

· 药物代谢 ·

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

张卫国, 李晓倩, 王兴*, 王萍, 王敏智, 李莹
(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] **目的:**观察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变化,探讨药物配伍前后对其归经的影响。**方法:**采用原发性高血压大鼠 (SHR), 钩藤组给予钩藤水煎液, 天麻钩藤组给予钩藤天麻配伍后水煎液, 空白组给予生理盐水, 给药剂量为 $1.172 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 用高效液相色谱法测定钩藤与天麻配伍前后其效应成分异钩藤碱在 SHR 大鼠肝脏和肾脏中的含量; 色谱条件: 色谱柱: Waters™ (4.6 mm × 250 mm, RP 18.5 μm); 流动相甲醇-水 (70:30) pH 8.0; 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 254 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。**结果:**异钩藤碱对照品在肝脏和肾脏组织中在 $0.08 \sim 16.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有较好的线性关系; 钩藤与天麻配伍前后在肝脏和肾脏的异钩藤碱的分布具有显著的差异性 ($P < 0.05$)。**结论:**中药配伍与归经之间有着密切的相关性。

[关键词] 钩藤; 天麻; 配伍; 归经; 异钩藤碱; 分布

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0220-04

Distribution of Isorhynchophyline in Liver and Kidney of SHR Rats before and after Compatibility of Uncariae Ramulus Cum Uncis with Gastrodiae Rhizoma

ZHANG Wei-guo, LI Xiao-qian, WANG Xing*, WANG Ping, WANG Min-zhi, LI Ying
(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiao-Tong University, Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To study the distribution of isorhynchophyline in liver and kidney tissues of SHR rats before and after compatibility of Gastrodiae Rhizoma with Uncariae Ramulus Cum Uncis Le, to investigate the impact of channel tropism before and after combination. **Method:** Uncariae Ramulus Cum Uncis decoction group was administrated Uncariae Ramulus Cum Uncis, Tianma Gouteng decoction group was administrated with decoction of compatible Gastrodiae Rhizoma with Uncariae Ramulus Cum Uncis at a dose of $1.172 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. A blank group was received normal saline. Then using HPLC to determinate the isorhynchophyline in liver and kidney tissues of SHR rats before and after the compatibility of Gastrodiae Rhizoma with Uncariae Ramulus Cum Uncis. 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, rate was $10.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detector wave length was set at 254 nm, the column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$. **Result:** Isorhynchophyline in liver and kidney tissues was linear in the range of $0.08 \sim 16.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. There existed significant ($P < 0.05$) differences in liver and kidney tissues before and after the compatibility. **Conclusion:** The compatibility of Chinese medicine has close correlation with channel tropism.

[Key words] Uncariae Ramulus Cum Uncis; Gastrodiae Rhizoma; compatibility; channel tropism; isorhynchophyline; distribution

[收稿日期] 20101014(008)

[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会专项资金 (SWJTU09ZT29)

[第一作者] 张卫国, 硕士, 研究方向: 中药药代动力学, Tel: 15982315082, E-mail: zhwg20041469@163.com

[通讯作者] * 王兴, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药代动力学, Tel: 028-87601838, E-mail: wshing@263.net

中药归经理论是中药药性理论的重要组成部分,是历代医家在长期的医疗实践中总结出来的宝贵经验,是指导临床辨证用药的重要依据;研究归经理论对指导临床用药也具有重要的实践意义;归经理论亦是炮制加工方法的重要理论之一。

本研究选择平肝熄风药中最常用的天麻、钩藤经典药对为研究对象,从效应成分组织分布的角度对归经理论进行了初步探讨。天麻是单一归肝经的中药,钩藤是归肝经和心包经的中药,这两味药都归肝经,归经相对单一,更有利对归肝经中药的理论及实质的研究。

1 材料

1.1 药材 钩藤购自四川新荷花中药饮片有限公司,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定为符合药典规定入药的茜草科钩藤属钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks, 大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall., 毛钩藤 *U. hirsuta* Havil., 华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil.。

天麻购自四川新荷花中药饮片有限公司,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定符合药典规定入药的兰科植物天麻 *Gastrodiae rhizomaelata* Blume 的干燥块茎。

1.2 动物 SHR 大鼠,雄性,体重(270 ± 10) g, 14 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,批号 SCXK(沪)2008-0005。

1.3 仪器 LC-20AT 高效液相色谱仪,日本岛津;UV1901 紫外分光光度计,北京普析通用公司;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,上海沪西分析仪器有限公司。

2 方法

2.1 动物分组 原发性高血压(SHR)大鼠 65 只,随机分为 13 组,空白对照组 5 只,钩藤组 30, 60, 120, 150, 180, 240 min 各 5 只;天麻钩藤组 30, 60, 120, 150, 180, 240 min 各 5 只。

2.2 药液制备 钩藤煎液:取钩藤 20 g,加 15 倍体积蒸馏水煎煮,沸腾 15 min(以开始沸记时),浓缩成含生药 0.1 g·mL⁻¹的煎液,冷却,备用。

天麻钩藤煎液:取天麻 15 g,加 450 mL 蒸馏水浸泡 1 h 后煎煮,沸腾 30 min(以开始沸记)后加入钩藤 20 g 合煎 15 min,浓缩成 175 mL,即制备成含

生药 0.2 g·mL⁻¹的煎液,冷却,备用。

2.3 动物饲养及给药 大鼠置于一个单独的独立通气(IVC)鼠笼中。实验前按常规饲养 1 周,饲料不含任何抗生素,从第 8 天开始给药,共 7 d,第 14 天开始实验。实验前禁食不禁水 12 h。

按照陈奇^[2]《中药药理学方法》中实验动物与人用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 × 6.17 × 校正系数。

本实验采用钩藤、钩藤天麻配伍后水煎液口服给药,给药剂量为 1.17 g·kg⁻¹。钩藤、钩藤天麻配伍后水煎液口服给药剂量是以钩藤计。

2.4 组织样本的采集 连续 ig 7 d 后分别于给药前(0 min)和 ig 给药后 30, 60, 120, 150, 180, 240 min 断头处死并取出肝脏、肾脏,用在冷生理盐水中荡洗 3 遍,每次用 3 层滤纸挤压。将压干的肝组织称重,分多次加入共计 W:V = 1:5 的生理盐水,用匀浆器研磨,充分混合均匀后,在 3 000 r·min⁻¹ 转速下离心 10 min,取其上清液即得肝脏、肾脏组织的匀浆液, -20 °C 下冷冻保存备用。

2.5 组织样品的预处理 精密吸取 0.5 mL 的组织匀浆液置于 5 mL 一次性塑料离心管中,用微量移液器精密加入内标卡马西平 100 μL(250 mg·L⁻¹),然后加 2 mL 甲醇沉淀 2 h, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,用微量移液器精密吸取上清液置于 5 mL 一次性塑料离心管中,于 60 °C 水浴 N₂ 流下吹干,用 500 μL 甲醇复溶 2 h,高速 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液置于 1.5 mL 一次性塑料离心试管中,备用。用微量进样器精密吸取 20 μL 进样^[4]。

2.6 色谱条件的确定 色谱柱:WatersTM(4.6 mm × 250 mm, RP18.5 μm);前置预柱:Wondasil(4.0 mm × 10 mm, C₁₈, 5 μm);流动相甲醇-水(70:30) 三乙胺调 pH 8.0;检测波长:254 nm;柱温 30 °C;流速为 0.8 mL;进样量 20 μL。

2.7 统计学处理方法 对钩藤组、天麻钩藤组异钩藤碱在肝脏、肾脏的分布的差异用 SPSS17.0 软件 *t* 检验进行统计分析,计算得到 *P* 值,讨论钩藤天麻配伍前后是否有显著性差异。*P* < 0.05 有统计学意义。

2.8 方法学评价

2.8.1 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 16.747 min,分离情况良好,各组织中的杂质均不干扰。空白肝脏

组织,空白肝脏组织中加入异钩藤碱对照品、内标的图谱如下图 1。

2.8.2 组织样品的标准曲线 取肝脏组织空白匀浆液 0.5 mL,各加入卡马西平内标液 100 μL (250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),再加入不同量的异钩藤碱对照品储备液 (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),配成系列质量浓度 0.08, 0.16,

0.40, 0.80, 1.60, 4.0, 8.0, 16.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,按上述组织样品处理方法处理,进样 20 μL 进行 HPLC 分析,以组分与内标的信号比对组分浓度做标准曲线,求其回归方程为 $Y = 55.792X - 0.1199$, $r = 0.9996$ ($n = 8$),表明异钩藤碱对照品在肝脏组织中在 0.08 ~ 16.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有较好的线性关系。

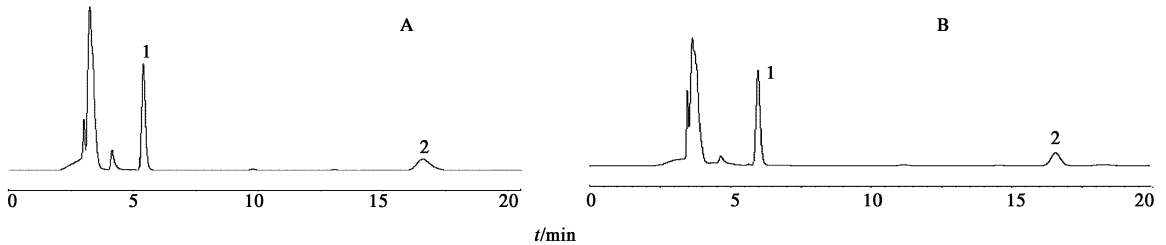


图 1 空白组织中加入内标卡马西平和对照品异钩藤碱的色谱
A. 空白肝脏; B. 空白肾脏; 1. 内标卡马西平; 2. 对照品异钩藤碱

肾脏标准曲线制作方法同肝脏,得其回归方程为: $Y = 58.297X - 0.1588$, $r = 0.9996$ ($n = 8$),表明异钩藤碱对照品在肾脏组织中在 0.08 ~ 16.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有较好的线性关系。

2.8.3 精密性与准确度 分别取肝、肾空白组织匀浆液 0.5 mL,加入不同量的异钩藤碱对照品储备液 (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),使其分别含异钩藤碱 0.16, 1.6, 16.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每个浓度平行 5 份,每份均加入内标 100 μL ,按照上述组织预处理方法处理,并测定药物浓度,分别用肝、肾标准曲线进行分析,计算日内、日间精密性。结果表明在上述 3 浓度下,肝脏日内精密性 RSD 4.98%,日间精密性 RSD 8.79%;肾脏日内精密性 RSD 5.08%,日间精密性 RSD 9.19%。

2.8.4 加样回收率 于已测定异钩藤碱浓度为 0.24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 0.5 mL 肝脏组织匀浆液和中分别加入 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异钩藤碱对照品储备液 1, 5, 25 μL ,另加入卡马西平储备液 (250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 100 μL ,每个浓度平行 5 份。按照上述组织预处理方法处理,进样 20 μL ,用标准曲线进行分析,结果加样回收率为 103.96%, RSD 2.35%。

2.8.5 稳定性考察 取空白组织匀浆 0.5 mL,配制成浓度为 4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 5 个样本按照上述组织预处理方法进行处理,于冰箱 -20 $^{\circ}\text{C}$ 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,结果在肝脏中 RSD 8.81%,在肾脏脏中 RSD 8.19%。说明异钩藤碱生物样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存下,至少可以稳定 15 d,能够满足测定工作的需要。

2.8.6 重现性考察 对同一份供试组织匀浆重复进样 5 次,计算结果得 RSD 3.23%。

3 结果

SHR 大鼠口服钩藤及天麻钩藤煎液之后,钩藤中的效应成分异钩藤碱各时间点肝脏和肾脏中的药物浓度见表 1 和表 2。

表 1 钩藤、钩藤天麻配伍后水煎液口服给药各时间点肝脏中异钩藤碱的浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时间 /min	异钩藤碱/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	钩藤组	天麻钩藤组
30	0.044 998 \pm 0.016 34	0.094 239 \pm 0.066 12
60	0.275 791 \pm 0.035 52	0.043 788 \pm 0.041 58 ¹⁾
120	0.442 515 \pm 0.122 13	0.126 617 \pm 0.021 97 ²⁾
150	0.315 262 \pm 0.055 18	0.045 426 \pm 0.005 80 ¹⁾
180	0.137 785 \pm 0.040 06	0.026 748 \pm 0.008 17 ¹⁾
240	0.190 097 \pm 0.042 58	0.048 758 \pm 0.017 75 ¹⁾

注:与钩藤组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 钩藤、钩藤天麻配伍后水煎液口服给药各时间点肾脏中异钩藤碱的浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时间 /min	异钩藤碱/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	钩藤组	天麻钩藤组
30	0.152 455 \pm 0.046 39	0.051 092 \pm 0.018 04
60	0.154 894 \pm 0.049 88	0.420 803 \pm 0.039 81 ²⁾
120	0.448 432 \pm 0.103 10	0.073 88 \pm 0.027 38 ¹⁾
150	0.402 677 \pm 0.054 81	0.218 028 \pm 0.085 30 ¹⁾
180	0.084 631 \pm 0.054 77	0.139 077 \pm 0.031 19
240	0.008 35 \pm 0.001 62	0.032 566 \pm 0.027 84

4 讨论

通过 SPSS 软件对钩藤天麻配伍前后相关数据进行相关性分析可知,钩藤与天麻配伍前后异钩藤碱在肝脏内的分布在 60,120,150,180,240 min 具有显著差异性,特别在 120 min 有非常显著的差异。从表 1 可知钩藤与天麻配伍前后,异钩藤碱在肝脏中分布浓度达到最大值都在 120 min。但是配伍后在肝脏中分布浓度有显著降低。

钩藤与天麻配伍前后异钩藤碱在肾脏内的分布在 60,120,150 min 有显著性差异。特别在 60 min 有非常显著的差异,由表 2 可知,配伍后,在肾脏中分布加快,分布浓度达到最高点的时间由配伍前的 120 min 提前到 60 min,且出现双峰现象,证治药动学假说内容之一就是复方进入体内成分之间存在药效、药动之间的相互作用。钩藤与天麻配伍之后其在肾脏的分布加快,从证治药动学的角度来看其配伍有促进钩藤入肾脏的作用。

对配伍后肝脏和肾脏分布的变化进行了探讨,根据证治药动学假说^[3]中药复方进入体内的化学成

分是一定的这一假说来看,虽然配伍后在肝脏的浓度降低,但由于目前只测了肝脏和肾脏组织,其他的脏器还没有进行测定,可能在其他的脏器中会出现配伍后含量增高的这种可能。本论文只对钩藤与天麻配伍前后异钩藤碱在肝脏、肾脏组织内的分布进行了探讨,在下一步的实验中将对异钩藤碱在心脏、脑、脾、肺、大血管中的分布进行探讨,以更全面的来探讨其归经。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:180.
- [2] 陈奇.中药药理实验方法[M].上海:上海科学技术出版社,1994:207.
- [3] 黄熙,陈可冀.“证治药动学”新假说的理论和实践[J].中医杂志,1997,38(12):745.
- [4] 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].华西药学杂志,2003,18(5):341.

[责任编辑 聂淑琴]

简 讯

据中国高等学校自然科学学报研究会、中国科学技术期刊编辑学会 2009 年统计结果报道,2008 年《中国实验方剂学杂志》登载的学术论文中,有 224 篇被美国化学文摘(CA)收录,标志着《中国实验方剂学杂志》已成为 CA 在国内的主要统计源期刊之一,也标志着该杂志的学术水平又迈上了一个新台阶。

在此,谨向热心于《中国实验方剂学杂志》审稿、组稿工作的人员表示衷心感谢,向各学术论文作者对《中国实验方剂学杂志》工作支持表示诚挚谢意!