

· 药物代谢 ·

## 养血清脑颗粒中有效成分的肠外翻吸收研究

陈晓鹏<sup>1,2</sup>, 李昂<sup>2</sup>, 褚扬<sup>2</sup>, 张兰兰<sup>2</sup>, 周水平<sup>2</sup>, 朱永宏<sup>2</sup>, 刘昌孝<sup>1,3\*</sup>

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 天津天士力制药集团股份有限公司, 天津 300410;  
3. 天津药物研究院释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193)

[摘要] 目的: 研究养血清脑颗粒中 2 种主要有效成分芍药苷和阿魏酸在大鼠不同肠段的肠外翻模型中的吸收动力学特征。方法: 采用大鼠肠外翻模型, 高效液相色谱法测定含量, 计算养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸的吸收参数, 分析其在不同部位的吸收特征。结果: 养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸在各肠段均为线性吸收, 相关系数的平方 ( $R^2$ ) 均达到 0.9 以上, 符合零级吸收速率。肠道不同部位的吸收实验表明, 其最佳吸收部位为回肠。结论: 养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸在肠道不同部位吸收均符合零级吸收速率。

[关键词] 养血清脑颗粒; 芍药苷; 阿魏酸; 肠外翻; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)04-0159-04

## Absorption of Active Ingredients in Yangxue Qingnao Granule in Rat Everted Gut Scas

CHEN Xiao-peng<sup>1,2</sup>, LI Ang<sup>2</sup>, CHU Yang<sup>2</sup>, ZHANG Lan-lan<sup>2</sup>,  
ZHOU Shui-ping<sup>2</sup>, ZHU Yong-hong<sup>2</sup>, LIU Chang-xiao<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;  
2. Tasly R&D Institute, Tianjin Tasly Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China;  
3. Tianjin State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute  
of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** The everted gut scas *in vitro* was used to investigate intestinal absorption kinetics characteristics of paeoniflorin and ferulic acid from Yangxue Qingnao granule at different intestinal section. **Method:** *In vitro* everted gut model was applied. The absorption concentration of paeoniflorin and ferulic acid, was detected by HPLC, and the absorption parameter was calculated for describing the absorption characters. **Result:** The absorption of paeoniflorin and ferulic acid was linearity in different intestine, and the square of coefficient correlation exceed 0.9, which consistent with zero order rate process. The absorption of paeoniflorin and ferulic acid in ileum was quick. **Conclusion:** The absorption of paeoniflorin and ferulic acid in Yangxue Qingnao granule conforms to the zero order rate process at different sections of intestine.

[Key words] Yangxue Qingnao granule; paeoniflorin; ferulic acid; everted gut sacs; HPLC

[收稿日期] 20120813(004)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项  
(2013ZX09402-202)

[第一作者] 陈晓鹏, 助理研究员, 在读博士, 从事药物分析工  
作, E-mail: fengpengtang@yahoo.com.cn

[通讯作者] \* 刘昌孝, 教授, 从事药物代谢动力学研究, Tel:  
022-23006860, E-mail: tjpk@163.com

药物胃肠道吸收动力学研究是药物代谢动力学研究中的重要组成部分, 口服药物的胃肠道吸收是影响药物生物利用度和变异性的的重要因素<sup>[1]</sup>。目前药物肠吸收的研究方法被广泛采用的有 3 种: 大鼠肠外翻模型、大鼠原位单次灌注和体外人结肠腺癌细胞系, 其中肠外翻模型具有操作简单、囊内液体较少、药物累积速度较快、药物用量较少等特点, 成

为目前研究体外肠道吸收较常用的生物模型<sup>[2]</sup>。

养血清脑颗粒由当归、川芎等 11 味中药组成,具有养血平肝、活络止痛的功效<sup>[3]</sup>,阿魏酸和芍药苷是养血清脑颗粒中君臣药的主要药效成分<sup>[4-5]</sup>。目前,关于养血清脑颗粒的肠道吸收特征尚无文献报道。为此作者利用体外肠外翻模型研究养血清脑颗粒中阿魏酸、芍药苷在肠道的主要吸收部位和吸收动力学,以期对养血清脑颗粒中有效成分的药代动力学研究提供参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1100 高效液相色谱仪系统,包括含二元泵、DAD 检测器、G1322A 在线脱气系统、G1313A 自动进样系统(美国 Agilent 公司),LG10-2.4A 型台式高速离心机(北京京立离心机有限公司),Milli-Q 型超纯水系统(美国 Millipore 公司),微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

**1.2 药品与试剂** 养血清脑颗粒(批号 080814,天津天士力制药股份有限公司),阿魏酸对照品(批号 110773-201012)和芍药苷对照品(批号 110736-200630),中国药品生物制品检定所,氯化钠、氯化钾、氯化钙、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、氯化镁和葡萄糖均为分析纯,天津市化学试剂一厂。

乙腈(色谱纯),德国 MERCK 公司,磷酸(分析纯),天津市化学试剂一厂,去离子水,Milli-Q 超纯水系统自制。

**1.3 动物** SPF 级 Wistar 大鼠,雄性,体重(220 ± 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2006-0009。

## 2 方法

**2.1 溶液的配制** Tyrode 液配制,组成为:NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, NaHCO<sub>3</sub> 1.0 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 g, MgCl<sub>2</sub> 0.1 g, 葡萄糖 1.0 g, 最后加蒸馏水至 1 000 mL。CaCl<sub>2</sub> 应先溶解,再与其他盐类共溶,防止沉淀析出。用盐酸调 Tyrode 缓冲液 pH 7.2 ~ 7.4, 以此作为空白肠孵育液。养血清脑颗粒药液的配制:称取养血清脑颗粒 5.00 g, 置于 100 mL 量瓶中,加入 Tyrode 液,超声 10 min, Tyrode 液定容,摇匀,即得。

芍药苷储备液的配制:精密称取芍药苷 4.03 mg, 置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

阿魏酸储备液的配制:精密称取阿魏酸 4.01 mg, 置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

混合对照品系列溶液的配制:精密吸取上述 2 种对照品储备液适量置 5 mL 量瓶中,定容后配制成不同质量浓度的芍药苷和阿魏酸的混合对照品溶液,芍药苷的质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg · L<sup>-1</sup>, 阿魏酸质量浓度分别为 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0 mg · L<sup>-1</sup>。

以上实验溶液均于 4 °C 冷藏保存,备用。

**2.2 色谱条件** 以 Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以 0.02% 磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0 ~ 5 min, 16% B; 5 ~ 15 min, 16% B ~ 20% B; 15 ~ 23 min, 20% B), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 240 nm (0 ~ 15 min, 芍药苷), 280 nm (15 ~ 23 min, 阿魏酸), 进样量为 10 μL。

**2.3 大鼠外翻肠囊法** 禁食 12 h 的大鼠用 10% 水合氯醛麻醉,股动脉充分放血后,沿腹白线剖开,小心将大鼠肠管同肠系膜剥离,分别取空肠、回肠、结肠各 10 cm, 放入 37 °C Tyrode 液中冲洗,直到没有内容物流出。将肠管一端结扎于自制塑料套管,小心将肠管翻转,用 Tyrode 液冲洗后将另一端结扎,使之形成囊状肠管。向肠囊内注入 2 mL 空白 Tyrode 液,将其放入已有 Tyrode 液的麦氏浴槽中,实验过程中保持 37 °C 恒温,并向浴槽中通入 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>。平衡 5 min 后,将麦氏浴槽中的 Tyrode 液倒出,向浴槽中注入配制好的养血清脑药液,分别在孵育后 15, 30, 60, 90, 120 min 从肠囊内取样 0.2 mL, 同时补足相同体积的空白 Tyrode 液。孵育液经高速离心机 13 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 进行 HPLC 测定。

**2.4 数据处理** 计算芍药苷和阿魏酸在各个时间点的累计吸收量(Q)

$$Q_{\text{累积量}} = 2Cn + 0.2 \sum_{i=1}^{n-1} Ci$$

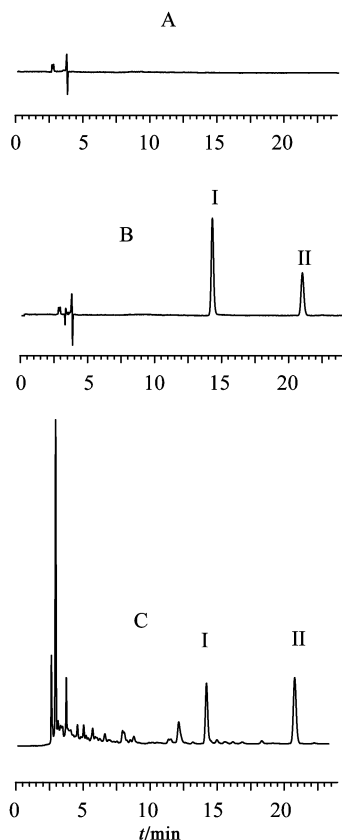
Q 为药物各时间的累积吸收量, Cn 为 n 时间点的实际检测质量浓度。药物的累积吸收量对时间作相关回归分析,以相关系数 r 为拟合优劣的判断标准,得出的斜率(L)除吸收表面积(A)求得吸收速率常数(K<sub>a</sub>, μg · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-2</sup>)。

$$K_a = \frac{L}{A}$$

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 10.0 对数据进行分析,各组间数据比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA), P < 0.05 认为具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 专属性** 取 2.1 项下的空白肠孵育液、对照品溶液、小肠孵育液,经高速离心机  $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,进样  $10\ \mu\text{L}$ ,色谱图见图 A,B,C。结果表明,在本实验色谱条件下,芍药苷(I)和阿魏酸(II)具有良好的峰形和分离度,空白肠孵育液对其测定无干扰,保留时间  $t_R$  分别为 14.3, 21.8 min,见图 1。因此可以用此条件检测小肠孵育液中芍药苷和阿魏酸的含量。



A. 空白 Tyrode 液; B. 芍药苷和阿魏酸对照品;  
C. 养血清脑颗粒 Tyrode 溶液; I. 芍药苷; II. 阿魏酸

图 1 养血清脑颗粒专属性 HPLC

**3.2 标准曲线** 取 2.1 项下的对照品系列溶液  $10\ \mu\text{L}$ ,进行 HPLC 测定,记录色谱图和峰面积。以峰面积  $A$  对质量浓度  $C(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$  进行线性回归,用加权 ( $W = 1/x^2$ ) 最小二乘法进行回归运算,得芍药苷在空白肠孵育液中的标准曲线方程为  $A = 107.9C + 2.88$ ,  $r = 0.998\ 7$  ( $n = 6$ ),线性范围  $0.5 \sim 20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;阿魏酸在空白肠孵育液中的标准曲线方程为  $A = 5.8C - 0.766$ ,  $r = 0.999\ 6$  ( $n = 6$ ),线性范围  $5.0 \sim 200.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**3.3 精密度和准确度** 按 2.1 项下配制质量浓度为低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液,于 1 d

内进行 5 样本分析,计算日内精密度和;每日测定 1 次,连续测定 3 d,计算日间精密度和准确度。结果表明,芍药苷和阿魏酸的精密度和准确度均符合方法学测定的要求,见表 1,2。

表 1 芍药苷精密度和准确度 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

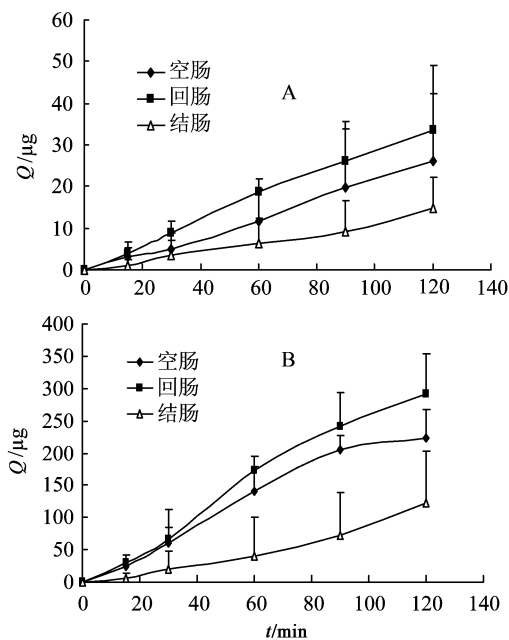
对照品 质量浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	测得质量浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	日内 精密度 $/\%$	日间 精密度 $/\%$	准确度 $/\%$
1.0	$1.01 \pm 0.02$	1.67	3.78	$101.46 \pm 2.13$
5.0	$4.89 \pm 0.10$	1.91	3.00	$97.84 \pm 2.05$
16.0	$16.09 \pm 0.41$	2.02	4.61	$100.54 \pm 2.57$

表 2 阿魏酸精密度和准确度 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

对照品 质量浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	测得质量浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	日内 精密度 $/\%$	日间 精密度 $/\%$	准确度 $/\%$
10.0	$10.25 \pm 0.11$	0.60	2.38	$102.51 \pm 1.08$
50.0	$49.35 \pm 0.43$	0.35	2.16	$98.70 \pm 0.87$
160.0	$162.31 \pm 2.24$	0.49	3.45	$101.44 \pm 1.40$

**3.4 稳定性** 分别取 2.1 项下低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液,常温放置,于放置后的第 2, 6, 12, 24 h 取样,经高速离心机  $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,进样  $10\ \mu\text{L}$ ,进行 HPLC 测定,芍药苷和阿魏酸的相对偏差分别  $< 4.4\%$ ,  $2.8\%$ 。结果表明,芍药苷和阿魏酸在空白肠孵育液中 24 h 内稳定。

**3.5 肠外翻试验** 养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏



A. 芍药苷; B. 阿魏酸

图 2 养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸  
由黏膜侧向浆膜侧转运 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

酸由黏膜侧向浆膜侧转运,以芍药苷和阿魏酸的经时累积量对时间作相关回归分析,结果见图 2。由图 2 可以看出各肠道对芍药苷和阿魏酸的累计吸收量均随时间的增加而增加,以各累积吸收量对时间做线性回归,其相关系数的平方( $r^2$ )均达到 0.9 以

上,符合零级吸收速率。通过对养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸在不同肠段由黏膜侧向浆膜侧转运的吸收速率常数  $K_a$  进行统计学分析(表 3),表明二者在各肠段吸收情况均为回肠 > 空肠 > 结肠 ( $P < 0.05$ )。

表 3 养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸的  $K_a$  和  $r^2$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

成分	空肠		回肠		结肠	
	$K_a(10^{-2})$	$r^2$	$K_a(10^{-2})$	$r^2$	$K_a(10^{-2})$	$r^2$
芍药苷	1.85 ± 0.38	0.993 8	2.65 ± 0.32	0.996 5	1.40 ± 0.32	0.981 4
阿魏酸	19.86 ± 1.61	0.971 1	24.12 ± 1.86	0.987 1	9.02 ± 2.16	0.965 9

#### 4 讨论

本实验通过肠外翻模型,研究了养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸的肠吸收特征。实验结果表明,养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸在各肠道中均为线性吸收,符合零级吸收。养血清脑颗粒中芍药苷和阿魏酸在回肠中吸收较好,提示回肠可能为养血清脑颗粒中有效成分的主要吸收部位。

中药配伍是中医用药的一大特色和优势,药物之间的相互作用、相互转化或分解代谢,对药物效应的改变具有重要作用。药物在肠道中的吸收过程也是药物组分之间相互作用的过程<sup>[6]</sup>,研究中药复方不同配伍在肠道吸收过程中的动态变化规律,可以揭示中药复方的配伍原理以及作用机制。养血清脑颗粒中芍药苷的吸收规律与白芍提取物中芍药苷的吸收规律<sup>[7]</sup>一致,提示方剂中的其他药味对于芍药苷的吸收没有显著影响。芍药苷和阿魏酸为养血清脑颗粒君臣药中的主要药效成分,本文仅对其肠吸收动力学进行了研究,其药代动力学规律及配伍对其规律的影响值得进一步探索。

#### [参考文献]

[1] 董宇,张英丰,杨庆,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.

[2] 张华,安靓,徐冉驰,等. 葛根芩连汤及不同配伍组中生物碱类成分的肠外翻吸收研究[J]. 中成药, 2012, 34(4): 620.

[3] 李文博,韩建平,高钧,等. 养血清脑颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 分析化学, 2011, 39(3): 387.

[4] 郭小瑞,李里,李学涛,等. 高效液相色谱法测定冠心宁冻干粉针剂中 9 个酚性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1894.

[5] 高小荣,田庚元. 白芍化学成分研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(6): 416.

[6] 王伟,杨伟鹏,梁日欣,等. 延胡索提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 121.

[7] 董宇,张英丰,杨庆,等. 炒白芍提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收及与 P-gp 相互作用研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 884.

[责任编辑 邹晓翠]