pei. Pharmacokinetics of geniposide in Zhi-Zi-Hou-Pu tablet and in different combinations of its constituent herbs[J]. Phytother Res, 2012, 26(1): 67
- [24] Volkova V V, Cazer C L, GräHn Y T. Models of antimicrobial pressure on intestinal bacteria of the treated host populations[J]. Epidemiology Infect, 2017, 145(10): 2081-2094
- [25] 姜昕易, 张晖芬, 王胜男, 等. ILs-HPLC 同时测定黄柏中 5 种生物碱含量[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3808-3812