

· 药物代谢 ·

天麻与钩藤配伍前后效应成分在 SHR 大鼠脑组织的分布

米佳, 王兴*, 董雨, 李莹

(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] 目的: 建立 SHR 大鼠脑组织中天麻苷元的含量测定方法, 考察天麻与钩藤配伍前后效应成分天麻苷元在脑组织中的分布情况。方法: 采用 HPLC 测定脑组织中天麻苷元含量, 流动相乙腈-0.03% 磷酸溶液 (7:93), 检测波长 221 nm。检测天麻与钩藤配伍前后效应成分天麻苷元在脑组织中的分布情况。结果: 大鼠血浆中天麻苷元的线性范围 0.5 ~ 100 mg·L⁻¹ ($R^2 = 0.9999$), 方法回收率 > 74.89%, 准确度 > 98%。配伍前、后天麻苷元在大鼠脑组织的药代动力学参数 C_{max} 分别为 0.485, 0.373 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, AUC 依次为 111.366, 213.585 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}$ 。结论: 该方法能准确、灵敏测定大鼠脑组织中天麻苷元含量。天麻与钩藤配伍对天麻苷元在 SHR 大鼠脑组织中分布具有先抑制后促进影响。

[关键词] 天麻; 天麻苷元; 脑组织分布; 钩藤

[中图分类号] R285.5; R289.9; R945 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)18-0105-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180105

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140722.1448.006.html>

[网络出版时间] 2014-07-22 14:48

Distribution of Gastrodigenin from Gastrodiae Rhizoma in Brain Tissue of SHR Rats Before and After Compatibility with Uncariae Ramulus Cum Uncis

MI Jia, WANG Xing*, DONG Yu, LI Ying

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of gastrodigenin content in brain tissue of SHR rats and investigate its tissue distribution before and after compatibility of Gastrodiae Rhizoma and Uncariae Ramulus Cum Uncis. **Method:** HPLC was employed to determine the content of gastrodigenin in brain tissue with mobile phase of acetonitrile-0.03% H₃PO₄ (7:93) and detection wavelength at 221 nm. Distribution of gastrodigenin in brain tissue before and after compatibility of Gastrodiae Rhizoma and Uncariae Ramulus Cum Uncis was detected. **Result:** The linear range of calibration curve was within drug concentrations of 0.5-100 mg·L⁻¹ ($R^2 = 0.9999$), recoveries of three levels were more than 74.89% and accuracies were more than 98%. Pharmacokinetic parameters of gastrodigenin in brain tissue before and after compatibility were received, such as C_{max} were 0.485, 0.373 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, AUC were 111.366, 213.585 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}$, respectively. **Conclusion:** This study establish a sensitive and accurate method for determination of gastrodigenin in brain tissue of SHR rats. Compatibility of Gastrodiae Rhizoma and Uncariae Ramulus Cum Uncis show a significant effect that first inhibiting and then promoting on distribution of gastrodigenin in brain tissue.

[Key words] Gastrodiae Rhizoma; gastrodigenin; brain tissue distribution; Uncariae Ramulus Cum Uncis

[收稿日期] 20140102(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801547); 四川省科技支撑计划项目(2013SZ0130)

[第一作者] 米佳, 在读硕士, 从事新药研究与开发, Tel:15202848742, E-mail:megahappy@126.com

[通讯作者] * 王兴, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药物动力学研究, Tel:028-87601838, E-mail:wshing@263.net

药对是中药配伍中最基本、最简单的用药形式,临床疗效显著。天麻与钩藤配伍,两者功效相似,尤其在治疗高血压方面各有所长,配伍后可在一定程度上增强疗效,如天麻钩藤饮。天麻性甘,味平,归肝经,为治疗肝阳上亢、肝风内动的要药,含有天麻素、天麻苷元、香荚兰醇、香荚兰醛等化学成分^[1-3]。目前,关于天麻效应成分在体内分布的研究报道较多,而对于天麻与其他药味配伍前后效应成分在体内的分布研究甚少。本实验通过检测天麻与钩藤配伍前后效应成分——天麻苷元在 SHR 大鼠脑组织的分布,探讨二者配伍的意义,为治疗脑部系统疾病的新药开发提供新思路和新方法。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司),TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公司),MTN-2800W 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

天麻、钩藤均购自四川新荷花饮片公司,产地分别为四川峨眉山和安徽亳州,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定,分别为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎,茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 及同属多种植物的带钩茎枝;天麻苷元对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110807-200205),对羟基苯甲醇(上海凯赛化工有限公司),水为蒸馏水或双蒸水,甲醇、乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SHR 大鼠,雄性,体重约(270 ± 20)g,14 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号 SCXK(川)2008-24。

2 方法与结果

2.1 动物分组与饲养 将 78 只 SHR 大鼠随机分为 3 组,依次为空白对照组(6 只)、天麻组(36 只)、天麻钩藤组(36 只),给药组分为 5,15,30,60,120,180 min 共 6 个时间点,每个时间点 6 只。大鼠在 IVC 独立送回风系统中,按《实验动物管理条例》中 SPF 级实验动物要求进行饲养。适应性饲养 1 周,第 8 天起开始给药,连续给药 7 d,第 13 天给药后禁食不禁水 12 h,第 14 天给药后按不同时间点处死。

2.2 药液配制与给药 取天麻细粉 50 g(过 200 目筛),加入 10 倍量水制成 0.1 g·mL⁻¹ 的天麻混悬液。根据《杂病证治新义》中天麻钩藤饮的处方比例,设定天麻钩藤煎液中天麻-钩藤(3:4)。在前期研究基础上,称取天麻饮片 15 g,加入 30 倍量水浸

泡 1 h,煎煮,沸腾 30 min,加入钩藤饮片 20 g,共煎 15 min,浓缩至 175 mL(0.2 g·mL⁻¹),得天麻钩藤煎液,冷却备用。大鼠(标准体重 200 g)给药剂量为人(标准体重 60 kg)剂量的 6.17 倍换算,大鼠日给药剂量 = 人日给药剂量 × 6.17 × 校正系数,校正系数为大鼠实际体重与大鼠标准体重的比值^[4]。

2.3 HPLC 分析条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.03% 磷酸溶液(7:93),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 221 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.4 对照品溶液配制 精密称取天麻苷元对照品 5 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得,密封后置 4 °C 冰箱保存。

2.5 内标液配制 精密称取间苯三酚 10 mg 置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得,密封后置 4 °C 冰箱保存。

2.6 样品预处理 精密称取一定量大鼠大脑组织,置于匀浆器中,加 3 倍量生理盐水制成脑组织匀浆。取该匀浆 0.5 mL,低速离心(3 500 r·min⁻¹, 5 min,下同),取上清液,加入内标液 30 μL,加入甲醇 2 mL,漩涡混匀 30 s,静置沉淀 3 h,低速离心,吸取上清液,60 °C 水浴氮气吹干,用水 0.3 mL 复溶,涡旋混匀,精密称定质量,静置 2 h,补重,于 10 000 r·min⁻¹ 高速离心 10 min,吸取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液^[5-6]。

2.7 标准曲线建立 取 6 支塑料离心试管,分别精密加入脑组织空白匀浆 250 μL,各加入内标溶液 30 μL 和一定量天麻苷元对照品溶液,摇匀,按 2.4 项下方法处理,配成天麻苷元质量浓度分别为 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 mg·L⁻¹ 的系列溶液,按 2.3 项下条件分析,以天麻苷元峰面积与内标峰面积之比为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 35.27X + 0.0945$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围 0.5 ~ 100 mg·L⁻¹。

2.8 准确度、精密度与回收率试验 按 2.6 项下方法处理样品,配成天麻苷元质量浓度为 0.5, 5.0, 50 mg·L⁻¹ 的 3 组样品溶液;另配制上述 3 种质量浓度但未经提取处理的标准样品溶液,按 2.3 项下条件分析,计算准确度和提取回收率。按 2.6 项下方法处理样品,配成天麻苷元质量浓度为 0.5, 5.0, 50 mg·L⁻¹ 的样品溶液,分别于同日内和连续 4 日内测定 4 次,计算日内和日间精密度,结果见表 1。

表 1 SHR 大鼠脑组织样品中天麻苷元的准确度、精密度和提取回收率($n=6$)

| 质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 标准样测定值 ($\bar{x}\pm s$)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 准确度 ($\bar{x}\pm s$)/% | 提取后测定值 ($\bar{x}\pm s$)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 提取回收率 ($\bar{x}\pm s$)/% | 精密度 RSD/% | |
|---|---|-----------------------------|---|-------------------------------|-----------|------|
| | | | | | 日内 | 日间 |
| 0.5 | 0.49 ± 0.01 | 98.51 ± 0.01 | 0.37 ± 0.02 | 74.89 ± 2.68 | 4.62 | 4.53 |
| 5.0 | 4.94 ± 0.05 | 98.84 ± 1.01 | 5.33 ± 0.11 | 107.93 ± 3.23 | 3.69 | 3.93 |
| 50 | 50.26 ± 0.32 | 100.5 ± 0.64 | 49.59 ± 0.44 | 98.67 ± 1.50 | 3.07 | 3.24 |

2.9 稳定性试验 按 2.6 项下方法处理样品,配制天麻苷元质量浓度为 0.5, 5.0, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 组样品溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存, 分别于 0, 5, 15, 30 d 按 2.3 项下条件测定, 结果显示 3 组样品中天麻苷元含量的 RSD 均 $<6.5\%$ 。取上述 3 组样品溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存, 室温解冻 1 h, 取出适量按 2.3 项下条件测定天麻苷元含量, 其余继续 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 24 h, 反复冻融 3 次, 结果显示天麻苷元含量的 RSD 均 $<6.05\%$, 说明天麻苷元在脑组织样品中稳定性良好。

2.10 重复性试验 取同一份组织匀浆样品重复进样 6 次, 按 2.3 项下条件测定, 结果天麻苷元含量的 RSD 均 $<3.28\%$, 表明该方法重复性良好。

2.11 组织分布试验 将分组的 SHR 大鼠分别在第 14 d 口服灌胃给药的 5, 15, 30, 60, 120, 180 min 时, 经股动脉及断头放血后, 取出大鼠的脑组织, 按 2.6 项下方法处理样品, 按 2.3 项下条件测定配伍前后天麻苷元在 SHR 大鼠脑组织中分布变化, 结果天麻组中天麻苷元在各时间点的质量分数依次为 0.292, 0.114, 0.324, 0.760, 0.363, 0.226 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 而天麻钩藤组中则分别为 0.236, 0.157, 0.306, 0.565, 0.216, 0.349 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。采用药代动力学软件 3p97 处理试验数据, 得药代动力学参数见表 2。结果表明在 120 min 内, 与配伍前相比, 天麻与钩藤配

伍后天麻苷元的 $\text{AUC}_{0-120\text{ min}}$ 减小; 但 120 min 后曲线呈上升趋势, 导致 3p97 拟合得到的配伍后 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 明显增加, 提示钩藤在 120 min 内会抑制天麻在脑中的分布, 但 120 min 后逐渐促进天麻在脑中的分布。

3 讨论

天麻与钩藤配伍后, 天麻苷元在脑组织中分布先降后升, 但总体呈上升趋势, 表明钩藤会使天麻苷元在脑组织中的分布增加, 促进天麻的药效。原因可能为: ①传统中医认为肝阳上亢症的病理机制为肝肾不足, 肝阳偏亢, 生风化热, 上扰脑髓, 引起头晕目眩、面红目赤、耳鸣、失眠等症, 表明肝为病源, 脑为发病之所。天麻钩藤同为平肝熄风药, 在天麻钩藤饮中均为君药, 能够主治肝阳偏亢症, 尤其对肝风上扰引起的头痛、眩晕、失眠多梦等具有很好疗效。表明两药配伍后针对头痛、眩晕、失眠多梦等表现在脑的病症疗效加强, 与本文得到的配伍后天麻苷元在脑组织中分布显著上升呼应。从药物效应成分体内分布的角度, 证实了天麻与钩藤配伍的合理性, 亦证明了钩藤与天麻配伍后能引天麻上行入脑, 加强治疗作用。②天麻口服后, 天麻素经肝脏代谢为天麻苷元, 天麻苷元亲脂性较强, 能透过血脑屏障进入脑组织, 发挥中枢神经抑制作用^[7]。本文研究显示大鼠口服天麻混悬液后, 脑组织中迅速检测到天麻苷元, 并且在一定时间内质量浓度呈上升趋势。说明口服天麻素由于存在肝脏的首过效应, 使天麻素水解为天麻苷元, 增加了天麻苷元在脑组织含量。③天麻的效应成分—天麻苷元会与脑细胞中苯二氮卓受体结合, 增强与 r -氨基丁酸受体亲和力, 产生中枢抑制作用, 进而抑制血液循环中枢, 降低心率, 增加心脏血流量, 降低总动脉血流阻力, 最终起到降压的作用^[8]。此外, 有学者研究发现天麻素能扩张脑内血管、增加脑血流量、保护脑血管内皮组织^[9], 故天麻治疗高血压的作用靶点之一为脑部, 而本文研究显示配伍后脑中天麻效应成分增加, 正好说明钩藤与天麻配伍, 能够增加天麻的降压效果, 证实了钩藤与天麻配伍的合理性。

表 2 天麻配伍前后天麻苷元在 SHR 大鼠脑组织中药物代动力学参数

| 参数 | 单位 | 天麻组 | 天麻钩藤组 |
|------------------|---|---------|---------|
| A | $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | 1.039 | 0.450 |
| K_e | min^{-1} | 0.007 | 0.002 |
| K_a | min^{-1} | 0.027 | 0.047 |
| t_{lag} | min | 0.333 | 0.333 |
| $t_{1/2ka}$ | min | 25.388 | 14.851 |
| $t_{1/2ke}$ | min | 99.692 | 344.049 |
| t_{max} | min | 67.217 | 70.373 |
| C_{max} | $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | 0.485 | 0.373 |
| AUC | $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}$ | 111.366 | 213.585 |
| CL/F | $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ | 0.009 | 0.010 |
| V_z/F | $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 1.227 | 5.113 |

大鼠在体单向肠灌注模型研究异绿原酸 A 的肠吸收特性

程漩格, 王素军*, 曾洁, 钟运鸣, 黄丽花
(广东药学院临床药理学系, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究异绿原酸 A 在大鼠肠道吸收特性。方法:以酚红为标示物,采用大鼠在体单向肠灌注模型研究异绿原酸 A 3 个质量浓度组(18,58,100 mg·L⁻¹)在大鼠的十二指肠、空肠、回肠及结肠的吸收情况。结果:异绿原酸 A 在低、中、高 3 个浓度下,在十二指肠段、空肠、回肠与结肠段的有效渗透系数(P_{eff})在(0.69~6.64)×10⁻⁵ cm·s⁻¹内,且随浓度增加,有上升趋势,具有显著性差异($P<0.05$),在回肠的 P_{eff} 显著大于其他肠段,由此可推断回肠段是异绿原酸 A 的最佳吸收部位。结论:异绿原酸 A 在考察浓度范围内,吸收无自身浓度抑制作用,以被动扩散方式吸收,有特殊的吸收窗。

[关键词] 异绿原酸 A; 单向肠灌注模型; 吸收

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0108-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180108

Absorption Characteristics of Isochlorogenic Acid A in Rat Intestine Using *in situ* Single-pass Perfusion Model

CHENG Xuan-ge, WANG Su-jun*, ZENG Jie, ZHONG Yun-ming, HUANG Li-hua
(Clinical pharmacy Department of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the absorption of isochlorogenic acid A in rat intestine. **Method:** The absorptions of three concentrations (18, 58, 100 mg·L⁻¹) of isochlorogenic acid A in different intestinal segments were studied with phenol red as the marker by *in situ* rats single pass perfusion model. **Result:** Effective permeability (P_{eff}) of duodenum, jejunum, ileum and colon in different concentration of isochlorogenic acid A was in (0.69-6.64) × 10⁻⁵ cm·s⁻¹, and there was upgrade tendency between the P_{eff} of duodenum, jejunum, ileum and colon in different concentration of isochlorogenic acid A, and it has obvious difference among each

[收稿日期] 20140307(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073141);广东省“十二五”医学重点学科(依托广东药学院附属第一医院、药科学院)

[第一作者] 程漩格,硕士研究生,从事中药药理与药动学研究,E-mail:cxg717@hotmail.com

[通讯作者] *王素军,副教授,硕士生导师,从事中药药理与药动学研究,Tel:020-39352561,E-mail:guangdongyao11@163.com

[参考文献]

- [1] Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, et al. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(1):55.
- [2] Tang W, Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin [J]. Berlin: Springer-Verlag, 1992:545.
- [3] Junko H, Toshikazu S, Shigeyoshi D, et al. Phenolic compounds from *Gastrodia* Rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation [J]. Phytochemistry, 2002, 59(5):513.
- [4] 陈奇. 中药药理实验方法 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1994:207.
- [5] 程刚, 郝秀华, 刘国良, 等. 天麻素在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(2):128.
- [6] 王兴, 胡瑞娟, 黄熙, 等. RP-HPLC 测定大鼠服用大川芎丸提取物后血浆中的天麻素 [J]. 华西药理学杂志, 2003, 18(5):341.
- [7] 郭正平, 谭天秩, 钟裕国, 等. 天麻素及天麻甙元作用机理的研究 [J]. 华西医科大学学报, 1991, 22(1):79.
- [8] 邢玉瑞. 中医基础理论 [M]. 西安:陕西科技出版社, 2005:86.
- [9] 穆朝娟, 张涛. 天麻素对戊四氮致痫大鼠脑内血管的保护作用 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(14):2226.

[责任编辑 刘德文]