

肠道菌群法研究延胡索、白芷配伍对 延胡索乙素代谢的影响

梁新丽, 祝婧云, 廖正根*, 赵国巍, 王光发

(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 考察大鼠肠道菌群对延胡索总碱(TA)中延胡索乙素(tetrahydropalmatine, TET)的代谢情况及白芷香豆素(coumarin, Cou)和白芷挥发油(volatil oil, VO)两种提取物与TA配伍对延胡索乙素在大鼠体内代谢的影响, 探讨元胡、白芷有效组分配伍规律。方法: 分别将TA, TA-Cou, TA-VO, TA-Cou-VO 4组药物与新鲜配制的大鼠肠内容物混悬液在37℃孵化, 采用HPLC-FLD测定孵化不同时间大鼠肠内容物混悬液中TET的浓度。结果: TA-Cou组明显减缓了TET的降解速度。结论: 从代谢的角度证实了元胡白芷配伍的合理性。

[关键词] 元胡白芷配伍; 延胡索乙素; 大鼠肠道菌群; 代谢; 荧光检测

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0092-03

中药延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 具有活血散瘀, 理气止痛的功效, 尤以止痛作用显著。现代药理研究表明延胡索的有效成分为具有镇痛的延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素等生物碱, 其中延胡索乙素的镇痛作用最强^[1]。临床上常与其它药物配伍治疗各种疼痛, 如配伍白芷组成的元胡止痛方^[2]为治疗胃痛、头痛、痛经等的要药。收载于1985~2005年各版药典, 该方的配伍研究仅见延胡索和白芷在镇痛方面具有协同作用。^[2]有研究表明^[3-4], 呋喃香豆素及其类似结构的化学成份可抑制代谢酶对药物的破坏, 减少药物成分在肠道内的分解, 导致药物以通常数倍乃至十几倍的量进入血液, 从而提高药物的吸收, 增强药物的生物利用度。而白芷中的香豆素成份中具有呋喃型香豆素和其它类似结构的成分, 这些成份是否存在相近的活性? 因此, 本实验通过大鼠肠道菌群来考察延胡索与白芷配伍对延胡索总碱中延胡索乙素代谢影响, 探讨延胡索白芷药对的配伍规律。

1 材料

1.1 药物与试剂 延胡索总生物碱(TA)自制; 白芷挥发油(VO, 自制); 白芷香豆素(Cou, 自制); 延

胡索乙素(TET)对照品, 购自中国药品生物制品检定所, 批号110726-200409, 经HPLC检测鉴定为单一色谱峰。乙腈(色谱纯, 德国默克), 磷酸(分析纯、广州市金华大化学试剂有限公司), 三乙胺(分析纯、上海金山亭林工业园区), 水为双蒸水。

1.2 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪; QYC-200 恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司); XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂);

1.3 动物 SD大鼠, 雄性, (250±20)g, 购于江西中医学院实验动物中心, 动物生产合格证书: SCXK(赣)2006-0001。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 延胡索总碱制备 取100g延胡索药材, 8倍量70%乙醇回流提取2次, 每次1h, 合并2次提取液, 减压回收乙醇至无醇味。D101大孔吸附树脂吸附药液后, 先用10BV的纯化水、再用15BV95%的乙醇以2BV/h的速度洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩、干燥即得延胡索总碱, 以延胡索乙素计总生物碱含量80.0%, 含延胡索乙素1.82%。

2.1.2 白芷总香豆素 取200g白芷药材, 10倍量70%乙醇浸渍24h后, 进行渗漉, 渗漉速度1mL/min, 收集渗漉液, 减压回收乙醇, 药液置4℃环境中静置过夜, 取沉淀层加等倍量乙醚反复萃取3次, 萃取液挥干乙醚, 即得。以欧前胡素计本品含总香豆素含量50.1%, 含欧前胡素3.2%。

2.1.3 白芷挥发油 采用水蒸气蒸馏法制备白芷

[收稿日期] 2009-08-18

[基金项目] 江西省自然科学基金资助项目(2007GZY0932)

[通讯作者] * 廖正根, Tel: (0791) 7119011; E-mail: lyzlyg@163.com

挥发油。挥发油提取率 2.0%，其中含 α -蒎烯含量为 6.71%，甲基-环癸烷 7.4%，1-十四烷醇 3.80%。

2.1.4 延胡索乙素对照品溶液的制备 精密称定延胡索乙素 2 mg，置于 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，得 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液，备用。

2.2 体外代谢研究

2.2.1 大鼠肠内容物混悬液的制备 大鼠 10 只，禁食 16 h，大鼠脱颈椎处死后马上将肠取出，用适量生理盐水将内容物冲出，置于研钵中研磨，用纱布过滤，即得。大鼠肠内容物制备后立即使用。

2.2.2 药物肠内容物混悬液的制备 TA 组：称取延胡索总生物碱 0.03 g，加入新配制的大鼠肠内容物混悬液 10 mL，混匀；TA-Cou 配伍组：称取延胡索总生物碱 0.03 g、白芷总香豆素 0.0162 g，加入新配制的大鼠肠内容物混悬液 10 mL，混匀；TA-VO 配伍组：取延胡索总生物碱 0.03 g、白芷挥发油 18 μL ，加入新配制的大鼠肠内容物混悬液 10 mL，混匀；TA-Cou-VO 配伍组：取延胡索总生物碱 0.03 g、白芷香豆素 0.0162 g、白芷挥发油 18 μL ，加入新配制的大鼠肠内容物混悬液 10 mL，混匀。

2.3 样品预处理 取大鼠肠内容物混悬液 0.2 mL，加入 0.8 mL 甲醇，涡旋混合 120 s，以 $15\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上清液滤过备用。

2.4 样品分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱：XTerra RP18 柱 (3.9 mm \times 150 mm, 5 μm , Waters)；流动相为乙腈-0.1% 磷酸水 (三乙胺调 pH = 6.13) (50:50)；激发波长：232 nm；发射波长：323 nm；体积流量：1.0 mL \cdot min⁻¹；柱温：25 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 20 μL 。

2.4.2 方法的专属性 在上述色谱条件下，延胡索乙素与大鼠肠内容物中的杂质有较好的分离，大鼠肠内容物中的杂质与其他的杂质不干扰样品峰，TET 的保留时间为 8.185。色谱图见图 1，说明该方法专属性较高。

2.4.3 线性关系的考察 分别取 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 延胡索乙素对照品 20, 40, 60, 80, 100 μL ，加入 0.2 mL 的大鼠肠内容物混悬液，涡旋 60 s，再分别加入 0.8 mL 甲醇，涡旋混合 30 s 后，以 $15\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min，取上清液 20 μL 注入 HPLC 仪，记录峰面积，建立标准曲线。以峰面积 Y 对进样含量 X 作线性回归，结果表明，在考察范围内，延胡索乙素的含量与峰面积呈良好的线性关系。回归方程： Y

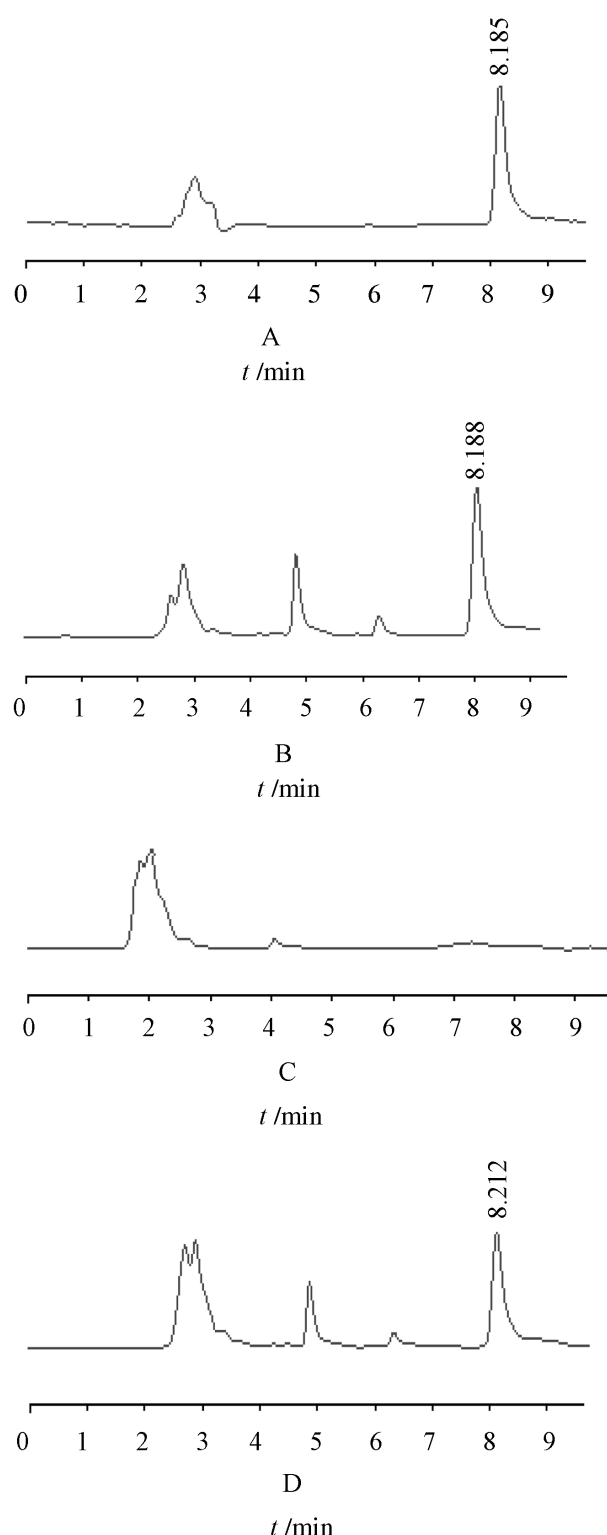


图 1 高效液相色谱图

A. 延胡索乙素对照品；B. 含有延胡索总碱的肠内容物；C. 含有白芷香豆素和挥发油的肠内容物；D. 含有延胡索总碱、白芷香豆素及挥发油的肠内容物

$= 750.21 X - 0.4297, r = 0.9999$ ，线性范围 $0.04 \sim 0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5 延胡索总碱及配伍白芷有效组份对延胡索乙素代谢的影响 将分别含有 TA, TA-Cou, TA-VO, TA-Cou-VO 4 组药物的肠内容物混悬液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中振荡孵化，每组样品平行温孵 6 次，分别于 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 h 从各组温孵液中取样 0.2 mL，按“样品预处理”方法项下处理，注入 HPLC 仪检测，记录峰面积，代入标准曲线计算延胡索乙素的浓度。结果表明，各组药物与大鼠肠内容物共同孵育后延胡索乙素迅速被代谢，TA-Cou-VO 及 TA-Cou-VO 两组与 TA 组相比，不同时间点延胡索乙素代谢

量相近,而 TA-Cou 明显减缓了延胡索乙素的代谢速度,在 4 组药物中,延胡索总碱配伍白芷总香豆素(TA-Cou)后延胡索总碱中活性成分延胡索乙素原形药物保留最多。结果见表 1、图 2。

表 1 延胡索、白芷有效组份配伍对延胡索乙素代谢的影响(均±s, n=6)

时间/h	TET 浓度/mg·mL ⁻¹			
	TA	TA-Cou	TA-VO	TA-Cou-VO
0	0.77 ±0.21	0.78 ±0.29	0.76 ±0.18	0.75 ±0.26
0.25	0.71 ±0.17	0.70 ±0.28	0.69 ±0.24	0.68 ±0.19
0.5	0.50 ±0.22	0.44 ±0.10	0.50 ±0.17	0.42 ±0.14
1	0.38 ±0.09	0.51 ±0.08	0.45 ±0.14	0.31 ±0.12
2	0.41 ±0.15	0.46 ±0.13	0.35 ±0.11	0.31 ±0.08
3	0.44 ±0.12	0.49 ±0.04	0.30 ±0.06	0.40 ±0.13
4	0.42 ±0.06	0.51 ±0.04 ¹⁾	0.33 ±0.07	0.32 ±0.10

注:与 TA 组相比较¹⁾ P<0.05

3 讨论

中药有效成分的肠内菌群代谢研究方法包括整体肠内菌实验,离体实验,体内实验方法,体外代谢实验和现代仪器分析法。本文采用的是离体实验法中的离体消化道内容物温孵法,具有可调控,速度快的特点^[5]。

我们前期的研究工作表明,白芷有效组份配伍延胡索总碱可增强延胡索总碱的镇痛效应,且增加动物血浆中延胡索乙素的血药浓度,改变延胡索乙素在大鼠体内的药代动力学性质^[6],并且可增强延胡索乙素的小肠吸收^[7]。那么延胡索、白芷的配伍是否也改变了延胡索乙素在体内的代谢?而延胡索乙素的药代动力学性质及小肠吸收特性的改变是否与延胡索乙素在体内代谢的改变有关?本实验从代谢角度进行延胡索有效组分与白芷有效组分的配伍的研究。结果表明,在离体条件下,延胡索乙素易被

大鼠肠道菌群降解,孵化 1 h 后延胡索乙素迅速被肠道菌群代谢,随着孵化时间的延长,延胡索乙素被大鼠肠道菌群代谢的速度放缓,至 4 h 后孵育液中延胡索乙素含量最低。配伍白芷挥发油及总香豆素后的代谢特征与延胡索总碱相似,但单独配伍香豆素明显延缓了延胡索乙素的代谢,提示延胡索乙素的吸收及药代动力学行为改变可能与此有关,但具体的机制有待进一步研究。本文第一次从药物代谢的角度阐明了该方配伍的合理性。

目前有关中药复方代谢的文献报道还较少,本实验从有效成分的肠道菌群代谢出发,研究了配伍药味对有效成分代谢的影响,对于全面反映复方中药的代谢,指导临床合理用药将具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] 刘赛月,朱蕴玮.延胡索生物碱的现代药理研究概况[J].中华实用中西医杂志,2006,19(1):83.
- [2] 朱央央,余伯阳.元胡止痛方配伍的化学和药效学比较研究[J].中国药科大学学报,2003,34(5):461.
- [3] 李雪宁,李志善,诸骏仁,等.葡萄柚汁与药物的相互作用[J].中药临床药理学杂志,1999,15(5):389.
- [4] 熊志勇,谢凤妮,王辉,等.葡萄柚中细胞色素 P450 酶抑制剂研究进展[J].广州化工,2007,35(6):8.
- [5] 索晴,刘树民.近年来中药在肠内的吸收代谢研究方法思路概述[J].中国中医药科技,2007,14(2):141.
- [6] 梁新丽,廖正根,王光发,等.白芷提取物与延胡索总碱配伍对延胡索乙素在大鼠体内药代动力学的影响[J].药学学报,2009,44(6):645.
- [7] 祝婧云,廖正根,陈绪龙,等.元胡白芷有效组分配伍对延胡索乙素小肠吸收的影响[J].江西中医学院学报,2009,21(3):56.