

基于大鼠离体外翻肠囊模型考察杜仲提取物在正常和自发性高血压状态下的肠吸收特性差异

吴林霖, 李梅, 巩仔鹏, 陈亭亭, 鲍红松, 陈艳, 胡贺佳, 李月婷,
李春, 王爱民, 李勇军, 王永林*

(贵州医科大学药学院, 贵州省药物制剂重点实验室, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 国家苗药工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:研究杜仲提取物在正常大鼠和自发性高血压大鼠的肠吸收特性差异。方法:采用大鼠外翻肠囊模型,收集 10.0 g·L⁻¹杜仲提取物给药后不同时间点的肠囊液,通过 UPLC-MS/MS 检测肠吸收液样品中京尼平苷酸、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷 7 个成分的含量,计算累积吸收量和吸收速率常数,比较正常大鼠和自发性高血压大鼠肠吸收液中杜仲提取物各指标成分的吸收情况。结果:杜仲提取物中 7 种成分的肠吸收均为线性吸收(R^2 均 > 0.99),主要吸收部位在小肠,正常状态下以十二指肠的吸收最好。原儿茶酸和松脂醇二葡萄糖苷在高血压状态下的空肠有更好吸收,提示病理状态可能会改变药物吸收的特定部位。7 个指标成分在 SHR 模型的肠吸收与正常大鼠相比均表现出了不同程度的差异。京尼平苷酸在自发性高血压大鼠各肠段的吸收弱于正常大鼠,但以松脂醇二葡萄糖苷为代表的其他成分都没有表现出一致的吸收趋势。结论:自发性高血压会影响杜仲提取物的肠吸收,从肠黏膜通透性降低和吸收部位后移的角度无法完全解释这些差异,可能还与肠道中存在的酶和转运蛋白等相关,具体作用机制有待进一步的深入研究。

[关键词] 杜仲; 离体外翻肠囊模型; 自发性高血压大鼠; 京尼平苷酸; 松脂醇二葡萄糖苷

[中图分类号] R22;R94;R283.6;R284;R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0015-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180803

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180125.1508.005.html>

[网络出版时间] 2018-01-26 10:28

Intestinal Absorption Characteristics of Eucommiae Cortex Extract Under Normal and Spontaneous Hypertensive Conditions Based on Everted Gut Sac Model *in Vitro*

WU Lin-lin, LI Mei, GONG Zi-peng, CHEN Ting-ting, BAO Hong-song, CHEN Yan, HU He-jia,
LI Yue-ting, LI Chun, WANG Ai-min, LI Yong-jun, WANG Yong-lin*

(National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the intestinal absorption characteristics of Eucommiae Cortex extract in normal rats and spontaneously hypertensive rats. **Method:** Everted intestinal sac model was utilized. Intestinal sac fluid samples at different time after administration of 10.0 g·L⁻¹ of Eucommiae Cortex extract were collected

[收稿日期] 20170730(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560683,81703661);贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2017]2845);贵州省科技厅合作计划项目(黔科合 LH 字[2016]7346);国家大学生创新创业计划项目(201610660044);贵州省中医药管理局贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项(QZYY-2015-079,QZYY-2017-115)

[第一作者] 吴林霖,在读硕士,从事中药药效物质基础及中药药代动力学研究,E-mail:shuining8090@163.com

[通信作者] *王永林,教授,博士生导师,从事中药药效物质基础及中药药代动力学研究,Tel:0851-86908468,E-mail:gywyl@gmc.edu.cn

and the contents of geniposidic acid, protocathechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, pinoresinol diglucoside and (+) -piresil-4-*O*- β -*D*-glucopyraside in intestine samples were determined by UPLC-MS/MS. Accumulative absorption (Q) and absorption rate constants (K_a) of these seven components were calculated, while absorbance of indicator components in intestinal absorbent liquid between normal rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) was compared. **Result:** The intestinal absorption of 7 components in *Eucommiae Cortex* extract was linear absorption with $R^2 > 0.99$, the main absorption area was in the small intestine, and the absorption of duodenum was the best under normal conditions. Protocatechuic acid and pinoresinol diglucoside had better absorption in the jejunum under hypertensive conditions, which suggested that pathological conditions may alter the specific site of drug absorption. Compared with normal rats, the intestinal absorption of the 7 index components in spontaneously hypertensive rats model showed different degrees of difference. The absorption of geniposidic acid in the intestinal segments of spontaneously hypertensive rats model was weaker than that of normal rats, but the other components represented by pinoresinol diglucoside showed no a consistent absorption trend. **Conclusion:** Spontaneous hypertension can affect the intestinal absorption of *Eucommiae Cortex* extract, these differences can not be fully explained from the perspective of intestinal mucosal permeability reduction and back shift of absorption site, which may be related to the presence of intestinal enzymes and transporters, and the specific mechanism needs further study.

[**Key words**] *Eucommiae Cortex*; everted gut sac model; spontaneously hypertensive rats; geniposidic acid; pinoresinol diglucoside

高血压是心血管病的重要危险因素,主要表现为动脉血压升高。根据其病因可分为原发性高血压和继发性高血压,而大部分高血压患者属于原发性高血压。高血压严重威胁着人们的健康与生命,高血压防治一直是心血管领域中的重大课题。目前高血压的治疗以西药为主,但是西药的降压药物往往作用机制单一。而我国传统中医药有多种治疗高血压的方法,且中药的降血压效果也很显著,对人体作用温和、不良反应小,适宜长期服用,符合高血压治疗的平稳降压原则,患者顺应性较好。随着目前国家对中医药研究和开发的重视,中药抗高血压的研究和应用得到了蓬勃发展。

杜仲又名思仙、思仲、木棉,是我国名贵滋补药材,味甘、性温,归肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨、安胎的功效,可用于高血压的治疗,并取得较好的效果^[1-3]。杜仲的化学成分主要包括木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类和黄酮类,目前报道较多的具有降压作用的化合物主要有松脂醇二葡萄糖苷和京尼平苷酸等^[4-5]。然而由于对杜仲抗高血压的具体物质基础和作用机制缺乏深入的研究,尤其是在病理状态下的研究更是鲜有报道,使得杜仲的深度开发与利用受到了一定的限制。基于此,本实验从肠吸收角度出发,以自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 为研究对象,采用离体外翻肠囊法考察杜仲提取物中 7 个代表成分^[6-8]在正常

机体和病理状态下的肠吸收特性,探讨自发性高血压对杜仲提取物肠吸收的影响,为明确该提取物的药效物质基础提供参考,并为杜仲药材的临床合理用药提供参考。

1 材料

ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪 (美国 Waters 公司, MassLynx V4.1 工作站), MRBP 型无创血压计 (美国 IITC 公司), Allegra 64R 型低温高速离心机 (美国 Beckman Coulter 公司), MTN-2800D 型氮吹浓缩装置 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司), WP-UP-II-20 型超纯水机 (四川沃特尔科技发展有限公司)。

杜仲药材购于贵阳市药材公司,经贵州医科大学药学院龙庆德副教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的干燥树皮;松脂醇二葡萄糖苷、京尼平苷酸、绿原酸、原儿茶酸、葛根素对照品 (中国食品药品检定研究院,批号分别为 111537-201204, 111828-201403, 110753-201415, 110809-201205, 110752-201514, 纯度分别为 $\geq 90.9\%$, $\geq 94.6\%$, $\geq 96.2\%$, $\geq 99.9\%$, $\geq 95.5\%$), 新绿原酸、隐绿原酸对照品 (四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为 160318, 160304, 纯度均 $\geq 98\%$), 松脂醇单葡萄糖苷对照品 (上海源叶生物科技有限公司,批号 P09J7F8760, 纯度 $\geq 98\%$), Tyrode 缓冲液 (台氏液, 自制, 称取 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, CaCl₂

0.2 g, NaHCO₃ 1.0 g, NaH₂PO₄ 0.05 g, MgCl₂ 0.1 g, 葡萄糖 1.0 g, 加水溶解后与溶解的 CaCl₂ 及葡萄糖混匀, 加水定容至 1 L), 水为屈臣氏蒸馏水, 乙腈、甲醇均为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

SPF 级健康 Wistar 大鼠与 SHR, 雄性, 体质量 (220 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2012-0001。经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准, 批准号 1702077。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液配制 精密称取京尼平苷酸、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷 9.70, 10.19, 10.54, 10.99, 10.48, 9.73, 10.46 mg, 分别置于不同 10 mL 量瓶中, 加甲醇充分溶解并定容, 得对照品储备液。分别精密量取京尼平苷酸等 7 种对照品储备液适量, 40 °C 下氮气吹干, 用空白台氏液溶解后按梯度稀释成所需质量浓度, 得系列混合对照品溶液。置于冰箱中 -20 °C 保存, 备用。

2.2 杜仲提取物的制备及其供试液的配制 取杜仲药材(1~3 cm) 10 kg, 加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 2 h, 水浴浓缩, 加乙醇醇沉至乙醇体积分数达 60%, 静置 12 h, 抽滤, 减压回收乙醇, 用 1/2 倍量水饱和的正丁醇萃取 4 次, 回收正丁醇, 上 D101 型大孔树脂, 用 40% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 减压回收乙醇, 水浴浓缩并真空干燥, 得杜仲提取物^[6]。经测定, 杜仲提取物含京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、原儿茶酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸的质量分数分别为 3.70, 13.35, 0.96, 0.47, 0.22, 0.08, 0.11 mg·g⁻¹。使用前用台氏液将杜仲提取物溶解, 制成质量浓度为 10.0 g·L⁻¹ 的供试液。

2.3 分析条件 色谱条件为 Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), Waters BEH VanGuard C₁₈ 保护柱 (2.1 mm × 5 mm, 1.7 μm), 流速 0.35 mL·min⁻¹, 柱温 45 °C, 进样量 2 μL, 流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0~0.5 min, 5%~10% A; 0.5~3.5 min, 10%~20% A; 3.5~4.0 min, 20%~90% A; 4.0~5.0 min, 90%~5% A)。质谱条件为采用电喷雾电离源 (ESI), 毛细管电离电压 3 kV, 离子源温度 120 °C, 喷雾气与反吹气均为氮气, 去溶剂气流速 650 L·h⁻¹, 去溶剂气温度 350 °C, 反吹气流速设定 50 L·h⁻¹, 碰撞气为氩气, 碰撞气流速设置 0.16 mL·min⁻¹, 扫描方式为多离子反应监测 (MRM), 京尼平苷酸、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、

隐绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷及葛根素(内标)用于定量分析的监测离子反应分别为 m/z 373.3 ~ 211.0, m/z 152.9 ~ 109.0, m/z 353.2 ~ 191.0, m/z 353.1 ~ 191.0, m/z 353.2 ~ 172.9, m/z 681.3 ~ 357.2, m/z 519.3 ~ 357.2, m/z 417.0 ~ 267.0。

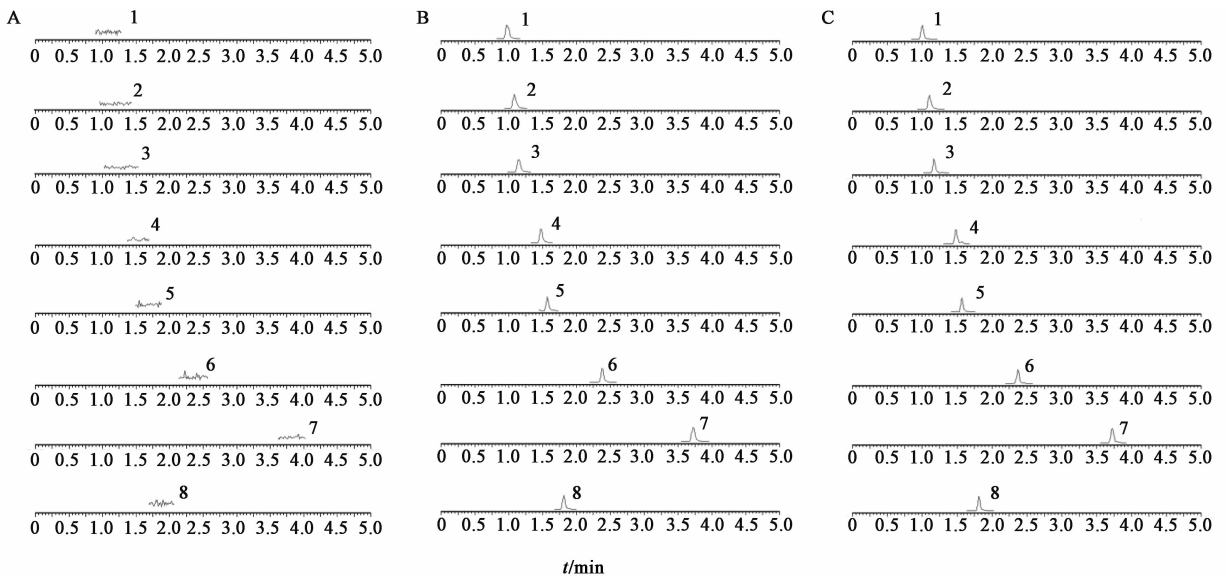
2.4 样品的处理 取样品液 200 μL, 置于塑料离心管中, 加入 0.1% 甲酸水溶液 200 μL, 加入水饱和正丁醇-乙酸乙酯(1:1)混合液 1 mL, 涡旋混合 1 min, 超声 (80 Hz, 下同) 5 min, 离心 (12 000 r·min⁻¹, 5 min, 下同)。取上清液于 40 °C, N₂ 流下吹干, 加入甲醇 200 μL 复溶, 加入 20 mg·L⁻¹ 内标溶液 20 μL, 涡旋混合 1 min, 超声 5 min, 离心, 取上清液进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.5 大鼠外翻肠囊模型的建立^[9-11] 实验前对所购买的 SHR 进行血压测定, 选取合格的大鼠进行实验(大鼠的 3 次收缩压值的平均值 ≥ 150 mmHg 为合格标准)。测压前将随机选取的 SHR 置于 37 °C 预热箱中 10 min, 用无创血压计测定大鼠尾动脉收缩压 (SBP)。记录大鼠安静状态下较为稳定的 3 次结果, 取平均值, 即得。取雄性正常 Wistar 大鼠和合格的 SHR, 实验前禁食 12 h, 按 3.5 mL·kg⁻¹ 腹腔注射 10% 水合氯醛, 沿腹中线剪开腹腔, 迅速取出目标肠段(十二指肠段自幽门 1 cm 处开始往下取 10 cm; 空肠段自幽门 15 cm 起往下取 10 cm; 回肠段自盲肠上行 20 cm 开始往下取 10 cm; 结肠段从盲肠下端开始往下)。将剪下的肠管放入 0 °C 的台氏液中冲洗, 至无肠内容物为止。将自制硅胶套管软端插入肠管用丝线结扎小心将肠道翻转。用 0 °C 的台氏液冲洗内表面, 将另一端用丝线结扎成囊状。将肠管放入盛有 37 °C 恒温台氏液 10 mL 的麦氏浴管中, 通入混合气体(95% O₂ 和 5% CO₂)。在肠管中注入台氏液 2 mL, 平衡 5 min, 将台氏液换成质量浓度 10.0 g·L⁻¹ 供试液, 分别在 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 从肠囊内取样 300 μL, 同时补加同温同体积的空白台氏液。样品放入干净离心管, -20 °C 保存待用。实验结束后将肠管纵向剖开, 自然摊于滤纸上测量长度和宽度, 记录吸收面积 (A)。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性 空白肠吸收液、混合对照品溶液和杜仲肠吸收液的色谱图见图 1。结果发现 7 种成分的分完全, 且空白肠吸收液无干扰。

2.6.2 标准曲线制备 取系列混合对照品溶液各 200 μL, 按 2.4 项下方法操作, 按 2.3 项下条件检



A. 空白肠吸收液; B. 空白肠吸收液 + 对照品; C. 供试品; 1. 京尼平苷酸; 2. 原儿茶酸; 3. 新绿原酸; 4. 绿原酸; 5. 隐绿原酸; 6. 松脂醇二葡萄糖苷; 7. 松脂醇单葡萄糖苷; 8. 葛根素

图 1 杜仲肠吸收液的 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of intestinal absorption solution of Eucommiae Cortex

测,以待测物峰面积与内标峰面积之比为纵坐标,各成分质量浓度为横坐标,得京尼平苷酸、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷及松脂醇单葡萄糖苷标准曲线方程依次为 $Y = 0.000\ 1X + 0.061\ 9 (R^2 = 0.997\ 7)$, $Y = 0.000\ 6X + 0.001\ 6 (R^2 = 0.999\ 8)$, $Y = 0.000\ 2X - 0.015\ 6 (R^2 = 0.999\ 7)$, $Y = 0.000\ 7X - 0.039\ 3 (R^2 = 0.999\ 7)$, $Y = 0.000\ 4X - 0.019\ 1 (R^2 = 0.999\ 9)$, $Y = 0.000\ 05X - 0.056\ 1 (R^2 = 0.999\ 1)$, $Y = 0.000\ 7X + 0.101\ 2 (R^2 = 0.999\ 2)$, 线性范围分别为 1.008 ~ 734.621, 0.140 ~ 101.758, 0.143 ~ 104.333, 0.152 ~ 110.970, 0.142 ~ 103.737, 2.021 ~ 1 473.636, 0.284 ~ 207.091 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.6.3 精密度与回收率试验 按 2.4 项下方法操作,分别配制高、中、低 3 个质量浓度的京尼平苷酸等 7 种成分的混合对照品溶液,每个质量浓度平行配制 6 份,按 2.3 项下条件检测,计算日内精密度的 RSD 2.1% ~ 9.0%;连续测定 5 d,计算日间精密度 RSD 2.3% ~ 9.6%。同上分别配制高、中、低 3 个质量浓度的京尼平苷酸等 7 种成分的混合对照品溶液,各 6 份,按 2.3 项下条件检测,以测得量与加入量之比计算方法回收率 82.83% ~ 114.66%。均符合生物样品的分析要求。

2.6.4 稳定性试验 取正常大鼠空肠于 120 min 时的肠吸收液样品,按 2.4 项下方法处理,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 按 2.3 项下条件分析,结果各成分

峰面积的 RSD 均 < 8.0%,说明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.6.5 基质效应 取低、中、高质量浓度的混合对照品溶液置离心管中,于 40 °C 氮气流下吹干,加入空白肠溶液 200 μL 溶解,按 2.4 项下方法进行操作,各个质量浓度进样 6 次,获得其相应的峰面积;另取上述低、中、高质量浓度的混合对照品溶液,于 40 °C 氮气流下吹干,残留物加初始流动相 200 μL 使溶解,按 2.4 项下方法操作,各个质量浓度进样 6 次,获得其相应的峰面积;计算两者峰面积比值(基质效应)81.53% ~ 113.54%,表明均不存在明显基质效应。

2.7 数据处理 计算药物各时间的累积吸收量(Q)和药物吸收速率常数(K_a)。

$$Q = 0.3C_n \times \frac{V_{\text{平衡}}}{V_{\text{取样}}} + 0.3 \sum_{i=1}^{n-1} C_i; K_a = L/A$$

式中 C_n 表示各时间点取样的实际检测质量浓度, $V_{\text{平衡}}$ 为平衡前肠管中加入的台氏液体积, $V_{\text{取样}}$ 为每次取样的体积, L 为药物 Q 对时间进行线性回归得到的斜率, A 为肠段的表面积。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用统计学软件 SPSS 17.0 进行分析,多组比较采用方差分析,两组比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.8 外翻肠囊试验

2.8.1 杜仲提取物在不同肠段的肠吸收情况 按 2.4 和 2.5 项下方法操作,制备十二指肠、空肠、回

肠和结肠各肠段不同时间点杜仲提取物外翻肠供试品溶液,计算京尼平苷酸等 7 个成分在 120 min 内各肠段 Q 和 K_a ,绘制 $Q-t$ 曲线(以杜仲提取物溶液

中京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷在肠道不同部位 $Q-t$ 为例绘图),并对其进行线性拟合,吸收情况见表 1~4 和图 2。

表 1 杜仲提取物中 7 个成分在正常大鼠与 SHR 十二指肠的吸收情况($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Absorption of seven components from Eucommiae Cortex extract in duodenum of normal rats and SHR($\bar{x} \pm s, n=5$)

化合物	正常组		SHR 模型组	
	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$
京尼平苷酸	61.173 8 ± 9.294 3	0.055 1 ± 0.008 6	52.918 9 ± 11.847 6	0.041 6 ± 0.008 2 ¹⁾
原儿茶酸	9.083 7 ± 1.115 5	0.007 4 ± 0.000 9	6.498 2 ± 0.745 0	0.005 1 ± 0.001 6
新绿原酸	1.215 3 ± 0.137 5	0.000 8 ± 0.000 1	1.129 7 ± 0.101 6	0.000 7 ± 0.000 2
绿原酸	2.820 8 ± 0.490 9	0.002 1 ± 0.000 2	2.079 3 ± 0.354 0 ¹⁾	0.001 4 ± 0.000 3 ¹⁾
隐绿原酸	1.375 5 ± 0.267 3	0.000 8 ± 0.000 1	1.223 6 ± 0.246 8	0.000 8 ± 0.000 2
松脂醇二葡萄糖苷	172.820 6 ± 19.144 6	0.131 6 ± 0.021 9	110.301 2 ± 15.227 3 ¹⁾	0.086 7 ± 0.027 6 ¹⁾
松脂醇单葡萄糖苷	11.869 4 ± 1.093 7	0.008 2 ± 0.001 9	15.530 3 ± 3.821 7	0.012 5 ± 0.004 3

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

表 2 杜仲提取物中 7 个成分在正常大鼠与 SHR 空肠的吸收情况($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Absorption of seven components from Eucommiae Cortex extract in jejunum of normal rats and SHR($\bar{x} \pm s, n=5$)

化合物	正常组		SHR 模型组	
	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$
京尼平苷酸	55.079 7 ± 3.323 9	0.041 4 ± 0.004 8	46.419 7 ± 5.429 4 ¹⁾	0.035 6 ± 0.003 3
原儿茶酸	6.819 2 ± 0.674 1	0.005 1 ± 0.000 7	8.861 5 ± 1.461 2 ¹⁾	0.006 4 ± 0.001 1
新绿原酸	0.925 6 ± 0.077 4	0.000 6 ± 0.000 1	1.147 8 ± 0.164 9 ¹⁾	0.000 7 ± 0.000 1
绿原酸	1.663 0 ± 0.099 5	0.001 2 ± 0.000 1	2.191 6 ± 0.335 3 ¹⁾	0.001 5 ± 0.000 2 ¹⁾
隐绿原酸	1.147 5 ± 0.092 4	0.000 8 ± 0.000 1	1.615 1 ± 0.169 2	0.000 7 ± 0.000 1
松脂醇二葡萄糖苷	92.114 4 ± 11.813 6	0.064 1 ± 0.009 9	164.486 6 ± 37.950 4 ¹⁾	0.117 9 ± 0.028 7 ¹⁾
松脂醇单葡萄糖苷	8.909 4 ± 1.217 7	0.006 4 ± 0.000 5	17.341 8 ± 2.787 0 ¹⁾	0.012 4 ± 0.002 0 ¹⁾

表 3 杜仲提取物中 7 个成分在正常大鼠与 SHR 回肠的吸收情况($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Absorption of seven components from Eucommiae Cortex extract in ileum of normal rats and SHR($\bar{x} \pm s, n=5$)

化合物	正常组		SHR 模型组	
	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$
京尼平苷酸	58.131 4 ± 5.662 0	0.044 2 ± 0.005 0	35.684 2 ± 3.813 3 ¹⁾	0.027 7 ± 0.005 0 ¹⁾
原儿茶酸	6.388 9 ± 0.833 4	0.004 8 ± 0.000 4	7.979 5 ± 0.439 7 ¹⁾	0.006 2 ± 0.000 9
新绿原酸	0.911 8 ± 0.052 2	0.000 5 ± 0	1.215 7 ± 0.058 6 ¹⁾	0.000 8 ± 0.000 1 ¹⁾
绿原酸	1.618 6 ± 0.027 4	0.001 1 ± 0.000 1	2.207 4 ± 0.243 4 ¹⁾	0.001 6 ± 0.000 1 ¹⁾
隐绿原酸	1.121 3 ± 0.046 8	0.000 7 ± 0.000 1	0.955 8 ± 0.067 0 ¹⁾	0.000 6 ± 0.000 1 ¹⁾
松脂醇二葡萄糖苷	110.023 8 ± 11.917 0	0.083 1 ± 0.010 6	140.818 5 ± 18.823 3 ¹⁾	0.111 0 ± 0.012 1 ¹⁾
松脂醇单葡萄糖苷	9.447 1 ± 1.170 6	0.007 3 ± 0.001 0	13.754 9 ± 1.954 9 ¹⁾	0.011 1 ± 0.002 1 ¹⁾

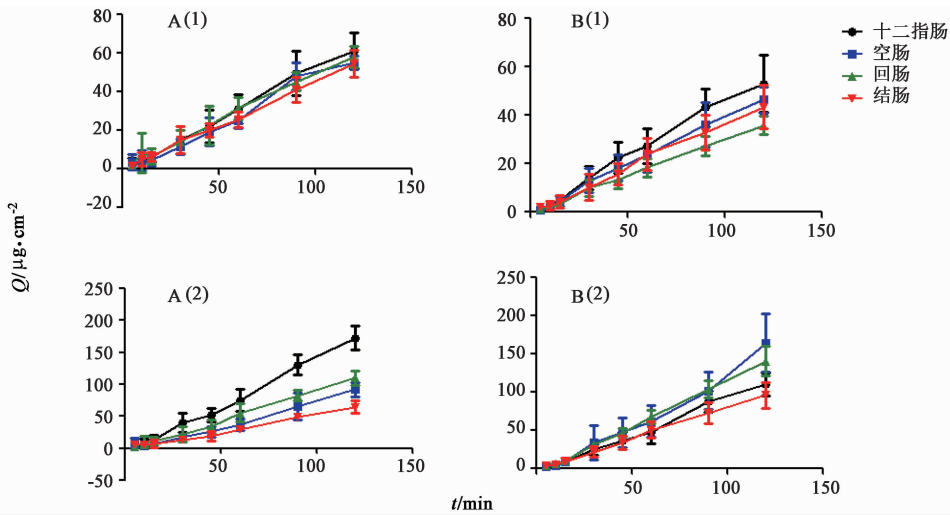
结果表明杜仲提取物中 7 种成分均可吸收进入肠囊,各成分的 $Q-t$ 曲线均为上升趋势,未呈饱和现象,提示 7 种成分在 120 min 内吸收未达到饱和状态。通过回归分析,其回归相关系数(R^2)均 > 0.9 ,符合零级吸收速度过程。供试药液的吸收主要集中在小肠,各肠段的吸收试验结果表明,正常大鼠十二指肠对各成分的吸收较空肠、回肠、结肠有较为明显

的优势。但这一优势在 SHR 模型组的表现却并不明显,各成分在十二指肠、空肠、回肠的吸收差异多数无统计学意义,其中原儿茶酸和松脂醇二葡萄糖苷在空肠有更好的吸收表现,提示病理状态可能会改变药物吸收的主要部位。肠吸收液和杜仲提取物中 7 种成分的含量大小排序基本保持一致,即松脂醇二葡萄糖苷 $>$ 京尼平苷酸 $>$ 松脂醇单葡萄糖苷 $>$

表 4 杜仲提取物中 7 个成分在正常大鼠与 SHR 结肠的吸收情况 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Absorption of seven components from Eucommiae Cortex extract in colon of normal rats and SHR ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

化合物	正常组		SHR 模型组	
	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	$Q/\mu\text{g}$	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$
京尼平苷酸	54.586 3 ± 6.785 5	0.042 5 ± 0.004 1	43.314 3 ± 9.005 1	0.033 5 ± 0.004 5 ¹⁾
原儿茶酸	5.991 0 ± 0.577 5	0.004 6 ± 0.000 3	4.868 3 ± 0.599 8 ¹⁾	0.003 6 ± 0.000 5 ¹⁾
新绿原酸	0.901 0 ± 0.106 1	0.000 6 ± 0.000 1	0.812 3 ± 0.084 5	0.000 5 ± 0.000 1 ¹⁾
绿原酸	1.630 4 ± 0.085 9	0.001 2 ± 0.000 1	1.634 7 ± 0.283 1	0.001 1 ± 0.000 2
隐绿原酸	0.716 2 ± 0.095 7	0.000 5 ± 0.000 1	0.956 8 ± 0.120 5 ¹⁾	0.000 6 ± 0.000 1 ¹⁾
松脂醇二葡萄糖苷	64.944 0 ± 9.906 8	0.043 9 ± 0.003 6	96.061 0 ± 16.774 7 ¹⁾	0.074 7 ± 0.014 5 ¹⁾
松脂醇单葡萄糖苷	8.733 9 ± 1.233 8	0.006 1 ± 0.001 1	10.263 1 ± 1.637 9	0.008 2 ± 0.001 3 ¹⁾



A. 正常组; B. SHR 模型组; 1. 京尼平苷酸; 2. 松脂醇二葡萄糖苷

图 2 杜仲提取物中京尼平苷酸及松脂醇二葡萄糖苷在正常大鼠和 SHR 各肠段的累积吸收量-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Cumulative absorption-time curves of geniposidic acid and pinoresinol diglucoside from Eucommiae Cortex extract in each segment of normal rats and SHR ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

原儿茶酸 > 绿原酸 > 隐绿原酸 ≈ 新绿原酸。

2.8.2 正常组与 SHR 模型组肠吸收动力学参数的比较 分别对相同质量浓度同一肠段正常大鼠与 SHR 的 Q 与 K_a 进行两两比较, 结果发现 7 种成分的吸收特征较为复杂, 在空肠和回肠的表现尤为明显。病理状态下, 京尼平苷酸、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷在十二指肠的吸收明显弱于正常大鼠, 其他成分的吸收表现差异无统计学意义。除隐绿原酸外, 杜仲提取物中其余 6 种成分在空肠的吸收都表现出了明显的差异。与正常组相比, 京尼平苷酸在 SHR 空肠的吸收减少, 原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷的吸收则显著增加。与正常组相比, 京尼平苷酸、隐绿原酸在 SHR 回肠的吸收降低, 原儿茶酸等其他 5 个成分在回肠的 Q 与 K_a 均大于正常大鼠。京尼平苷酸、原儿茶酸、新绿原酸在 SHR 结肠的 K_a 均小于正常组

($P < 0.05$), 而隐绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷在结肠的吸收则有所增加。整体吸收情况表明, 除京尼平苷酸在 SHR 各肠段的吸收均小于正常大鼠外, 其余成分在 4 个肠段的吸收较正常组都没有保持一致的吸收趋势, 这种差异可能与高血压复杂的病理变化有关。

3 讨论

在前期实验基础上, 本研究选择 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 杜仲提取物溶液作为肠囊供试液, 基本能代表京尼平苷酸等各成分在安全有效剂量下的肠吸收情况。将离体外翻肠囊模型的取样时间控制在 120 min 内^[11], 既确保了肠囊的生理活性, 又在一定程度上降低了实验误差。

基于离体外翻肠模型, 杜仲提取物中 7 种成分的肠吸收均为线性吸收, 主要吸收部位在小肠, 正常状态下以十二指肠的吸收最好。但原儿茶酸和松脂

醇二葡萄糖苷在高血压状态下的空肠有更好吸收,提示病理状态可能会改变药物吸收的特定部位。此外,通过正常大鼠的体循环灌注试验^[8]发现,京尼平苷酸在体内的吸收机制可能属于被动吸收,新绿原酸、绿原酸在高浓度下可能存在饱和现象,除单纯的被动吸收外,还可能同时存在主动转运和易化扩散。采用 Caco-2 细胞模型研究^[12]发现,杜仲提取物中原儿茶酸、京尼平苷酸、松脂醇单葡萄糖苷、松脂醇二葡萄糖苷 4 种成分存在浓度、时间依赖性,以被动扩散方式吸收。而杜仲在高血压状态下的体内吸收特性还需后续的体内试验进行确证。

近年来,越来越多的研究表明,中药的药代动力学特征会受到疾病状态所影响,生理及病理的变化在一定程度上会影响机体内的药物代谢酶、转运蛋白、细胞膜通透性及微生物菌群的改变^[13]。本文采用 SHR 结合离体外翻肠模型考察杜仲提取物的肠吸收特性,更接近疾病状态下机体的真实状况,较正常状态更有意义,且与临床更加相关。结果表明杜仲提取物中 7 个指标成分在 SHR 的肠吸收与正常大鼠相比均表现出了不同程度的差异。这种变化与高血压导致的血管张力增高、管壁增厚^[14-15]等密切相关。肠黏膜表面的绒毛是小肠物质吸收的部位,内含丰富的血管、毛细血管及乳糜淋巴管。从这个角度推测,SHR 的肠黏膜通透性较正常大鼠低,这在一定程度上解释了京尼平苷酸在各肠段的吸收弱于正常大鼠,这一影响也与绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷在正常大鼠十二指肠的吸收,隐绿原酸在回肠以及原儿茶酸、新绿原酸在结肠的吸收表现相吻合。此外,与正常大鼠相比,SHR 模型的十二指肠不再是 7 个成分的最大吸收部位,以松脂醇二葡萄糖苷为代表的其他成分在空肠和回肠都表现出吸收增加的趋势(除京尼平苷酸、隐绿原酸外),提示自发性高血压可能会使 7 种成分从小肠中的最大吸收部位后移,从十二指肠不同程度地转移到空肠、回肠,这种影响甚至使得松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷在结肠的吸收也有所增加。综上所述,高血压产生的病理变化比预测的情况更复杂,从肠黏膜通透性降低和吸收部位后移的角度尚无法完全解释,可能还与肠道中存在的酶和转运蛋白等相关,具体作用机制有待进一步的深入研究。

【参考文献】

[1] LUO L F, WU W H, ZHOU Y J, et al. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in

spontaneously hypertensive rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(2): 238-243.

- [2] GU J, WANG J J, YAN J, et al. Effects of lignans extracted from *Eucommia ulmoides* and aldose reductase inhibitor epalrestat on hypertensive vascular remodeling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(1): 6-13.
- [3] LANG C, LIU Z J, Taylor H W, et al. Effect of *Eucommia ulmoides* on systolic blood pressure in the spontaneous hypertensive rat [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(2): 215-230.
- [4] Kwan C Y, ZHANG W B, Deyama T, et al. Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Eucommia ulmoides* Oliv. bark extract is mediated by NO and EDHF in small vessels [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2004, 369(2): 206-211.
- [5] Kwan C Y, CHEN C X, Deyama T, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action [J]. *Vascular Pharmacol*, 2003, 40(5): 229-235.
- [6] 王永林, 向文英, 陆苑, 等. 杜仲的血清药物化学研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(7): 1101-1105.
- [7] 兰燕宇, 向文英, 杨武, 等. UPLC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中杜仲的五个成分及其药代动力学研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(4): 827-830.
- [8] 陈鹏程, 侯靖宇, 胡杰, 等. 杜仲提取物中 4 个主要成分的大鼠在体肠吸收 [J]. *中国医药工业杂志*, 2015, 46(7): 730-735.
- [9] 朱晶晶, 王智民, 龚慕辛, 等. 基于肠吸收的质量评价指标选择的方法和原则 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(6): 659-662.
- [10] 黄慧辉, 张小燕, 沈娟, 等. 菝葜抗炎有效部位群在大鼠肠外翻试验中的吸收特性考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(8): 96-99.
- [11] 秦海蛟, 柳梦婷, 唐力英, 等. 肠外翻囊法研究淫羊藿肠吸收成分及其吸收特征 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22): 163-168.
- [12] 兰燕宇, 刘跃, 曹旭, 等. 杜仲提取物中 4 种主要成分在 Caco-2 细胞的摄取特性研究 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(9): 1306-1310.
- [13] 巩仔鹏, 陈颖, 张瑞杰, 等. 疾病状态下的中药药代动力学研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 169-173.
- [14] 陆再英, 钟南山, 谢毅, 等. 内科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 251-256.
- [15] 魏国, 张立德. 高血压病的中药治疗机制探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(6): 1225-1228.

【责任编辑 刘德文】