

胡黄连苦苷 II 大鼠在体肠吸收特征研究

高宏伟¹, 匡海学², 阎雪莹^{2*}

1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 研究胡黄连苦苷 II 在大鼠肠道各区段的吸收动力学特征、吸收部位。**方法** 采用大鼠在体肠循环灌流实验, 采用 HPLC 法对循环液中的胡黄连苦苷 II 进行分析, 研究其吸收部位和吸收动力学特征。**结果** 胡黄连苦苷 II 在肠道各部位的吸收速率常数 (K_a) 和表观渗透系数 (P_{app}) 按照空肠、回肠、十二指肠的顺序依次下降。**结论** 胡黄连苦苷 II 在肠道内无明显的特异吸收部位, 吸收呈现一级吸收动力学特征。

关键词: 胡黄连苦苷 II; 在体肠循环灌流; 吸收动力学; 高效液相色谱

中图分类号: R285.5; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)04-0284-03

Absorption characteristics of picroside II in rat intestine *in situ*

GAO Hong-wei¹, KUANG Hai-xue², YAN Xue-ying²

1. The first Attached Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the absorption kinetics of picroside II at different intestine segments of rats. **Methods** The intestine in rats was cannulated for *in situ* recirculation. Picroside II concentration in the flux was measured by the reversed phase HPLC. The absorption characteristics and sites of picroside II in intestine were researched. **Results** The absorption rate constant (K_a) and apparent permeability coefficient (P_{app}) in rats was descended as the order of jejunum, ileum, and duodenum. **Conclusion** The intestinal absorption for picroside II in rats had no specific absorption site. The absorption of picroside II in rat's intestine is a first-order process.

Key words: picroside II; *in situ* intestinal recirculating perfusion; absorption-kinetic; HPLC

胡黄连中的胡黄连苦苷 I~III、桃叶珊瑚苷和胡黄连苷具有保肝利胆及消炎作用, 其中胡黄连苦苷 II 能够降低 D-半乳糖胺和脂多糖所致的急性肝损伤时血清中丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶水平, 减少丙二醛的量, 增强超氧化物歧化酶的活性, 保护肝细胞损伤, 阻止肝细胞凋亡^[1-5]。虽然对胡黄连苦苷 II 的药理作用研究很多, 但其在肠道内的吸收机制却未见报道。本实验采用大鼠在体肠吸收模型, 建立了 HPLC 法测定肠循环液中胡黄连苦苷 II, 对其在大鼠各肠段的吸收动力学特征进行研究, 为其提供生物药剂学依据。

1 材料与仪器

胡黄连苦苷 II (自制, 质量分数为 96.86%),

乌拉坦 (上海曹阳第二中学化工厂), 苯酚红 (天津市新精细化工开发中心), 甲醇 (色谱纯, 美国 Dikma 公司), 其余试剂均为分析纯。

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪、Class-VP 6.0 工作站 (岛津公司), Sartorius BT25S 电子天平 (德国 Sartorius 公司), HJ-6A 型数显恒温磁力搅拌器 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), HL-3 恒流泵 (上海精科实业有限公司), pH 计 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), 722 型光谱可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司)。

清洁级 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体质量为 (200±20) g, 由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供, 许可证号: SCXK (黑) 2008004。

收稿时期: 2011-04-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600804)

作者简介: 高宏伟 (1979—), 男, 博士, 主管药师, 研究方向为药效物质基础研究。

*通讯作者 阎雪莹, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为缓控释制剂及天然药效成分的体内代谢。

2 方法与结果

2.1 Krebs-Ringers 肠循环灌流液的配制

将 NaCl 6.75 g/L、KCl 0.31 g/L、CaCl₂ 0.37 g/L、NaH₂PO₄ 0.22 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.29 g/L、NaHCO₃ 1.83 g/L、葡萄糖 2.2 g/L 溶解在双蒸水中，调溶液 pH 值至 7.4。

2.2 酚红的 UV 法测定

2.2.1 紫外测定波长的确定 取肠循环灌流液 0.5 mL，加 4.5 mL NaOH (0.2 mol/L)，以不加酚红的灌流液为空白对照，分别于 200~700 nm 波长进行扫描，酚红在 558 nm 处有最大吸收，其他成分在此处无吸收，故选定 558 nm 为酚红的测定波长。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称定酚红 6.25 mg，用空白循环灌流液定容至 25 mL。分别取 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL 定容至 25 mL，使酚红的终质量浓度为 5、10、20、40、60、80 μg/mL。取上述酚红溶液各 0.5 mL，加入 0.2 mol/L NaOH 溶液 4.5 mL 显色，于 558 nm 处测定吸光度 (A)，以 A 与酚红质量浓度进行回归，得回归方程 $A=0.0175C+0.0422$ ， $r=0.9993$ 。

2.3 胡黄连苦苷 II 的 HPLC 法测定

2.3.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，偶联 Dikma EasyGuard II C₁₈ 保护柱；流动相为甲醇-水 (38:62)；检测波长 267 nm；体积流量 1 mL/min；进样量 20 μL；柱温 35 °C。

2.3.2 专属性试验 取只加入酚红的肠灌流液和加入胡黄连苦苷 II 与酚红的灌流液，分别过 0.22 μm 微孔滤膜，进样 20 μL，测定，色谱图见图 1。可见肠循环灌流液中酚红对胡黄连苦苷 II 无干扰，色谱峰形良好。

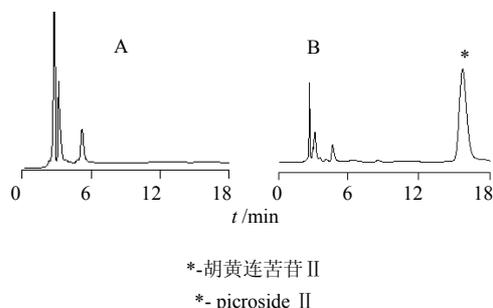


图 1 加酚红的空白 (A) 和酚红+胡黄连苦苷 II 的循环灌流液 (B) 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank added phenolsulfonphthalein solution (A) and phenolsulfonphthalein + picroside II recirculating perfusion solution (B)

2.3.3 标准曲线的绘制 精密称定胡黄连苦苷 II 2.72 mg，用经肠循环 2 h 的灌流液定容至 25 mL，按倍数稀释成 8.704、13.056、17.408、21.76、43.52、65.28 μg/mL 系列溶液，0.45 μm 微孔滤膜滤过，进样 20 μL，测定，所得峰面积与质量浓度进行线性回归，得回归方程 $Y=22806X+16731$ ， $r=0.9998$ 。

2.3.4 精密度试验 配制高、中、低 3 个质量浓度的胡黄连苦苷 II 与酚红溶液，每个质量浓度取 3 个样品，于 1 d 内重复测定 5 次，计算日内精密度；每个质量浓度取 3 个样品，每日测定 1 次，连续测定 5 d，计算日间精密度。见表 1。

表 1 精密度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Results of precision test ($\bar{x} \pm s, n=3$)

试验	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)		RSD/%
	样品	测定值	
日内	2.38	2.38±0.034	1.43
	23.80	24.32±0.600	2.49
	47.60	46.73±0.901	1.94
日间	2.38	2.29±0.067	2.94
	23.80	24.03±0.610	2.53
	47.60	47.11±0.54	1.13

2.3.5 稳定性试验 分别取胡黄连苦苷 II 适量，用灌流液稀释至 8.70、17.41、43.52 μg/mL，置 (37±0.5) °C 水浴中，不断搅拌 10 min，分别于 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 取样，测定峰面积，计算得 RSD 分别为 4.05%、6.31%、5.53%。

2.3.6 回收率试验 用空白灌流液配制肠循环灌流液，其中胡黄连苦苷 II 质量浓度 15 μg/mL，酚红的质量浓度为 20 μg/mL，置 (37±0.5) °C 温水浴中保温，加入胡黄连苦苷 II 与酚红，重复测定 3 次，计算得平均回收率为 99.63%，RSD 为 1.87%。

2.4 大鼠在体肠循环灌流实验

用空白灌流液配制含 20.9、21.8、17.8 μg/mL 胡黄连苦苷 II，15 μg/mL 酚红的供试液，作为实验药液。37 °C 水浴，搅拌。

选取健康合格 Wistar 大鼠，实验前禁食不禁水 12 h，ip 10% 乌拉坦 10 mL/kg，麻醉，仰卧，固定，沿腹中线打开腹腔，结扎胆总管。分别选取十二指肠 (距离胃的幽门 1.5 cm 处开始 15 cm)，空肠 (距离胃的幽门 25 cm 处开始 15 cm)、回肠部位 (距离盲肠上行 15 cm) 作为肠循环灌流部位。在选定肠段两端剪开小口，分别插入软管，扎紧，连接蠕动泵，使“肠段-软管-泵”形成一个闭合回路。

开启恒流蠕动泵,用空白灌流液清洗肠腔至流出液清澈无脏物,泵入空气排净管中液体,然后泵入药液,灌流速度为 2 mL/min,循环 10 min 后从储液罐中取样 3 mL 开始计时,30 min 取肠循环灌流液,测定酚红和胡黄连苦苷 II 质量浓度,计算循环灌流液中剩余的药量,以剩余药量的对数对取样时间进行线性回归,得回归方程。十二指肠: $Y = -0.0201X + 3.3214$ ($r=0.98$),空肠: $Y = -0.0623X + 3.3597$ ($r=0.98$),回肠: $Y = -0.0603X + 3.2459$ ($r=0.99$)。吸收速率常数 (K_a) 分别为 0.0201、0.0623、0.0603 h^{-1} 。

因此胡黄连苦苷 II 在大鼠小肠吸收速率大小顺序为:空肠>回肠>十二指肠,对数据进行方差齐性检验及两两组间 t 检验,结果十二指肠、空肠、回肠的吸收速率差异均无显著性,表明胡黄连苦苷 II 在大鼠小肠中并无特异的吸收部位;根据剩余药量的对数对取样时间的回归方程中 r 均大于 0.9,表明药物浓度在肠道各部位的下降与循环时间呈线性关系,提示胡黄连苦苷 II 在大鼠小肠中吸收属于动力学为一级吸收。相关参数见表 2。

药物表观渗透系数 (P_{app}) = $K_a A$ (小肠面积 cm^2) / 时间 (3 600 s)

表 2 胡黄连苦苷 II 大鼠肠吸收动力学的参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Intestinal absorption dynamics parameter of picroside II in rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

部位	$K_a/(h^{-1})$	$t_{1/2}/h$	每小时吸收分数	$P_{app}/(\times 10^{-7}, cm^2 \cdot s^{-1})$	最大吸收率/%
十二指肠	0.020 ± 0.0034	35.46 ± 6.74	0.042 ± 0.0066	5.13 ± 1.45	12.43 ± 1.99
空肠	0.062 ± 0.0086	10.57 ± 1.57	0.110 ± 0.0150	11.30 ± 3.85	33.45 ± 4.55
回肠	0.060 ± 0.0063	11.39 ± 0.98	0.130 ± 0.0160	14.80 ± 6.05	38.16 ± 4.84

根据文献报道^[6],大鼠表观渗透系数 $P_{app} < 3 \times 10^{-6} cm^2/s$ 和 $> 2 \times 10^{-5} cm^2/s$ 分别表示药物难以吸收和易于吸收,胡黄连苦苷 II 在十二指肠、空肠、回肠中的 P_{app} 分别为 5.13×10^{-7} 、 1.13×10^{-6} 、 $1.48 \times 10^{-6} cm^2/s$,提示其在肠道中难以被吸收。

3 讨论

小肠是口服制剂的主要吸收部位,研究表明大鼠小肠吸收模型与人类小肠吸收模型相似,大鼠小肠吸收模型所得的数据可用于人类小肠的预测^[7-8]。

本实验采用单向灌流对胡黄连苦苷 II 的肠吸收进行了研究,肠段的灌流方法基于灌流前后肠腔内药物浓度的变化,由于小肠不仅吸收药物,同时也吸收或分泌水分导致灌流液的体积变化,通过测定苯酚红的浓度进行校正。

中药的成分复杂,许多中药口服后,其“药效成分”不能或很少直接吸收入血,造成生物利用度低,但药理学研究表明许多中药对机体确实具有不可否认的药理作用,这提示需要明白中药的真正药效物质基础,进而了解其发挥作用的机制。已有文献报道^[9],许多中药成分在胃肠道中发生代谢反应,致使难以从生物样品中检测其原型。胡黄连苦苷 II 在结构上属于环烯醚萜糖苷类化合物,性质不稳定,但其确有保肝利胆的药理作用。实验显示其

几乎不被吸收,这就提示胡黄连苦苷 II 起效的可能不是原型药物,而是其在肠道中的代谢产物,其在体内的具体代谢行为还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 周美丽,李后涛,刘杰,等.胡黄连苷对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用[J].齐鲁药事,2006,11(25):681.
- [2] 颜大华,张朝晖,禹道春,等.胡黄连总苷对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用[J].南京军医学院学报,2002,(3)24:145-146.
- [3] 王晓燕,庞建新.胡黄连总苷对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J].广西医科大学学报,2002,19(4):524.
- [4] Gao H, Zhou Y W. Inhibitory effect of picroside II on hepatocyte apoptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(6): 729-736.
- [5] 周菲,倪健. HPLC 法测定市售胡黄连中胡黄连苷 I 和黄连苷 II [J]. 中草药,2010,41(4):658-660.
- [6] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [7] 程锦,狄留庆.在体肠段灌流模型在中药吸收研究中的应用[J].中国中医药信息杂志,2008,15(2):98-100.
- [8] 朱容慧,赵军宁,毕岳琦,等.中药肠吸收动力学的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(1):25-29.
- [9] 杨秀伟,郝美荣,服部征雄.中药成分代谢分析[M].北京:中国医药科技出版社,2003.