

川楝子提取物在大鼠肠外翻试验中吸收特性考察

王岚, 王伟, 杨伟鹏, 梁日欣*, 李鹏跃, 王彦礼, 胡楠, 成龙, 侯瑞, 王怡薇, 殷小杰
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 采用肠外翻模型观察川楝子提取物在大鼠十二指肠、空肠、回肠及结肠段的吸收特征。**方法:** 采用大鼠肠外翻模型, 通过 HPLC 检测肠吸收液中川楝素(TSN)含量, 计算吸收速率参数, 以分析川楝素在肠道不同部位的吸收特征。**结果:** 不同质量浓度的 TSN 在各肠段均为线性吸收, R^2 均 > 0.95 , 符合零级吸收; TSN 的吸收速率常数均随川楝子提取物质量浓度的增加而显著增加, 表现为被动吸收。川楝素在十二指肠、空肠、回肠吸收较好, 且无显著性差异, 但在结肠处吸收较差。**结论:** TSN 在肠道不同部位吸收均符合零级吸收速率, 吸收形式可能为被动吸收。

[关键词] 川楝子提取物; 肠外翻; 川楝素; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0184-04

[doi] 10.11653/syfj2013170184

Absorption Characteristics Investigation of Extract from Toosendan Fructus in Rat Everted Gut Test

WANG Lan, WANG Wei, YANG Wei-peng, LIANG Ri-xin*, LI Peng-yue, WANG Yan-li,
HU Nan, CHENG Long, HOU Rui, WANG Yi-wei, YIN Xiao-jie

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe absorption characteristics of extract from Toosendan Fructus in duodenum, jejunum, ileum and colon segment by rat everted gut model. **Method:** Toosendanin (TSN) which was representative compositions of extract from Toosendan Fructus in rat everted gut test was detected by HPLC, and absorption rate parameter to describe absorption characteristics of TSN in different parts of intestine was calculated. **Result:** Absorption of TSN with different concentration was linearity in different intestines, square of coefficient correlation all exceed 0.95, which consistent with zero order absorption. K of TSN significantly increased along with raised the concentration of extract from Toosendan Fructus, indicated passive absorption. Absorption of TSN in duodenum, jejunum, ileum was quick with no significant differences, but absorption of TSN in colon was slow. **Conclusion:** Absorption of TSN at different sections of intestine conformed to zero order model with a pattern of passive absorption.

[Key words] extract of Toosendan Fructus; everted gut; toosendanin; RP-HPLC

川楝子别称金铃子, 具有舒肝、行气止痛、驱虫

等作用, 临床用于治疗胸胁、脘腹胀痛、疝痛、虫积腹痛等病症^[1]。目前, 国内学者对川楝子的研究主要集中于药效学和毒理学方面^[2-3], 药代学研究鲜有涉及。研究表明川楝素(TSN)为川楝子中主要有效成分, 且结构明确, 对 TSN 提取、鉴定及药理作用报道较多^[4]。本实验选择 TSN 为测定指标, 采用肠外翻囊模型, 借助 RP-HPLC 观察中药川楝子在十二指肠、空肠、回肠及结肠等肠道的吸收状况, 阐明川楝子在肠道的吸收特点, 为其临床合理应用提供依据。

[收稿日期] 20130226(004)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项项目(2008070036)

[第一作者] 王岚, 副主任技师, 从事中药药理研究, Tel: 010-64014411-2948, E-mail: wll11111@sina.com

[通讯作者] * 梁日欣, 博士, 研究员, 从事中药药理及药物代谢研究, Tel: 010-64014411-2948, E-mail: liangrixin2009@sina.com

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),Sorvall super T21 型高速离心机(美国索福公司),BP211D 型 1/万电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

川楝子(购自亳州医药公司,经中国中医科学院中药研究所何希荣教授鉴定为楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 的果实),川楝素(TSN)提取物(中日医院药剂科制备,提取量 $3.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),TSN 对照品(上海融禾医药科技发展有限公司,批号 090223),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物研究所),Tyrode 液(NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 , NaHCO_3 , NaH_2PO_4 ,葡萄糖质量浓度分别为 $8.0, 0.2, 0.1, 0.2, 1, 0.05, 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} 7.4$),乙腈、甲醇为色谱纯,水为自制高纯水,其他试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠,雄性,体重(250 ± 20) g,由军事医科院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(军)2007-004。

2 方法与结果

2.1 川楝素含量测定

2.1.1 色谱条件 Kromasil- C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相乙腈-水(35:65),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $32 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长 215 nm ,见图 1。

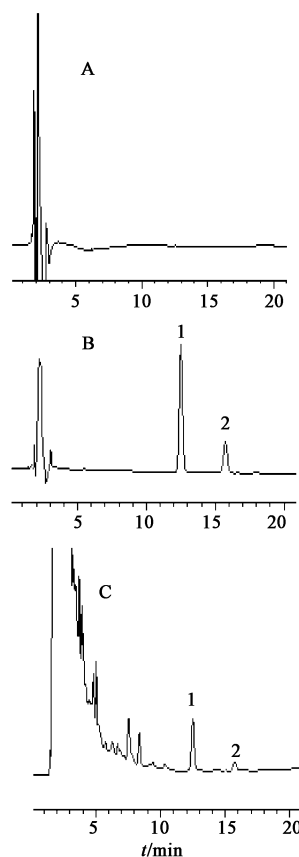
2.1.2 对照品溶液配制 精密称取 TSN 对照品 2.24 mg 于 10 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解并定容,配制成 $0.224 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,密封后冷藏备用。

2.1.3 川楝子提取物配制 精密称取川楝子提取物 7.04 g ,置于三角瓶中,用 Tyrode 液超声溶解并定容至 160 mL ,配制成 $44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 川楝子提取物储备液,使用时加 Tyrode 液稀释成相应质量浓度。

2.1.4 标准曲线的制备 吸取 TSN 对照品母液,加甲醇稀释成 $1.4, 2.8, 5.6, 11.2, 28, 56, 112, 224 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列质量浓度溶液,进样 $10 \mu\text{L}$,按 2.1.1 项下色谱条件进行分析,记录峰面积,以质量浓度对峰面积进行线性回归,得回归曲线方程 $Y = 141.7X + 2.178$ ($R^2 = 0.998$),线性范围 $1.6 \sim 224 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.5 精密度试验 分别配置低、中、高 3 个质量浓度的 TSN ($4, 56, 224 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对照品溶液,于 1 d 内分别测定 5 份样品,计算日内精密度 RSD 分别为 $0.77\%, 1.42\%, 1.25\%$;每个质量浓度的样品各取 1 份,连续测定 5 d,计算日间精密度 RSD 分别为 $1.08\%, 1.23\%, 1.52\%$,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取十二指肠于 45 min 时样



A. 空白 Tyrode 液; B. 对照品; C. 空肠 45 min 样品;

1, 2. 川楝素同分异构体

图 1 川楝子提取物 HPLC

品,于 0, 1, 2, 6, 12, 24 h 分别进样 $20 \mu\text{L}$,测定 TSN 变化,结果表明川楝子提取物中 TSN 在 24 h 内较为稳定, $\text{RSD} 1.23\%$ 。

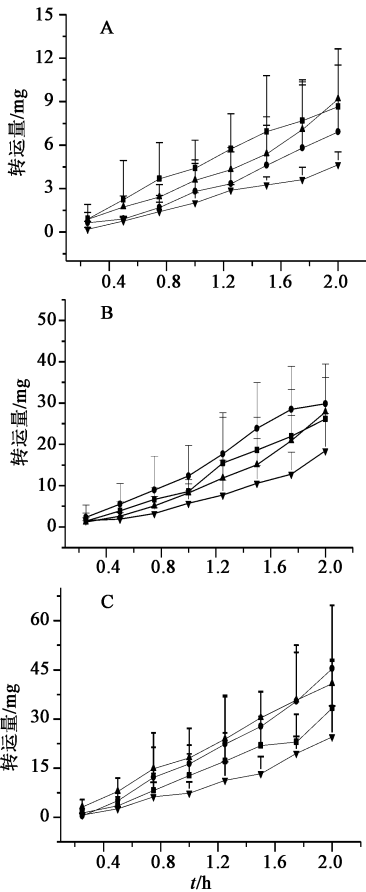
2.2 大鼠肠外翻吸收试验

2.2.1 肠外翻模型建立^[6-7] 试验分为 11, 33, $44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个质量浓度组,每组 4 只大鼠。大鼠禁食 12 h 后,脱颈处死,剖腹迅速取出十二指肠、空肠、回肠(长度均约 10 cm)及结肠(7 cm)。在冰 Tyrode 液中冲洗,直到无内容物流出,剔除肠段表面的肠系膜和脂肪;翻转肠管使各肠段的黏膜侧向外,浆膜侧向内, Tyrode 液冲洗干净后,肠段下端结扎,上端固定于取样口,最终形成囊状肠管。取空白 Tyrode 液 2 mL 注入肠囊内作为受药体系。置于麦氏浴槽中,整个试验过程保持 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温,浴槽中通入 $95\% \text{ O}_2 / 5\% \text{ CO}_2$ 。肠囊平衡 5 min 后,放掉麦氏浴槽中 Tyrode 液,注入事先配好的药液 20 mL (终质量浓度分别为 $11, 33, 44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),分别在给药后 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 min 从肠囊内取样 $200 \mu\text{L}$,同时补足相同体积的空白 Tyrode 液。

2.2.2 样品处理 待测样品于 4 ℃, 13 000 r·min⁻¹ 条件下离心 25 min, 取上清 150 μL, 再次离心, 取上清 20 μL 进样, HPLC 测定 TSN 含量。计算不同质量浓度下 TSN 在各个时间点的累积吸收量(Q)。

$$Q = 2C_n + 0.2 \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

式中 C_n 为 n 时间点的实际检测质量浓度。以 Q 对时间进行零级、一级、Higuchi 方程、米-曼氏方程拟合, 以相关系数(r)为拟合优劣的判断标准, 结果显示零级拟合较好, 以 Q 平均值对时间作线性回归, r 均 > 0.95, 说明符合零级吸收, 见图 2 和表 1。



A. 11 g·L⁻¹; B. 33 g·L⁻¹; C. 44 g·L⁻¹;
■. 十二指肠; ◆. 空肠; ▲. 回肠; ▼. 结肠

图 2 川楝子提取物中 TSN 由黏膜侧向浆膜侧转运 ($\bar{x} \pm s$)

表 1 不同质量浓度下各肠段 Q 对时间的线性回归方程 (n=4)

肠段	质量浓度 /g·L ⁻¹	回归方程	r
十二指肠	11	Q = 4.406t + 0.084	0.993
	33	Q = 14.59t - 3.583	0.984
	44	Q = 17.47t - 4.472	0.974
空肠	11	Q = 3.701t - 0.820	0.979
	33	Q = 17.00t - 3.018	0.985
	44	Q = 24.72t - 7.171	0.997
回肠	11	Q = 4.504t - 0.733	0.964
	33	Q = 14.81t - 5.08	0.954
	44	Q = 21.69t - 2.497	0.987
结肠	11	Q = 2.471t - 0.419	0.990
	33	Q = 9.349t - 2.775	0.940
	44	Q = 13.18t - 4.099	0.963

由相关回归分析得出的斜率(L)与吸收表面积(A)求得吸收速率常数(K), 即 K = L/A, 计算药物吸收率(V)。

$$V = Q_{\text{累积量}} / 2C_0 \times 100\%$$

式中 Q_{累积量} 为 2 h 药物累计吸收量, C₀ 为药物初始质量浓度。采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析, 单因素方差分析 (ANOVA) 进行各组间数据比较, 见表 2 和图 3。结果表明各肠段 TSN 的 K 随质量浓度增加而成线性增加, r 均 > 0.95, 表明 TSN 在肠道的吸收方式为被动吸收。低质量浓度时, 十二指肠的 K 显著高于其他肠段的 K; 在中、高质量浓度时, 十二指肠、空肠、回肠各肠段等质量浓度的 K 统计学无显著性差异, 但均显著高于结肠。

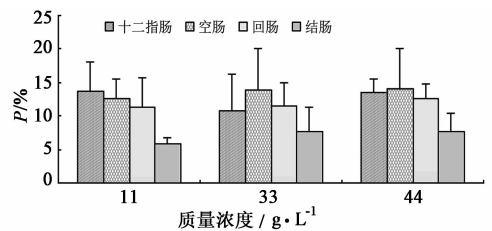


图 3 川楝子提取物中 TSN 在肠道不同部位的吸收率 ($\bar{x} \pm s$)

表 2 不同质量浓度川楝子提取物中 TSN 的吸收速率常数 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

川楝子提取物 质量浓度/g·L ⁻¹	K/μg·min ⁻¹ ·cm ⁻²			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
11	0.379 ± 0.081	0.161 ± 0.071	0.136 ± 0.047	0.075 ± 0.008
33	0.894 ± 0.224	0.815 ± 0.320	0.660 ± 0.062	0.325 ± 0.167
44	1.002 ± 0.212	0.980 ± 0.308	0.999 ± 0.296	0.448 ± 0.128

3 讨论

川楝素为同分异构体,检测波长 215 nm^[8],增加了检测难度,经前期试验反复摸索,建立 RP-HPLC 测定川楝子提取物中川楝素的测定方法,方法学考察结果表明该方法精密性、重复性及稳定性均良好。

药物肠吸收在某一程度上能反映药物口服后整体吸收情况。外翻肠囊法是目前最为常见的体外吸收模型,主要是通过测定肠吸收液中受试药的成分来确定其吸收方式或特征,该模型能较为真实地模拟肠道生理环境,获得的试验数据能客观地反映有效成分的吸收特征,在一定程度上,还可用于分析药物的吸收机制^[9],在中药药代动力学研究中应用较为广泛^[10-12]。但此模型的操作过程需快速完成,以保留肠管完整的组织和黏膜的特性,本试验控制在 10 min 左右,经检测确定能较好地保留肠细胞活性。

[参考文献]

- [1] 魏春花,吕建辉.川楝子药效古今论要[J].实用医技杂志,1997,4(7):561.
- [2] 齐双岩,金若敏,刘红杰,等.川楝子致大鼠肝毒性机制研究[J].中国中药杂志,2008,33(16):2045.
- [3] 齐双岩,谷颖敏,金若敏,等.川楝子对大鼠肝组织超微结构和原代培养肝细胞的影响[J].中国中药杂志,2009,4(22):2966.

- [4] 陈兵.川楝子的现代研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(12):259.
- [5] 董宇,张英丰,杨庆.黄连提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究[J].中国中药杂志,2008,33(9):1056.
- [6] 柏冬,牛晓红,范斌,等.桂枝汤在肠道不同部位的吸收研究[J].中药新药与临床药理,2010,21(2):167.
- [7] 毕肖林,程锦.连翘苷在大鼠小肠的吸收特性研究[J].中国现代应用药学,2010,27(2):92.
- [8] 谢帆,张勉,张朝凤,等.川楝子的化学成分研究[J].中国药学杂志,2008,43(14):1066.
- [9] Wilson T H, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface[J]. J Physiol, 1954, 123(1):116.
- [10] 龚慕辛,王雅琦,宋亚芳,等.外翻肠囊法快速发现吴茱萸汤吸收成分群的研究[J].中国中药杂志,2010,35(11):1399.
- [11] 张英丰,杨庆,李玉洁,等.离体外翻肠囊法研究丹参水溶性提取物丹酚酸 B 的大鼠肠吸收特性[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):187.
- [12] 张英丰,李玉洁,杨庆,等.采用离体外翻肠囊模型进行穿心莲内酯的肠吸收特性研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):107.

[责任编辑 仝燕]

《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2014 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。