

· 药物代谢 ·

天钩降压胶囊中钩藤碱、异钩藤碱大鼠 在体肠吸收动力学研究

李季, 李凌军*, 娄华伟
(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钩藤碱、异钩藤碱在大鼠肠道的吸收动力学。方法: 采用大鼠在体肠灌注试验, 利用 HPLC 测定钩藤碱、异钩藤碱的含量 KROMASIL C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (含 0.01 mol·L⁻¹ 三乙胺, 冰醋酸调 pH 7.5) (45:55), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL, 用紫外-可见分光光度法在 560 nm 测定酚红的含量。结果: 钩藤碱吸收动力学方程为 $Y = -0.3317X - 0.7718$ ($r = 0.9985$), $K_a = 0.3317$ (h⁻¹), $t_{1/2} = 2.09$ (h); 异钩藤碱吸收动力学方程为 $Y = -0.6870X - 0.1504$ ($r = 0.9852$), $K_a = 0.6870$ (h⁻¹), $t_{1/2} = 1.01$ (h)。结论: 天钩降压胶囊中钩藤碱、异钩藤碱在大鼠在体小肠的吸收呈一级动力学过程。

[关键词] 天钩降压胶囊; 钩藤碱; 异钩藤碱; 在体肠灌注; 吸收动力学

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0167-04

In vivo Intestinal Absorption Kinetics Study of Rhynchophylline and Isorhynchophylline of Tiangou Jiangya Capsules

LI Ji, LI Ling-jun*, LOU Hua-wei
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To study *in vivo* intestinal absorption kinetics of rhynchophylline and isorhynchophylline of Tiangou Jiangya capsules. **Method:** HPLC method was used to determine the content of rhynchophylline, isorhynchophylline and Ultra-violet (UV) spectrophotometry was used to determine the content of phenol red in the rat *in vivo* intestinal perfusion tests. **Result:** The regression of rhynchophylline is $Y = -0.3317X - 0.7718$ ($r = 0.9985$), $K_a = 0.3317$ (h⁻¹), $t_{1/2} = 2.09$ (h). The regression of isorhynchophylline is $Y = -0.6870X - 0.1504$ ($r = 0.9852$), $K_a = 0.6870$ (h⁻¹), $t_{1/2} = 1.01$ (h). **Conclusion:** The absorption of rhynchophylline and isorhynchophylline of Tiangou Jiangya capsules in rat's intestine comply with the first-order kinetics process.

[Key words] Tiangou Jiangya capsules; rhynchophylline; isorhynchophylline; *in vivo* intestinal perfusion; absorption kinetics

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]。钩藤碱、异钩藤碱是天钩降压胶囊君药钩藤的主要有效成分, 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^[2]。

目前, 钩藤碱、异钩藤碱的药理作用研究较多^[3-5], 体内外吸收研究较少, Wei W^[6-7] 等对钩藤碱、异钩藤碱的体内代谢进行了研究, 钩藤碱、异钩

[收稿日期] 20120921(005)

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

[第一作者] 李季, 硕士研究生, 从事中药新制剂、新技术研究, Tel: 15966610609, E-mail: lij0106@126.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

藤碱的在体肠吸收研究尚未见报道。本文建立在体肠灌注模型,采用酚红对循环液前后体积的变化进行校正,研究天钩降压胶囊中钩藤碱、异钩藤碱在大鼠肠段的吸收动力学,能够较为真实地反映中药复方中有效成分的肠吸收,为进一步研究天钩降压胶囊提供了有价值的试验依据。

1 材料

岛津 LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),AE240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),BT100M 型恒流泵(保定创锐泵业有限公司),恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司),PHS-3WB 精密 pH 计(上海理达公司)。

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),苯酚红(天津博迪化工股份有限公司),Krebs-Ringer's 营养液(简称 K-R 试液,自配,每 1 L 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),乙腈、三乙胺为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠,雌雄兼有,体重(220 \pm 20)g,购于山东中医药大学试验动物中心。

2 方法与结果

2.1 肠循环液中酚红浓度的测定

2.1.1 酚红测定波长的选择 用 K-R 试液配制质量浓度为 100 mg·L⁻¹的天钩降压胶囊溶液、20 mg·L⁻¹的酚红溶液,用 K-R 试液进行在体肠灌注 2 h 制备空白肠循环液,分别精密吸取 0.5 mL,精密加入 0.2 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液 5 mL,显色,以 0.2 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液作为空白溶液,于 200 ~ 700 nm 进行扫描。

结果表明,在酚红的最大吸收波长 560 nm 处,天钩降压胶囊溶液及空白肠循环液均无吸收,故选择在 560 nm 波长处测定酚红浓度。

2.1.2 酚红标准曲线的绘制 精密称取酚红 10 mg,置 100 mL 量瓶中,用 K-R 试液溶解并定容至刻度,分别吸取 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4 mL 溶液置 1 mL 量瓶中,用 K-R 试液定容至刻度,即得酚红浓度分别为 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg·L⁻¹的系列质量浓度标准溶液,然后各取 0.5 mL 置 10 mL 离心管中,分别加入 0.2 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液 5 mL,摇匀,以 0.2 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液为空白,在 560 nm 波长下测定酚红的吸光度。以吸光度

(A)对酚红浓度(C, mg·L⁻¹)进行线性回归,得回归方程为 $Y = 0.0175X - 0.0159$ ($r = 0.9995$)。

2.1.3 酚红浓度的测定 在不同时间点取大鼠在体肠灌流液 0.5 mL,加入 0.2 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液 5 mL,摇匀,以 0.2 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液为空白,在 560 nm 波长下测定酚红的吸光度,将其代入回归方程计算酚红浓度。

2.2 肠循环液中钩藤碱、异钩藤碱的含量测定

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(含 0.01 mol·L⁻¹三乙胺,冰醋酸调 pH 7.5)(45:55),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。

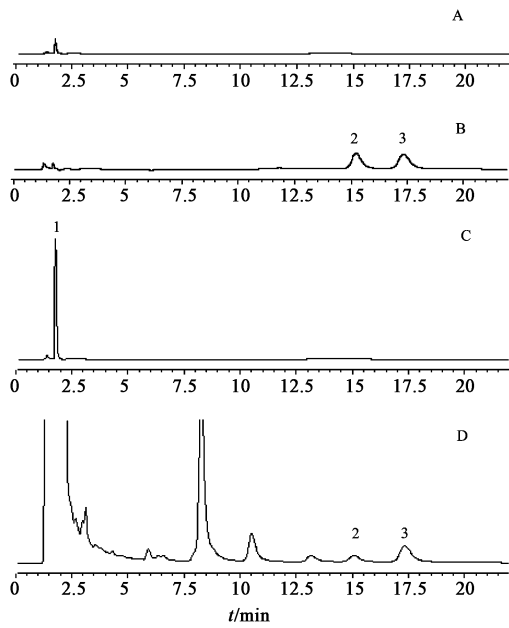
2.2.2 钩藤碱、异钩藤碱标准曲线的绘制 精密称取钩藤碱 1.63 mg、异钩藤碱对照品 5.15 mg,置 25 mL 量瓶中,用含酚红 20 mg·L⁻¹的 K-R 试液溶解并定容至刻度,摇匀,即得钩藤碱质量浓度为 65.2 mg·L⁻¹、异钩藤碱质量浓度为 206 mg·L⁻¹的储备液。精密吸取储备液适量,用含酚红 20 mg·L⁻¹的 K-R 试液稀释成含钩藤碱 0.325 5, 0.651 1, 1.627 5, 3.255 6, 6.51 9, 9.675 1, 13.02 mg·L⁻¹、异钩藤碱 2.06 4, 4.12 1, 10.3 2, 20.6 4, 41.2 8, 61.8 2, 82.4 mg·L⁻¹的系列质量浓度标准溶液,进样 20 μ L 测定,以峰面积对浓度进行线性回归,得钩藤碱的回归方程为 $Y = 35913X + 305.26$ ($r = 0.9998$),异钩藤碱的回归方程为 $Y = 38823X - 369.78$ ($r = 0.9999$)。

2.2.3 钩藤碱、异钩藤碱浓度的测定 在不同时间点取大鼠在体肠灌流液 1.5 mL,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取上清液 20 μ L 进样分析,将所得峰面积值代入回归方程计算钩藤碱、异钩藤碱的浓度。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 分别取空白肠循环液、空白肠循环液外加对照品溶液、空白肠循环液外加酚红溶液、在体肠灌流液,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,照 2.2.1 项下方法测定,结果表明空白肠循环液及酚红对钩藤碱、异钩藤碱的测定无干扰, HPLC 图见图 1。

2.3.2 精密度考察 取 2.2.2 项下钩藤碱质量浓度为 0.651, 3.255, 13.02 mg·L⁻¹,异钩藤碱质量浓度为 2.06, 20.6, 82.4 mg·L⁻¹的低、中、高质量浓度的混合对照品溶液,照 2.2.1 项下方法测定,重复进样 5 次,结果低、中、高质量浓度的钩藤碱的日内精密度 RSD 分别为 1.2%, 1.0%, 1.5%; 日间精密度 RSD 分别为 1.0%, 0.9%, 1.5%。低、中、高质量浓



A. 空白肠循环液; B. 对照品空白肠循环液;
C. 酚红空白肠循环液; D. 在体肠灌液;
1. 酚红; 2. 钩藤碱; 3. 异钩藤碱

图1 天钩降压胶囊 HPLC

度的异钩藤碱的日内精密度 RSD 分别为 3.0%, 1.4%, 0.4%; 日间精密度 RSD 分别为 3.1%, 1.8%, 0.8%, 表明钩藤碱、异钩藤碱的精密度良好。

2.3.3 稳定性考察

2.3.3.1 钩藤碱、异钩藤碱在不同 pH 的 K-R 试液中的稳定性考察 用 2 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液调节 K-R 试液的 pH 分别为 5.0, 6.5, 7.4, 分别配制 5 份 10 g·L⁻¹ 的天钩降压胶囊溶液, 置 37 °C 水浴中, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 取样 0.6 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 照 2.2.1 项下方法测定, 结果钩藤碱在 pH 5.0, 6.5, 7.4 的 K-R 试液中的 RSD 分别为 3.7%, 4.1%, 0.8%; 异钩藤碱在 pH 5.0, 6.5, 7.4 的 K-R 试液中的 RSD 分别为 1.9%, 2.1%, 1.8%, 表明钩藤碱、异钩藤碱 8 h 内在不同 pH 的 K-R 试液中的稳定性良好。

2.3.3.2 钩藤碱、异钩藤碱在空白肠循环液中的稳定性考察 取空白肠循环液配制 10 g·L⁻¹ 的天钩降压胶囊溶液, 置 37 °C 水浴中, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 取样 0.6 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 照 2.2.1 项下方法测定, 结果钩藤碱的 RSD 1.8%, 异钩藤碱的 RSD 2.3%, 表明钩藤碱、异钩藤碱 8 h 内在空白肠循环液中的稳定性良好。

2.3.4 回收率考察 取 2.2.2 项下低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 照 2.2.1 项下方法测定, 重复进样 5 次, 结果表明钩藤碱、异钩藤碱的回

收率符合要求, 见表 1, 2。

表1 钩藤碱的回收率测定 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

钩藤碱/mg·L ⁻¹	测定值/mg·L ⁻¹	RSD/%	回收率/%
0.651	0.732 3 ± 0.008 7	1.2	112.49
3.255	3.195 3 ± 0.032 2	1.0	98.17
13.02	13.098 7 ± 0.192 5	1.5	100.60

表2 异钩藤碱的回收率测定 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

异钩藤碱/mg·L ⁻¹	测定值/mg·L ⁻¹	RSD/%	回收率/%
2.06	2.004 6 ± 0.060 2	3.0	97.31
20.6	20.432 7 ± 0.278 3	1.4	99.19
82.4	81.520 2 ± 0.343 5	0.4	98.93

2.4 大鼠在体肠灌流试验 取试验前禁食不禁水 12 ~ 18 h 的大鼠, 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 0.004 mL·g⁻¹, 将麻醉后的大鼠背位固定于手术台板上, 沿腹部正中中线剪开约 3 cm, 并分离出空肠约 10 cm, 两端剪开小口, 插管, 结扎, 用 37 °C 生理盐水以 5 mL·min⁻¹ 的流速冲净肠内容物, 装好回流装置。将小肠部分小心放回肠腔, 尽可能避免卷曲和扭结, 还要注意进口管和出口管保持在同一高度, 以免重力影响下溢流。切口处用生理盐水浸润的纱布覆盖以保湿, 生理盐水冲净后, 换成 37 °C 肠循环液 100 mL 以 5 mL·min⁻¹ 的流速循环 10 min 后, 将流速调为 2 mL·min⁻¹, 分别于 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 取样 2 mL, 同时补加等量的等温含酚红 20 mg·L⁻¹ 的 K-R 试液, 所取样品 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 照 2.1.3, 2.2.1 项下方法测定。根据酚红浓度计算出供试液的体积, 根据每一时间段药物浓度和供试液体积的变化计算出肠循环液中的剩余药量 X, 以 lnX 对取样时间 t 作图得一直线 (方程为 lnX = lnX₀ - K_at), 由直线的斜率得出吸收速率常数 (K_a) 和吸收半衰期 (t_{1/2} = 0.693/K_a)。结果见表 3, 4。

表3 钩藤碱剩余量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

取样时间/h	钩藤碱剩余量 X/mg	lnX	RSD/%
0	0.463 8 ± 0.003 8	-0.768 2	0.7
0.25	0.418 5 ± 0.002 0	-0.871 0	0.5
0.5	0.398 3 ± 0.003 9	-0.920 5	1.0
0.75	0.355 1 ± 0.004 4	-1.035 4	1.2
1	0.336 4 ± 0.003 2	-1.089 3	1.0
1.25	0.304 1 ± 0.005 6	-1.190 4	1.8
1.5	0.281 1 ± 0.002 6	-1.268 9	0.9
1.75	0.261 1 ± 0.007 3	-1.343 0	2.8
2	0.235 7 ± 0.005 8	-1.445 3	2.5

表 4 异钩藤碱剩余量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

取样时间/h	异钩藤碱剩余量 X/mg	$\ln X$	RSD/%
0	1.084 0 \pm 0.003 4	0.080 6	0.3
0.25	1.013 1 \pm 0.013 2	0.013 0	1.3
0.5	0.980 5 \pm 0.012 2	-0.019 7	1.2
0.75	0.661 5 \pm 0.021 2	-0.413 3	3.2
1	0.551 7 \pm 0.018 8	-0.594 8	3.4
1.25	0.475 4 \pm 0.007 1	-0.743 5	1.5
1.5	0.385 8 \pm 0.004 2	-0.952 4	1.1
1.75	0.350 5 \pm 0.006 2	-1.048 4	1.8
2	0.316 4 \pm 0.016 2	-1.150 6	5.1

以钩藤碱、异钩藤碱剩余量对数值对时间作线性回归分析,结果钩藤碱吸收动力学方程为 $Y = -0.331 7X - 0.771 8 (r = 0.998 5), K_a = 0.331 7 (\text{h}^{-1}), t_{1/2} = 2.09 \text{ h}$; 异钩藤碱吸收动力学方程为 $Y = -0.687 0X - 0.150 4 (r = 0.985 2), K_a = 0.687 0 (\text{h}^{-1}), t_{1/2} = 1.01 \text{ h}$ 。

3 讨论

通过不同肠段大鼠在体肠吸收预实验知天钩降压胶囊中钩藤碱、异钩藤碱的主要吸收部位为空肠和回肠,因此选择空肠进行吸收动力学试验。

评价药物在肠道吸收的方法有离体法、在体法和体内法等。本试验采用大鼠在体肠灌注法考察药物的肠吸收动力学,该方法在保证了肠道神经与内分泌输入较为完好及血液和淋巴液供应的同时,试验条件与口服给药后药物接触的肠道环境接近,与人体有较好的相似性^[8]。但该方法由于较长时间以较高流速回流供试液,而对肠黏膜造成一定损伤,导致药物的吸收增大,使测得值与真实值有较大偏差^[9]。

试验前要将药物溶液混合均匀,避免在循环过程中堵塞管路。药物对管壁的非特异性吸附也会产生一定的试验误差,故试验时需要将管路和肠管平衡一段时间,使药物对管壁的吸附达到饱和,也使机体适应灌注过程^[10]。

大鼠在体肠灌注实验中,肠道不仅吸收药物,还

吸收水分导致供试液体积减小,故不能采用直接测定浓度的方法计算剩余药量。本实验采用在肠道生理 pH 条件下不易被肠道吸收的酚红作为标记物,通过其浓度变化来校正药物浓度^[11]。

[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):267.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 黄厚才,钟荣玲,曹鹏,等.钩藤散对 NIH-3T3 细胞衰老模型增殖与凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):160.

[5] 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.

[6] Wei W, Chao M M, Ma sao H. Metabolism and pharmacokinetics of rhynchophylline in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2010,33(4):669.

[7] Wei W, Chao M M, Masao H. Metabolism of isorhynchophylline in rats detected by LC-MS [J]. J Pharm Pharmaceut Sci, 2010,13(1):27.

[8] 陈地灵,陈振兴,林励,等.巴戟多糖在体肠吸收机制的研究[J].中药新药与临床药理,2012,23(1):64.

[9] 张晓雷,周明眉,贾伟,等.在体肠灌注模型及其在中药研究中的应用[J].上海中医药大学学报,2010,24(3):87.

[10] 张英丰,李玉洁,杨庆,等.大鼠在体单向肠灌注法进行丹参素、丹酚酸 B 的肠吸收研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):96.

[11] 王娟,单进军,狄留庆,等.UPLC 同时测定大鼠肠灌注液中桔梗皂苷 D 和酚红的浓度[J].南京中医药大学学报,2012,28(1):67.

[责任编辑 邹晓翠]