

# 异钩藤碱与天麻素合用对异钩藤碱 在大鼠肝脏分布的影响

陈志远, 王兴\*, 李晓倩, 王新勇, 张卫国

(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

**[摘要]** 目的: 观察天麻素与异钩藤碱合用前后异钩藤碱在SD大鼠肝脏的分布变化。方法: 采用高效液相色谱法测定异钩藤碱与天麻素合用前后异钩藤碱在SD大鼠肝脏中的含量。色谱条件: Waters™ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, RP 18.5 μm); 流动相甲醇-水(70:30), pH 8.0, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 20 μL。结果: 异钩藤碱对照品在肝脏组织中在0.16 ~ 4.0 mg·L<sup>-1</sup>具有较好的线性关系; 异钩藤碱与天麻素配伍前后在肝脏中的分布无显著性差异。结论: 天麻素有一定的降低异钩藤碱在肝脏分布的作用。

**[关键词]** 钩藤; 天麻; 天麻素; 异钩藤碱

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0193-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1214.060.html>

**[网络出版时间]** 2012-08-13 12:14

## Distribution of Isorhynchophylline in Liver Tissues before and after Compatibility with Gastrodin and Isorhynchophylline in Rats

CHEN Zhi-yuan, WANG Xing\*, LI Xiao-qian, WANG Xin-yong, ZHANG Wei-guo

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

**[Abstract]** **Objective:** To observation the distribution of isorhynchophylline in liver tissues before and after compatibility with gastrodin and isorhynchophylline in rats. **Method:** HPLC was employed to determinate the isorhynchophylline in liver tissues in rats before and after compatibility with gastrodia and unicaria; analytical column was Waters™ (4.6 mm × 250 mm, RP 18.5 μm); the mobile phase consisted of methanol-water (70:30), pH 8.0, fluid rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; the column temperature was 30 °C, the detector wave length was set at 254 nm, the sample amount is 20 μL. **Result:** Isorhynchophylline in liver and kidney tissues was linear in the range of 0.16-4.0 mg·L<sup>-1</sup>. There were no significant differences in liver tissues of SD rats before and after compatibility.

**Conclusion:** Gastrodin has a certain effects reduction in the liver tissues distribution.

**[Key words]** Uncariae Ramulus Cum Uncis; Rhizoma Gastrodiae; gastrodine; isorhynchophylline

天麻、钩藤为常用平肝潜阳药对,其所含效应成分分别为天麻素(gastrodine)、异钩藤碱(isorhynchophylline)对肝阳上亢证有明显的治疗作用<sup>[1-2]</sup>。课题的前期研究对药对配伍前后天麻素的肝脏分布做了研究,本研究主要从单一有效成分

伍的角度出发,通过测定异钩藤碱与天麻素合用前后异钩藤碱在大鼠肝脏中的分布来探讨药对配伍对异钩藤碱在SD大鼠体内分布过程的影响。

### 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,雄性,体重(200 ± 20)g,清洁

**[收稿日期]** 20120411(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30801547);中央高校基本科研业务费专项资金项目(SWJTU11ZT26,SWJTU09ZT29)

**[第一作者]** 陈志远,硕士研究生,从事中药新药研发, Tel:028-87603202, E-mail:czy928@foxmail.com

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

级,动物许可证号 SCXK(川)2010-10,购自四川大学实验动物中心。

**1.2 药物、试剂和仪器** 异钩藤碱对照品,购自南昌贝塔生物科技有限公司(10525-080117);天麻素对照品,购自中国药品生物制品检定所(批号 110807-200205);甲醇(色谱纯),购自天津市科密欧化学试剂有限公司(批号 20090103);乙腈(分析纯),购自天津市科密欧化学试剂有限公司(批号 20070508);无水乙醇(分析纯),购自广东汕头市西陇化工厂(批号 070912);LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津);MTN-2800W 氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);WH-3 微型漩涡混合仪(WH-3 微型漩涡混合仪);BS224S 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);SK8200LH 超声清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);KL-UP-H-20 艾科超纯水机[(台湾艾科)成都康宇实验专用纯水设备厂]。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 将 SD 大鼠随机分为 3 组:空白组,异钩藤碱组(钩藤组),天麻素加异钩藤碱组(天麻钩藤组)。其中空白组 3 只;钩藤组 15 只,分别为钩藤 15 min 组 3 只,钩藤 30 min 组 3 只,钩藤 60 min 组 3 只,钩藤 120 min 组 3 只,钩藤 240 min 组 3 只;天麻素加异钩藤碱组 15 只,分别为天麻素异钩藤碱 15 min 组 3 只,天麻素异钩藤碱 30 min 组 3 只,天麻素异钩藤碱 60 min 组 3 只,天麻素异钩藤碱 120 min 组 3 只,天麻素异钩藤碱 240 min 组 3 只。

**2.2 药液制备** 天麻素供试品溶液的配制:精密称取天麻素对照品 11.825 mg,加水定容 50 mL、配成  $0.2635 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,按大鼠  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药的天麻素供试液(天麻素大鼠的给药剂量  $2.635 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>[3]</sup>。

异钩藤碱供试品溶液的制备:精密称取异钩藤碱单体 0.8 mg,加水定容 50 mL,配成按大鼠  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药的异钩藤碱供试液(异钩藤碱大鼠的给药剂量为  $0.16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。

**2.3 动物饲养及给药** 将大鼠置于一个单独的独立通气(IVC)鼠笼中,饲养期间可自由获得食物和干净水。常规饲养一周后开始给药,给药前将大鼠称重,记录。按照参考文献[4]中实验动物与人用药量换算出每只大鼠的 ig 量。即:大鼠日给药剂量 = 人日给药剂量  $\times 6.17 \times$  校正系数。得大鼠日给药剂量为:天麻素单体给药  $2.635 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,异钩藤碱单体给药  $0.16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

**2.4 组织样品的采集及预处理** 连续 ig 3 d 后分别于给药前(0 min)和 ig 给药后 15,30,60,120,240 min 断头处死并取出肝脏组织,在冷生理盐水中荡洗 3 遍,每次均用 3 层滤纸挤压。将压干的肝脏组织称重,用生理盐水制成 W:V 1:5 匀浆,充分混合后,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心 10 min,保留上清液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  下冷冻保存,备用。

用微量移液器精密吸取 0.5 mL 空白大鼠肝组织匀浆于洁净的 5 mL 一次性塑料离心试管中,试管中加入 100  $\mu\text{L}$  的对照品溶液,然后加入 2 mL 甲醇,在涡旋混匀器上混匀 30 s,置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中静置沉淀 2 h,  $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取出后用微量移液器精密吸取上清液于一次性塑料离心试管中,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴  $\text{N}_2$  流下吹干,用微量移液器精密加入 500  $\mu\text{L}$  甲醇复溶,在涡旋混匀器上混匀 30 s,精密称定质量,置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中静置沉淀 2 h,用相应的溶剂补足减失的质量,摇匀,于  $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 5 min,用微量移液器精密吸取上清液置于 1.5 mL 一次性塑料离心管,备用<sup>[5]</sup>。

**2.5 色谱条件的确立** 色谱柱 Waters<sup>TM</sup> (4.6 mm  $\times$  250 mm, RP 18.5  $\mu\text{m}$ );前置预柱 Wondasil (4.0 mm  $\times$  10 mm,  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$ );流动相甲醇-水(70:30)三乙胺调 pH 8.0;检测波长 254 nm;柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;流速  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.6 统计学处理方法** 对异钩藤碱组、天麻素异钩藤碱组中异钩藤碱在肝脏的分布差异用 SPSS 17.0 软件 *t* 检验进行统计分析,计算得 *P* 值,讨论异钩藤碱与天麻素配伍前后是否有显著性差异。 $P < 0.05$  有统计学意义

## 2.7 方法学评价

**2.7.1 异钩藤碱体内检测方法专属性** 在确定的色谱条件下,异钩藤碱的保留时间为 9.58 min,分离情况良好,肝脏组织中的杂质均不干扰。大鼠分别给予异钩藤碱、异钩藤碱合并天麻素后的肝脏 HPLC 图谱如图 1、图 2 所示。

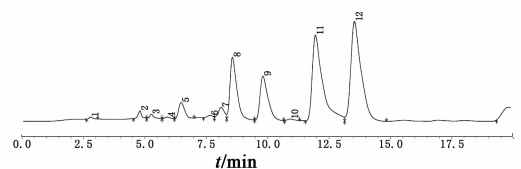


图 1 大鼠单独给予异钩藤碱(9号峰为异钩藤碱)

**2.7.2 组织样品的标准曲线** 取肝脏组织空白匀浆液 0.5 mL,再加入不同浓度的异钩藤碱对照液,配成系列质量浓度 0.16,0.40,0.80,1.60,4.00  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

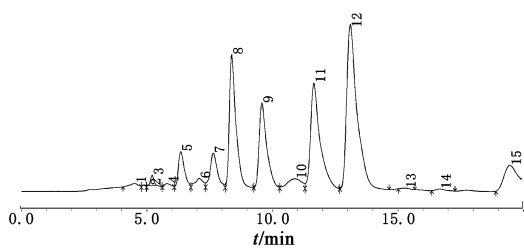


图2 大鼠给予异钩藤碱合并天麻素(9号峰为异钩藤碱)

$L^{-1}$ ,按上述 2.4 项下组织样品处理方法处理,进样 20  $\mu L$ 进行 HPLC 分析,对组分浓度做标准曲线,求其回归方程为  $Y = 67\ 502X - 4\ 161.9$ ,  $R^2 = 0.998\ 8$  ( $n = 5$ ),表明异钩藤碱对照品在肝脏组织中在 0.16 ~ 4.0  $mg \cdot L^{-1}$  具有较好的线性关系。

**2.7.3 精密度与准确度** 取肝空白组织匀浆液 0.5 mL,加入不同量的异钩藤碱对照品储备液(200  $mg \cdot L^{-1}$ ),使其分别含异钩藤碱 0.15,1.5,15.0  $mg \cdot L^{-1}$ ,每个浓度平行 5 份,按照组织预处理方法处理,并测定药物浓度,用肝标准曲线进行分析,计算日内、日间精密度。结果表明在上述 3 个质量浓度下,肝脏日内精密度 RSD 4.93%,日间精密度均 RSD 7.07%。

**2.7.4 萃取回收率** 于已测定异钩藤碱质量浓度为 0.15  $mg \cdot L^{-1}$  的 0.5 mL 肝脏组织匀浆液中分别加入质量浓度为 200  $mg \cdot L^{-1}$  的异钩藤碱对照品储备液 1,5,25  $\mu L$ ,每个浓度平行 5 份<sup>[6]</sup>。按照上述组织预处理方法处理,进样 20  $\mu L$ ,用标准曲线进行分析,结果回收率为 102.45%,RSD 2.27%。

**2.7.5 稳定性考察** 取空白组织匀浆 0.5 mL,配

制成质量浓度为 0.8  $mg \cdot L^{-1}$  5 个样本按组织预处理方法进行处理,于冰箱 -20  $^{\circ}C$  冻存 0,7,15 d 后取出,进样分析记录相应峰面积,用标准曲线进行分析<sup>[7]</sup>,结果在肝脏中 RSD 7.84%。说明异钩藤碱样品在 -20  $^{\circ}C$  冰箱保存下,至少可稳定保存 15 d,可以满足测定工作要求。

**2.7.6 重复性考察** 对同一份供试组织匀浆重复进样 5 次,计算结果得 RSD 3.03%。

### 3 结果

**3.1 给药后不同时间异钩藤碱在肝脏中的浓度** SD 大鼠口服异钩藤碱及异钩藤碱与天麻素合用药液之后,采用一步法测定异钩藤碱各时间点肝脏中的药物浓度见表 1。

采用统计学方法对上述结果进行分析,异钩藤碱与天麻素配伍前后在肝组织内的异钩藤碱的分布无显著性差异。

表1 异钩藤碱和天麻素合用药液口服给药各时间点肝脏中异钩藤碱的质量浓度

时间/min	异钩藤碱/ $\mu g \cdot L^{-1}$	
	钩藤组	天麻钩藤组
15	4.175 6	5.577
30	4.666 5	7.501 6
60	6.022 6	10.575 1
120	8.060 4	7.429 5
240	6.322 5	6.344 2

**3.2 参数的计算及分析** 应用 3p97 药动学软件对所得的药时曲线进行数据分析,所得的药动学参数见表 2。

表2 各实验组的药动学参数

单位	参数意义	异钩藤组	天麻素与异钩藤合用
$A/mg \cdot L^{-1}$	分布相的零时截距	8.710 690	11.720 630
$Ke/L \cdot min^{-1}$	表观一级消除速率	0.001 206	0.002 825
$Ka/L \cdot min^{-1}$	表观一级吸收速率常数	0.031 729	0.053 576
Lagtime/min	滞后时间	-	2.476 885
$t_{1/2 ka}/min$	吸收半衰期	21.845 75	72.937 625
$t_{1/2 ke}/min$	消除半衰期	574.531 490	245.382 156
$t_{peak}/min$	单剂量给药后出现最高血药浓度时间	107.118 622	57.982 292
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	单剂量给药后最高血药浓度	7.363 620	9.425 313
$AUC/\mu g \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$	药时曲线下总面积	6 945.529 800	3 930.473 100

由以上药动学参数可以看出,两个实验组异钩藤碱的药动学特征有着明显的不同。在与天麻素合用后,异钩藤碱的吸收加快( $Ka = 0.053\ 576\ L \cdot min^{-1}$ ),消除亦加快( $Ke = 0.002\ 825\ L \cdot min^{-1}$ )。达峰时间较异钩藤碱单独给药组降低( $T_{peak} = 57.982\ 292\ min$ ),

达峰浓度较异钩藤碱单独给药组略有升高( $C_{max} = 9.425\ mg \cdot L^{-1}$ ),表明与天麻素合用后,异钩藤碱在体内的分布速度加快,吸收速度和代谢速度明显增加。与天麻素合用后的生物利用度(AUC)比单独给药组小的多(AUC合用 = 3930.473  $\mu g \cdot L^{-1} \cdot min$ )。

# 金莲花总黄酮抗炎作用研究

刘平, 刘玉玲, 佟继铭\*

(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

**[摘要]** 目的: 观察金莲花总黄酮(TFTL)的抗炎作用, 为其临床应用提供实验依据。方法: 以阿司匹林(Asp)及金莲花片(JLHT)为阳性对照药, 采用大鼠皮内色素渗出法、大鼠足跖肿胀实验、大鼠棉球肉芽肿法评价 0.1, 0.2, 0.4 g·kg<sup>-1</sup> TFTL 的抗炎活性。结果: TFTL 0.2, 0.4 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组大鼠皮内蓝斑面积、蓝斑内色素含量(吸光度), 足肿胀度和肉芽肿质量均明显低于空白对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); TFTL 0.4 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组大鼠蓝斑内色素含量(吸光度), 足肿胀度和肉芽肿质量均明显低于 JLHT 2.4 g·kg<sup>-1</sup> 对照组( $P < 0.05$ ); TFTL 0.4 g·kg<sup>-1</sup> 组足跖肿胀度低于 Asp 组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); TFTL 对足跖肿胀度的抑制作用持续时间为 5~6 h, Asp 持续时间为 3 h。结论: TFTL 对大鼠急性炎症模型均有明显的抑制作用, 其作用优于金莲花片, 持续时间长于阿司匹林。

**[关键词]** 金莲花; 总黄酮; 抗炎; 色素渗出; 足跖肿胀度; 棉球肉芽肿

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0196-04

## Anti-inflammatory Effect of Total Flavones of *Trollius Ledebouri* Reichb

LIU Ping, LIU Yu-ping, TONG Ji-ming\*

(Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for New Drugs, Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**[收稿日期]** 20120215(005)

**[基金项目]** 河北省科技厅重大项目(07276444Z-3)

**[第一作者]** 刘平, 副主任医师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0314-2291116, E-mail: liu-ping18@126.com

**[通讯作者]** \* 佟继铭, 教授, 研究生导师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0314-2290076, E-mail: tongjiming@163.com

$\text{min}^{-1} < \text{AUC 单独给药} = 6\ 945.530 (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$ 。

### 4 讨论

通过对配伍前后异钩藤碱在肝脏组织中的分布进行了研究且对其配伍前后的相关性进行了探讨并通过药动学件对相关数据进行分析可知, 异钩藤碱与天麻素配伍前后异钩藤碱在肝脏内的分布无显著性差异。配伍前, 异钩藤碱在肝脏中分布的  $T_{\max}$  在 120 min, 配伍后, 异钩藤碱在肝脏的分布最大浓度 ( $C_{\max}$ ) 有一定增加, 且  $T_{\max}$  提前到 60 min。上述结果表明, 天麻素有一定的降低异钩藤碱在肝脏分布的作用。具体原因有待进一步分析。

### [参考文献]

[1] 胡小勤, 曾学文, 等. 补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证、肝阳上亢证关联性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 203.

[2] 徐瑞琪, 徐冰. 中西药联合治疗肝阳上亢型高血压 43 例临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5): 90

[3] 李莹, 李晓倩, 王兴, 等. 天麻与钩藤配伍前后天麻素在 SHR 大鼠肝脏和肾脏的分布与归经探讨[J]. 中国药房, 2011, 22(43): 4036

[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] 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.

[6] 李晓倩, 王兴, 李莹, 等. 天麻与钩藤配伍前后对 SHR 大鼠肾脏相关基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 131.

[7] 张卫国, 李晓倩, 王兴, 等. 钩藤与天麻配伍前后异钩藤碱在 SHR 大鼠肝脏和肾脏的分布[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 220.

[责任编辑 聂淑琴]