

复方丹参滴丸对阿司匹林大鼠在体肠吸收的影响研究

张国荣, 段好刚, 魏玉辉, 李波霞, 张建强, 武新安* (兰州大学第一医院药剂科, 兰州 730000)

摘要: 目的 建立阿司匹林的 HPLC 分析方法, 研究复方丹参滴丸对阿司匹林大鼠肠吸收的影响。方法 采用大鼠在体肠单向灌流吸收实验模型, 应用重量法校正灌流液体积, HPLC 测定灌流液中阿司匹林浓度, 计算阿司匹林肠吸收参数。结果 阿司匹林组、阿司匹林与复方丹参滴丸联合灌流组、复方丹参滴丸诱导组阿司匹林吸收速率常数(K_a)分别为 1.05×10^{-2} , 1.44×10^{-2} , $2.29 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, 吸收渗透系数(P_{app})分别为 0.219×10^{-3} , 0.304×10^{-3} , $0.504 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结论 复方丹参滴丸对阿司匹林大鼠肠吸收有明显影响, 能促进阿司匹林的肠吸收。

关键词: 复方丹参滴丸; 阿司匹林; 肠吸收; 在体肠单向灌流

中图分类号: R969.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)01-0005-04

Study on Effect of Compound Danshen Dropping Pills on Intestinal Absorption of Aspirin in Rats

ZHANG Guorong, DUAN Haogang, WEI Yuhui, LI Boxia, ZHANG Jianqiang, WU Xin'an* (Department of Pharmacy, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of determination aspirin (ASP) by HPLC. Study on the effect of compound Danshen dropping pills (CDDP) on intestinal absorption in rats. **METHODS** The rat single-pass intestinal perfusion technique was applied to investigate the intestinal absorption of ASP, and the gravimetry was used to correct the perfusion volume. After the concentration of ASP in perfusate was determined by HPLC, the absorption parameters of ASP were calculated. **RESULTS** The absorption rate constants (K_a) of the ASP group, ASP combined with CDDP group and CDDP induced group were 1.05×10^{-2} , 1.44×10^{-2} and $2.29 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectively. And the apparent permeability coefficients (P_{app}) were 0.219×10^{-3} , 0.304×10^{-3} and $0.504 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** When CDDP was combined with ASP, the intestinal absorption of ASP is influenced significantly by CDDP, and CDDP could improve the intestinal absorption of ASP in rats.

KEY WORDS: compound Danshen dropping pills; aspirin; in situ intestine absorption; single-pass intestinal perfusion

复方丹参滴丸(compound Danshen dripping pills, CDDP)是以传统中医理论与现代医药技术相结合研制的新型纯中药复方制剂, 具有扩张冠脉血管、增加冠脉血流量、防治心肌缺血和抗血小板等作用^[1-2], 临床上常用于冠心病和心绞痛等心血管疾病的治疗^[3-4]。阿司匹林(aspirin, ASP)具有明确的抗血小板聚集作用, 广泛用于预防心脑血管

管的发病和短暂性缺血发作, 如脑血栓、冠心病、心肌梗死、偏头痛、人工心脏瓣膜或其它手术后的血栓形成及血栓闭塞性脉管炎等^[5-7]。二者合用于预防、治疗冠心病、心绞痛已成为临床上常用的治疗方案, 但联合用药后势必会引起药物相互作用的发生, 主要表现在药效学及药动学方面。前期研究表明, CDDP 对 ASP 药动学有明显影响。

基金项目: 兰州市城关区科技计划项目(2010-6-9); 兰州大学第一医院院内基金(ldyynqn201009)

作者简介: 张国荣, 男, 主管药师 Tel: (0931)8616392

E-mail: lzgry@sohu.com

*通信作者: 武新安, 男, 博士, 教授, 博

导 Tel: (0931)8616392

E-mail: xinanwu6511@163.com

一般来讲吸收过程是药物进入体内发挥作用的首要环节, CDDP 是否对 ASP 的肠吸收产生影响尚未见相关报道, 因此本实验采用大鼠在体肠灌流的方法来探讨 CDDP 对 ASP 大鼠肠吸收的影响, 为二者合理联合用药提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 二元梯度泵, SPD-M20A 二极管阵列检测器, DGU-20A 在线脱气系统, SIL-20A 自动进样系统, CTO-20A 柱温箱, LC solution 色谱工作站(Shimadzu, Kyoto, Japan.); SHZ-III型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂); 高速离心机(深圳国华仪器厂); XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); LT-224S 电子天平(北京赛多利斯); DDB-600 蠕动泵(上海之信仪器有限公司)。

1.2 动物

Wistar 大鼠, ♂, 体重 180–220 g, 购于兰州大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK(甘)2009-0004。

1.3 药品与试剂

阿司匹林对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100113-200603, 纯度: 99.6%); 阿司匹林原料药(山东新华制药股份有限公司, 含量为 99.5%, 批号: 100507); 复方丹参滴丸(天津天士力制药股份有限公司, 批号: 110108); Krebs-Ringer 缓冲液(自制, 每 1 000 mL 内含氯化钠 7.80 g、氯化钾 0.35 g、氯化钙 0.37 g、碳酸氢钠 1.37 g、磷酸二氢钠 0.32 g、氯化镁 0.02 g、葡萄糖 1.40 g), 甲醇为色谱纯(迪马公司), 乙腈为色谱纯(山东禹王), 其它试剂均为国产分析纯; 去离子水为兰州大学第一医院自制。

1.4 统计学处理

实验结果采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理, 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验进行统计, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 方法与结果

2.1 灌流液中阿司匹林的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: 依利特 Hypersil ODS2 (4.6 mm×150 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1%醋酸(36:64); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 275 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μ L。在该色谱条件下, 灌流液中阿司匹林保留时间约 8 min, 且灌流液中其它物质对其测定无干扰, 空白灌流液、联合灌

流 1 h 及诱导后灌流 1 h 后的样品色谱图见图 1。

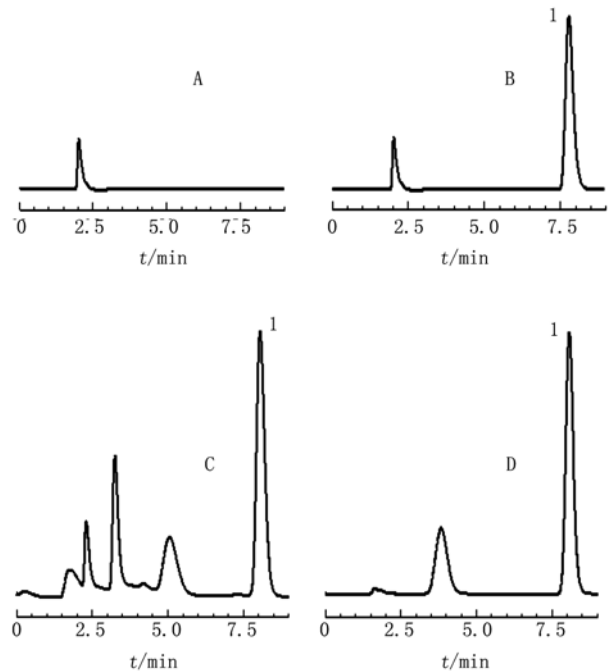


图 1 阿司匹林高效液相色谱图

A-空白灌流液; B-空白灌流液+阿司匹林标准品; C-联合灌流 1 h 后的样品; D-诱导灌流 1 h 后的样品; 1-阿司匹林

Fig 1 HPLC chromatograms of aspirin

A-blank Krebs-Ringer's solution; B-Krebs-Ringer's solution spiked ASP; C-sample of co-perfusion group after perfused 1 h in rat; D-sample of induced group after perfused 1 h in rat; 1-aspirin

2.1.2 溶液的制备 分别称取氯化钠 7.80 g、氯化钾 0.35 g、氯化钙 0.37 g、碳酸氢钠 1.37 g、磷酸二氢钠 0.32 g、氯化镁 0.02 g、葡萄糖 1.40 g, 用去离子水溶解并定容至 1 000 mL, 即得 Krebs-Ringer 缓冲液。

精密称取阿司匹林对照品 9.7 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加 Krebs-Ringer 缓冲液稀释至刻度, 得到浓度为 1.94 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液, 4 °C 贮藏备用。

2.1.3 标准曲线的制备 精密量取上述对照品储备液, 用 Krebs-Ringer 缓冲液稀释为 0.015 1, 0.030 2, 0.060 5, 0.121, 0.242, 0.485, 0.970, 1.94 mg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液。按上述色谱条件进样测定, 以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归, 得标准曲线方程为 $Y=3\ 464\ 900X-1\ 484.8$, $r=0.999\ 9$, 由此可见阿司匹林在 0.015 1~1.94 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.1.4 精密性与回收率 配制高、中、低(1.55, 0.242, 0.030 2 mg·mL⁻¹)浓度的阿司匹林对照质控

样品,于同一天内重复测定5次,计算日内精密度;于不同天内每日测定1次,连续测定5 d,计算日间精密度。结果测得高、中、低浓度的日内精密度均<2.31%,日间精密度均<5.17%;以测得的高、中、低浓度与加入的浓度作比较计算相对回收率,高、中、低浓度的相对回收率在98.3%~101.7%之间。

2.1.5 阿司匹林肠灌流液中的稳定性 取 Krebs-Ringer 缓冲液进行大鼠在体小肠循环 2 h 得空白肠循环液,以此空白肠循环液配制 1 mg·mL⁻¹ 的阿司匹林溶液,磷酸调节 pH 为 4.4, 5.4, 6.6, 置 37 °C 水浴中,分别于 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h 取样 100 μL,以 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后,10 μL 进样测定,计算阿司匹林浓度。阿司匹林、复方丹参滴丸+阿司匹林在不同 pH 的 Krebs-Ringer 缓冲液中的稳定性,结果见图 2。

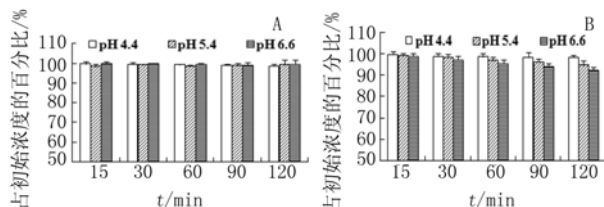


图 2 阿司匹林在不同 pH 的 Krebs-Ringer 缓冲液中的稳定性结果

A-ASP; B-ASP+CDDP

Fig 2 Stability of ASP at 37 °C in perfusates with different pH

A-ASP; B-ASP+CDDP

结果表明,在不同 pH 灌流液中 37 °C 水浴孵化 2 h 后,阿司匹林在灌流液中损失的量小于 2%,说明阿司匹林在不同 pH 灌流液中基本稳定,可以满足肠灌流实验的要求。阿司匹林+复方丹参滴丸在 37 °C 水浴联合孵化 2 h 后,阿司匹林在不同 pH(4.4, 5.4, 6.8)灌流液中损失的量分别为 1.6%, 5.1%和 7.4%,因此为保证实验数据的准确性,在整个实验中采用阿司匹林在 pH 4.4 的灌流液中进行大鼠单向肠灌流实验。

2.2 动物分组及灌流液的配制

取 Wistar 大鼠 24 只,♂,随机分为 3 组,每组 8 只,即阿司匹林灌流组、阿司匹林+复方丹参滴丸联合灌流组、复方丹参滴丸诱导后灌流组。

阿司匹林灌流组:精密称取阿司匹林 1.0 g,用空白 Krebs-Ringer 缓冲液稀释定容至 1 L;阿司匹林与复方丹参滴丸联合灌流组:精密称取阿司匹林 1.0 g,复方丹参滴丸 8.1 g,用空白 Krebs-Ringer

缓冲液稀释定容至 1 L; CDDP 诱导后灌流组:每天按 81 mg·kg⁻¹ 灌胃给予 CDDP 混悬液,连续给药 7 d 后,灌胃给予 CDDP 1 h 后,进行 ASP 肠灌流,灌流液配制方法同阿司匹林灌流组。

2.3 大鼠在体肠吸收单向灌流实验^[8-9]

大鼠禁食 16 h,自由饮水,腹腔注射 10% 乌拉坦(1.0 g·kg⁻¹)麻醉,固定并维持 37 °C 体温。沿腹中线打开腹腔,分离十二指肠段,长度为 10~15 cm,于两端切口,用预热至 37 °C 的生理盐水将肠内容物冲洗干净,插管后结扎。伤口处用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿。将硅胶管连接恒流装置,用阿司匹林灌流液小瓶,以流速 0.2 mL·min⁻¹ 平衡 15 min 后,此时迅速换准确称重的阿司匹林灌流液(20 mL)继续灌流,以准确称重的具塞小瓶每 15 min 接取流出液,实验共收集灌流液 7 次,灌流完成后剪下被考察的肠段,量取小肠的长度,并将灌流液小瓶和收集液小瓶称重,以计算流入肠道的液体量,收集液以 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后,用 HPLC 测定收集液中阿司匹林的浓度。

2.4 吸收参数的计算

本实验采用重量分析法对灌流液的流入和流出的体积进行校正,消除其体积变化的影响,按下列方程式计算吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})。

$$K_a = \frac{Q(1 - C_{out}V_{out}/C_{in}V_{in})}{\pi r^2 L}$$

$$P_{app} = \frac{[-Q \ln(C_{out}V_{out}/C_{in}V_{in})]}{2\pi r L}$$

V_{in} 和 V_{out} 分别为肠道进、出口灌流液的体积 (mL); C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进、出口灌流液的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Q 为灌流速度($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$); L 为被灌流肠段的长度, r 为灌流肠段内径($r=0.18 \text{ cm}^{[10]}$)。

2.5 阿司匹林肠吸收实验结果

按上述在体肠吸收单向灌流方法进行实验,测定阿司匹林在灌流液中的浓度,计算各组大鼠阿司匹林的吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app}),结果见表 1。

表 1 阿司匹林大鼠肠吸收参数($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab 1 Absorption parameters of aspirin in rat ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分组	$K_a(\times 10^2)/\text{min}^{-1}$	$P_{app}(\times 10^3)/\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$
ASP 灌流组	1.05±0.34	0.219±0.076
ASP+CDDP 联合灌流组	1.44±0.24 ¹⁾	0.304±0.055 ¹⁾
CDDP 诱导灌流组	2.29±0.73 ²⁾	0.504±0.124 ²⁾

注:与阿司匹林灌流组相比,¹⁾ $P<0.05$;²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with ASP group, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$

3 讨论

本实验采用在体单向灌流法其主要优点是：不切断血管及神经，测得的吸收速率等指标与体内法相近，比离体法更接近机体内的真实吸收；能避免胃内容物、消化道固有运动等的生理影响^[1]；该方法可靠，简便，测定结果准确，无须加入“标识物”，减小了实验误差。

研究结果表明，复方丹参滴丸对阿司匹林的肠道吸收有明显的影 响。阿司匹林与复方丹参滴丸联合灌流后，阿司匹林的肠吸收速率常数 K_a 及表观吸收系数 P_{app} 明显增大，与阿司匹林单独灌流组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)，其原因可能与复方丹参滴丸中含有冰片，具有促进药物吸收的作用有关。复方丹参滴丸诱导 7 d 后，阿司匹林大鼠体内的 K_a 及 P_{app} 也明显增大，与阿司匹林单独灌流组相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。水杨酸、苯甲酸、阿司匹林等弱酸性药物在体内主要通过一元羧酸转运蛋白转运吸收，复方丹参滴丸诱导 7 d 后，阿司匹林的 P_{app} 明显增大，这可能是由于复方丹参滴丸对大鼠肠道的一元羧酸转运蛋白有一定的诱导作用，进而导致了阿司匹林吸收的增加，其详细机理有待于进一步研究。

REFERENCES

[1] XIANG B, PANG Z H, CAO D Y. Compound Danshen dropping pill quality control and pharmacological research [J]. J Chin pharm(中国药房), 2007, 18(9): 708-710.

- [2] HE L X. Action mechanism and clinical application of compound Danshen dropping pill [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2010, 19(8): 1030- 1032.
- [3] SHI H T, HAN Q H. Influence of compound Danshen dropping pill on total ischemia burden and heart rate variability in angina pectoris of coronary disease [J]. Chin J Integr Med Card/Cerebro Dise (中西医结合心脑血管病杂志), 2009, 7(6): 649-651.
- [4] WANG J J, WEI W. Clinical observation on the treatment of 60 cases of angina pectoris of coronary heart diseases with compound Danshen dropping pill [J]. J Chin Pract Med (中国实用医药), 2008, 3(27):130-131.
- [5] WEISS H J. Discovery of the antiplatelet effect of aspirin: a personal reminiscence [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(9): 1869-1875.
- [6] ALBERTS M J, BERGMAN D L, MOLNER M, et al. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease [J]. Stroke, 2004, 35(1): 175-178.
- [7] JIANG W X, YAN J L. Clinical effects of Shuxuetong injection combined with aspirin in patients with carotid atherosclerosis and effects on the level of inflammatory cytokines [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2011, 28(S1): 1372-1375.
- [8] NIE S F, PAN W S, YANG X G, et al. Evaluation of gravimetry in the rat single-pass intestinal perfusion technique [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2005, 14(10): 1176- 1178.
- [9] KIM J S, MITCHELL S, KIJEK, et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests [J]. Mol Pharm, 2006, 3(6): 686-694.
- [10] ISSA C, GUPTA P, BANSAL A K. Implications of density correction in gravimetric method for water flux determination using rat single-pass intestinal perfusion technique: a technical note [J]. AAPS PharmSciTech, 2003, 4(2): E16.
- [11] CHEN J, DI L Q. Application of *in vivo* intestinal perfusion model on the absorption of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2008, 15(2): 98-100.