

· 药物代谢 ·

天钩降压胶囊中钩藤碱、异钩藤碱 在大鼠离体小肠的吸收动力学研究

姜华伟, 李凌军*, 李季

(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] **目的:** 研究天钩降压胶囊中有效成分钩藤碱、异钩藤碱的大鼠离体小肠吸收动力学。**方法:** 采用外翻肠囊法, 用 HPLC 测定不同取样时间肠内液钩藤碱、异钩藤碱的含量并计算累计吸收量, 以钩藤碱、异钩藤碱的累计吸收量对时间作线性回归分析, 计算吸收动力学参数。**结果:** 钩藤碱回归方程为 $Y = 0.0009X - 0.0085$ ($r = 0.9086$), $K_a = 9.0 \times 10^{-4}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), $t_{1/2} = 12.8$ h, 异钩藤碱回归方程为 $Y = 0.0086X - 0.1782$ ($r = 0.9090$), $K_a = 8.6 \times 10^{-3}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), $t_{1/2} = 1.34$ h。**结论:** 天钩降压胶囊中钩藤碱、异钩藤碱在大鼠离体小肠的吸收为一级动力学过程。

[关键词] 天钩降压胶囊; 吸收动力学; 钩藤碱; 异钩藤碱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1, R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0150-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070150

Studies on Absorption Kinetics of Rhynchophylline and Isorhynchophylline of Tiangou Jiangya Capsules in Rats' Intestinal

LOU Hua-wei, LI Ling-jun*, LI Ji

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To study the absorption kinetics of active components which was rhynchophylline and isorhynchophylline of Tiangou Jiangya capsules in rat's intestinal. **Method:** Using an improved rat everted gut sac model, rhynchophylline concentration and isorhynchophylline concentration were determined by HPLC. The concentration of cumulative absorption amount was calculated. The linear regression equation was figured through the concentration of cumulative absorption amount and time. The parameters were calculated. **Result:** The regression equation of rhynchophylline was $Y = 0.0009X - 0.0085$ ($r = 0.9086$), $K_a = 9.0 \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $t_{1/2} = 12.8$ h; the regression equation of isorhynchophylline is $Y = 0.0086X - 0.1782$ ($r = 0.9090$), $K_a = 8.6 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $t_{1/2} = 1.34$ h. **Conclusion:** The absorption of rhynchophylline and isorhynchophylline conforms to the first-order kinetics in rats' intestine.

[Key words] Tiangou Jiangya capsules; rhynchophylline; isorhynchophylline; absorption kinetics; HPLC

天钩降压胶囊由天麻、钩藤、杜仲、黄芩、牡丹皮、珍珠母组成, 具有平肝潜阳、镇静安神的功效, 用

于轻中度高血压, 属一、二级高血压低中危患者见肝肾不足、肝阳上亢证候者^[1]。钩藤为天钩降压胶囊

[收稿日期] 20120921 (010)

[基金项目] 国家十二五“重大新药创制”项目(2012ZX09102201-004)

[第一作者] 姜华伟, 硕士, 从事中药新制剂、新技术研究, Tel: 15066149144, E-mail: huawei0811@163.com

[通讯作者] * 李凌军, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新制剂、新技术研究, Tel: 15953176976, E-mail: lljun66@yahoo.com.cn

君药,具有息风定惊、清热平肝的功能,现代研究表明钩藤具有降压、扩血管、抗心律失常、抗癫痫等作用,其主要活性成分为钩藤生物碱,其中钩藤碱(rhynchophyline)、异钩藤碱(isorhynchophyline)含量较高^[2-3]。

口服药物肠道吸收是影响药物生物利用度的因素之一。常用的药物肠吸收研究方法有离体外翻肠囊法、在体肠循环法、在体单向肠灌注法等。外翻肠囊法是由英国 Wilson 和 Wiseman 首先提出,是在体外培养小肠肠环技术的刷状缘膜囊技术的基础上发展而来的一种研究药物在小肠吸收的方法。此模型最早用于研究葡萄糖和氨基酸的透膜转运^[4],离体实验的外翻肠囊法模型具有影响因素较少、实验条件可控、参数易于分析等特点,是简便、快速的药物吸收模型^[5]。在中药领域中,外翻肠囊法多局限于研究由中药中分离获得的单体化合物,何盛江等用翻肠囊法研究了吸收促进剂对小肠吸收苦参碱的作用^[6];董宇等采用大鼠肠外翻实验对黄连提取物的吸收进行了研究^[7];王弘等采用外翻肠囊法对黄芩苷在大鼠胃、离体小肠中的吸收动力学进行了研究^[8]。

目前,对钩藤碱、异钩藤碱的现代研究主要是对其药理作用的研究较多^[9-10],钩藤碱、异钩藤碱的离体肠吸收研究尚未见报道。本实验用外翻肠囊法对天钩降压胶囊中钩藤碱和异钩藤碱在大鼠离体小肠的吸收动力学进行了研究,为临床合理用药提供试验依据。

1 材料

岛津 LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司),医用氧气(山东华宸高压容器有限公司),FA1104 型电子天平(上海天平仪器厂),KQ-250E 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,频率 40 kHz),TGL-20M 型离心机(长沙维尔康湘鹰离心机有限公司)。

钩藤碱对照品(上海源叶生物科技有限公司,HPLC \geq 98%,批号 20120426),异钩藤碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111927-201102),天钩降压胶囊自制,Krebs-Ringer's 营养液(简称 K-R 试液,自配,每 1 L 水含 NaCl 7.80 g, KCl 0.35 g, NaHCO₃ 1.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, CaCl₂ 0.37 g, 葡萄糖 1.40 g, 水为蒸馏水);乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠,雌雄兼有,体重(200 \pm 20)g,购于山东中医药大学实验动物中心,动物合格证号

SCYK(鲁)20050015。

2 方法与结果

2.1 大鼠外翻肠囊模型的建立^[11] 选取实验前禁食 12 h(自由饮水)大鼠,用 10% 的水合氯醛(0.004 mL \cdot g⁻¹)腹腔注射麻醉,待麻醉后固定,延腹中线剪开腹腔,取出小肠,置于冰浴的 K-R 试液中,通入医用氧气(95% O₂, 5% CO₂),除去肠系膜和内容物。取空肠约 10 cm,用冰冷的台式液清洗后,用玻片小心的剥去肌肉、脂肪。用小玻璃棒将肠段轻柔翻转,将小肠黏膜面向外,浆膜侧向内,并且同时结扎肠肌侧端,将小肠上端固定于取样口,整个过程不要碰触内表面以防损伤,可在预备结扎端用力。用注射器从取样口处向肠内注入 37 $^{\circ}$ C, 1.5 mL K-R 试液,作为受药体系。将准备好的肠囊垂直放入含药物溶液的试管中,在试管中通入医用氧气(95% O₂, 5% CO₂),整个装置放入 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中进行实验。

2.2 肠内液中钩藤碱、异钩藤碱含量测定

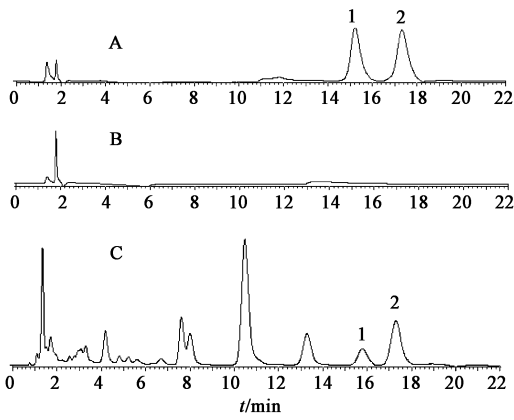
2.2.1 色谱条件 KROMASIL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 200 mm, 5 μ m),流动相 乙腈-水(45:55)(含 0.01 mol \cdot L⁻¹三乙胺,冰醋酸调 pH 7.5),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 20 μ L。

2.2.2 供试液制备 精密称取天钩降压胶囊药粉 2.10 g,溶解于 300 mL 的 K-R 试液中,超声 30 min,抽滤,即得含药溶液。分别于 25, 40, 60, 80, 100, 120 min 精密吸取肠内液 0.3 mL,并同时补充空白 K-R 试液 0.3 mL,于肠内液中精密加入甲醇 0.1 mL 沉淀蛋白,放置 1 h, 3 000 r \cdot min⁻¹离心 10 min,取上清液 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,作为供试液溶液。

2.2.3 对照品溶液制备 精密称取钩藤碱 5.70 mg,置 25 mL 量瓶中,加入乙腈定容至刻度,即得钩藤碱对照品储备溶液;精密称取异钩藤碱 5.15 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入乙腈定容至刻度,即得异钩藤碱对照品储备溶液。将钩藤碱、异钩藤碱对照品储备液按 1:1 的比例混合,即得钩藤碱质量浓度 0.114 g \cdot L⁻¹,异钩藤碱质量浓度 0.103 g \cdot L⁻¹混合对照品储备溶液。

2.2.4 专属性试验 分别取空白肠内液,对照品溶液,供试品溶液,按照 2.2.1 项下的色谱条件进样 20 μ L 测定,结果空白肠内液对钩藤碱、异钩藤碱的测定无干扰,色谱图见图 1。

2.2.5 钩藤碱、异钩藤碱标准曲线的绘制 分别取混合对照品溶液 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μ L,置 2 mL 量瓶中,加入适量的 K-R 试液定容至刻度,摇匀,即得含钩藤碱 0.285, 0.57, 1.425, 2.85, 5.7,



A. 对照品溶液; B. 空白肠内液; C. 供试品溶液;
1. 钩藤碱; 2. 异钩藤碱

图 1 钩藤碱、异钩藤碱的 HPLC

8.55, 11.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及异钩藤碱 0.257 5, 0.515, 1.287 5, 2.575, 5.15, 7.725, 10.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 进样 20 μL 测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 结果钩藤碱的回归方程 $Y = 34\ 847X + 895.62$ ($r = 0.999\ 5$); 异钩藤碱的回归方程 $Y = 18\ 102X + 1\ 772.3$ ($r = 0.999\ 4$)。

2.2.6 精密度试验 取 2.2.3 项下混合对照品溶液用 K-R 试液分别配制高、中、低 3 个质量浓度, 每个质量浓度各 3 份, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 于 1 d 内连续进行测定, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 根据标准曲线计算日内精密度, 结果高、中、低质量浓度的钩藤碱的日内精密度 RSD 分别为 1.1%, 1.9%, 1.3%; 高、中、低质量浓度的异钩藤碱的日内精密度 RSD 分别为 1.1%, 2.4%, 1.5%, 表明钩藤碱、异钩藤碱的精密度良好。

2.2.7 回收率试验 取 2.2.3 项下的混合对照品溶液, 用空白肠内液分别配制高、中、低 3 个质量浓度的溶液, 精密吸取 0.3 mL, 精密加入甲醇 0.1 mL 沉淀蛋白, 放置 1 h, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 于 1 d 内连续进行测定, 按 2.2.1 项下色谱条件分析, 各样平行测定 6 次, 根据标准曲线计算回收率, 结果见表 1, 2, 结果符合生物样品分析要求, 表明实验方法可行。

表 1 钩藤碱回收率测定

钩藤碱理论值/ μg	钩藤碱测定值/ μg	RSD/%	回收率/%
1.197 0	1.110 1 \pm 0.011 9	1.1	92.74
2.394 0	2.228 4 \pm 0.022 1	1.0	93.08
4.788 0	4.419 7 \pm 0.063 2	1.4	92.31

2.2.8 稳定性试验 精密称取天钩降压胶囊药粉

表 2 异钩藤碱回收率测定

异钩藤碱理论值/ μg	异钩藤碱测定值/ μg	RSD/%	回收率/%
1.081 5	1.019 9 \pm 0.023 3	2.3	94.30
2.163 0	2.0395 \pm 0.021 3	1.0	94.29
4.326 0	4.032 2 \pm 0.048 7	1.2	93.21

1.05 g, 溶解于 300 mL 的 K-R 试液中, 超声 30 min 混合均匀并抽滤, 即得含药溶液, 取禁 12 h 大鼠进行肠外翻试验, 定时取样, 并将样品置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育, 分别于 30, 60, 120, 180, 240 min 取样, 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 钩藤碱、异钩藤碱的 RSD 分别为 3.4%, 3.6%, 结果钩藤碱和异钩藤碱在 4 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 精密称取天钩降压胶囊粉 2.1 g, 溶于 300 mL K-R 液中, 超声 30 min 混匀并抽滤, 即得含药溶液。随机选取禁食 12 h 大鼠 6 只进行肠外翻试验, 并于 60 min 取样, 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 得钩藤碱、异钩藤碱的 RSD 分别为 4.1%, 3.2%, 重复性良好。

2.2.10 供试品溶液测定 取 2.2.2 项下供试品溶液按 2.2.1 项下色谱条件进行测定, 按以下公式计算药物的单位面积累计吸收量, 结果见表 3, 4。

$$Q = (0.4 \times C_n \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} + 0.4 \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / A$$

式中: Q 为药物单位面积累计吸收量, C_n 为各

表 3 钩藤碱小肠累计吸收量测定结果 ($n = 3$)

取样时间 /min	钩藤碱测定值 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	累计吸收量 / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-1}$	RSD /%
25	0.070 6	0.014 1	17.7
40	0.132 5	0.029 3	6.2
60	0.160 9	0.040 3	11.8
80	0.250 2	0.064 6	14.7
100	0.374 3	0.060 2	16.0
120	0.374 3	0.106 9	12.8

表 4 异钩藤碱小肠累计吸收量测定 ($n = 3$)

取样时间 /min	异钩藤碱 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	累计吸收量 / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-1}$	RSD /%
25	0.264 4	0.052 9	11.0
40	1.070 2	0.224 6	12.0
60	1.160 6	0.285 5	13.2
80	2.028 8	0.505 6	15.1
100	1.725 2	0.526 0	17.9
120	3.678 1	0.985 6	11.6

时间点取样的实测浓度, $V_{\text{总}}$ 为平衡前肠管中加入的 K-R 试液体积, $V_{\text{样}}$ 为每次取样的体积, A 为吸收面积, 0.4 为供试品溶液的体积。

以钩藤碱、异钩藤碱的单位面积累计吸收量对时间作线性回归分析, 结果钩藤碱吸收动力学方程为 $Y = 0.0009X - 0.0085 (r = 0.9086)$, $K_a = 9.0 \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $t_{1/2} = 12.8 \text{ h}$, 异钩藤碱吸收动力学方程为 $Y = 0.0086X - 0.1782 (r = 0.9090)$, $K_a = 8.6 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $t_{1/2} = 1.34 \text{ h}$ 。

3 讨论

通过对不同肠段的大鼠离体小肠吸收预实验, 钩藤碱和异钩藤碱在十二指肠、空肠、回肠 3 个肠段均有吸收, 钩藤碱在十二指肠和空肠吸收较回肠好, 异钩藤碱在空肠和回肠吸收较十二指肠好, 因此选择空肠进行吸收动力学研究。

通过预实验对高、中、低 3 个浓度的待测药液进行离体肠吸收实验, 结果表明, 在吸收面积不变时, 钩藤碱和异钩藤碱累计吸收量与时间成线性关系, 符合一级吸收动力学过程, 因此选择中浓度进行吸收动力学研究。

由于待测药液本身的浓度、成分可能对肠管的生理状态有影响, 肠管中 K-R 试液的量需经预实验确定^[12], 本实验通过注入不同量的空白 K-R 试液进行离体小肠实验, 确定将 1.5 mL K-R 试液注入 10 cm 的肠管中进行离体肠吸收实验。各样品中的化学成分吸收代谢情况与肠囊的存活时间有关, 本实验通过预实验测定确定采用外翻肠囊法的大鼠离体小肠在 120 min 内可以保持肠细胞的活性。

对不同时间点取出的样品经不同处理方法发现, 经 0.1 mL 的甲醇沉淀蛋白后离心后进行测定的结果, 对钩藤碱和异钩藤碱的吸收面积影响较小; 而经乙醚、氯仿萃取, 离心后挥干, 再将残渣复溶的处理方法, 结果使待测成分的峰面积减小很多。故选择用 0.1 mL 的甲醇沉淀蛋白后离心后进行测定。

[参考文献]

- [1] 张微, 李凌军, 王瑛兰. 天钩降压胶囊中天麻苷、丹皮酚在大鼠离体小肠的吸收动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 266.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药工业出版社, 2010.
- [3] 谭超元, 王海波, 王东. 钩藤饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 63.
- [4] Andrés Carmona. A simple *in vitro* perfusion system to measure intestinal nutrient uptake[J]. J Nutr Biochem, 1998, 9: 52.
- [5] 张英丰, 李玉洁, 杨庆, 等. 采用离体外翻肠囊模型进行穿心莲内酯的肠吸收特性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 107.
- [6] 何盛江, 栾立标. 翻转肠囊法研究吸收促进剂对小肠吸收苦参碱的作用[J]. 药学进展, 2004, 28(3): 126.
- [7] 董宇, 杨庆, 朱晓新, 等. 黄连提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 1056.
- [8] 王弘, 陈济民, 张清民. 黄芩苷在大鼠胃、离体小肠的吸收动力学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(1): 5.
- [9] 宋雪云. 钩藤方提取物对自发性高血压大鼠降压作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 216.
- [10] 莫雪妮, 杨益宝, 黄绍湘, 等. 天麻钩藤饮对高血压大鼠血管重构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 149.
- [11] Cornaire G, Duncan R. Everted rat intestine: a new model for the quantitation of P-glycoprotein mediated efflux of anticancer agents[J]. Anticancer Res, 2000, 20: 3157.
- [12] 朱晶晶, 王智民, 龚慕辛, 等. 基于肠吸收的质量评价指标选择的方法和原则[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 659.

[责任编辑 邹晓翠]