

组分配伍对延胡索总生物碱中主要成分体外吸收的影响

林力,刘建勋*,张颖,毛超一,段昌令,林成仁
(中国中医科学院西苑医院,北京 100091)

[摘要] 目的:建立检测 M199 培养液中延胡索乙素和脱氢紫堇碱的 HPLC 分析方法,并探讨复方给药和延胡索提取物给药对这 2 种成分在体外吸收的影响差异。方法:采用大鼠肠囊外翻法探讨不同配伍对延胡索乙素和脱氢紫堇碱吸收量的影响规律,采用 HPLC-UV 方法测定药液浓度,并对实验结果进行统计分析。结果:色谱采用 SB-C₁₈反相柱,流动相为乙腈-50 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠梯度洗脱,运行 27 min。延胡索乙素的线性范围 0.29~46.4 mg·L⁻¹;脱氢紫堇碱的线性范围 0.09~22.7 mg·L⁻¹,两种成分的提取回收率为 95%~100%,方法的精密度、准确度和稳定性均符合要求。结论:本方法操作简单、专属性强、灵敏度高、准确性好,可用于延胡索乙素(THP)和脱氢紫堇碱(DHC)的肠吸收的测定。肠吸收实验结果显示复方配伍对其 THP 的吸收没有影响,但可以显著提高 DHC 的吸收。

[关键词] 肠囊外翻法;延胡索;配伍

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0203-03

Prescription Compatibility Effect on Absorption of Major Components in Yanhusuo Extract

LIN Li, LIU Jian-xun*, ZHANG Ying, MAO Chao-yi, DUAN Cang-ling, LIN Cheng-ren
(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] An improved everted gut sac method was applied to the prescription compatibility effect on absorption of the major components in Rhizoma Coridalis extracts. With the separation and detection, tetrahydropalmatine(THP) and dehydrocorydaline(DHC) were quantified by HPLC-UV. The standard curves of THP and DHC were lineary over the concentration range of 0.29-46.4 and 0.09-22.7 g·mL⁻¹ respectively. The extraction recovery of both compounds were 95%-100%. The precisions, the accuracy and the stability all met the requirements. The contents of THP did not show difference before and after compatible prescription administrated, where the DHC had a significant increase in the same process. The results revealed that DHC might lead to an increasing pharmacological effect after prescription compatibility.

[Key words] everted gut sac; Rhizoma Coridalis; combination

复方双参通冠由人参、丹参和元胡三药有效部位组成,临床主要用于治疗气血郁滞、心失所养所致

的冠心病心绞痛,方中重用延胡索,是行其化瘀止痛、行气活血的功效。现代药理研究表明^[1]延胡索在中枢神经系统、心血管系统、消化系统及垂体肾上腺皮质系统等方面具有广泛的药理活性,在临床上应用十分广泛。延胡索中主要活性成分是生物碱,已鉴定结构的达 40 余个,主要为原小檗碱型(主要为叔胺碱)和小檗碱型(主要为季胺碱)等多种异喹啉类生物碱。本室前期整体药理学和细胞药理学研究都显示复方配伍给药的药效要优于延胡索给药的药效,本文尝试从体外采用改进的肠囊外翻法,探讨

[收稿日期] 20101109(010)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30830118);国家中医药管理局课题(06-07ZP49);国家科技重大新药创制(2009ZX09301-005-2-11)

[第一作者] 林力,博士,副研究员,从事中药复方药代动力学研究,Tel:010-62835618,E-mail:tcmlinli@gmail.com

[通讯作者] *刘建勋,博士,研究员,从事中药药理与药代,Tel:010-62875083,E-mail:liujx0324@sina.com

复方配伍对延胡索中主要有效成分延胡索乙素和脱氢紫堇碱 2 种成分肠吸收的影响,以期阐释复方配伍应用的合理性。

1 材料

1.1 试药 延胡索乙素(tetrahydropalmatine, THP)购自中国药品生物制品检定所(批号 110726-200409);脱氢紫堇碱(dehydrocorydaline, DHC)对照品自制(纯度大于 98%)。人参总皂苷、丹参总酚酸和延胡索总生物碱均由中国中医科学院西苑医院药学室提供批号依次为 040801,050816,060927。

牛血清白蛋白 V(批号 736585,北京世纪银丰),考马斯亮蓝 G-250(批号 20031201 华美生物工程有限公司);Tissue Culture 199 培养基(批号 1302027,北京夏斯生物科技有限公司)。

1.2 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重为 (220 ± 20) g,中国医学科学院动物实验研究中心提供[许可证号 SCXY(京)2004-0001]。

1.3 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm),Agilent C₁₈ Guard-Pak 保护柱(美国 Agilent 公司);Micro 22R 台式高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司);Biomedical Freezer 超低温冰箱(日本 SANYO 公司);AG-245 分析天平和 320 pH 计(美国 Mettler Toledo 公司);M18780 氮吹仪(美国 Pierce 公司);MS1 Minishaker 涡流混合器(德国 IKA 公司);10 ~ 1 000 μL 移液枪(Socorex 公司)。

2 方法

2.1 样品溶液配制 实验分为延胡索总生物碱组和复方组,取各组样品适量,用 TC199 培养液分别配制成含有延胡索均为 0.156,0.313,0.625 g·L⁻¹ 的溶液。

2.2 样品溶液的制备 取肠吸收样品 200 μL 于 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液待测。

2.3 肠囊的制备和孵育 采用改良的大鼠肠囊外翻法^[2] 进行研究。取禁食后大鼠,脱颈椎处死,从胃幽门以下 15 cm 开始向下取出整段小肠,用生理盐水灌洗后转移至 TC199 培养液中,剥离肠表面的脂肪及血管,将其分成 4.5 cm 左右的肠囊,外翻后内侧注入 0.8 mL 的 TC199 溶液,外侧加入含有待测药品的 TC199 培养基溶液,于 37 ℃ 振荡水浴(60 cycle/min)中孵育,在 120 min 取样 200 μL,4 ℃ 高速离心后待测。同时取出肠囊,应用考马斯亮蓝

法^[3] 进行蛋白含量的测定。

2.4 数据分析 小肠对药物的吸收可能由于有效吸收面积的不同而不同,因此不能以直接测定的药物浓度来计算药物的肠吸收。考虑到精确测定肠囊表面积较为困难,同时由于肠表面积与肠蛋白含量具有一定的线性关系^[2],因此本文采用肠蛋白量进行校正,以消除不同批次肠囊大小对吸收结果的差异。对于不同配伍引起化合物的吸收差异,用单位肠蛋白累积吸收总量表示。采用 Excel 进行数据分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同给药方式下肠转运药物差别用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 HPLC 方法学确证

3.1.1 色谱条件考察 根据化学属性,分别从检测波长、流动相选择和柱温等几个方面摸索延胡索总生物碱的 HPLC 检测条件,以保证在一个色谱条件下分离测定所有的化学成分,并确定实验结果的重复性和准确性。通过实验最终确定色谱条件为:色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱,流动相乙腈-50 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(用磷酸调制 pH 3.5),梯度洗脱(0 min,20% ACN;7 min,20% ACN,20 min,30% ACN),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。

3.1.2 专属性 取 TC199 空白样品、延胡索总碱及复方给药后肠囊吸收的样品,按样品处理方法操作,图 1 结果表明 TC199 中内源性杂质和复方中其他成分不干扰 THP 和 DHC 的测定。

3.1.3 标准曲线及线性范围 取 TC199 培养液 160 μL,依次加入人参皂苷系列对照品溶液 40 μL,按 2.2 样品处理项下操作,建立工作曲线。用加权最小二乘法进行回归运算,求得直线回归方程。THP 的标准曲线为 $Y = 3.487 + 11.49 X$, $r = 0.999$,线性范围 0.29 ~ 46.4 mg·L⁻¹;DHC 的标准曲线为 $Y = 2.381 + 41.03 X$, $r = 0.992$,线性范围 0.09 ~ 22.7 mg·L⁻¹。

3.1.4 回收率、精密度、准确度和稳定性实验 在标准曲线范围内选择高、中和低 3 种浓度(THP 的 3 个浓度分别为 1.72,5.16,46.40 mg·L⁻¹,DHC 为 0.84,2.52,11.35 μg·L⁻¹),以空白 TC199 配制样品,每个浓度点 5 份样品,将相同浓度的样品按照样品处理方法与处理后分析,分别计算其回收率精密度和准确度实验。3 种浓度下 THP 和 DHC 的回收率为 95% ~ 100%,精密度的 RSD 2.45 ~ 6.82%,准

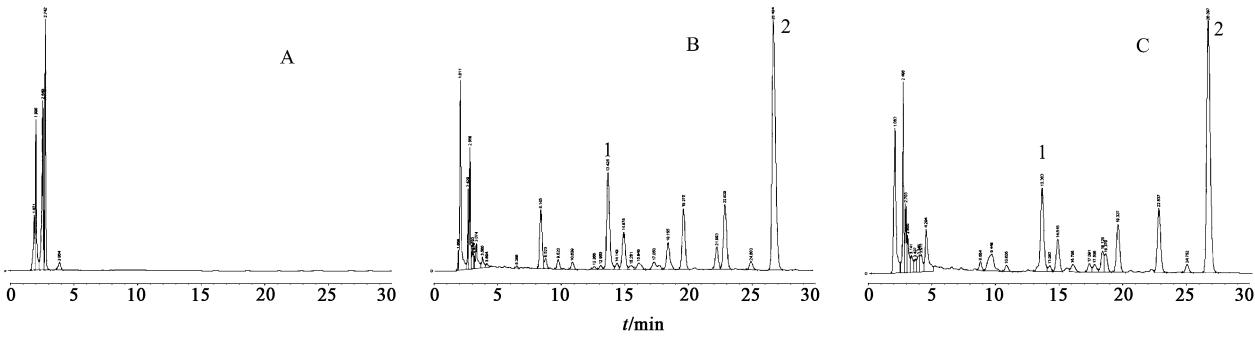


图 1 延胡索中主要成分的 HPLC

A. 空白 TC199 液;B. 延胡索给药后肠囊吸收液;C. 复方给药后肠囊吸收液;1. 延胡索乙素;2. 脱氢紫堇碱

确度在 81% ~ 101%, 2 种成分在室温 24 h 空白 TC199 中样品稳定性符合测定要求。

3.2 组分配伍对肠吸收成分影响结果 延胡索乙素:不同剂量组下复方配伍给药和延胡索提取物给药在各时间点测定结果如表 1 所示,结果显示除了

中剂量的 1.5 h 和高剂量 2.0 h 的点外,其余各时间点复方配伍给药和延胡索提取物给药对延胡索乙素的吸收没有统计学差异,但从数据上看复方配伍给药具有促进小肠吸收的趋势。

表 1 不同时间点 THP,DHC 累积吸收量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) ng·mg⁻¹

样品	剂量/ g·L ⁻¹	0.5 h		1.0 h		1.5 h		2.0 h	
		THP	DHC	THP	DHC	THP	DHC	THP	DHC
延胡索	0.156	3.69 ± 1.15	0.005 ± 0.003	12.27 ± 2.79	2.34 ± 1.45	22.34 ± 3.43	4.57 ± 2.15	39.24 ± 4.12	8.73 ± 1.87
	0.313	3.40 ± 14.27	0.004 ± 0.001	17.89 ± 3.89	2.22 ± 0.72	40.37 ± 5.78	4.66 ± 1.34	78.74 ± 15.82	12.44 ± 3.86
	0.625	6.48 ± 0.87	0.004 ± 0.001	32.19 ± 6.91	2.87 ± 0.37	70.46 ± 8.06	8.11 ± 1.26	135.20 ± 5.87	30.73 ± 4.17
复方	0.156	3.77 ± 0.93	0.005 ± 0.001	11.53 ± 1.52	2.70 ± 0.57 ¹⁾	20.57 ± 2.20	6.34 ± 1.05 ¹⁾	42.76 ± 4.38	14.28 ± 2.79 ¹⁾
	0.313	4.19 ± 0.97	0.005 ± 0.002	19.67 ± 2.51	3.98 ± 1.13 ¹⁾	45.80 ± 4.44 ¹⁾	10.67 ± 2.70 ²⁾	88.44 ± 13.37	22.74 ± 3.87 ¹⁾
	0.625	8.29 ± 2.81	0.007 ± 0.003	37.20 ± 7.77	6.08 ± 1.98 ¹⁾	81.79 ± 11.42	15.46 ± 2.85 ²⁾	150.83 ± 6.61 ²⁾	34.85 ± 5.85 ¹⁾

注:与延胡索给药组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

不同剂量组下复方配伍给药和延胡索提取物给药在各时间点测定结果如表 1 所示,除了 0.5 h 时间点,低中高 3 个剂量组复方配伍给药和延胡索提取物给药相比均能显著促进脱氢紫堇碱的吸收。

4 讨论

生物碱是一大类具有良好生物活性的天然产物,目前应用体外模型研究生物碱类成分吸收情况有一定的报道,如周王月等^[3]应用在体循环实验研究了叔胺碱巴马碱(黄藤素)的吸收机理,结果表明黄藤素在全肠段均有吸收,但吸收都较差,吸收机制为被动转运。李磊等^[4]考察了氧化苦参碱在大鼠小肠十二指肠、空肠、回肠及结肠部位的吸收情况,确定是否存在药物特异性吸收部位,结果表明氧化苦参碱在小肠各肠段均无特异吸收。但目前应用肠囊外翻法研究配伍对延胡索中主要成分的影响尚未见报道。本文应用 HPLC 测定了延胡索总生物碱中两种主要有效成分延胡索乙素和脱氢紫堇碱的肠吸收情况,并比较了复方配伍给药和延胡索提取物给药对

肠吸收成分的影响。结果显示配伍对其延胡索乙素的吸收没有影响,但可以显著提高脱氢紫堇碱的吸收。脱氢紫堇碱对心血管也有一定的药理作用^[5],这有可能是复方配伍后药物疗效增加的原因之一。

[参考文献]

[1] 范卓文,武斌,刘国臣. 延胡索药理研究及临床应用进展[J]. 黑龙江医药, 2007, 30(5):522.
[2] Barthe L, Bessouet M, Woodley J F, et al. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein[J]. Int J Pharm, 1998,173(1):255.
[3] 周王月,蒋学华. 黄藤素在大鼠胃肠道中的吸收动力学[J]. 华西药学杂志,2006,21(2):168.
[4] 李磊,刘晓红,王冬梅,等. 氧化苦参碱在大鼠离体小肠各肠段吸收的研究[J]. 中国药剂学杂志,2004,2(2):30.
[5] 蒋燮荣,吴庆仙,施化莲,等. 脱氢紫堇碱对心血管系统的药理作用[J]. 药学学报,1982, 17(1):61.

[责任编辑 邹晓翠]