

桂皮醛在大鼠肠中的体外代谢转化研究

何平均¹, 李凯鹏², 杨 洁¹, 杨丽娟¹, 张玉杰^{1*}

(1 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2 中日友好医院 药剂科, 北京 100029)

摘要:目的 考察桂皮醛在大鼠离体小肠中的代谢转化特性及黄连对其代谢的影响。方法 RP-HPLC 法测定桂皮醛及其代谢产物肉桂酸; 考察不同浓度桂皮醛在大鼠离体小肠提取液、小肠组织匀浆液中的代谢动力学及黄连对其代谢的影响。结果 桂皮醛在各种大鼠离体小肠液中均可被迅速代谢, 主要代谢产物为肉桂酸; 小肠各提取液对桂皮醛的代谢速率存在差异; 桂皮醛浓度越低, 代谢速率越快; 黄连对桂皮醛的大鼠小肠代谢存在明显抑制作用。结论 桂皮醛在大鼠小肠中可迅速被代谢, 主要代谢产物为肉桂酸; 黄连对桂皮醛代谢具有抑制作用。

关键词: 桂皮醛; 代谢; 黄连; 肉桂酸

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-2014-05

In vitro metabolic transformation characteristics of cinnamaldehyde in rat intestine

HE Ping-jun¹, LI Kai-peng², YANG Jie¹, YANG Li-juan¹, ZHANG Yu-jie¹

(1 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Department of Pharmacy, China Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective To research the *in vitro* biotransformation characteristics of cinnamaldehyde in rat intestine and the influence of *Coptis chinensis* on its metabolism. **Methods** RP-HPLC Method was applied for analyzing the content of cinnamaldehyde as well as its metabolite cinnamic acid. The stability of cinnamaldehyde in extracts of rat small intestinal mucosa side, serosal side, and homogenate was investigated, respectively. Also the impact of *C. chinensis* on this process was estimated. **Results** The results showed that cinnamaldehyde in rat intestine was unstable and could rapidly be transformed into cinnamic acid. *C. chinensis* had inhibition on cinnamaldehyde metabolism. **Conclusion** Cinnamaldehyde could be metabolized in rat different intestinal extracts immediately and the main metabolite is cinnamic acid. *C. chinensis* shows inhibiting effect on the cinnamaldehyde metabolism.

Key words: cinnamaldehyde; metabolism; *Coptis chinensis* Franch.; cinnamic acid

桂皮醛是肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的主要成分, 具有广泛的药理活性, 包括降压、解热、镇痛、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗血小板聚集和抗凝血等多种药理作用, 具有广泛的临床应用和开发前景^[1-2]。此外, 桂皮醛还是一种良好的吸收促进剂, 具有促进药物透皮吸收和提高药物血药浓度的作用, 肉桂油作用于皮肤后, 可使黄芩苷的渗透系数、增渗倍数均增大^[3]; 桂皮醛还可以改善芍药苷的生物利用度^[4]。但桂皮醛不稳定, 在体内和皮肤吸收过程可发生代谢转化, 在皮肤转化过程中的产物主要为肉桂醇及肉桂酸^[5], 而肉桂醇和桂皮醛在皮肤不同的亚片段代谢方式也不同, 细胞液可能是肉桂主要成分代谢的主要场所, 醇脱氢酶及醛脱氢酶抑制剂 4-甲基吡唑和双硫仑对其在皮肤匀浆及胞浆代谢有明显的抑

制作用; iv 给药后桂皮醛在血浆内立刻被氧化为肉桂酸; 口服后尿液中可检测到多种酸性代谢产物, 尿中主要代谢物为马尿酸 (hippuric acid)^[6,7]。

肉桂与黄连配伍组成著名方剂“交泰丸”。研究表明, 肉桂能增强黄连在大鼠小肠吸收^[8], 为了研究黄连对肉桂主要成分在小肠吸收的影响, 针对肉桂主要成分桂皮醛在大鼠小肠内不稳定, 迅速代谢为肉桂酸的性质, 初步探讨黄连对肉桂主要成分桂皮醛在大鼠小肠代谢影响。由于中药常以口服形式给药, 肠道吸收是影响药物发挥作用的首要因素, 肠道中大量的代谢酶和微生物可加速药物的代谢。因此了解桂皮醛在肠道内的代谢转化特点, 进而阐明肉桂的体内作用的物质基础, 为进一步研究桂皮醛及肉桂与其他药物的相互作用具有重要意义。

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672585)

作者简介: 何平均 (1982—), 女, 湖南人, 硕士, 研究方向为中药药理学。Tel: (010) 84738618 E-mail: fenxi811@126.com

* 通讯作者 张玉杰 Tel: (010) 84738618 Fax: (010) 84738611 E-mail: zhyj227@126.com

1 仪器与试药

1.1 仪器: Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括四元梯度洗脱系统, 在线脱气机, DAD 型检测器, Agilent 色谱工作站, 7725i 手动进样器; ER-182A 型精密电子天平 (日本 A&D 公司); DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器 (江苏太仓市实验设备厂); F8 型超细匀浆机 (德国 FLUKO); Biofuge stratos 台式高速冷冻离心机 (德国 Heraeus 公司); G-16 型高速离心机 (北京白洋离心机厂)。

1.2 药品与试剂: 黄连药材为市售, 经北京中医药大学陈玉亭教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎; 桂皮醛、肉桂酸对照品 (批号分别为 110786-200803、110710-200814, 供定量测定用) 购于中国药品生物制品检定所; 乙腈

为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物: SD 大鼠, 雄性, 体质量 (250 ± 10) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物饲养生产合格证号: SCXK (京) 2007-0001。

2 方法与结果

2.1 桂皮醛测定: HPLC 色谱条件为 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A-0.1% 磷酸, B-乙腈; 洗脱程序: 0~3 min, 36% B; 3~9 min, 36%~46% B; 9~11 min, 46%~36% B。体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 284 nm。在此条件下, 桂皮醛与代谢物分离良好, 空白肠液、黄连对桂皮醛及肉桂酸的测定无干扰, 该色谱条件可用于肠液中桂皮醛、肉桂酸定量测定, 见图 1。

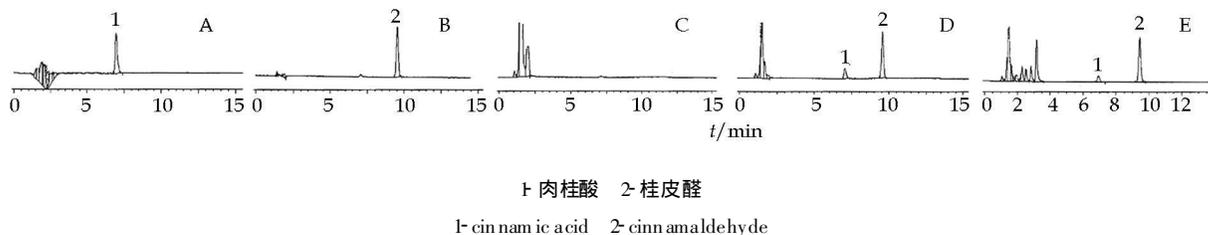


图 1 对照品 (A 肉桂酸, B 桂皮醛) 和桂皮醛大鼠肠液样品 (C 空白肠匀浆液, D 样品肠匀浆液, E 加入黄连的样品肠匀浆液) HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A cinnamic acid, B cinnamaldehyde) and sample (C blank intestinal homogenate, D sample in intestinal homogenate, E sample with *C. chinensis* in intestinal homogenate)

2.2 溶液的制备

2.2.1 Ringer's 液的配制: 精密称取氯化钠 7.3 g, 氯化钾 0.37 g, 磷酸二氢钠 0.187 g, 碳酸氢钠 0.84 g, D-葡萄糖 2.178 g, 加水 600 mL 使溶解, 另取氯化钙 0.154 g, 加入适量使之溶解, 使两液混合后加水稀释至 1 000 mL 即得 Ringer's 液。

2.2.2 桂皮醛对照品溶液的配制: 精密称取桂皮醛对照品适量, 加 Ringer's 液配制成高、中、低 (1 330、66.8、2.94 μg/mL) 3 个质量浓度桂皮醛对照品溶液。

2.2.3 黄连提取液的制备: 参照黄连配伍肉桂中黄连与桂皮醛质量浓度的关系, 制备不同质量浓度的黄连提取液。称取 6.00 g 黄连加入 8 倍水浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 浓缩并定容至 20 mL。

2.2.4 大鼠小肠液的制备: 取大鼠, 禁食 24 h, 待用 25% 乌拉坦 ip 麻醉, 打开腹腔, 从 Treitz 韧带以下 5 cm 取小肠肠段 50 cm, 取出后用 Ringer's 液洗净小肠黏膜侧, 直至无污物, 将其剪成 10 cm 的肠段, 将肠段翻转, 结扎两端, 放入盛有 50 mL Ringer's 液的三角瓶中, 置于 (37 ± 1) °C 的恒温震

荡仪中, 震荡提取 30 min, 倾出, 即为黏膜提取液。将剪成 10 cm 的肠段, 不翻转, 结扎两端, 余步骤同上, 作为浆膜提取液。取肠段按 1:5 加 Ringer's 液于 4 °C 匀浆, 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 即为肠匀浆液。上述各提取液用考马斯亮蓝测定蛋白量分别为: 黏膜提取液 0.616 g/L, 浆膜提取液 0.262 g/L, 匀浆液 9.46 g/L。各提取液 -80 °C 保存, 备用。

2.3 桂皮醛测定方法的建立

2.3.1 标准曲线的绘制: 精密称取桂皮醛对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度为 0.117、0.587、1.17、2.35、4.70、9.40、18.8、47.0 μg/mL 的系列溶液, 分别进样 10 μL, 测定, 以峰面积对桂皮醛质量进行线性回归, 得标准曲线方程 $Y = 5420.6X - 5.368$, $r = 0.9999$, 线性范围为 0.00117~0.47 μg。

2.3.2 精密度试验: 精密吸取 4.70 μg/mL 桂皮醛对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 测定, 桂皮醛峰面积的 RSD 为 0.83%。

2.3.3 回收率试验: 精密吸取 66.8 μg/mL 桂皮醛对照品溶液 5 份, 加入大鼠肠匀浆液中, 并立即加

入 0.1 mol/L HCl 终止反应,测定,计算桂皮醛回收率,平均回收率为 103.44%,RSD 为 2.47%。

2.3.4 稳定性试验:按“回收率试验”方法制备桂皮醛样品液并加入等体积 0.1 mol/L HCl 终止反应,混匀,分别于 0、1、3、6、9、12 h 进样 10 μL,测定桂皮醛峰面积。桂皮醛在加入等体积 0.1 mol/L HCl 后较稳定,12 h 后质量浓度降为初始质量浓度的 92.27%。

2.4 桂皮醛在大鼠小肠液中的代谢:精密吸取高、中、低 (1 330、668、2.94 μg/mL) 3 个质量浓度的桂皮醛对照品溶液各 400 μL,分别加入大鼠肠黏膜提取液或浆膜提取液 3、6 mL,每组 3 份,(37±1) °C 恒温振荡器中孵育,分别于 0、5、10、15、30、60 min 取样 100 μL,立即加入 0.1 mol/L HCl 100 μL,混匀,测定桂皮醛。同时向孵育液中补充 100 μL 小肠黏膜提取液或浆膜提取液。以桂皮醛剩余率表示药物在肠液中代谢情况(将 0 min 时间点的药量作为 100%),同时测定肉桂酸增加率,再分别以桂皮醛剩余率及肉桂酸增加率的自然对数对时间作图,结果见图 2 和 3。

分别精密吸取高、中、低 (1 330、66.8、2.94 μg/mL) 3 个质量浓度桂皮醛样品溶液 400 μL,各 3

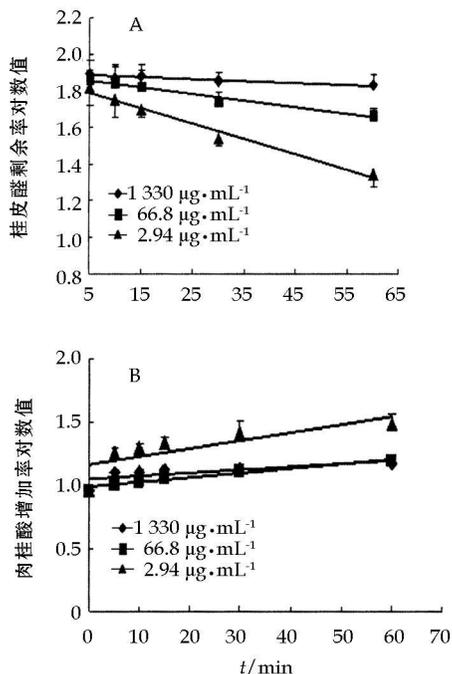


图 2 大鼠小肠黏膜提取液中桂皮醛的代谢 (A) 和肉桂酸的生成 (B) (n=3)

Fig. 2 Metabolism of cinnamaldehyde (A) and production of cinnamic acid (B) in rat intestinal mucosa extract (n=3)

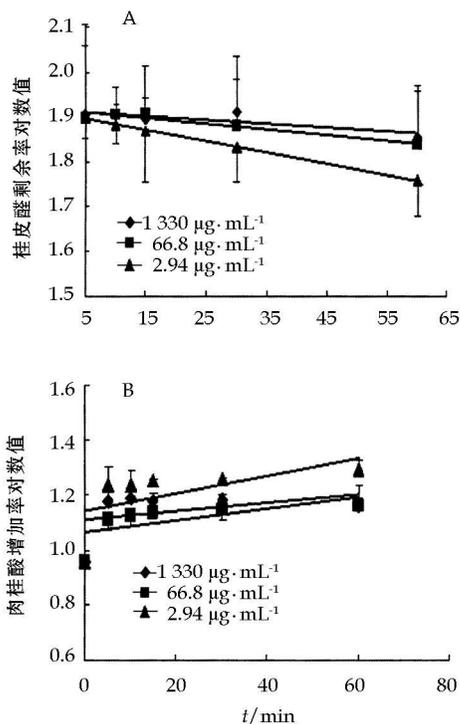


图 3 大鼠小肠浆膜提取液中桂皮醛的代谢 (A) 和肉桂酸的生成 (B) (n=3)

Fig. 3 Metabolism of cinnamaldehyde (A) and production of cinnamic acid (B) in rat intestinal serosal extract (n=3)

份,加入大鼠肠匀浆提取液 5 倍稀释液 3 200 μL,加入 400 μL Ringer's 液,(37±1) °C 恒温振荡器中孵育,其余步骤同上。结果见图 4。

由结果可知,桂皮醛在各大鼠小肠提取液中均不稳定,可迅速代谢转化为主要产物肉桂酸。在各肠液中,随着药物质量浓度的降低,其代谢速率有加快的趋势。

2.5 黄连对桂皮醛大鼠小肠代谢的影响:精密称取桂皮醛对照品,加 Ringer's 液制成 70 μg/mL 桂皮醛对照品溶液。取黏膜提取液、浆膜提取液和肠匀浆液各 3.2 mL,每组 6 份。其中 3 份加入 400 μL 黄连提取液作为供试样品,3 份加入 400 μL Ringer's 液作为对照样品。分别于上述样品中加入 400 μL 桂皮醛对照品溶液,迅速混匀,37 °C 孵育,分别于 0、5、10、15、30、60 min 取样 100 μL,立即加入 0.1 mol/L HCl 100 μL,混匀,测定桂皮醛,同时向孵育液中补充 100 μL 各小肠提取液。计算并作图,结果见图 5。同时分别取桂皮醛剩余率及肉桂酸增加率的自然对数对时间进行线性回归,以方程的斜率分别求得各供试液中桂皮醛(肉桂酸)的代谢(生成)速率常数(K)。样品组与对照组间统计

学比较采用 *t* 检验, 结果见表 1。与对照组相比, 肠黏膜提取液中黄连组的桂皮醛代谢差异非常显著 ($P < 0.01$), 肠浆膜提取液和肠匀浆液中桂皮醛代谢差异显著 ($P < 0.05$)。

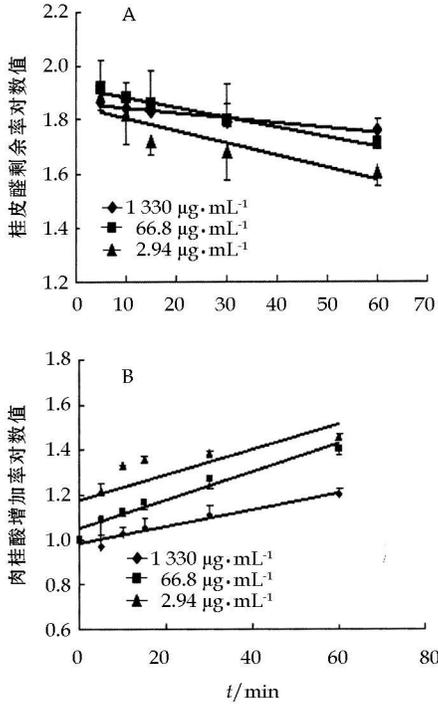


图 4 大鼠小肠匀浆液中桂皮醛的代谢 (A) 和肉桂酸的生成 (B) ($n = 3$)

Fig. 4 Metabolism of cinnamaldehyde (A) and production of cinnamic acid (B) in rat intestinal homogenate ($n = 3$)

3 讨论

桂皮醛在大鼠小肠黏膜提取液、浆膜提取液、肠匀浆液中均不稳定, 主要代谢产物为肉桂酸, 这与文献报道^[7]桂皮醛在体内代谢为肉桂酸相吻合, 但桂皮醛代谢与肉桂酸生成并非为等物质的量关系, 推测桂皮醛在体系中可能尚存在其他代谢途径, 其减少并非全部转化为肉桂酸, 尚待进一步对代谢产物进行分析研究证实。随着桂皮醛质量浓度的降低, 其剩余药量下降速率呈加快趋势。桂皮醛在小肠匀浆液中的代谢试验中, 为了较真实反映其代谢情况, 避免反应过快, 所以对肠匀浆液进行了 5 倍稀释。各种小肠提取液中的桂皮醛在加入等体积 0.1 mol/L HCl 后较稳定, 因此在取样后加入酸以终止进一步反应。

黄连对桂皮醛在黏膜提取液、浆膜提取液、组织匀浆液中的代谢有抑制作用。推测桂皮醛在肠内存在菌群代谢或各种酶的代谢, 黄连在这个环节当中起到抑菌作用, 从而抑制桂皮醛的代谢, 或者黄连在

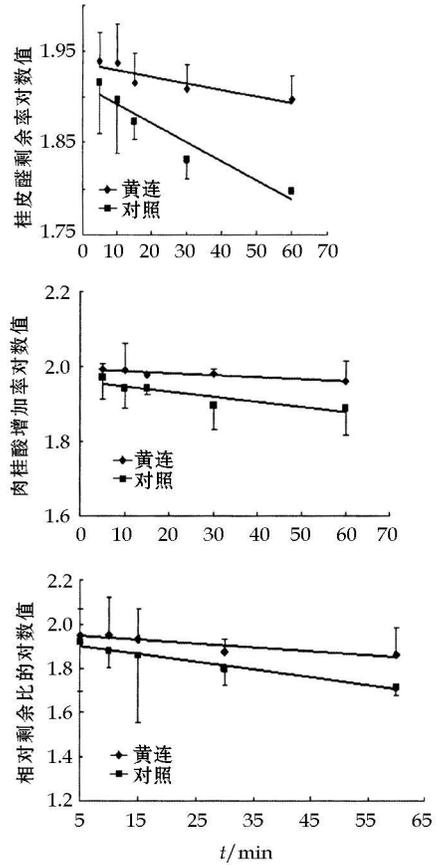


图 5 黄连对桂皮醛在大鼠小肠黏膜提取液 (A)、浆膜提取液 (B) 和肠匀浆液 (C) 中代谢的影响 ($n = 3$)

Fig. 5 Effect of *C. chinensis* on metabolism of cinnamaldehyde in rat intestinal mucosa extract (A), mesosal extract (B) and intestinal homogenate (C) ($n = 3$)

表 1 黄连对桂皮醛大鼠小肠代谢速率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of *C. chinensis* on metabolism rate of cinnamaldehyde in rat intestine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取液	组别	桂皮醛代谢 <i>K</i> 值
黏膜提取液	对照	-0.00210 ± 0.00031
	黄连	-0.00070 ± 0.00011**
浆膜提取液	对照	-0.00140 ± 0.00029
	黄连	-0.00060 ± 0.00010*
匀浆液	对照	-0.00400 ± 0.00100
	黄连	-0.00170 ± 0.00043*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

高浓度的情况下抑制了某些酶的活性, 从而减慢了桂皮醛的降解。

参考文献:

- [1] 张荣发. 桂皮醛的药理作用研究进展 [J]. 中国药业, 2008, 17(10): 75
- [2] 赵京霞, 李萍, 张玮, 等. 桂皮醛对小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞碱性成纤维细胞生长因子及转化生长因子 β -1 表达的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 582-584

- [3] 朱卫丰, 张亚红. 肉桂酸透皮吸收的实验研究 [J]. 中成药, 2003, 25(6): 443
- [4] 杨祖贻, 裴瑾. 赤芍和赤芍肉桂复方在小鼠血浆中芍药苷浓度比较 [J]. 中国药理与临床, 2004, 20(5): 4
- [5] Smith C K, Moore C A. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 168(3): 189
- [6] Sapienza P P, Ikeda G J, Warr P I, *et al*. Tissue distribution and excretion of ¹⁴C-labelled cinnamic aldehyde following single and multiple oral administration in male Fischer 344 rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 1993, 31(4): 253
- [7] Yuan J H, Dieter M P, Bucher J R, *et al*. Toxicokinetics of cinnamaldehyde in F344 rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 1992, 30(12): 997
- [8] 张玉杰, 杨洁, 邹晓翠, 等. 黄连肉桂药对配伍对黄连总碱大鼠小肠吸收的影响 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1521

地奥心血康对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究

陈虹¹, 朱鲲鹏¹, 张真², 于雷², 康毅^{3*}, 刘欣^{4*}

(1. 武警医学院附属医院 药剂科, 天津 300162; 2. 地奥集团 学术部, 四川 成都 600041; 3. 天津医科大学 药理学教研室, 天津 300070; 4. 天津医科大学 病理生理教研室, 天津 300070)

摘要:目的 观察地奥心血康(DAXXK)对大鼠心肌缺血再灌注(IR)损伤的保护作用和作用机制。方法 采用大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,观察DAXXK不同剂量组心肌缺血再灌注损伤所致ECG的ST段变化、心律失常出现和持续时间、心律失常评分、心肌梗死面积和心肌形态学指标的变化。TUNEL法检测心肌细胞凋亡,免疫组化法检测凋亡相关蛋白Fas、FasL表达情况,比色法测定心肌组织抗氧化能力,RT-PCR法检测心肌M_rSOD mRNA表达,ELISA法检测血管内皮分泌功能。结果 与模型组相比,DAXXK各组,ECG中ST段抬高幅度显著降低,心律失常评分明显降低,心律失常发生的开始时间明显推后,持续时间明显缩短,心肌梗死面积明显缩小,心肌细胞肿胀和炎性细胞浸润减少,心肌细胞凋亡减少,心肌总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力增强,M_rSOD mRNA表达增加,血管内皮功能改善。上述作用呈剂量依赖性。结论 DAXXK对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用与其抗氧化损伤、抑制心肌细胞凋亡以及改善血管内皮功能有关。

关键词:地奥心血康; 心肌缺血再灌注; 氧化损伤; 细胞凋亡; 内皮功能

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2018-06

Protection and mechanism of Dǎo Xinxue Kang against myocardial ischemia reperfusion injury in rats

CHEN Hong¹, ZHU Kurpeng¹, ZHANG Zhen², YU Lei², KANG Yi^{3*}, LIU Xin^{4*}

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital, Medical University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 2. Department of Academic, Dǎo AO Group, Chengdu 600041, China; 3. Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 4. Department of Pathophysiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To observe the cardioprotective effect of Dǎo Xinxue Kang (DAXXK) and to explore the mechanisms on myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** The myocardial ischemia reperfusion injury model was established by the ligation of left descending coronary artery for 30 min and reperfusion for 120 min in rats. By using it, the effects of DAXXK different dosage groups on the ST segment of ECG, onset and duration of ventricular arrhythmia (VA), the score of arrhythmia, and the effects on myocardial infarction size and morphologic change after myocardial injury in rats were observed. Myocardial apoptosis was detected using TUNEL method. Expressions of apoptosis-associated protein Fas and FasL were measured using the immunohistochemical method. Total-superoxide dismutase (T-SOD) was detected by spectrophotometer. NO and ET-1 in serum were detected by ELISA. M_rSOD mRNA was measured by RT-PCR method. **Results** Compared with I/R group, DAXXK with dose-dependent brought

收稿日期: 2010-01-28

作者简介: 陈虹(1961—),女,江苏人,学士,副主任药师,主要研究方向为中草药药理学和临床药学。

Tel: (022) 60578892 E-mail: chenhongyilia@163.com

* 通讯作者 康毅 Tel: (022) 23542523 E-mail: kangy@tjmu.edu.cn

刘欣 Tel: (022) 23542745 E-mail: liuxin@tjmu.edu.cn