

试验,可以得到各重金属的脱除率分别为 55.2%、59.2%、52.0%。表 5 的结果表明,超临界配合萃取后橘红中的重金属量可达到 FDA 标准。

表 4 最佳工艺的萃取效果

Table 4 Extractive effects under optimum technics

重金属	萃取前的量/ (mg · kg ⁻¹)	萃取后的量/ (mg · kg ⁻¹)	FDA 标准/ (mg · kg ⁻¹)	脱除率 /%
Cu	18.28	8.19	<20.0	55.2
Pb	3.296	1.34	<3.0	59.2
As	0.353	0.166	<0.2	53.0

3 结论

在本实验中使用 NaDDC 作为超临界 CO₂ 萃取橘红中重金属的配合剂,研究了压力、温度及配合剂用量对重金属萃取效率的影响。采用 L₉(3⁴) 正交表设计试验,确定了最佳萃取条件,萃取后的药材中重金属的量显著下降,为降低中药材中重金属开辟了一条新的思路和研究方法。通过实验研究得到超临界 CO₂ 萃取橘红中的重金属的较佳萃取条件为压力 25 MPa、温度 60 ℃、配合剂量 2 g、萃取时间 3 h;压力对铜的萃取影响很大,随着压力增大,萃取率增大;温度对各离子的萃取率影响都很大;萃取时间对铜的萃取率影响较大,但对砷、铅的影响不明显。

就超临界 CO₂ 萃取中药中重金属,笔者认为今

后的工作应从以下两个方面入手:一是对配合萃取本身的机制的研究,通过选用适宜的配合剂与改性剂,取得更多的热力学与动力学数据,建立超临界流体萃取重金属的理论模型;二是对样品的研究,从重金属形态与基体的角度进行研究,一方面可以提高萃取的选择性与效率,一方面可以在保持中药有效药性的前提下,将有毒重金属萃出,降低其量,才能使配合萃取重金属的科研有意义。

References:

- [1] Xu L Y, Tao J S, Feng Y. Review of the development and manufacture of Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22 (1): 6-21.
- [2] Wen Z, Dang Z, Yu S D, et al. Research progress of supercritical carbon dioxide fluid extraction of heavy metals [J]. *Prog Chem* (化学进展), 2001, 13 (4): 310-314.
- [3] Liang P, Hu B, Chen H, et al. Study on determination of trace elements in traditional Chinese medicine by ICP-MS with microwave digestion [J]. *Chin J Spec Lab* (光谱实验室), 2001, 18 (4): 509-512.
- [4] Cui H Y, Shen Z Y, Wang T. Supercritical CO₂ chelating extraction of metal ions and its effecting factors [J]. *Environ Protec Chem Ind* (化工环保), 2000, 20 (4): 14-19.
- [5] Osawa K, Matsumoto T, Maruya M T, et al. Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria [J]. *Bull Tokyo Dent Coll*, 1990, 31 (1): 17-21.
- [6] Nicholson F A, Smith S R, Alloway B J, et al. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales [J]. *Sci Total Environ*, 2003; 205-219.
- [7] Robert W, Peters C. Extraction of heavy metals from contaminated soils [J]. *J Hazard Mater*, 1999, 66: 151-210.

肠内菌群对积雪草苷的代谢转化研究

翁 骏, 吕秋军*, 田 瑛, 张 敏, 卞广兴, 温利青

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘 要:目的 通过离体、在体实验研究大鼠肠道内菌群对积雪草苷的代谢作用,并确定代谢产物的化学结构。方法 将积雪草苷加入大鼠肠内细菌的菌酶溶液中,温孵一定时间后,以 TLC 和 LC-MS 法检测体外实验代谢产物,LC-MS 法检测在体实验大鼠尿、血中的代谢产物。结果 发现了 3 个积雪草苷的代谢产物,鉴定了代谢产物的结构。结论 积雪草苷可被大鼠肠内菌群代谢,原形物和代谢产物均为吸收入血成分。

关键词:积雪草苷;肠内菌群;代谢物

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)07-1008-04

Metabolism and transformation of asiaticoside by intestinal flora

WENG Jun, LÜ Qiu-jun, TIAN Ying, ZHANG Min, BIAN Guang-xing, WEN Li-qing

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Key words: asiaticoside; intestinal flora; metabolites

积雪草苷(asiaticoside)为五环三萜类皂苷,是 伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 的

收稿日期:2005-09-23

作者简介:翁 骏(1978—),男,北京市人,在读硕士生,研究方向为新药筛选。E-mail: wengjunpharm@hotmail.com

*通讯作者 吕秋军 Tel: (010) 66932201 E-mail: lqj66@yahoo.com.cn

主要活性成分,可刺激成纤维细胞的胶原合成^[1],临床用于促进创伤愈合^[2]、治疗麻风病^[3]和溃疡^[4]。笔者发现积雪草苷有其他显著在体药理活性,但其口服生物利用度很低。因此用离体方法研究大鼠肠道菌群对积雪草苷的代谢作用,并检测积雪草苷口服后吸收入血的成分,以期阐明其发挥药效的物质基础。

1 实验材料

SD 雄性大鼠(200~250 g)购自军事医学科学院实验动物中心,清洁级。积雪草苷(Fluka,质量分数 $\geq 98.5\%$)。

Waters 2695 高效液相色谱仪,Waters 2487 UV 检测器;Finnigan MAT 公司 LCQ 液相色谱-电喷雾质谱仪;Shiseido Capcell pak C₁₈反相色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);THZ-95 型台式恒温振荡培养箱;固相萃取柱 ASI SepedTM C₁₈/18 (100、500 mg);Millipore 超纯水系统。

色谱用硅胶 GF254(青岛海洋化工有限公司);乙腈(Fisher Scientific);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);厌氧培养液^[5][37.5 mL A 液(0.78% K₂HPO₄)和 37.5 mL B 液(0.47% K₂HPO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄·H₂O, 混匀,再加入 0.5 g L-半胱氨酸,2 mL 25% L-抗坏血酸,50 mL 8% Na₂CO₃,牛肉膏 1 g,蛋白胨 1 g,营养琼脂 1 g,加蒸馏水至 1 L,最后调 pH 7.5~8.0];人工胃液和人工肠液按《中国药典》2005 年版配制。

2 实验方法

2.1 制备微生物粗酶悬浮液^[6]

2.1.1 厌氧菌株的活化:取一段大鼠的结肠,取出新鲜粪便,按 2 g:19 mL 的比例加入厌氧培养液中得肠菌培养液。在无菌条件下,从厌氧菌贮备液内取出 20 μ L 菌液,加到 10 mL 新的厌氧培养液中,然后在 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h。

2.1.2 厌氧菌株的预培养:在无菌条件下,从活化的厌氧菌液中取出 0.1 mL 菌液,加入到 10 mL 新的厌氧培养液,然后在 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h。

2.1.3 厌氧菌株的扩大培养:在无菌条件下,从预培养的厌氧菌液中取出 1 mL 菌液,加到 100 mL 新的厌氧培养液中,然后在 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h,备用。

2.1.4 微生物粗酶的提取:将扩大培养的厌氧菌液在 7 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min;倾去上清液,沉淀用 0.9% NaCl 溶液悬浮,然后在 7 000

r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下再次离心 10 min。弃去上清液,将沉淀用 21 mL 0.2 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液悬浮,即得微生物粗酶的悬浮液。用 Bladford 法测定微生物粗酶的蛋白质质量浓度为 515.7 μ g/mL。

2.2 积雪草苷体外代谢产物的制备和提取:将微生物粗酶的悬浮液分成两份,各 10 mL,分别加入积雪草苷使质量浓度为 0.1 mg/mL,37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中振荡培养,于 24、48 h 取出后加入 10 mL 冷乙腈终止反应。涡旋振荡 30 s 后以 4 500 r/min 离心 3 min 沉淀蛋白。N₂ 吹去上清液中乙腈,剩余液体用 500 mg 固相萃取柱萃取。甲醇洗脱液用 N₂ 吹干,然后以流动相 1 mL 重建得样品,滤过后进 LC-MS 分析。同时以温孵粗酶空白溶液和药物的磷酸盐缓冲液(0.1 mg/mL) 48 h 作为对照。

2.3 LC-MS 和 TLC 法检测条件

2.3.1 色谱条件:检测波长为 204 nm,体积流量为 1 mL/min,柱温 26 $^{\circ}$ C,流动相 A 为乙腈,流动相 B 为含 10%乙腈的水溶液。梯度洗脱程序:0~25 min, A:12% $\rightarrow$ 50%, B:88% $\rightarrow$ 50%;25~30 min, A:50%, B:50%;30~40 min, A:50% $\rightarrow$ 12%, B:50%~88%。

2.3.2 质谱条件:负离子检出模式;喷雾电压 4.5 kV,鞘气(N₂)流速:50 arb,辅助气(He):5 arb;毛细管温度:320 $^{\circ}$ C;毛细管电压:12 V;扫描范围 300~1 200。

2.3.3 TLC 法检测条件:硅胶板硅胶厚度约为 0.25 mm,展开溶剂系统为氯仿-甲醇-水(65:35:10);醋酐-浓硫酸-无水乙醇(1:1:10)显色。

2.4 积雪草苷在人工胃液和人工肠液的稳定性考察:精密称取积雪草苷 1.0 mg,加入 20 μ L DMSO 溶解,与 10 mL 37 $^{\circ}$ C 人工胃液充分混合,在 0、1、2、3、4 h 点各取 1 mL,以三氯醋酸沉淀蛋白,上清液用 100 mg 固相萃取柱萃取,甲醇洗脱液挥干后以流动相 1 mL 重建得样品,滤过后进 HPLC 分析。同法,将积雪草苷与人工肠液共温孵,于 0、4、8、12、24 h 取样 1 mL,前处理后 HPLC 分析。以 0 h 组测得的积雪草苷的量为 100%,依据各组峰面积与 0 h 组的峰面积之比求出经一段时间后未变化的积雪草苷占原加入药物的比例。

2.5 在体实验方法:大鼠于代谢笼中饲养 7 d,适应周围环境后收取空白尿液。禁食 12 h,灌胃积雪草苷,剂量为 50 mg/(kg $\cdot$ d),期间自由饮用糖盐水,24 h 内收集尿液。第 2 次给药后 6 h 用乙醚麻醉大鼠,腹主动脉取血约 5 mL,分离得血浆。血浆和尿液

以等量 10% 三氯醋酸沉淀蛋白后用 C_{18} 固相萃取柱萃取, 收集甲醇洗脱液, 挥干后以流动相溶解残渣, 滤过, 取滤液进行 LC-MS 分析。

3 实验结果

3.1 离体培养肠道菌对积雪草苷的代谢转化作用

3.1.1 TLC 检测结果: 见图 1。薄层色谱检查结果表明 24 h 后, 除原形物外另外检出 3 个代谢物斑点; 48 h 后, 原形物不能用薄层色谱法检出, 仍出现 3 个代谢物斑点。

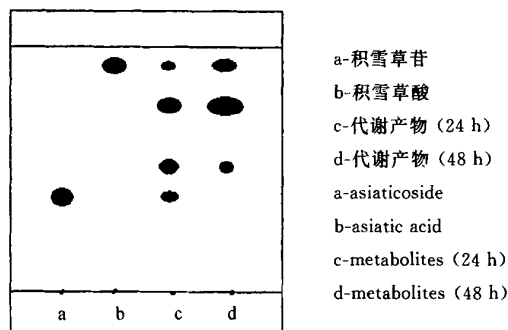


图 1 积雪草苷及其代谢产物的 TLC 图谱

Fig. 1 TLC Chromatogram of asiaticoside and its metabolites

3.1.2 LC-MS 检测结果: 由于积雪草苷和其苷元积雪草酸极性相差很大, 为了得到满意的分离结果, 采用乙腈和含 10% 乙腈的水溶液为洗脱溶剂进行梯度洗脱。见图 2, 检测 30 min, 积雪草苷各代谢产物分离结果较好, 与对照品对照可知 10.66 min 峰为积雪草苷, 25.08 min 处为苷元积雪草酸。对样品进行一级质谱全扫描, 大部分产物在负离子模式下响应较好。将积雪草苷置磷酸盐缓冲液温孵 48 h

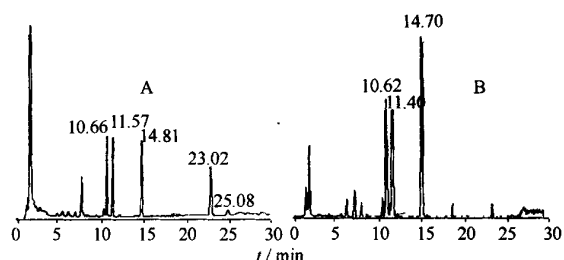


图 2 积雪草苷与大鼠肠道菌酶温孵 24 h 后液相色谱图(A)和负离子模式下总离子流图(B)

Fig. 2 LC-UV Chromatogram (A) and negative ion total ion current chromatogram (B) of asiaticoside and its metabolites formed following incubation with enzymes of intestinal flora for 24 h

后, 无其他产物生成。

各时间点色谱峰的质谱检测结果为: 10.66 min 处出峰物质 m/z 957.71 为积雪草苷的准分子离子峰 $[M-H]^-$; 11.37 min 处 m/z 811.53 为失去 1 个端基鼠李糖; 14.81 min 处 m/z 649.42 为失去 1 个葡萄糖和 1 个鼠李糖; 25.08 min 处 m/z 487.37 为积雪草酸, 生成量少, 其在正离子和负离子模式下响应值都较低, SIM 模式下可检出; 其他时间点出峰由 TLC 图谱和菌酶空白图谱予以排除。

3.2 积雪草苷在人工胃液和人工肠液中的稳定性: 以 0 h 时积雪草苷的量为 100%, 在人工胃液中温孵 4 h 和在人工肠液中温孵 24 h 后, 剩余率均大于 98%。胃液和肠液对积雪草苷基本无影响。

3.3 大鼠在体实验代谢转化测定结果: 见图 3。

在体实验表明, 大鼠口服积雪草苷吸收较差, 尿

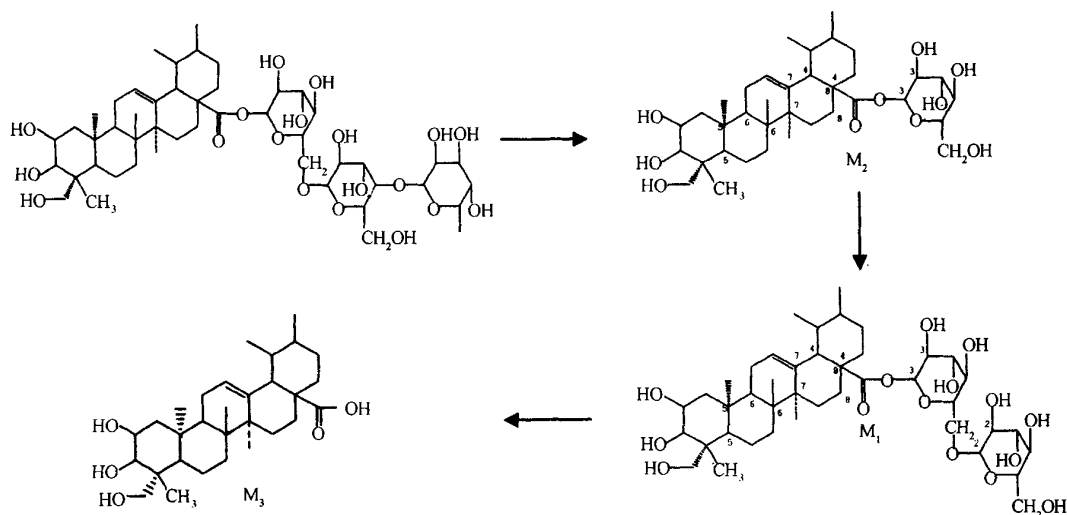


图 3 积雪草苷经大鼠肠内菌群代谢途径

Fig. 3 Metabolic route of asiaticoside by intestinal flora in rats

液和血液均需较大程度浓缩后才能检出。口服积雪草苷后,能在尿液中检测到原形物、代谢产物 M1、代谢产物 M2、代谢产物 M3(苷元);在血液中检测到原形物、代谢产物 M1、M2。血液中未检测到苷元积雪草酸可能是由于得量太少,低于质谱检测限。实验结果表明,积雪草苷在大鼠体内经代谢后可生成 3 种代谢产物,部分原药和代谢产物吸收入血,经尿液排出。

4 讨论

国内文献中对天然药物的肠道细菌代谢研究多采用将药物直接加入肠细菌培养液中温孵,再经过有机相反复提取和处理后进行分析,但此法培养液中的杂质不易除去,对分析仪器和结果解释都造成很大影响。本实验采用肠菌粗酶与积雪草苷共孵育,克服了上述缺点,结合 TLC 和 LC-MS 法给出明确色谱和质谱图,阐明肠道菌群对积雪草苷的代谢转化行为,用药量小且重现性很好。

从本实验结果可知积雪草苷可以在肠道内被代谢,皂苷糖基应是由肠内菌分泌的苷键水解酶系水解。推测积雪草苷在肠道内的代谢呈阶梯式,糖基逐个被水解,直至全部转化为苷元。在本实验室另外的实验中,大鼠肝脏微粒体对积雪草苷及其苷元积雪

草酸不产生代谢转化,预测积雪草苷进入体内除糖基水解外无其他代谢作用,无首关效应,积雪草苷和其代谢产物进入血液循环,共同发挥药效作用。

综上所述,积雪草苷口服后会被肠道菌群所代谢。代谢产物随着端基糖的失去相对分子质量和极性逐渐减小,吸收可能会有所变化,但吸收入血的量和代谢产物对发挥药效的贡献大小还需进一步研究。

References:

- [1] Bonte F, Dumas M, Chaudagne, C, et al. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis [J]. *Planta Med*, 1994, 60 (2): 133-135.
- [2] Viala A, Cano J P, Duranid A, et al. Study in animals of transcutaneous penetration of labeled active principles of the titrated extract of *Centella asiatica* applied on the skin in two topical forms [J]. *Therapie*, 1977, 32 (5): 573-584.
- [3] Babu T D, Kuttan G, Padikkala J. Cytotoxic and antitumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) [J]. *Urban J Ethnopharma-Col*, 1995, 48: 53-57.
- [4] Etrebi A, Ibrahim A, Zaki K. Treatment of ulcer bladder with asiaticoside [J]. *J Egypt Med Assoc*, 1975, 58 (5-6): 324-327.
- [5] Kyoichi K, Teruaki A. Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides [J]. *Bioscience Microflora*, 1997, 16 (1): 1-3.
- [6] Yang X W, Hao M R, Masao. *Metabolite Analysis for Chemical Constituents of Chinese Materia Medica* (中药成分代谢分析) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2003.

氮酮和油酸增强黄芩苷经皮渗透作用的研究

杨巧丽¹, 周雪琴^{1,2*}, 张志慧¹, 王雷³, 王学艳³, 刘东志², 姚康德¹

(1. 天津大学高分子材料研究所, 天津 300072; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072;

3. 天津市长征医院 药剂科, 天津 300021)

摘要:目的 研究氮酮、油酸及两者配伍对黄芩苷透皮吸收的促进作用。方法 透皮吸收研究以改进型 Franz 扩散池为模型,采用 HPLC 法测定黄芩苷透过量,以均匀设计法考察氮酮、油酸及两者配伍对黄芩苷透皮吸收的影响。结果 氮酮体积分数为 10% 时,黄芩苷 24 h 累积透过量为 466.11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,油酸体积分数为 14% 时,24 h 累积透过量为 77.34 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,氮酮与油酸以 10% : 0.5% 配伍后 24 h 累积透过量为 641.88 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,促渗性能为 146.69。结论 氮酮和油酸对黄芩苷的透皮吸收均有促进作用,两者配伍可产生协同促进作用,氮酮与油酸以 10% : 0.5% 配伍后促渗效果最好。

关键词:黄芩苷;氮酮;油酸;透皮吸收

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)07-1011-03

Enhancement of baicalin percutaneous penetration by azone and oleic acid

YANG Qiao-li¹, ZHOU Xue-qin^{1,2}, ZHANG Zhi-hui¹, WANG Lei³,

WANG Xue-yan³, LIU Dong-zhi², YAO Kang-de¹

收稿日期:2005-09-30

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(033610411)

作者简介:杨巧丽(1981-),女,河北省石家庄市人,天津大学硕士研究生,研究方向为药物经皮渗透。

Tel: (022) 27400911 E-mail: xiaozhaoy@eyou.com

* 通讯作者 周雪琴