

• 药物研究 •

夏天无提取物中原阿片碱和延胡索乙素的大鼠肠吸收特性*

马宏达 郭涛 何进

(沈阳军区总医院药剂科, 110016)

[摘要] 目的 考察夏天无提取物中有效成分原阿片碱和延胡索乙素的大鼠肠吸收特性。方法 采用体内外翻肠囊模型研究原阿片碱和延胡索乙素的肠吸收特性。采用高效液相色谱(HPLC)法测定样品浓度,计算表观渗透系数(P_{app})并绘制累积吸收量-时间曲线图。考察并比较原阿片碱和延胡索乙素在不同肠段、不同给药浓度、不同 pH 条件下的 P_{app} 。结果 原阿片碱和延胡索乙素在回肠段的 P_{app} 分别约为 2.58×10^{-5} 和 $3.15 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 与其他肠段比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。原阿片碱在十二指肠、空肠和回肠的 P_{app} 随着给药体系浓度的升高而降低, 累计吸收量呈非线性增加。给药体系 pH 由 7.4 降低到 5.4 时, 原阿片碱和延胡索乙素在各肠段的吸收均呈降低的趋势。结论 原阿片碱和延胡索乙素在回肠吸收较好, pH 对于其在小肠内的吸收具有一定影响, 原阿片碱的吸收在十二指肠、空肠和回肠可能存在饱和现象。

[关键词] 夏天无提取物; 原阿片碱; 延胡索乙素; 体内外翻肠囊法; 肠吸收

[中图分类号] R282.71; R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)09-1125-05

Rat Intestine Absorption Characteristics of Protopine and Tetrahydropalmatine in Extracts of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

MA Hong-da, GUO Tao, HE Jin (Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Command Area, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT Objective To study the rat intestine absorption characteristics of protopine (Pro) and tetrahydropalmatine in extracts of *Rhizoma Corydalis decumbentis*. **Methods** The isolated everted intestinal sac was utilized to study the intestine absorption characteristics of protopine and tetrahydropalmatine. The sample's concentration was determined by HPLC method. The apparent permeability coefficients (P_{app}) and the mean cumulative permeation amount versus time curves were calculated and drawn. The P_{app} of protopine and tetrahydropalmatine was investigated and compared under different everted gut sacs, different concentrations and different pH values. **Results** The P_{app} of protopine and tetrahydropalmatine in ileum was about $2.58 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and $3.15 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively, and the difference was remarkable compared to other intestine sacs ($P < 0.05$). The P_{app} was decreased as Pro level increased, and the cumulative permeation amount was non-linear increased in the duodenum, jejunum, and ileum. When the pH value decreased from 7.4 to 5.4, the absorption of protopine and tetrahydropalmatine across intestinal membrane presented declining tendency. **Conclusion** The absorption of protopine and tetrahydropalmatine in ileum is much better than that in other parts of intestine. The pH values could affect intestinal absorption of protopine and tetrahydropalmatine. The absorption of protopine in duodenum, jejunum and ileum might be saturated.

KEY WORDS *Corydalis Decumbentis Rhizoma* extracts; Protopine; Tetrahydropalmatine; Isolated everted intestinal sac; Intestine absorption

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 [*Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.] 的干燥块茎, 主产于江西、湖南、浙江等地。夏天无具有活血祛淤、通络、行气镇痛的功效, 用于卒中偏瘫、半身不遂、跌打损伤、风湿性

关节炎、坐骨神经痛、小儿麻痹后遗症。夏天无及其有效成分还具有保肝和抗老年痴呆症等多种药理作用^[1]。夏天无含有原阿片碱 (protopine, Pro), 延胡索乙素 (tetrahydropalmatine, THP) 等二十余种生物碱^[2-3]。2010 年版《中华人民共和国药典》已将生物碱作为夏天无的定性和定量指标。本研究采用体内外翻肠囊法, 考察夏天无提取物中有效成分原阿片碱和延胡索乙素在大鼠体外肠内的吸收性质, 为夏天无有效成分的药理学吸收特性进行初步考察。

[收稿日期] 2011-03-07 **[修回日期]** 2011-03-30

[基金项目] * 辽宁省博士科研启动基金项目资助 (基金编号: 20101133)

[作者简介] 马宏达 (1976-), 男, 辽宁新民人, 主管药师, 博士, 研究方向: 药物新制剂与新剂型。电话: 024-23897073-800, E-mail: mahongdamahongda@163.com。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 色谱仪(配 W600 泵, 2996 二极管阵列检测器, 717 plus 自动进样器), XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司), TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), DT100A 光电分析天平(沈阳杰龙仪器有限公司), HH-数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

1.2 试剂 夏天无提取物(本室自制); 原阿片碱对照品、延胡索乙素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110853-200402, 110726-200409); O₂:CO₂=95:5 混合气(中国科学院金属研究所); 乳酸脱氢酶试剂盒(南京建成生物工程研究所); 色谱纯乙腈(美国 Fisher 公司); 其余试剂均为分析纯; 水为双重纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制 Krebs-Ringer's 肠营养液配制: 分别称取氯化钠(NaCl) 7.8 g、氯化钾(KCl) 0.35 g、氯化钙(CaCl₂) 0.37 g、磷酸二氢钠(NaH₂PO₄) 0.32 g、碳酸氢钠(NaHCO₃) 1.37 g、氯化镁(MgCl₂) 0.02 g、葡萄糖 1.4 g 置于 50 mL 量瓶中, 加适量纯化水, 超声使溶解, 纯化水稀释至刻度, 摇匀。用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠(NaOH) 或者 2 mol·L⁻¹ 盐酸(HCl) 分别调节 pH 至 5.4、6.8 和 7.4。

对照品溶液的配制: 精密称取原阿片碱和延胡索乙素对照品适量, 置量瓶中, 甲醇超声溶解定容, 配制成对照品储备液。取储备液适量, 用 K-R 营养液稀释, 配制成浓度约为 10 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

供试品溶液的配制: 分别精密称取夏天无提取物适量, 加入适量 K-R 营养液, 超声使其溶解, 定容, 以孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过。经高效液相色谱(HPLC) 测定, 原阿片碱浓度分别为 3.1、28.0 和 120.0 μg·mL⁻¹, 延胡索乙素浓度为 3.7 和 34.0 μg·mL⁻¹。另外, 分别以不同 pH 的 K-R 营养液配制含有原阿片碱和延胡索乙素的供试品溶液。

2.2 色谱条件 Diamonsil ODS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5% 冰酸(21:79), 三乙胺调节 pH4.5, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL, 室温。

2.2.1 专属性实验 分别取对照品溶液、空白 K-R 营养液和供试品溶液, 置于外翻肠囊中, 按实验操作法培养 1 h 后, 滤过, 注入高效液相色谱仪, 色谱图见图 1。结果显示, 空白肠液中的内源性杂质和其他成分不干扰原阿片碱和延胡索乙素的测定, 方法专属性良好。

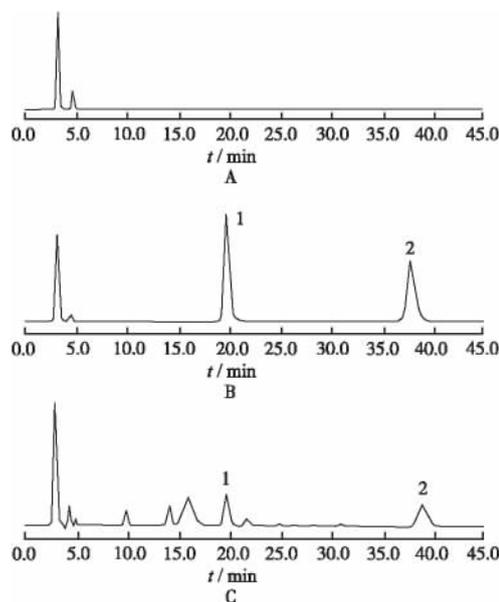


图 1 3 种溶液的 HPLC 图

A. 空白溶液; B. 对照品; C. 样品; 1. 原阿片碱; 2. 延胡索乙素

Fig. 1 Representative chromatograms of 3 kinds of solution

A. blank K-R buffer; B. references; C. sample; 1. Pro; 2. THP

2.2.2 线性关系考察 分别精密量取对照品储备液适量, 用空白 K-R 液配制成系列浓度的溶液, HPLC 测定。以浓度(C)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 进行线性回归。结果显示, 原阿片碱回归方程为 $A = 25\,699C + 542$, $r = 0.999\,9$, 线性浓度范围为 $0.525\,6 \sim 50.400\,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。延胡索乙素回归方程为 $A = 23\,259C - 109$, $r = 0.999\,9$, 线性浓度范围为 $0.546 \sim 49.250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。两种生物碱在各自的浓度范围内线性关系良好。

2.2.3 精密度实验 取 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 原阿片碱和延胡索乙素对照品溶液, 连续进样 5 次, 连续 3 d, 计算日内和日间精密度。结果显示, 原阿片碱日内和日间精密度 RSD 值分别为 1.09% 和 1.35%, 延胡索乙素日内和日间精密度 RSD 值分别为 0.96% 和 1.27%, 该方法精密度良好。

2.2.4 稳定性实验 取对照品 K-R 溶液, 置于 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 水浴中, 每隔 2 h 取 20 μL 进样, 连续进样 6 h。结果显示, 在此放置条件下, 原阿片碱和延胡索乙素对照品溶液在 6 h 内较为稳定, 峰面积 RSD 值分别为 1.15% 和 1.38%。

2.2.5 回收率实验 取对照品储备液适量, 用空白 K-R 液配制成 1.0 、 5.0 和 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 种浓度的稀释液, HPLC 测定, 计算各浓度平均回收率。由实验结果可知, 原阿片碱的平均回收率为 $(99.87 \pm 1.20)\%$,

延胡索乙素的平均回收率为(100.77±0.95)% ,方法回收率良好。

2.3 体外肠吸收实验

2.3.1 体内外翻肠囊法 雄性 Wistar 大鼠(沈阳药科大学动物实验中心提供,辽宁省实验动物许可证号 0024453)。实验前大鼠禁食过夜,自由饮水。腹腔注射 20% 乌拉坦溶液麻醉(1.0 g·kg⁻¹) ,沿腹中线打开腹腔,取出实验用肠段,十二指肠自幽门 1 cm 处开始;空肠距离幽门 15 cm 处开始;回肠距离回盲部 20 cm 处开始;结肠紧靠盲肠后至直肠,肠段均取约 10 cm。肠段置于 K-R 液中,通入混合气体(O₂:CO₂=95:5),小心清洗并去除肠系膜。将肠段翻转,使黏膜侧朝外,浆膜侧向内,肠肛侧端扎紧,近胃端固定于取样口上。肠段内注入空白 K-R 液作为受药体系,放入供试品溶液中,通入混合气,体系置于(37.0±0.5)℃ 的恒温水浴中。分别于 0,30,60,90 和 120 min 从肠囊内取出受药体系溶液,同时补充同体积空白 K-R 液。取出的肠内液过滤,HPLC 测定。实验结束后,记录肠段的长度和宽度,计算吸收面积。

2.3.2 数据分析 以有效成分的累积渗透量和表观渗透系数(apparent permeability, P_{app}) 作为评价指标,计算方程如下。其中 dQ/dt 为渗透速率(μg·s⁻¹) ,是根据药物在不同时间内进入肠囊的药量对时间回归得到的直线斜率。A 为肠囊的表面积(cm²);C₀: 供试溶液的初始浓度(μg·mL⁻¹)。采用 SPSS 13.1 软件对各组数据进行组间 t 检验。

$$P_{app}(\text{cm/s}) = \frac{dQ/dt}{A \times C_0}$$

2.3.3 不同肠段对吸收的影响 以含有原阿片碱(28.0 μg·mL⁻¹) 和延胡索乙素(34.0 μg·mL⁻¹) 的 K-R 营养液对各肠段进行实验,不同肠段下的表观渗透系数 P_{app} 结果见图 2,累积吸收量-时间曲线见图 3。

由实验结果可知,原阿片碱和延胡索乙素在各肠段均有吸收。经组间 t 检验,原阿片碱在回肠的 P_{app} 值与其他肠段比较差异有统计学意义(P<0.05);其次为十二指肠和空肠,结肠 P_{app} 值最小。原阿片碱与延胡索乙素吸收情况基本相似,均是回肠的 P_{app} 值最大,十二指肠、空肠次之,结肠最小。

2.3.4 不同浓度对吸收的影响 以含有原阿片碱浓度分别约为 3.1,28.0,120.0 μg·mL⁻¹ 的 K-R 营养液,和含有延胡索乙素浓度分别约为 3.7,34.0 μg·mL⁻¹ 的 K-R 营养液对各肠段吸收情况进行实验。药物在不同肠段下的 P_{app} 结果见图 4,原阿片碱的累积吸收量-浓度曲线见图 5。

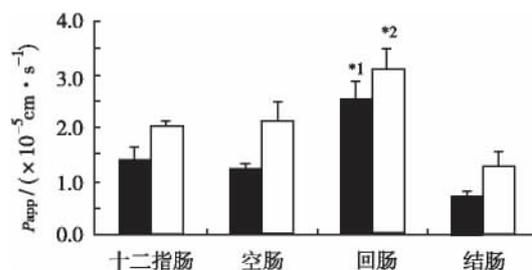


图 2 原阿片碱和延胡索乙素在不同肠段的渗透系数

□ 原阿片碱; ■ 延胡索乙素

与其他肠段比较,*¹P<0.05;与十二指肠和结肠比较,*²P<0.05

Fig. 2 Permeability coefficient of Pro and THP in different intestinal segments of rats

□ Pro; ■ THP

Compared with other gut sacs,*¹P<0.05; Compared with duodenum and colon,*²P<0.05

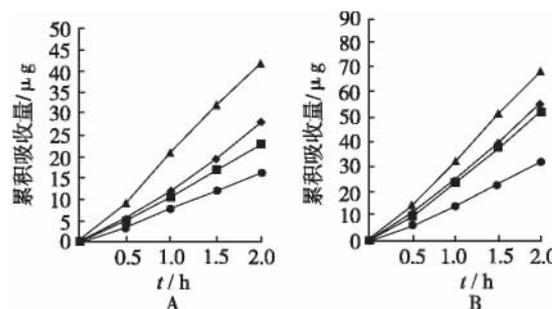


图 3 原阿片碱和延胡索乙素累积吸收量-时间曲线图

▲ 十二指肠; ■ 空肠; ◆ 回肠; ● 结肠

A. 原阿片碱; B. 延胡索乙素

Fig. 3 Mean cumulative permeation amount—time curves of Pro and THP

▲ duodenum; ■ jejunum; ◆ ileum; ● colon

A. Pro; B. THP

结果显示,原阿片碱在十二指肠、空肠、回肠的 P_{app} 值随给药体系浓度的升高而呈现下降趋势,药物的转运量与浓度也呈现非线性增加。而结肠的 P_{app} 值随浓度变化不显著,其转运量基本随着浓度的升高呈现线性增加。实验提示原阿片碱在 3~120 μg·mL⁻¹ 浓度范围内,在十二指肠,空肠,回肠的吸收可能存在饱和现象。延胡索乙素在十二指肠、空肠、回肠的 P_{app} 值随给药体系浓度的升高而呈现下降趋势,但结果差异无统计学意义。结肠的 P_{app} 值随浓度的变化基本不改变。

2.3.5 不同 pH 对吸收的影响 考察了供药体系 pH 分别为 5.4,6.8 和 7.4 时,对原阿片碱和延胡索乙素在大鼠各肠段吸收的影响,表观渗透系数 P_{app} 结果见图 6。实验结果显示,随着供试品溶液体系 pH 的降低,原阿片碱和延胡索乙素的 P_{app} 均呈降低趋势,但各

pH 组间差异无统计学意义。

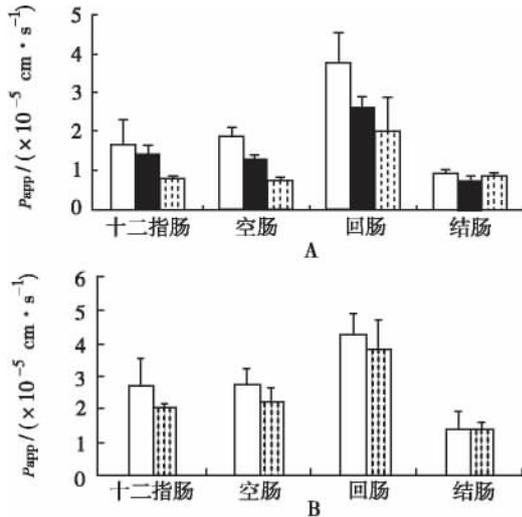


图4 不同浓度原阿片碱和延胡索乙素的渗透系数
□ 低浓度; ■ 中浓度; ▨ 高浓度
A. 原阿片碱; B. 延胡索乙素

Fig. 4 Permeability coefficient of Pro and THP at different concentrations

□ low concentration; ■ middle concentration; ▨ high concentration

A. Pro; B. THP

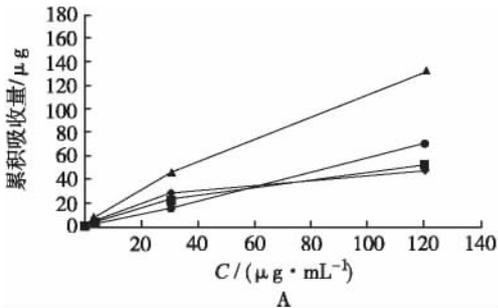


图5 原阿片碱的累积吸收量-浓度曲线图

▲ 十二指肠; ■ 空肠; ★ 回肠; ● 结肠

Fig. 5 Mean cumulative permeation amount-time curves of Pro at different concentrations

▲ duodenum; ■ jejunum; ★ ileum; ● colon

2.4

肠细胞活性评价 体外外翻肠囊实验 2 h 后,测定 K-R 液中乳酸脱氢酶的活力。测定结果表明,随着实验时间的延长,各肠段 K-R 液中乳酸脱氢酶的活性有增加的趋势,但在 2 h 内的细胞活力无显著变化 ($P > 0.05$) ,表明大鼠体外肠段在实验的 2 h 内,可以基本保持肠黏膜的活性。

3 讨论

药物的肠吸收模型较多,如体外外翻肠囊法^[4]、体内单向肠灌注法^[5]、体内肠循环法^[6]、Caco-2 细胞模型^[7]等。体外外翻肠囊法以其操作简单、重复性好

等优点,广泛应用于药物吸收及转运机制的研究。常用于寻找药物的最佳吸收部位,筛选吸收促进剂,评价药物在吸收环节的相互作用,肠道外排蛋白和代谢酶的研究。另外,浆膜侧的体积相对较小,药物积累较快,便于样品分析^[8]。

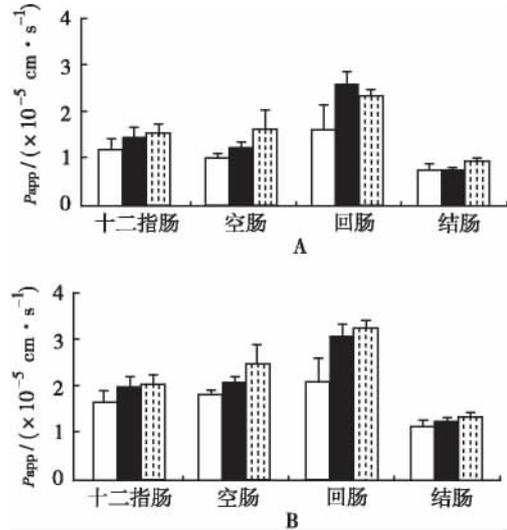


图6 原阿片碱和延胡索乙素在不同 pH 条件下的渗透系数

□ pH5.4; ■ pH6.8; ▨ pH7.4

A. 原阿片碱; B. 延胡索乙素

Fig. 6 Permeability coefficient of Pro and THP at different pH values

□ pH5.4; ■ pH6.8; ▨ pH7.4

A. Pro; B. THP

翻转肠囊方法本身以及实验的条件等因素都会引起肠黏膜的破坏,因此应选择一种合适的方法评价肠黏膜的活性。除测定乳酸脱氢酶法外,还可以采用显微镜法^[9]和^[14C]PEG 法^[10]。显微镜法在对肠黏膜进行处理过程中,可能损伤肠黏膜,会导致肠黏膜活性降低。^[14C]PEG 方法准确可靠,但其放射性对人体有害,使用受到了限制。因此笔者采用了乳酸脱氢酶法来评价肠黏膜的活性。

由于有效成分原阿片碱和延胡索乙素二者均为叔胺类生物碱,当供试品溶液 pH 降低时,使二者离子型百分比逐渐升高,可能影响其在小肠的吸收,导致 P_{app} 呈现降低的趋势。初步说明环境的 pH 对于生物碱类物质在小肠内的吸收具有一定影响。

吸收过程出现饱和现象的转运方式有易化扩散、主动转运、吞噬。实验结果提示,原阿片碱吸收过程可能存在饱和现象,但其具体方式和机制尚需要进一步实验研究。虽然实验中延胡索乙素的 P_{app} 值随着给药体系浓度的升高而呈现下降趋势,但由于其浓度梯度较小,故暂不能确定吸收过程是否存在饱和现象。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.09.002

[参考文献]

- [1] 马宏达, 史国兵. 夏天无药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2008, 19(36): 2867-2869.
- [2] LIAO J, LIANG W Z, TU G S. Isolation and identification of eleven tertiary alkaloids in *Coydalis decumbens* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1995, 4(2): 57-61.
- [3] 朱大元, 宋纯清, 高耀良, 等. 夏天无及其他十一种化学成分的分和结构鉴定 [J]. 中草药, 1980, 11(8): 341-343.
- [4] 何卉, 陈西敬, 王广基. 药物转运体在反式白藜芦醇肠道吸收中的作用 [J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(4): 324-328.
- [5] 周萍, 蒋惠娣. 单向灌流模型研究木犀草素对大鼠在体肠的吸收 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(4): 29-32.
- [6] 张新勇, 张兴德, 高运军, 等. 灯盏花素自微乳在大鼠肠道吸收动力学研究 [J]. 医药导报, 2009, 28(5): 571-573.
- [7] 王元佩, 张桂春, 赵政, 等. Caco-2 细胞中二甲双胍的摄取和转运特征 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1565-1569.
- [8] 祝诚诚, 何新. 药物肠道吸收研究方法 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 222-227.
- [9] JONKER C, HAMMAN J H, KOTZE A F. Intestinal paracellular permeation enhancement with quaternised chitosan: *in situ* and *in vitro* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2002, 238(2): 205-213.
- [10] TOMEI S, TORIMOTO M, HAYASHI Y, et al. Kinetic characterization of carrier-mediated transport systems for D-glucose and taurocholate in the everted sacs of the rat colon [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(6): 899-901.

鱼藤素对斑马鱼胚胎 COX/EP 信号通路相关基因表达的影响

韩勇军 吴新荣

(广州军区广州总医院药学部 510010)

[摘要] 目的 研究鱼藤素斑马鱼胚胎 COX/EP 信号通路相关基因表达的影响。方法 采用实时荧光定量核酸扩增检测系统 (real-time quantitative PCR detecting system, qPCR) 比较鱼藤素作用前后目的基因表达水平的变化。结果 鱼藤素处理组 COX/EP 信号通路上的 *ptges*、*ptges3a*、*ep4a*、*ep4b*、*ep2a*、*ep2b*、*egr1*、*cyclin D1* 基因表达水平分别下降到空白对照组的 0.46 ± 0.16 、 0.82 ± 0.06 、 0.59 ± 0.03 、 0.12 ± 0.03 、 0.15 ± 0.04 、 0.16 ± 0.01 、 0.19 ± 0.08 、 0.33 ± 0.06 , 均差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 鱼藤素作用的斑马鱼胚胎在 sphere 期停止发育, 其机制可能与鱼藤素抑制 COX/EP 信号通路上主要基因的表达相关。

[关键词] 鱼藤素; 基因表达; COX/EP

[中图分类号] R282.71; R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)09-1129-04

Effect of Deguelin on Genes Expression in COX/EP Pathway of Zebrafish Embryos

HAN Yong-jun, WU Xin-rong (Department of Pharmacy, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT Objective To study the effect of deguelin on genes expression in COX/EP pathway of zebrafish embryos.

Methods Real-time quantitative PCR detecting system was used to compare genes expression pre- and post-treatment of deguelin. **Results** Compared with the control, the expression on transcript levels of *ptges*, *ptges3a*, *ep4a*, *ep4b*, *ep2a*, *ep2b*, *egr1*, *cyclin D1* in COX/EP pathway were decreased to 0.46 ± 0.16 , 0.82 ± 0.06 , 0.59 ± 0.03 , 0.12 ± 0.03 , 0.15 ± 0.04 , 0.16 ± 0.01 , 0.19 ± 0.08 , 0.33 ± 0.06 , respectively ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Deguelin arrests zebrafish embryonic development at sphere stage, which may be related to the inhibition of main genes expression in the COX/EP signaling pathway.

KEY WORDS Deguelin; Genes expression; COX/EP

鱼藤素 (deguelin) 是一种从植物中分离的黄酮类化合物, 体外实验已初步证实鱼藤素可以抑制环氧化酶 (cyclooxygenase, COX)-2 的表达^[1-2], 抑制 PI3K 活性^[3-4] 并可降低 pAkt 水平, 促进肿瘤细胞凋亡。斑马

鱼 (*Danio rerio*) 是近年来兴起的一种新型模式生物。它的显著优势在于: 个体小, 便于大批量饲养; 产卵量大, 胚胎透明, 易于观察和操作; 体外发育迅速, 2~3 d 即可完成主要器官的建成。笔者利用斑马鱼胚胎对鱼藤素