

双黄连口服制剂中连翘有效成分的吸收调控

李芸霞¹ 朱红云¹ 蒋学华^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院 教育部中药材标准化重点实验室 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地 四川 成都 610075; 2. 四川大学华西药学院 四川 成都 610041)

摘要: 目的 研究双黄连口服制剂中连翘有效成分的吸收调控。方法 采用 HPLC 法测定大鼠在体实验中连翘苷和连翘酯苷的含量, 采用大鼠在体肠实验方法分别进行了整方和拆方的研究。结果 连翘苷几乎无吸收。绿原酸能显著改善连翘酯苷在大鼠体内的吸收速度和程度。结论 双黄连制剂中, 金银花能显著改善连翘酯苷的吸收, 提示中药组方的合理性。

关键词: 连翘苷; 连翘酯苷; 双黄连口服制剂; 吸收调控

中图分类号: R94

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2011)05-0411-03

Study on the absorption modulation of phillyrin and forsythiaside in Shuanghuanglian oral preparations

LI Yun-xia¹ ZHU Hong-yun¹ JIANG Xue-hua^{2*}

(1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory Breeding Base Co-Constructed by Ministry of Science and Technology and Province Department of Systemically Research and Exploitation of Chinese Medicine Resources, Chengdu, Sichuan, 610075 P. R. China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To study the absorption characters and mechanism of phillyrin and forsythiaside in Shuanghuanglian oral preparations. **METHODS** The concentration of phillyrin and forsythiaside were determined by HPLC, the absorption mechanism was investigated by using an *in situ* intestine experiment model. **RESULTS** The concentration of phillyrin in perfusion solution changed little which indicated that the compositions in Shuanghuanglian oral preparations could not improve the absorption of phillyrin. But the absorption extent and rate of forsythiaside were obviously improved after combined with *Flos Lonicerae*. **CONCLUSION** *Flos Lonicerae* significantly increases the absorption of forsythiaside which indicates the rationality of traditional Chinese medicine prescription.

Key words: Phillyrin; Forsythiaside; Shuanghuanglian oral preparations; Absorption modulation

CLC number: R94

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2011)05-0411-03

连翘为木犀科植物连翘的干燥果实, 主要含有苯乙醇苷类、木脂体及其苷类、五环三萜类、挥发油等化合物。连翘具有抗菌消炎、解热、镇吐、利尿强心、抗肝损伤、镇痛、抗病毒、降血压、抗内毒素等作用^[1]。2005 年版《中国药典》中将木脂体苷成分中的连翘苷作为其主要指标成分^[2], 而 2010 年版《中国药典》新增加连翘酯苷作为指标成分与连翘苷一起作为连翘的质量控制指标^[3]。双黄连制剂主要由连翘、金银花和黄芩组成, 对细菌和病毒感染的感冒、流感及肺炎、支气管炎、扁桃体炎等都有较好的疗效, 并作为卫生部重点推荐的抗甲流药物。现选择连翘的指标成分连翘苷和连翘酯苷作为研究对象, 经整方及拆方实验考察金银花的主要药效成分绿原酸、黄芩中的黄芩苷对连翘吸收的调控作用, 为

双黄连制剂的配伍机理研究提供思路。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及动物

TU-1800 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); LC-10A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu)。连翘苷对照品(批号: 110753-200412)、绿原酸对照品(批号: 110715-200414)、黄芩苷对照品(批号: 110821-200409)(中国药品生物制品检定所); 连翘酯苷对照品(辽宁生物医药科技有限公司, 批号: 050402); 双黄连口服液(三精制药厂, 批号: 050316); 双黄连糖浆(哈药集团制药六厂, 批号: 050428); HPLC 所用溶剂为色谱纯; 水为二次重蒸水; 其余试剂均为分析纯。♂ Wistar 鼠

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30070935; 30271614)

作者简介: 李芸霞(1979—), 女, 四川遂宁, 博士, 副研究员, 从事中药药效物质基础及药理学研究的工作。

* 通信作者(Correspondent author), Email: jxh1013@vip.163.com

(四川大学动物实验中心) 200 ± 10 g, 实验前未用任何药物。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 连翘苷的测定采用 Diamosil 钻石 C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈-水 (30:70); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 35°C ; 进样量 $100 \mu\text{L}$; 测定波长 277 nm 。连翘酯苷的测定采用 Shimadzu C_{18} 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈- $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 水溶液-乙酸 (18:82:0.2); 流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 30°C ; 进样量 $100 \mu\text{L}$; 测定波长 332 nm 。

1.2.2 溶液的制备 精密量取连翘苷、连翘酯苷对照品贮备液适量, 置 10 mL 量瓶中, 用 K-R 液稀释至刻度, 得 1.03 、 2.06 、 3.10 、 4.13 、 5.16 、 8.26 、 $10.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的连翘苷对照品工作液及 0.25 、 0.50 、 1.00 、 2.00 、 5.00 、 10.00 、 $20.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的连翘酯苷对照品工作液。取连翘苷、连翘酯苷对照品适量, 置棕色量瓶中, 用含 0.2% Vc 的酚红 K-R 液溶解至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照液。取双黄连糖浆适量, 置棕色量瓶中, 用含 0.2% Vc 的酚红 K-R 液稀释至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试液 1; 取双黄连口服液适量, 置棕色量瓶中, 用含 0.2% Vc 的酚红 K-R 液稀释至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $11.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试液 2; 取连翘苷、连翘酯苷、绿原酸对照品适量, 置棕色量瓶

中, 用含 0.2% 的 Vc 酚红 K-R 液稀释至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试液 3; 取连翘苷、连翘酯苷对照品、金银花提取物适量, 置棕色量瓶中, 用含 0.2% Vc 的酚红 K-R 液溶解稀释至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试液 4; 取连翘苷、连翘酯苷、黄芩苷对照品适量置棕色量瓶中, 用含 0.2% Vc 酚红的 K-R 液溶解稀释至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、黄芩苷 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试液 5; 取连翘苷、连翘酯苷对照品、黄芩提取物适量, 置棕色量瓶中, 用含 0.2% Vc 酚红的 K-R 液溶解稀释至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、黄芩苷 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试液 6; 取连翘苷、连翘酯苷、绿原酸、黄芩苷对照品适量, 置棕色量瓶中, 用含 0.2% Vc 酚红的 K-R 液溶解稀释至刻度, 得含连翘苷 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、黄芩苷 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试液 7。

1.2.3 标准曲线的制备和精密度及回收率试验 照“1.2.1”项色谱条件进样测定。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行加权回归, 得到连翘苷、连翘酯苷的标准曲线方程分别为: $Y_{\text{连翘苷}} = 1.308 \times 10^4 X_{\text{连翘苷}} - 93.761$ ($r = 0.9999$); $Y_{\text{连翘酯苷}} = 3.454 \times 10^4 X_{\text{连翘酯苷}} - 5.368 \times 10^3$ ($r = 0.9998$)。方法的日间 RSD、日内 RSD 及方法回收率见表 1。

表 1 分析方法学考察 ($n=5$)

Table 1 Validation of analysis method ($n=5$)

Compounds	Added	Detected	RSD in a day/%	RSD between days/%	Recovery/%
Phillyrin	1.0320	1.022	1.38	7.39	99.03
	5.0160	4.993	0.39	1.35	99.54
	10.320	10.283	0.82	1.64	99.64
Forsythiaside	0.5000	0.5361	2.78	7.56	107.20
	5.0000	4.8340	2.83	2.52	96.68
	20.0000	20.0400	1.12	1.76	100.20

1.2.4 样品的处理及测定 取样品液 1.0 mL , 置试管中, 以 $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清液 $100 \mu\text{L}$ 进样测定。取样品液 0.5 mL , 置试管中, 加入 $5 \text{ mL } 0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 溶液, 混匀, 于 $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 在 558 nm 处测定吸光度。

1.2.5 大鼠在体肠循环实验 选实验前禁食一夜 (饮水不限)、体重约 200 g 的 Wistar 大鼠, ip 戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 麻醉后固定。沿腹中线切开腹腔 (约 2.5 cm), 在实验肠管两端各切一小口, 在上端小口处插入直径为 0.3 cm 的玻璃管, 并用线扎紧。用注射器将 37°C 的生理盐水缓缓注入肠管, 洗去肠

管内的容物至净。然后在实验肠管下端小口处插入玻璃管, 用线扎紧。连接肠管两端的玻璃管与蠕动泵的胶管, 形成回路, 开动蠕动泵。以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速循环 10 min 后, 将流速调节为 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 立即自灌注液锥形瓶中取样 1.0 、 0.5 mL 各一份, 分别作为测定零时间药物浓度和酚红浓度的样品。另向锥形瓶中补加酚红液 2 mL , 其后每隔 15 min 亦同法取样, 补加酚红液, 循环 3 h 后, 中止实验^[4]。

1.2.6 吸收参数的计算 用 Fick's 方程定量描述消化管吸收药物。

$$\text{吸收速率常数 } K_a = (\ln X_0 - \ln X) / t \quad (1)$$

吸收半衰期 $t_{1/2} = 0.693 / K_a$ (2)

单位时间吸收率 $P = (C_0V_0 - C_tV_t) / (C_0V_0t) \times 100\%$ (3)

表观渗透系数 $P_{app} = K_a / A / 3600$ (4)

C_0 为灌注液药物初始浓度; V_0 为灌注液初始体积; C_t 为 t 时刻灌注液药物浓度; V_t 为 t 时刻灌注液体积; t 为灌注液循环灌注时间; A 为小肠吸收面积 (试验结束 ,从肠两端插管处剪下小肠 ,冲洗后剖开 ,摊于坐标纸上 ,通过坐标纸刻度计算小肠面积) 。

1.2.7 实验结果 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 8 组 按照 “1.2.5”项试验方法 ,自十二指肠上部及回盲肠末端插管 ,分别用供试液 1 ~ 7 进行原位小肠灌注试验 ,计算连翘苷剩余药量及各时间点剩余药量与 0 点时剩余药量之间的相对标准差(表 2) 。结果表明: 双黄连口服制剂中其他成分对连翘苷的吸收

表 3 连翘酯苷在体肠吸收实验结果($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

Table 3 *In situ* absorption of forsythiaside in rat intestine($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

Solution	K_a / h^{-1}	$t_{1/2} / h$	$P / \%$	$P_{app} \times 10^{-7} / cm \cdot s^{-1}$	$P_{(Ka)}$	$P_{(P\%)}$
Control	0.097 ± 0.017	7.520 ± 1.629	7.20 ± 0.99	2.240	—	—
1	0.153 ± 0.084	5.651 ± 3.245	13.75 ± 4.93	3.530	0.037	0.002
2	0.231 ± 0.035	3.121 ± 0.435	16.23 ± 3.19	5.330	0.015	0.001
3	0.161 ± 0.034	4.452 ± 1.053	14.56 ± 3.61	3.720	0.013	0.017
4	0.145 ± 0.028	4.916 ± 1.020	12.79 ± 2.77	3.350	0.020	0.024
5	0.112 ± 0.015	6.177 ± 1.001	9.63 ± 2.26	2.590	0.220	0.207
6	0.068 ± 0.025	10.191 ± 12.92	7.81 ± 3.37	1.570	0.097	0.803
7	0.138 ± 0.022	5.122 ± 0.890	12.65 ± 2.52	3.190	0.017	0.020

2 讨论

前期研究结果表明: 连翘苷在体内无论是单独给药或是与其他吸收促进剂一起给药 ,胃、小肠及结肠内各个时间点的连翘苷含量都无明显下降 ,即口服连翘苷不能得到良好的吸收^[4]。双黄连口服制剂中 ,连翘苷原型也显示几乎无吸收。木脂体苷内成分可能在肠道内经葡萄糖苷酶的作用经水解而被吸收^[5] ,而大鼠在体肠实验时 ,先用生理盐水冲洗肠道 ,可造成代谢酶的缺失。实验结果提示: 连翘苷原型药物在体内吸收极少 ,其可能通过代谢成苷元后再进行吸收 ,这还需要进一步的实验证实。文中可见: 双黄连口服液和糖浆中连翘酯苷的吸收速率明显提高 ,吸收程度明显增加。经拆方分析后发

无影响。连翘苷原型药物仍显示无明显吸收。

测定各时间点的连翘酯苷和酚红浓度 ,计算剩余药量。按 “1.2.6”项计算方法求出 K_a 、 $t_{1/2}$ 、 P 、 P_{app} (表 3) 。考察双黄连制剂所含成分是否影响连翘酯苷的吸收情况。结果表明: 双黄连口服制剂中 ,金银花的主要有效成分绿原酸可明显提高连翘酯苷的吸收速度和程度 ,而黄芩对连翘酯苷吸收无明显影响。

表 2 各时间点与 0 点时剩余药量之间的相对标准差(% $n=5$)

Table 2 The RSD of residue between each time point and zero point(% $n=5$)

RSD_1	RSD_2	RSD_3	RSD_4	RSD_5	RSD_6	RSD_7
1.15	1.40	4.43	5.94	7.53	7.80	4.45
4.27	2.34	6.13	3.21	6.34	7.56	8.24
3.89	3.45	5.89	4.23	5.38	5.64	4.82
1.71	1.30	2.78	5.67	6.74	8.47	5.92
1.24	1.80	1.57	6.32	4.65	2.27	5.80

现: 金银花中的绿原酸能显著改善连翘酯苷在大鼠体内的吸收速度和程度 ,这提示了中药组方的合理性。

参考文献:

[1] 董梅娟 ,倪艳. 连翘药理活性及其物质基础的研究概况 [J]. 山西中医 2009 25(4) : 56 - 57.

[2] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社 2005: 117.

[3] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社 2010: 159.

[4] 李芸霞 ,蒋学华 ,周静. 大鼠在体吸收连翘苷的机理研究 [J]. 华西药理学杂志 2005 20(5) : 387 - 390.

[5] 郑一敏 ,蔡绍哲 ,胥秀英 ,等. 牛蒡子总木脂素代谢化学及其动态研究 [J]. 中国中药杂志 2005 30(16) : 1287 - 1289.

收稿日期 2010 - 12 - 03