

大麻药总皂苷中大麻药苷 B 的含量测定 及其在体肠吸收特性分析

徐海燕, 覃勤, 葛月宾*, 陈旅翼

(中南民族大学药学院, 武汉 430074)

[摘要] 目的:建立大麻药苷 B 的 HPLC 分析方法,用于测定其在有效部位大麻药总皂苷中的含量,并考察大麻药苷 B 的大鼠在体肠吸收能力。方法:采用 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 0.1% 乙酸乙腈溶液-0.1% 乙酸水溶液梯度洗脱,流速 0.5 mL·min⁻¹,检测波长 215 nm,进样量 20 μL。结果:标准曲线线性范围 60~210 mg·L⁻¹,相关系数 0.999 9,加样回收率在 95%~105%,4 批大麻药总皂苷提取物中大麻药苷 B 质量分数分别为 89.99%,82.08%,89.96%,84.38%。大鼠小肠在体肠吸收大麻药苷 B 的吸收速率常数(0.018 3±0.001 1) h⁻¹,5 h 累积吸收率(9.49±0.26)%。结论:该 HPLC 分析方法简便、准确,可用于大麻药苷 B 的含量测定。大麻药苷 B 在大鼠小肠内吸收情况较差。

[关键词] 大麻药苷 B; 总皂苷; 大麻药; 肠吸收; 大麻药苷 A

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0021-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015200021

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150826.1526.008.html>

[网络出版时间] 2015-08-26 15:26

Determination of Doliroside B in Total Saponins from *Dolichos appendiculatus* Roots and Analysis of Its *in situ* Intestinal Absorption Characteristics XU Hai-yan, QIN Qin, GE Yue-bin*, CHEN Lyu-yi (School of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for analyzing the content of doliroside B in total saponins from *Dolichos appendiculatus* roots, and to investigate intestinal absorption characteristics of doliroside B. **Method:** Ultimate AQ-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisted of water-acetonitrile containing 0.1% acetic acid for gradient elution at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹, detection wavelength was 215 nm and an injection volume was 20 μL. **Result:** Good linearity was obtained over the concentration range of 60-210 mg·L⁻¹ with the correlation coefficient of 0.999 9. The mean recoveries were between 95% and 105%. The content of doliroside B in four batches of total saponins extract from *D. appendiculatus* roots were all above 80%. In addition, the absorption rate constant of doliroside B in small intestine was (0.018 3±0.001 1) h⁻¹ and cumulative absorption percentage in 5 h was (9.49±0.26)%. **Conclusion:** This HPLC method is simple and accurate for quality control of doliroside B. Doliroside B is badly absorbed in small intestine.

[Key words] doliroside B; total saponins; *Dolichos appendiculatus*; intestinal absorption; doliroside A

大麻药记载于《中国植物志》,原植物为豆科植物丽江镰扁豆的根或叶^[1]。《中华本草·傣药卷》中记载其傣药名托也腾^[2],俗称麻里麻、麻三段、豆叶百步还阳,味辛、麻,性温,有毒,入肺、心二经,功效祛风活血、消炎镇痛、止血生肌,主治风湿疼痛、跌打

损伤、骨折、外伤出血、吐血、衄血、便血等^[3-4]。研究报道表明大麻药的主要化学成分为皂苷类,包括大麻药皂苷 A^[5-6],该成分具有抗炎镇痛^[7]、抗动脉粥样硬化、调血脂及抗心肌缺血的药理作用。前期已从大麻药中提取了大麻药总皂苷,开展了抗痛风

[收稿日期] 20150407(008)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470181);湖北省自然科学基金群体项目(2013CFA013)

[第一作者] 徐海燕,在读硕士,从事中药药剂学研究,Tel:13260526512,E-mail:feliciaxy19900417@163.com

[通讯作者] *葛月宾,博士,副教授,从事药物制剂研究和中药、民族药开发,Tel:027-67841196,E-mail:duckygreen@163.com

性关节炎的活性及其毒性研究,结果表明大麻药总皂苷对尿酸钠晶体处理的 RAW264.7 细胞中促炎性细胞因子(白细胞介素-1 β ,白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α)具有很强的抑制作用。从大麻药总皂苷中分离出大麻药苷 A 和大麻药苷 B,由于大麻药 B 的含量远远大于大麻药苷 A^[8],故本实验拟以大麻药苷 B 为指标成分,建立其 HPLC 分析方法,采用大鼠在体肠吸收模型,研究大麻药总皂苷中大麻药苷 B 的吸收情况。类似研究内容国内外文献尚无报道,实验结果能为后续的药物质量控制提供可靠适用的分析手段,并为大麻药总皂苷的制剂设计提供实验依据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), AB265-S 型 1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), PHSJ-3F 型实验室 pH 计(上海精科实业有限公司), BT100-ZJ 型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司), ZNCL-G 型磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司)。

大麻药(采摘于云南省大理市宾川县太和镇,经中南民族大学药学院陈旅翼博士鉴定为豆科植物镰叶山扁豆 *Dolichos appendiculatus* 的根),大麻药苷 B 对照品(自制,经 HPLC 归一法测定,纯度 > 98%), HPD400 型大孔吸附树脂柱(河北沧州宝恩吸附材料有限公司), Krebs-Ringer 试液(简称 K-R 液,每 1 L 含氯化钠 7.8 g,氯化钾 0.35 g,氯化钙 0.37 g,碳酸氢钠 1.37 g,磷酸二氢钠 0.32 g,氯化镁 0.02 g,葡萄糖 1.4 g,用 1.5 mol·L⁻¹磷酸调 pH 7.4),乙腈为色谱纯,水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,购于湖北省实验动物研究中心,合格证号 SCXK(鄂)2008-0005。

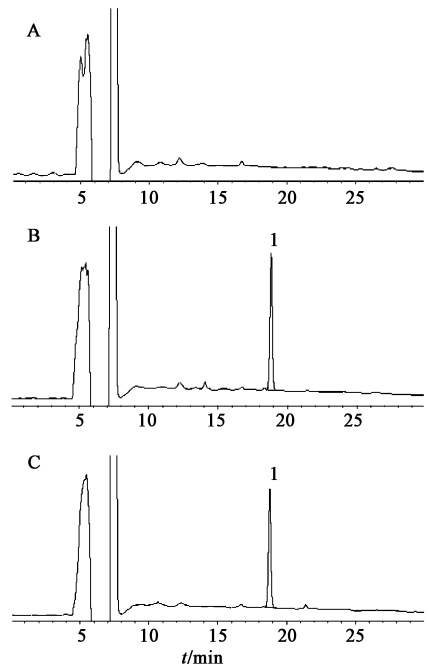
2 方法与结果

2.1 大麻药总皂苷的提取与分离^[9] 取大麻药粉末适量,置于圆底烧瓶中,加 10 倍量 60% 乙醇浸泡 2 h,水浴回流提取 3 次,提取时间分别为 2.0,1.5,1.0 h,合并滤液;滤液减压回收乙醇至无醇味,制成生药质量浓度 0.05 g·mL⁻¹ 的药液;将配好的药液通过 HPD400 型大孔吸附树脂柱,加 30% 乙醇 8 BV 冲洗除杂,加 60% 乙醇 7 BV 洗脱,收集洗脱液,浓缩、干燥,得大麻药总皂苷。

2.2 大麻药苷 B 的含量测定

2.2.1 色谱条件 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱

(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相 0.1% 乙酸乙腈溶液(A)-0.1% 乙酸水溶液(B) 梯度洗脱(0 ~ 25 min, 40% ~ 65% A; 25 ~ 30 min, 65% ~ 40% A; 30 ~ 45 min, 40% A), 检测波长 215 nm, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。在该色谱条件下, 供试品溶液中其他成分不会干扰指标成分的测定, 见图 1。



A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 大麻药苷 B

图 1 大麻药总皂苷 HPLC

Fig. 1 HPLC of total saponins from *Dolichos appendiculatus* roots

2.2.2 方法学考察 精密量取 300 mg·L⁻¹ 大麻药苷 B 对照品溶液适量,用甲醇稀释成 60 ~ 210 mg·L⁻¹ 的系列溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y = 13.317X - 66.337$ ($r = 0.9999$),线性范围 60 ~ 210 mg·L⁻¹。取同一供试品溶液(大麻药苷 B 质量浓度 104.8 mg·L⁻¹),分别于 0,1,2,4,6,8,10,12 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果显示大麻药苷 B 峰面积的 RSD 0.1%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。精密吸取同一对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果日内、日间精密度 RSD 分别为 0.6%,1.0%,表明仪器精密度良好。6 份供试品溶液的重复性 RSD 1.0%,表明该方法重复性较好。量取 300 mg·L⁻¹ 大麻药总皂苷供试品溶液 0.7,1.4,2.9 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,各加入 300 mg·L⁻¹ 大麻药苷 B 对照品储备液 1 mL,用甲醇稀释至刻度,配制成 94.252,128.502,201.898 mg·L⁻¹ 的

溶液($n=3$),结果 3 种质量浓度样品溶液的平均加样回收率分别为 98.86%,98.86%,98.47%,RSD 分别为 0.3%,0.8%,1.5%。测定结果符合方法学要求,表明该分析方法准确有效,可用于大麻药苷 B 的含量测定。

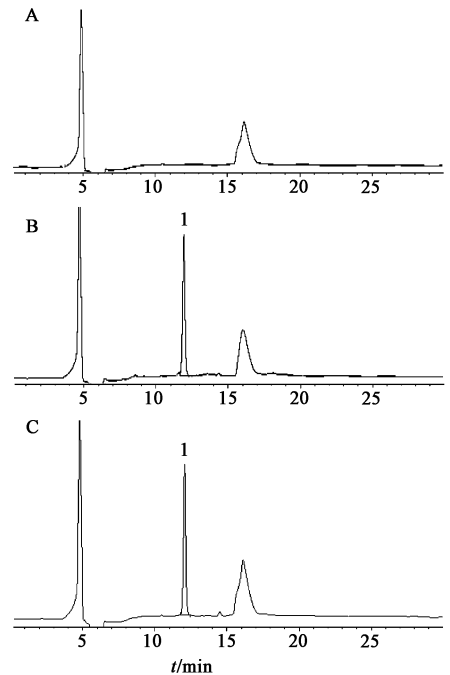
2.2.3 样品测定 精密称取不同批次大麻药总皂苷供试品适量,分别置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻线,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算不同批次样品中大麻药苷 B 平均质量分数分别为 89.99%,82.08%,89.96%,84.38%,RSD 依次为 0.6%,1.0%,0.6%,0.8%。

2.3 大麻药苷 B 在体肠吸收试验

2.3.1 肠灌注液中酚红浓度的测定^[10] 精密称取酚红适量,用 K-R 试液溶解并稀释定容,得质量浓度分别为 10,15,20,25,30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列溶液,以 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液显色 10 min,于 558 nm 处测定吸光度 A 。以 A 对酚红质量浓度 C 进行线性回归,得回归方程 $A=0.019C-0.009$ ($r=0.9995$),结果表明酚红在 10~30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 A 呈良好线性关系。

2.3.2 色谱条件 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.1% 乙酸乙腈溶液(A)-0.1% 乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0~25 min,50%~65% A;25~30 min,65%~50% A;30~45 min,50% A),检测波长 215 nm,流速 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL ,见图 2。在该色谱条件下,供试品溶液中其他成分不会干扰指标成分的测定。

2.3.3 方法学考察 分别精密吸取大麻药苷 B 对照品储备液(含酚红 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)适量,用 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 酚红液稀释成质量浓度为 67.02~201.06 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列溶液,按 2.3.2 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y=13.746X-38.033$ ($r=0.9995$),线性范围 67.02~201.06 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。取同一样品溶液,分别于 0,1,2,4,6,8,10,12 h 按 2.3.2 项下色谱条件测定,结果大麻药苷 B 峰面积的 RSD 0.1%,表明样品溶液在 12 h 内稳定。日内精密度 RSD 0.3%,表明仪器精密度良好。6 份样品测定重复性 RSD 0.4%,表明该方法重复性好。量取 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 大麻药总皂苷溶液 0.8,1.0,1.4 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,各加入 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 大麻药苷 B 对照品储备液(含酚红 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)2.5 mL,用酚红液(20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)稀释并定容至刻度,配制 91.02,101.28,121.79 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液($n=3$),结果 3 种质量浓度样品溶液的平均加样回收



A. 阴性样品(酚红空白肠液);B. 对照品;C. 供试品;1. 大麻药苷 B

图 2 大麻药总皂苷肠灌注液 HPLC

Fig.2 HPLC of intestinal perfusate of total saponins from *Dolichos appendiculatus* roots

率分别为 97.67%,101.33%,104%,RSD 分别为 0.9%,1.1%,0.1%。测定结果符合方法学要求。

2.3.4 大鼠在体肠吸收试验^[11] 取 SD 大鼠,禁食不禁水 12 h,按 0.004 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 腹腔注射 10% 水合三氯乙醛,麻醉,固定,沿腹中线打开腹腔,自十二指肠上部及回肠下部插管,洗净肠管内容物后,灌注 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 大麻药总皂苷供试液,按流速 5.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 循环 10 min 后,将流速调至 2.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,自灌注液中取样 2.0 mL 作为测定零点,并补加同体积酚红液,其后每隔固定时间同法取样。根据酚红质量浓度计算供试液的体积,根据每一时间段药物质量浓度和供试液体积的变化计算出肠灌注液中的剩余药量(大麻药苷 B)。以肠循环液中剩余药量的对数($\ln X$)对取样时间(t)作图,得 $\ln X=-0.0176t+9.8516$ ($r=0.982$),通过直线斜率求算吸收速率常数(K_a),平均吸收情况见图 3。结果表明大鼠小肠在体吸收大麻药苷 B 的 K_a 为 $(0.0183\pm 0.0011)\text{h}^{-1}$,5 h 累积吸收率 $(9.49\pm 0.26)\%$ 。

3 讨论

采用 HPLC 测定大麻药苷 B 准确度较好,该成分在 215 nm 处有最大吸收,预试验考察了 HPLC 等度和多种梯度条件下测定大麻药苷 B,最后确定为梯度测定,色谱峰的对称因子均在 9.55~1.05,分

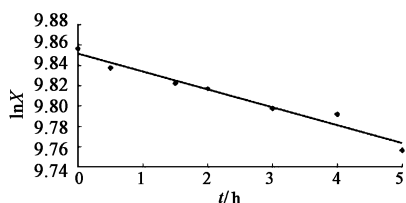


图 3 大麻药苷 B 大鼠小肠在体吸收曲线

Fig. 3 *In situ* absorption curve of doliroside B in small intestine of rats

离度 > 1.5, 理论塔板数 > 10 000, 符合 2010 年版《中国药典》要求。通过精密度、重复性、加样回收率等试验证明, 建立的 HPLC 测定大麻药苷 B 的方法简单可靠、准确度高。

了解药物在胃肠道的吸收转运情况, 可减少剂型设计的盲目性, 为剂型开发提供依据, 是制剂处方前工作的必要环节。在大鼠小肠在体吸收试验中, 由于肠道对水分有吸收, 故采用酚红进行体积标定, 测定不同时间点的酚红质量浓度, 根据酚红质量浓度的变化计算不同时间点供试液的体积, 并结合药物的质量浓度, 准确求出不同时间点小肠中剩余的药量或被吸收的药量。但文献报道酚红也能少量被小肠吸收, 平均吸收速率 6%, Ca^{2+} 能抑制酚红的吸收。故本文采用含有一定浓度 Ca^{2+} 的 K-R 液配制循环液, 以减小实验误差^[12]。当前大多数皂苷类化合物的主要给药方式为口服给药, 而大量研究发现皂苷类化合物经口服给药后, 在肠道内较难吸收, 生物利用度低^[13-17]。本文结果表明大麻药苷 B 在大鼠小肠体内的吸收并不理想, 这可能与其分子结构有关, 大麻药苷 B 的相对分子质量比较大, 所以透过小肠的上皮细胞有些困难, 但有实验证明大鼠灌胃大麻药总皂苷具有良好的药理作用, 关于其药物体内代谢情况尚不清楚, 有待于进一步研究证实。

[参考文献]

[1] 吴征镒. 中国植物志. 第 41 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 274.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 秦药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 37.

[3] 《云南中草药》整理组. 云南中草药[M]. 昆明: 云南人民出版社, 2011: 62-63.
[4] 冉先德. 中华药海. 下卷[M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 2005: 80.
[5] 浦湘渝, 吴大刚, 杨崇仁, 等. 大麻药的三萜皂苷成分(1)[J]. 云南植物研究, 1984, 6(3): 321-324.
[6] 王琼, 王真. 大麻药化学成分研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(5): 583-585.
[7] Wei H, Hu C, Xie J, et al. Doliroside A attenuates monosodium urate crystals-induced inflammation by targeting NLRP3 inflammasome[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 321-328.
[8] Chen L, Mola M, Deng X, et al. *Dolichos falcata* Klein attenuated the inflammation induced by monosodium urate crystals *in vivo* and *in vitro*[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(2): 545-552.
[9] 梅之南, 陈旅翼, 邓旭坤, 等. 大麻药苷 A 和大麻药总皂苷的提取方法及其应用: 中国, CN102875615A [P]. 2013-01-16.
[10] 任静, 邓盛齐, 陶静, 等. 绿原酸大鼠胃肠吸收动力学研究[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(15): 1299-1302.
[11] 李文兰, 南莉莉, 季宇彬, 等. 人参中人参皂苷 R_{g1} , R_{b1} 在体肠吸收影响因素的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2627-2632.
[12] 冯亮, 蒋学华, 周静, 等. 三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 的大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(14): 1097-1101.
[13] 何明珍, 梁起栋, 欧阳辉, 等. α -常春藤皂苷大鼠在体肠吸收特性研究[J]. 中草药, 2014, 45(6): 807-812.
[14] 刘超, 张欣, 赵东东, 等. 珠子参总皂苷肠吸收机制研究[J]. 中南药学, 2013, 11(3): 191-193.
[15] 马加庆, 云宇, 后文俊, 等. 三七总皂苷对药物性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 246-249.
[16] 冷广意, 盖芸芸, 左艳华, 等. 升麻总皂苷在体肠吸收动力学研究[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2011, 24(2): 126-129.
[17] 赵阳, 熊呈琦, 马百平, 等. 甾体皂苷 9714 的肠吸收研究[J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(7): 655.

[责任编辑 刘德文]