

· 药物代谢 ·

延胡索提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究

王伟, 杨伟鹏, 梁日欣*, 王岚, 李鹏跃, 王彦礼, 胡楠, 杨庆, 成龙, 侯瑞, 王怡薇, 殷小杰

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 利用肠外翻模型研究延胡索提取物不同剂量在大鼠不同肠段的吸收特征。方法: 采用大鼠肠外翻模型, HPLC 检测延胡索提取物中的延胡索甲素(CDL)和延胡索乙素(THP), 计算各成分的吸收参数, 分析它们在肠道不同部位的吸收特征。结果: 不同浓度延胡索提取物中 CDL 和 THP 在各肠段均为线性吸收, R^2 均大于 0.95, 符合零级吸收; CDL 和 THP 的吸收速率常数(K_a)均随延胡索提取物给药剂量的增加而增加($P < 0.05$), 表明其为被动吸收。肠道不同部位的吸收实验表明, 十二指肠, 空肠, 回肠对其均有较好的吸收, 结肠吸收较差; 且肠道对 THP 的吸收好于对 CDL 的吸收。结论: 不同浓度延胡索提取物 CDL 和 THP 在肠道不同部位吸收均符合零级吸收速率, 其吸收形式可能为被动吸收。

[关键词] 延胡索; 肠外翻; 延胡索甲素; 延胡索乙素; 反相高效液相

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0121-05

Absorption of Extracts from *Corydalis yanhusuo* in Rat Everted Gut Scas

WANG Wei, YANG Wei-peng, LIANG Ri-xin*, WANG Lan, LI Peng-yue, WANG Yan-li, HU Nan, YANG Qing, CHENG Long, HOU Rui, WANG Yi-wei, YUN Xiao-jie

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Using *in vitro* everted gut scas to investigate the intestinal absorption of the extracts from *Corydalis yanhusuo* at different intestinal section and different concentration. **Method:** Corydaline (CDL) and Tetrahydropalmatine (THP) which are representative compositions of the extracts from *Corydalis yanhusuo* in everted gut scas were detected by HPLC, and the absorption parameter to describe the character of absorption was calculated. **Result:** The absorption of CDL and THP was linearity in different intestine and different dose, and the square of coefficient correlation exceed 0.95, which consistent with zero order rate process. The K_a of CDL and THP increased along with the raised dosage of the extracts from *Corydalis yanhusuo* ($P < 0.05$), indicated the passive absorption. The absorption of CDL or THP in duodenum, jejunum, ileum was quick, but the absorption of CDL or THP in colon absorption was slow. And the absorption of THP was quicker than that of CDL. **Conclusion:** For different dosage of extracts from *Corydalis yanhusuo*, the absorption of CDL and THP conforms to the zero order rate process at different sections of intestine, with a pattern of passive absorption.

[Key words] extracts *Corydalis yanhusuo*; everted gut sacs; Corydaline; Tetrahydropalmatine; RP-HPLC

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。具有显著的镇痛、镇静和

催眠作用。常用于治疗胸胁、腕腹肿痛, 经闭痛经、产后瘀血、跌扑肿痛等。正因为延胡索效果显著, 临

[收稿日期] 2010-11-30

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项项目(2008070036)

[第一作者] 王伟, 硕士研究生, 从事中药药理与药代研究

[通讯作者] * 梁日欣, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理及药物代谢研究, Tel: 010-64014411-2948, E-mail: liangrixin2009@sina.com

床应用广泛,在《中国药典》2005 年版中,接近 30% 的复方制剂中使用了延胡索^[1]。不少学者从化学、药理等角度对延胡索做了相应研究,发现延胡索主要成分为生物碱(叔胺、季胺类生物碱),叔胺类生物碱在原药材中的量约为 0.65%,季胺类生物碱(如延胡索甲素、乙素)约为 0.3%^[2]。到目前为止,从延胡索中分离得到的生物碱类成分约有 30 种。其中以延胡索乙素(THP)的镇痛作用为最强,延胡索甲素(CDL)也具有一定的镇痛作用,且含量较高^[3]。因此本实验选择 CDL 和 THP 为测定指标,通过肠外翻囊模型,利用反相高效液相色谱法技术,探讨中药延胡索在肠道中的吸收特征和机制,为合理设计剂型及新药的开发提供生物药剂学依据。

1 材料

1.1 药物 延胡索药材,购自亳州医药公司;延胡索提取物由中日医院药剂科制备,其中延胡索甲素含量(CDL)为 $6.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,延胡索乙素(THP)含量为 $5.43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2 试剂 CDL 对照品(纯度 98% 以上,美国 Varian 公司,批号 ASB-00003805-005);THP 对照品(纯度 98% 以上,中国药品生物制品检定所,批号 117026-200610);乙腈(HPLC 级,美国 Fisher 公司,批号 100751);甲醇(HPLC 级,美国 Fisher 公司,批号 095586),三乙胺(分析纯,北京市旭东化工厂,批号 090506);磷酸(分析纯,北京化学试剂公司,批号 20091120);高纯水(自制)。

1.3 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重(250 ± 20) g,由军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(军)2007-004。

1.4 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司);HSS-1B 数字式超级恒温浴槽(成都仪器厂);麦氏浴槽(成都仪器厂);Sorvall super T21 高速离心机(美国 Sorvall 公司);KQ-100 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇:0.1% 磷酸(三乙胺调 pH 6.0)(70:30),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 32 °C,检测波长 280 nm。

2.2 对照品溶液配制 精密称取 CDL 对照品 0.69 mg 于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解,超声,用甲醇定容。配制成 $69 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液,密封后冷藏备用;精密称

取 THP 对照品 0.89 mg 于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解,超声,用甲醇定容。配制成 $89 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液,密封后冷藏备用。

2.3 Tyrode 液制备 NaCl $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,KCl $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,CaCl₂ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,NaHCO₃ $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,NaH₂PO₄ $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,MgCl₂ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,葡萄糖 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.4。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的制备 吸取 CDL 对照品母液,加甲醇稀释成 1.3,2.6,6.5,13.8,26,34.5,69,138 μg·mL⁻¹ 溶液;吸取 THP 对照品母液,加甲醇稀释成 1.6,3.2,8.9,17.8,32,44.5,89,178 μg·mL⁻¹ 溶液,进样 10 μL。在 2.1 色谱条件下进行分析,记录峰面积,以样品浓度对峰面积进行线性回归,计算标准曲线方程。

2.4.2 专属性 比较空白 Tyrode 液,CDL,THP 对照品,样品(取空肠 45 min 的样品)中的 CDL,THP 的色谱行为,判断 CDL,THP 在相应峰位是否存在内源性干扰。

2.4.3 精密度实验 在标准曲线范围内,分别配置低、中、高 3 个质量浓度的 CDL(2.6,26,138 μg·mL⁻¹),THP(3.2,32,178 μg·mL⁻¹) 标准溶液,于 1 d 内分别测定 5 份样品,计算日内精密度;每个浓度的样品各取 1 份,连续测定 5 d,计算日间精密度。

2.4.4 稳定性实验 取十二指肠于 45 min 时的样品,于 0,1,2,6,12,24 h 分别进样 20 μL,测定 CDL,THP 的变化。

2.5 大鼠肠外翻实验^[4-5] 大鼠按实验设定随机分组,每组 4 只,实验前 12 h 禁食,自由饮水。脱颈处死,打开腹腔,取出约 10 cm 长的十二指肠、空肠、回肠、7 cm 结肠各段。放入冰 Tyrode 液中冲洗,直到没有内容物流出,小心剥离肠段表面的肠系膜和脂肪。利用自制塑料套管,将肠管翻转,使肠黏膜侧向外,用 Tyrode 液冲洗后,结扎肠段下端,将上端固定于取样口,使之形成囊状肠管。向肠囊内注入 2 mL 空白 Tyrode 液,作为受药体系。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% O₂/5% CO₂。平衡 5 min 后,将麦氏浴槽中的 Tyrode 液倒出,向其注入配制好的($5.75, 11.5, 23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的药液 50 mL,分别在给药后 15,30,45,60,75,90,105,120 min 从肠囊内取样 200 μL,同时补足相同体积的空白 Tyrode 液。

2.6 样品处理 4 °C 下 $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心样品 25

min,取上清 150 μL ,同上法再次离心,取第 2 次的上清 20 μL 进样,HPLC 测定 CDL,THP 含量。

2.7 数据处理 计算不同质量浓度下 CDL,THP 在各个时间点的累积吸收量(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 时间点的实际检测浓度。

以 $Q(\mu\text{g})$ 对时间(h) 进行零级、一级、Higuchi 方程、米-曼氏方程拟合,以相关系数 R 为拟合优劣的判断标准。计算吸收速率常数($Ka, \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$),采用方差分析,探讨不同肠段、不同浓度下肠吸收速率有无差异。

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

$$\text{药物的吸收率 } V = \frac{Q_{\text{累积吸收量}}/2}{C_0} \times 100\%$$

$Q_{\text{累积吸收量}}(\mu\text{g})$ 为 2 h 的累积吸收量, $C_0(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为原始药物浓度。

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 标准曲线 CDL 标准曲线方程为 $A(\text{CDL}) = 471.37C + 0.2515 (R^2 = 0.9999, n = 8)$,得到标准曲线在 $1.3 \sim 138 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好;THP 标准曲线方程为 $A(\text{THP}) = 483.17C + 0.6837 (R^2 = 0.9998, n = 8)$,得到的标准曲线在 $1.6 \sim 178 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好,见图 1。

3.1.2 专属性 在建立的 HPLC 色谱条件下,可以看出在 CDL 和 THP 色谱峰处 Tyrode 液中物质和延胡索提取物中其他成分对其没有干扰,且 CDL 和 THP 的峰型较好,能够完全分离,保留时间(t)分别为 10.5,17.5 min。此方法专属性较好。见图 2。

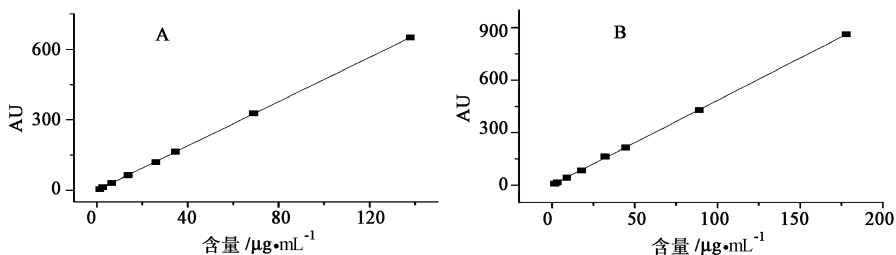


图 1 肠外翻试验中 CDL 和 THP 标准曲线

A. CDL 标准曲线,B. THP 标准曲线

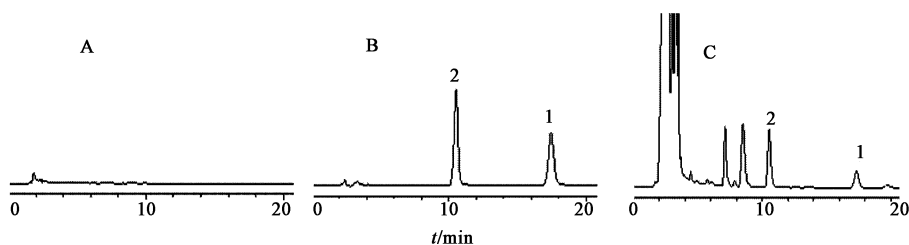


图 2 延胡索提取物专属性 HPLC

A. 空白 Tyrode 液;B. CDL 和 THP 对照品;C. 样品;1. CDL;2. THP

3.1.3 精密度 CDL 的高,中,低质量浓度的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 1.45, 0.75, 0.78%;1.11, 1.34, 1.78%。THP 的高,中,低质量浓度的日内精密度和日间精密度 RSD 分别为 1.09, 0.67, 0.42;1.43, 1.61, 1.59。表明精密度良好。

3.1.4 稳定性 延胡索提取物 CDL 和 THP 在 24 h 之内较为稳定。CDL 和 THP 的 RSD % 分别为 1.39, 0.46%。

3.2 肠外翻实验

3.2.1 延胡索提取物中 CDL 和 THP 由黏膜侧向浆膜侧转运情况 对比不同浓度延胡索提取物中的 CDL 和 THP 的经时累积量 $Q(\mu\text{g})$ 对时间(h) 的 3 种拟合方式,结果表明,以零级拟合较好。以各累积吸收量对时间做线性回归,其相关系数(R^2) 均大于 0.95,符合零级吸收。见图 3 和表 1。

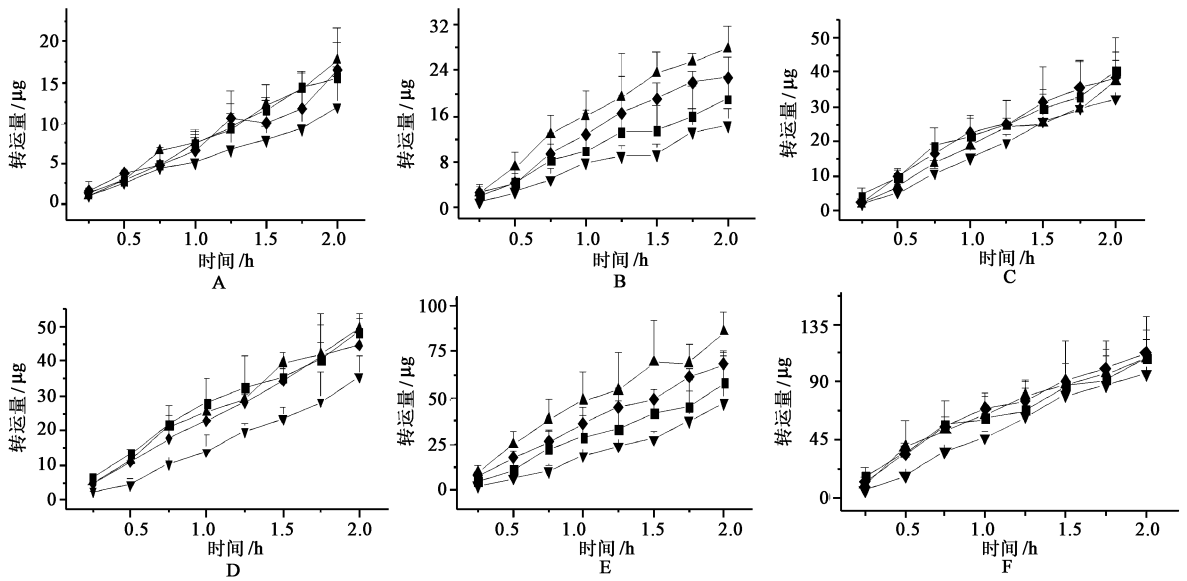


图 3 延胡索提取物中 CDL 和 THP 由黏膜侧向浆膜侧转运

A. CDL 5.75 g·L⁻¹; B. CDL 11.5 g·L⁻¹; C. CDL 23 g·L⁻¹; D. THP 5.75 g·L⁻¹; E. THP 11.5 g·L⁻¹; F. THP 23 g·L⁻¹

■ 十二指肠; ◆ 空肠; ▲ 回肠; ▼ 结肠

表 1 不同浓度下各肠段 Q (g) 对时间 (h) 的线性回归方程和 R² ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

肠段	质量浓度 /g·L ⁻¹	CDL		THP	
		回归方程	相关系数 R ²	回归方程	R ²
十二指肠	5.75	$Q = 7.895 t - 0.789$	0.989	$Q = 20.029 t + 2.233$	0.983
	11.5	$Q = 9.363 t + 0.209$	0.980	$Q = 28.860 t - 1.836$	0.986
	23.0	$Q = 19.492 t + 1.176$	0.981	$Q = 48.443 t + 11.297$	0.972
空肠	5.75	$Q = 8.518 t - 1.184$	0.995	$Q = 20.556 t - 0.796$	0.996
	11.5	$Q = 12.513 t - 0.415$	0.978	$Q = 34.270 t + 0.343$	0.995
	23.0	$Q = 19.492 t - 0.055$	0.982	$Q = 54.543 t + 7.478$	0.975
回肠	5.75	$Q = 9.111 t - 1.416$	0.987	$Q = 21.865 t - 0.291$	0.988
	11.5	$Q = 14.604 t + 0.392$	0.980	$Q = 40.527 t + 4.204$	0.975
	23.0	$Q = 18.960 t - 1.547$	0.981	$Q = 51.933 t + 9.050$	0.966
结肠	5.75	$Q = 4.988 t - 1.153$	0.980	$Q = 13.488 t - 2.166$	0.967
	11.5	$Q = 7.707 t - 0.954$	0.978	$Q = 24.934 t - 6.445$	0.979
	23	$Q = 18.066 t - 2.844$	0.995	$Q = 53.879 t - 6.458$	0.990

3.2.2 不同质量浓度延胡索提取物 CDL 和 TPH 的 Ka 比较 对不同质量浓度延胡索提取物中 CDL 和 TPH 的吸收速率常数 Ka 进行方差分析和两两多重比较,结果显示在各肠段随延胡索提取物质量浓度

增加,CDL 和 THP 的 Ka 增加,统计学均有显著差异 (P < 0.05 或 P < 0.01 或 P < 0.001),表明 CDL 和 TPH 在肠道吸收为被动吸收,见表 2,3。

表 2 不同质量浓度 CDL 的吸收速率常数 (Ka) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

CDL 质量浓度 /g·L ⁻¹	Ka /µg·min ⁻¹ ·cm ⁻²			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
5.75	0.379 ± 0.017	0.366 ± 0.067	0.312 ± 0.056	0.188 ± 0.014
11.5	0.596 ± 0.114	0.536 ± 0.031	0.586 ± 0.065	0.275 ± 0.015
23.0	0.790 ± 0.134	0.867 ± 0.033	0.729 ± 0.066	0.742 ± 0.005

表3 不同质量浓度 THP 的吸收速率常数 (Ka) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

THP 质量浓度 /mg·mL ⁻¹	$Ka / \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
5.75	0.975 ± 0.115	0.870 ± 0.072	0.785 ± 0.137	0.560 ± 0.117
11.5	1.502 ± 0.286	1.452 ± 0.050	1.622 ± 0.021	0.784 ± 0.245
23	2.158 ± 0.655	2.115 ± 0.252	2.198 ± 0.672	2.242 ± 0.309

3.2.3 CDL 和 THP 在肠道不同部位的吸收率 如图3所示,在低、高浓度时 CDL 和 THP 在十二指肠、空肠、回肠的吸收没有明显差异,中浓度时回肠的吸收好于其他肠段;CDL 和 THP 在结肠的吸收明显低于其他肠段;且 THP 吸收率较高,均达到 40% 以上,明显高于 CDL 在肠道不同部位的吸收。

4 讨论

本课题组在前期已经建立了利用反相高效液相色谱法测定延胡索提取物 CDL 和 THP 含量测定方法。方法学考察结果表明,该方法精密性、重复性及样品稳定性均良好,可以准确测定待测成分的含量。

中药胃肠药动学涉及药物、机体和两者之间相互作用规律的研究,阐明药物的有效成分在胃肠道内的变化,通过分析药物在胃肠道内的动态过程,揭示有效成分的吸收特点。此类研究主要分为体内和体外实验。在体外实验中,外翻肠囊法是目前最为常见的体外吸收模型,由 Wilson 和 Wiseman 首先提出,通过测定肠吸收液中的成分来研究某种物质是否被吸收以及吸收的速度和数量该模型条件可控,操作简便,保留了完整的组织和黏膜的特性,较为真实的模拟了肠道环境,获得的药动学参数可合理的反映有效成分的吸收特征。一定程度上可反映被分析药物的吸收机制,为其代谢动力学的深入研究提供参考^[6]。

延胡索主要成分为生物碱——叔胺、季胺类生物碱。到目前为止,从延胡索中分离得到的生物碱类成分约有 30 种。延胡索中的生物碱具有很强的镇痛、镇静、降压和抗心律失常作用。目前,很多新的研究表明,延胡索还具有其他广泛的生理活性,如抗心肌缺血、抗实验性胃溃疡、抗肿瘤、抗氧化、保

肝^[7]等。延胡索乙素是其中多数药理作用的主要活性成分。而延胡索中 CDL 的含量较高,其药效作用不容忽视。本实验通过肠外翻模型,研究延胡索提取物中 CDL 和 THP 的肠吸收特征。实验结果表明,CDL 和 THP 在各段肠道中均为线性吸收,符合零级吸收;且均为被动吸收。CDL 和 THP 在十二指肠、空肠、回肠中均有较好的吸收趋势,生物利用度较高。且 THP 的吸收要明显好于 CDL,提示在延胡索众多成分中 THP 是主要的起效成分。但是离体外翻肠囊法存在一定的缺陷,不能对药物的吸收程度做出定量评价。可结合细胞水平(Caco-2, MDCK 等细胞系)、整体水平(单向肠灌注法,在体肠循环法)等,多层次、多环节的判断其吸收机制,对其肠吸收情况进行客观评价。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005: 643.
- [2] 张晓丽,曲扬,侯家鸣,等.延胡索的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2008,25(7):537.
- [3] 郑汉臣,蔡少青.药用植物学与生药学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2006:284.
- [4] 董宇,张英丰,杨庆.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.
- [5] 柏冬,牛晓红,范斌,等.桂枝汤在肠道不同部位的吸收研究[J].中药新药与临床药理,2010,21(2):167.
- [6] Wilson T H, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface[J]. J Physiol, 1954, 123(1):116.
- [7] 汤法银,聂爱国,李艳玲.中药延胡索的研究进展[J].临床和实验医学杂志,2006,5(2):185.

[责任编辑 何伟]