

哈巴俄苷在大鼠胃肠道内容物中的稳定性及其入血成分分析

刘文君¹, 孟兆青¹, 孙林¹, 程宁波¹, 黄文哲¹, 王振中¹, 王跃生^{1,2}, 萧伟^{1*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;
2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究哈巴俄苷在生物样品中的稳定性及其大鼠灌胃后的入血成分。方法:利用 HPLC 测定哈巴俄苷的含量,流动相 0.03% 磷酸水溶液-乙腈梯度洗脱,检测波长 210 nm,计算其在各样品中的剩余率,研究哈巴俄苷在人工胃液、人工肠液、大鼠胃肠道内容物及相应 pH 溶液中的稳定性;利用 LC-MS 检测大鼠灌胃给药后的血液样品,对哈巴俄苷的入血成分进行定性研究。结果:哈巴俄苷在人工肠液、大鼠小肠内容物、大鼠大肠内容物中较稳定,降解率 < 10%;在稀酸液、人工胃液、大鼠胃内容物中哈巴俄苷可发生降解,但降解率 < 15%;大鼠灌胃给予哈巴俄苷后的血液样品中检测到了哈巴俄苷、哈巴苷、肉桂酸。结论:哈巴俄苷在人工胃肠液、大鼠胃肠道内容物及相应 pH 溶液中较稳定,少部分在酸性环境可分解成肉桂酸及哈巴苷元的脱水产物;哈巴俄苷大鼠灌胃给药后主要以原型入血,在体内可代谢为肉桂酸及哈巴苷。

[关键词] 哈巴俄苷; 稳定性; 肉桂酸; 哈巴苷; 玄参; 人工胃液; 肠内容物

[中图分类号] R945;R284.1;R969.1;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0108-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040108

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1043.010.html>

[网络出版时间] 2016-11-29 10:43

Stability of Harpagoside in Gastrointestinal Contents of Rats and Analysis of Its Constituents Absorbed in Rat Serum After Oral Administration

LIU Wen-jun¹, MENG Zhao-qing¹, SUN Lin¹, CHENG Ning-bo¹,
HUANG Wen-zhe¹, WANG Zhen-zhong¹, WANG Yue-sheng^{1,2}, XIAO Wei^{1*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To investigate stability of harpagoside in biological fluids *in vitro* and analyze its constituents absorbed in rat serum after oral administration. Method: Harpagoside was dissolved in artificial gastric juice, intestinal juice and gastrointestinal contents of rats, the corresponding pH solution, respectively; then thermostatically maintained at 37 ℃. HPLC was used to calculate the remaining rate of harpagoside in biological samples by measuring the content of harpagoside at time intervals after degradation. Constituents absorbed in rat serum were detected by LC-MS after oral administration. Result: Harpagoside was relatively stable in artificial intestinal juice and intestinal contents of rats, its degradation rates were less than 10%; however, it could be degraded in diluted acid, artificial gastric juice and gastric contents of rats, its degradation rates were less than 15%. Harpagoside, cinnamic acid and harpagide were detected in rat serum after oral administration of harpagoside. Conclusion: Harpagoside is relatively stable in artificial gastric juice, intestinal juice as well as gastrointestinal contents of rats, and a few of it in the acidic environment can be broken into cinnamic acid and dehydration product of harpagide aglycone. Harpagoside is mainly absorbed by prototype in rat serum after oral

[收稿日期] 20160411(024)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)
[第一作者] 刘文君, 中级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel:025-87181852, E-mail:lwj.518@163.com
[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel:0518-81152367, E-mail:kanionlunwen@163.com

administration, and it can be metabolized to cinnamic acid and harpagide *in vivo*.

[**Key words**] harpagoside; stability; cinnamic acid; harpagide; Scrophulariae Radix; artificial gastric juice; intestinal contents

哈巴俄苷为环烯醚萜苷类成分,是玄参药材主要的功效成分之一^[1-3],具有抗慢性炎症、降压、镇痛、解痉、抗乙型肝炎病毒、促进免疫作用,且与玄参的滋阴功效密切相关^[4-6]。据文献报道,玄参在炮制过程中哈巴俄苷的含量降低,推测该成分被水解^[7-8];大鼠口服玄参水提物后的药代动力学研究表明,肉桂酸的血药浓度出现 2 次上升现象,推测可能是由哈巴俄苷代谢而来^[9];药代动力学研究表明大鼠口服哈巴俄苷后生物利用度低(<5%),在大鼠血浆中的主要代谢产物为肉桂酸^[10]。前期在研究哈巴俄苷的肠道菌群代谢时发现,该成分在空白的培养基中即降解,表明其在培养基中不稳定。本实验拟考察哈巴俄苷在人工胃肠液、大鼠胃肠道内容物及相应 pH 溶液中的稳定性,并对哈巴俄苷灌胃给药后血液样品中的入血成分进行定性检测,以揭示其在大鼠体内的吸收及入血成分。结果表明哈巴俄苷在大鼠胃肠道中较稳定,血液样品中检测到哈巴俄苷、哈巴苷、肉桂酸,推测哈巴俄苷主要以原型入血,在体内可代谢为肉桂酸及哈巴苷。本研究还发现哈巴俄苷的降解产物哈巴苷在酸性条件下不稳定,根据质谱检测结果,推测其降解为哈巴苷苷元的脱水产物,该结果可为深入研究哈巴苷的药代动力学及药理作用成分提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪和 1290/6538 型 Q-TOF 液质联用系统(美国 Agilent 公司),AL204 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),Milli-Q 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。哈巴俄苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号 140604),哈巴苷和肉桂酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 201506,200503),胃蛋白酶和胰蛋白酶(北京拜尔迪生物技术有限公司),二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(赛默飞世尔科技公司),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

SPF 级 SD 大鼠 12 只,雌雄各半,体重 180 ~ 200 g,由上海杰思捷实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2013-0006。

2 方法与结果

2.1 溶液配制 精密量取稀盐酸 16.4 mL,加水约

800 mL,加入胃蛋白酶 10 g,摇匀,加水稀释至 1 L,得人工胃液。精密称取磷酸二氢钾 6.8 g,加水至 500 mL 使溶解,用 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠调 pH 6.8;取胰蛋白酶 10 g 溶于水,两液混合,加水至 1 L,得人工肠液。取 SD 大鼠 6 只(雌雄各半),禁食 20 h(不禁水)后断颈椎处死,沿腹中线打开腹腔,分别用适量冰冷的 pH 1.2 盐酸溶液,pH 6.8 及 pH 8.0 磷酸盐缓冲液冲洗大鼠胃、小肠及大肠,收集内容物。内容物冷冻离心 15 min(4 ℃,5 000 r·min⁻¹,下同),取上清液,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量,分别用相应 pH 的缓冲液调节蛋白质质量浓度至 1.2 g·L⁻¹,作为空白生物样品。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.03% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~10 min,3%~10% B;10~20 min,10%~33% B;20~25 min,33%~50% B;25~30 min,50%~80% B;30~35 min,80% B),检测波长 210 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2.2 HPLC-MS 检测条件 流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液,其他色谱条件同 2.2.1 项。质谱条件为电喷雾电离(ESI)离子源,离子化方式 ESI(+,-),干燥气温度 350 ℃,干燥气流量 10 L·min⁻¹,雾化气压力 344.75 kPa,毛细管电压(+)4 kV 和(-)3.5 kV,毛细管出口电压 135 V,锥孔电压 65 V,扫描范围 *m/z* 100~1 200。

2.3 哈巴俄苷的含量测定

2.3.1 线性关系考察 精密量取 1.06 g·L⁻¹哈巴俄苷对照品储备液 0.5,1,2,4,8 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得系列质量浓度的对照品溶液,按 2.2 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 7\,900.2X + 74.232$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.053 ~ 1.06 g·L⁻¹。

2.3.2 专属性考察 对人工胃液、人工肠液、胃内容物、小肠内容物、大肠内容物中待测成分的色谱专属性进行分析,结果空白基质不干扰哈巴俄苷的检测,见图 1。

2.3.3 精密度考察 取 0.53 g·L⁻¹哈巴俄苷对照

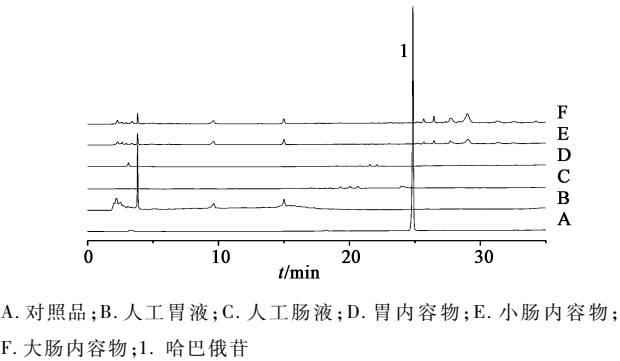


图 1 哈巴俄昔的 HPLC 专属性质考察
Fig.1 HPLC specificity of harpagoside

品溶液,按 2.2 项下色谱条件重复进样 6 次,计算哈巴俄昔峰面积的 RSD 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验

2.4.1 哈巴俄昔的稳定性研究 精密称取哈巴俄昔对照品 8 份,每份 5.0 mg,置于 20 mL 具塞试管中,分别加入 37 ℃ 水浴预热的人工胃液、人工肠液、胃内容物、小肠内容物、大肠内容物及相应 pH 的空白溶液 10 mL,每种样品平行制备 3 份,置于 37 ℃ 恒温水浴中孵育,分别于不同时间点取样 0.2 mL,胃内容物、小肠内容物和人工胃液的取样时间点为 0.5,1,2,4,6,8 h;大肠内容物、人工肠液的取样时间点为 1,2,4,8,12,24 h。每次取样 0.2 mL,立即加入甲醇 0.6 mL 终止反应,漩涡 1 min,冷冻离心 10 min,立即取上清液转移至自动进样小瓶中进行分析^[11-12],计算哈巴俄昔在样品中的剩余率,见表 1,2。

2.4.2 哈巴昔的酸稳定性及样品分析 精密称取哈巴昔对照品 5.0 mg,加入 pH 1.2 稀酸液 10 mL,按 2.4.1 项下稳定性试验进行研究,见图 2。化合物 4 在正离子模式下离子峰的 m/z 167.051 4 [M + H]⁺;负离子模式下离子峰的 m/z 165.055 2 [M - H]⁻;推测化合物 4 的相对分子质量 166,分子式 C₉H₁₀O₃。

2.5 入血成分的定性鉴别 取 SD 大鼠 6 只(雌雄各半),禁食 12 h,给药前眼眶静脉丛采集空白血样,哈巴俄昔按 50 mg·kg⁻¹灌胃给药,分别于 0,1,2,3,4 h 对大鼠眼眶静脉丛采集血样 0.4 mL,加肝素钠抗凝,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,收集上清液。上清液中加入 4 倍量甲醇涡旋 3 min,离心 5 min (14 000 r·min⁻¹,下同),转移上清液,40 ℃ 氮气吹干,残渣加甲醇 0.1 mL 使溶解,离心 10 min,取上清液进行 LC-MS 分析^[12-13]。血液样品在对照品的相

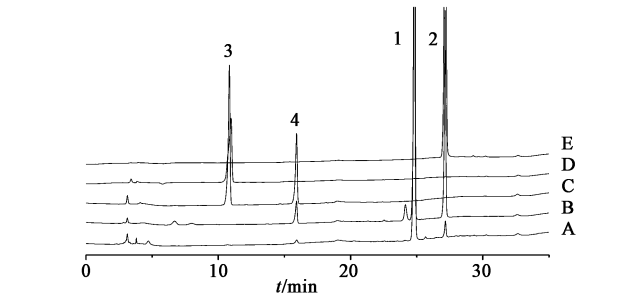
表 1 哈巴俄昔在不同 pH 溶液中的剩余率
Table 1 Remaining rates of harpagoside in different pH solutions %

t/h	稀酸液 (pH 1.2)	磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)	磷酸盐缓冲液 (pH 8.0)
0	100.00	100.00	100.00
0.5	98.82	99.85	99.69
1	97.88	99.70	99.07
2	95.17	98.13	98.75
4	89.89	96.17	98.42
6	88.36	94.40	98.16
8	86.36	93.59	97.78
12	—	91.78	96.69
24	—	90.31	95.13

注:“—”表示未考察,食物在胃内停留 4~6 h^[11],故考察至 8 h (表 2 同)。

表 2 哈巴俄昔在人工胃肠液及大鼠胃肠内容物中的剩余率
Table 2 Remaining rates of harpagoside in artificial gastric juice, intestinal juice and gastrointestinal contents of rats %

t/h	人工胃液	人工肠液	胃内容物	小肠内容物	大肠内容物
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
0.5	98.69	98.51	98.06	98.95	97.02
1	98.32	97.74	97.74	97.94	96.88
2	94.03	96.15	96.58	96.80	95.90
4	91.49	95.21	96.36	96.41	95.87
6	90.58	94.44	96.22	96.23	95.68
8	88.93	93.90	94.48	96.03	95.00
12	—	91.43	—	97.49	94.60
24	—	90.05	—	96.38	95.34



A. 哈巴俄昔大鼠胃内容物样品;B. 哈巴俄昔稀酸液样品;C. 哈巴昔稀酸液样品;D. 哈巴昔对照品溶液;E. 肉桂酸对照品溶液;1. 哈巴俄昔;2. 肉桂酸;3. 哈巴昔;4. 哈巴昔降解产物
图 2 哈巴俄昔及哈巴昔稳定性样品 HPLC

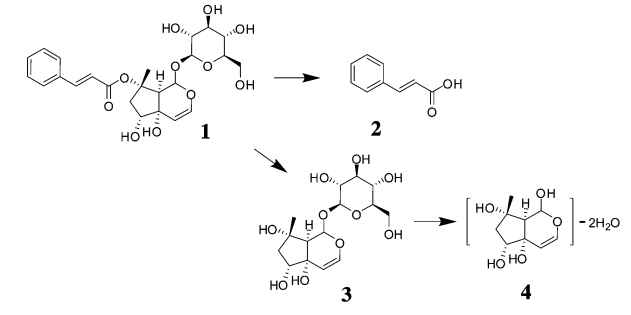
Fig.2 HPLC chromatograms of stability samples of harpagoside and harpagide

应位置中分别检测到化合物的质谱峰,正、负离子模式下哈巴俄昔的 m/z 分别为 517.108 5 [M + Na]⁺,

539. 118 8 [M + HCOOH - H]⁻; 哈巴苷的 *m/z* 分别为 387. 082 0 [M + Na]⁺, 409. 134 8 [M + HCOOH - H]⁻; 肉桂酸的 *m/z* 分别为 149. 060 6 [M + H]⁺, 147. 045 3 [M - H]⁻。血液样品中检测到哈巴苷。

3 讨论

由表 1, 2 可知, 哈巴俄苷在人工肠液、大鼠小肠内容物、大鼠大肠内容物中比较稳定; 在稀酸液、人工胃液、大鼠胃内容物中哈巴俄苷可发生降解, 但降解率未超过 15%。由图 2 可知, 哈巴俄苷在酸性条件下可产生肉桂酸和化合物 4。由哈巴俄苷的结构式可知, 哈巴俄苷可水解为肉桂酸及哈巴苷, 推测哈巴苷(相对分子质量 364)在酸性条件下不稳定, 其脱去 1 分子葡萄糖后生成哈巴苷苷元(相对分子质量 202), 继续脱去 2 个分子 H₂O 生成化合物 4(相对分子质量 166), 推测的反应过程见图 3。哈巴苷对照品在相同的酸性条件下可产生化合物 4, 说明哈巴俄苷在酸性条件下水解生成的少量哈巴苷可反应生成化合物 4。



1. 哈巴俄苷; 2. 肉桂酸; 3. 哈巴苷; 4. 哈巴苷苷元脱水产物

图 3 哈巴俄苷在酸液中的水解过程

Fig. 3 Hydrolysis process of harpagoside in acidic solution

在哈巴俄苷大鼠灌胃给药后的血液样品中检测到了哈巴俄苷、哈巴苷、肉桂酸。据文献报道哈巴俄苷大鼠灌胃给药吸收后在体内的主要代谢产物为肉桂酸^[10], 推测哈巴俄苷口服给药主要以原型入血, 在体内可代谢为肉桂酸及哈巴苷。本研究表明哈巴俄苷在人工胃肠液、大鼠胃肠道内容物及相应 pH 的溶液中较稳定, 少部分在酸性环境可能分解成肉桂酸及哈巴苷苷元的脱水产物; 推测哈巴俄苷大鼠灌胃给药后主要以原型入血, 在体内可代谢为肉桂酸及哈巴苷。哈巴俄苷大鼠口服生物利用度低^[10]的原因与其在胃肠道中的稳定性关系较小, 与其部分转化为代谢产物有关, 也可能与其吸收较少有关, 该结果可为哈巴俄苷口服剂型的设计提供参考。本研究发现哈巴俄苷的降解产物哈巴苷在酸性条件下

可进一步降解为哈巴苷苷元的脱水产物, 而哈巴苷的稳定性及在体内的代谢研究鲜有报道, 本课题组后续将对哈巴苷的体内代谢及其苷元的脱水产物进行结构鉴定和活性研究, 以揭示哈巴俄苷、哈巴苷的最终药效作用成分。

[参考文献]

[1] 薛刚强, 杜婧, 潘新艳, 等. 玄参化学成分研究[J]. 中药材, 2014, 37(9): 1597-1599.

[2] 张刘强, 李医明. 近 10 年玄参属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(11): 2360-2368.

[3] 李媛, 宋宝安, 杨松, 等. 中草药玄参化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(1): 47-51.

[4] 谢丽华, 刘洪宇, 钱瑞琴, 等. 哈巴苷与哈巴俄苷对阴虚小鼠免疫功能及血浆环化核苷酸的影响[J]. 北京大学学报, 2001, 33(3): 283-284.

[5] 华静, 戚进, 余伯阳. 玄参属植物中的环烯醚萜类化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 233-239.

[6] 蔡少青, 谢丽华, 王建华, 等. 中药玄参中哈巴俄苷和肉桂酸的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(3): 191-194.

[7] 魏庆华, 王勤. HPLC 测定增液承气口服液液中哈巴苷和哈巴俄苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 81-83.

[8] 张发科, 吕青涛, 张兆旺, 等. HPLC 法研究不同炮制工艺对玄参中哈巴俄苷和肉桂酸含量的影响[J]. 化学分析计量, 2006, 15(6): 51-53.

[9] WANG S J, RUAN J X, ZHAO Y H, et al. Simultaneous determination of harpagoside and cinnamic acid in rat plasma by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies[J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(1): 50-57.

[10] 宋晓晨, 陈林霖, 戚进, 等. 哈巴俄苷及其代谢产物在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(3): 262-265.

[11] 宫灿仪, 萧伟, 王振中, 等. 木通皂苷 D 在大鼠胃肠道内容物中的稳定性考察[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2311-2313.

[12] 孙桂霞, 赵园园, 苗培培, 等. 黄芪甲苷的生物样品稳定性考察及在大鼠体外肠菌中代谢转化研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4258-4264.

[13] 苗凤茹, 刘光宇, 林力. 延胡索总生物碱大鼠灌胃给药后入血成分的定性研究[J]. 中药实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 166-170.

[责任编辑 刘德文]