

LC-MS 法及微生物效应法研究金银花提取物抗菌成分在 SD 大鼠体内药代动力学

★ 晏肃霜¹ 梁小明² (1. 江西省赣州市肿瘤医院 赣州 341000; 2. 江西博雅生物制药股份有限公司 抚州 344000)

摘要:目的:金银花提取物抗菌成分在 SD 大鼠体内的药代动力学研究。方法:建立一种液质联用方法(LC-MS)定量测定大鼠血浆中的绿原酸。结果:此方法快速、灵敏、准确,并且与以抗菌活性为指标的微生物效应法有相关性。结论:此方法成功应用金银花主要抗菌成分药代动力学研究,为合理阐述金银花抗菌成分的体内药效物质基础提供一条新的思路。

关键词:金银花;绿原酸;LC-MS 法;微生物效应法;药代动力学

中图分类号:R 285.6 文献标识码:A

Pharmacokinetics of antibacterial composition of Flos Lonicerae Japonicae extract in SD rat by LC-MS method and microbiological effect method

AN Su-shuang¹, LIANG Xiao-ming²

Ganzhou Tumor Hospital in JiangXi Province, Ganzhou 341000;

Jiangxi Boya Biopharmaceutical Company Limited, Fuzhou 344000

Abstract: Objective: Pharmacokinetics of antibacterial composition of Flos Lonicerae Japonicae extract in SD rat was study. METHOD: A LC-MS analysis method was developed to determine chlorogenic acid in plasma of SD rats. RESULT: The method was fast, sensitive and accurate. The result implied to the relevance with the method of microbiological effect. CONCLUSION: The method was applied successfully for the pharmacokinetics of main antibacterial composition of Flos Lonicerae Japonicae extract. The paper would provides a new way to explain reasonably the active foundation of antibacterial composition of Flos Lonicerae Japonicae in vivo.

Key words: Flos Lonicerae Japonicae; Chlorogenic acid; LC-MS; Microbiological effect method; Pharmacokinetics

金银花又名银花、双花、忍冬,具有清热解毒、凉散风热的功能,用于疮痍肿痛、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热诸病^[1],是临床常用中药。也常见于各种复方用药。现代药理研究证明金银花有很好的体外抗菌活性^[2]。绿原酸是金银花的主要药效成分^[3]。

金银花的抗菌活性成分的体内药动学研究主要是针对绿原酸^[4]。绿原酸性状不稳定,有文献报道^[5]口服绿原酸类物质在体内转化成其他成分物质,因此单纯以绿原酸为指标的药代动力学研究不能完全反映金银花的抗菌成分的体内动态变化。微生物效应法研究药代动力学直接以金银花的抗菌效应为指标,可综合反映金银花在体内的抗菌成分动态变化,也符合中药方剂特点和中医整体思想。

结合灵敏可靠化学定量方法,可在时间、浓度、效应三方面同步,建立金银花抗菌活性成分的 PK-PD 模型,为阐明金银花的药效物质基础及进一步开发提供理论依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200 液相色谱仪,二极管阵列检测器, Agilent 6410 三重四极杆质谱仪;SW-CJ 无菌操作台(苏州灵净公司), ZHWY-100B 恒温培养摇床;Sigma1-14 离心机(德国 SIGMA 西格马公司);CM-12 氮吹仪(北京成萌伟业公司)。甲醇为色谱级(Merck 公司);其余试剂均为分析纯;LC-MS 法用水为重蒸馏水;微生物效应法用水为灭菌生理盐水。对照品:绿原酸购于中国药品生物制品检定所,批号:110753—200212

金银花 (Flos Lonicerae Japonicae) 为忍冬科植物忍冬 (Lonicera Japonicae Thunb.) 的花, 产于河南省封丘县。

SD 大鼠, 雄性, 体重 180 ~ 220g, 由江西中医药大学实验动物中心提供 (合格证号: 021-9602)。

2 方法与结果

2.1 样品制备 取金银花药材晒干磨成粉末, 称取 300 g, 加入石油醚脱脂; 残渣用十倍量 70% 乙醇水浴提取三次, 每次一小时; 提取液旋蒸, 除去乙醇, 并浓缩到 300 ml (1 ml 溶液相当于 1 g 药材) 备用。

2.2 给药与取样 选取 5 只健康 SD 大鼠, 禁食不禁水 10 h。称重。每只灌胃 3 ml。按时间周期 5、10、20、30、50、70、100、130、180、300 min 从眼眶取血, 置于预留肝素的离心管中, 3 000 r/min 离心。量取 200 μ l 血浆, 加入 0.2 M 盐酸溶液 100 μ l, 涡旋 5min。再加入四倍量的甲醇沉蛋白, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 高速离心分离蛋白。精密量取上清液 1 ml, 氮气吹干。用 200 μ l 蒸馏水复溶。备用。

2.3 LC-MS 方法

2.3.1 色谱条件 色谱柱: ZOR BAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.650 mm, 1.8 μ m); 流动相: 甲醇-0.01% 的甲酸水溶液 (10:90) 等度洗脱。检测波长: 327 nm; 流速: 0.2 ml/min; 进样量: 5 μ l。质谱条件: ESI 离子源 (10.0 L/min; 350 $^{\circ}$ C; 35 psi; 3851V); 采用负离子的 SIM 模式扫描。数据处理采用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis version B.01.00Build 1.0.82.5。

2.3.2 溶液配制 取绿原酸对照品适量, 精密称定, 加入蒸馏水配制成 1 mg/ml 的对照品溶液。依次稀释成浓度 10.0、1.0、0.1 ng/ml 高中低三个浓度作为质量控制样本溶液。

2.3.3 标准曲线 绿原酸对照品溶液依次稀释成

浓度 (20.0 ng/ml ~ 0.01 ng/ml) 浓度范围, 分别加入空白血浆, 并按上述 2.2 项下样品处理方法处理。制得溶液作为工作溶液, 进样。考察线性范围 ($r > 0.999$), 制得标准曲线。

2.3.4 回收率考察 质量控制样本溶液加入血液按 2.2 项下样品处理方法处理后, 各浓度连续进样 5 次, 与质量控制样本溶液直接进样所得峰面积的比值为回收率, 其结果为表 1。

表 1 加样回收率

样品浓度 / ng·ml ⁻¹	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0.1	83.1 $\pm$ 10.7	86.1
1.0	88.5 $\pm$ 4.8	10.0
	86.7 $\pm$ 6.7	

2.3.5 精密度考察 三个浓度的质量控制样本溶液同一天连续进样 5 次, 计算结果所得偏差为日内精密度; 三个浓度的质量控制样本溶液在连续三天每天分别进 1 针, 计算结果所得偏差为日间精密度。结果为表 2。

表 2 精密度试验结果

	理论浓度 / ng·ml ⁻¹	测定浓度 / ng·ml ⁻¹	RSD (%)
日内精密度	0.1	0.10 $\pm$ 0.01	10.0
	1.0	1.08 $\pm$ 0.05	4.6
	10.0	10.14 $\pm$ 1.08	10.7
日间精密度	0.1	0.09 $\pm$ 0.01	11.1
	1.0	1.10 $\pm$ 0.06	5.4
	10.0	10.11 $\pm$ 0.93	9.1

2.3.6 灵敏度 标准曲线线性的起始浓度为定量限 (QOD), 为 0.05 ng/ml; 检测限选取 S/N = 3 时的被测物的绝对值, 为 0.01 ng/ml。

2.3.7 稳定性考察 质量控制样本溶液分别进行短期室温稳定性、长期低温条件下的稳定性及冻融试验考察。结果为表 3。

表 3 稳定性试验结果

样品浓度	短期稳定性		长期稳定性		冻融试验	
	浓度	偏差 (%)	浓度	偏差 (%)	浓度	偏差 (%)
0.1	0.11 $\pm$ 0.01	10.0	0.09 $\pm$ 0.01	-10.0	0.09 $\pm$ 0.01	-10.0
1.0	1.05 $\pm$ 0.07	5.0	1.01 $\pm$ 0.03	1.0	1.01 $\pm$ 0.05	1.0
10.0	10.07 $\pm$ 0.11	7.0	9.94 $\pm$ 0.09	-6.0	9.98 $\pm$ 0.13	-2.0

2.4 微生物效应法

上述按 2.2 项下处理的血浆样品经恰当灭菌后, 采用琼脂平板稀释法^[6]测定血药浓度。

3 药代动力学研究

分别以体内绿原酸的浓度和 MIC 为纵坐标, 各取血点为横坐标, 绘制药时曲线。所得数据用 DAS 软件 (PK version 1.0, 中国药学会) 处理。主要药动

学参数为表 4。

表 4 主要药动学参数

参数	LC-MS 法	微生物效应法
$T_{1/2}$ /min	26.7	27.6
T_{max} /min	30.6	30.1
C_{max} /ng·ml ⁻¹	79.60 $\pm$ 25.7	95.14 $\pm$ 22.3
AUC ₍₀₋₂₄₀₎ (ng·ml ⁻¹ ·min ⁻¹)	59.67 $\pm$ 6.8	64.19 $\pm$ 10.3

益肾通脉汤对兔动脉粥样硬化形成过程中平滑肌细胞增殖和凋亡的影响

★ 程红 罗陆一 (广州中医药大学附属深圳市中医院心内科 深圳 318033)

摘要:目的:探讨益肾通脉汤对兔动脉粥样硬化(AS)形成过程中血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和凋亡的影响。方法:40只健康新西兰雄性大耳白兔,随机分成4组,即模型组(MG),益肾通脉汤组(YSG),阿托伐他汀组(ACG);通过兔耳缘静脉注射牛血清白蛋白及高脂饲料喂养,复制兔动脉粥样硬化模型,免疫组化法检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达,缺口末端标记法(TUNEL)检测VSMC凋亡情况。结果:与CG组比较, MG组、YSG组、ACG组PCNA和VSMC凋亡均有显著升高($P=0.000$);与MG组比较, YSG组、ACG组PCNA和VSMC凋亡表达的阳性细胞率均有显著降低($P=0.000$); YSG组和ACG组相比PCNA和VSMC凋亡表达无明显区别($P=0.255, P=0.276$)。结论:对AS形成过程中VSMC增殖和凋亡进行合理调节可能是益肾通脉汤延缓动脉粥样硬化发生发展的有效途径。

关键词:动脉粥样硬化;血管平滑肌细胞;增殖;凋亡

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

4 讨论

中药活性成分的药代动力学研究在阐述中药的药效物质基础及作用机制发挥着重要的作用。但是中药成分复杂,进入体内的活性成分含量低,常规的色谱方法不易检测。质谱检测以高灵敏性和高准确性无疑是中药体内药物分析的发展趋势。本文通过液质联用技术,定量检测了金银花粗提物灌胃给药的SD大鼠体内绿原酸的含量,区分了绿原酸代谢物对其含量的影响。

从LC-MS法及微生物效应法所得数据可以明显看出两者之间有密切关系。从侧面论证了绿原酸是金银花中主要的抗菌成分。因此,可以初步认为体内绿原酸浓度的变化一定程度反映了抗菌成分的变化,绿原酸及转化成分还是金银花在体内的主要活性成分。

本文建立一种快速、灵敏的体内绿原酸的检测方法,并应用于口服金银花粗提物的药代动力学研究,并且辅助以抗菌活性成分的微生物效应法,建立时间、浓度、抗菌效应三者同步的PK-PD模型,为解

释金银花的抗菌活性成分在体内的药效物质基础提供一种新的方法。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005. 152.
- [2] 孙延波,冯延民. 金银花对口腔病原性微生物体外抑菌试验的研究[J]. 中国中药杂志,1996,21(4):242.
- [3] Xin-Pu Li, Jie Yu, Jin-Yin Luo, et al. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, Ferulic Acid, Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde in Chinese Herbal Preparation by RP-HPLC[J]. Chem. Pharm. Bull., 2004, 52(10):1251.
- [4] Hongjuan Yang, Bo Yuan, Lei Li, et al. HPLC Determination and Pharmacokinetics of Chlorogenic Acid in Rabbit Plasma after an Oral Dose of Flos Lonicerae Extract [J]. Journal of Chromatographic Science, 2004, 42(4):173.
- [5] Marie-Paule Gonthier, Marie-Anne Verny, Catherine Besson, et al. Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats[J]. Nutr., 2003, 133(6):1853.
- [6] John V. Bennett, Jean L. Brodie, et al. Simplified, Accurate Method for Antibiotic Assay of Clinical Specimens [J]. Appl Microbiol. 1966, 14(2):170.

(收稿日期:2009-03-25)