



大叶茜草素及羟基茜草素在大鼠体肠吸收研究

王侃¹, 陈星¹, 单鸣秋¹, 丁安伟^{1,2*}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] **目的:**研究大叶茜草素及羟基茜草素在大鼠各肠段中的吸收动力学特征。**方法:**采用大鼠在体单向肠灌流模型对大叶茜草素和羟基茜草素在大鼠各肠段的吸收特性进行研究。用酚红标记法校正循环液体积。**结果:**不同质量浓度的大叶茜草素(12.33, 24.66, 49.32 mg·L⁻¹)及羟基茜草素(8.455, 16.91, 33.82 mg·L⁻¹)在各肠段的吸收量顺浓度梯度, 渗透系数呈上升趋势且均大于 $0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 在相同浓度下大叶茜草素及羟基茜草素在各肠段 P_{eff} 表现为相同趋势, 依次为结肠 > 十二指肠 > 回肠 > 空肠, 且有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**大叶茜草素及羟基茜草素在大鼠肠道内为高渗透性药物, 各肠段均有吸收, 且在结肠部位可能存在特异性吸收。

[关键词] 大叶茜草素; 羟基茜草素; 在体单向肠灌流; 高效液相色谱法

茜草始载于《神农本草经》, 系茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根及根茎。味苦, 性寒, 归肝经。功能凉血, 祛瘀, 止血, 通经。用于吐血, 衄血, 崩漏, 外伤出血, 瘀阻经闭, 关节痹痛, 跌扑肿痛^[1]。其主要成分大叶茜草素及羟基茜草素是从茜草中分离出的醌类化合物, 具有明显的生物活性。药理学表明其有良好的活血功效^[2-3]。

本文采用大鼠单向肠灌流模型考察大叶茜草素及羟基茜草素吸收机制, 为大叶茜草素、羟基茜草素及茜草的剂型选择和新剂型的开发提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters 515 高效液相色谱仪, Waters 2487 检测器; 752 型紫外光栅分光光度计(上海光谱仪器有限公司); TB100-1F 型兰格蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司); SZ-1 型快速混匀器(江苏金坛市全城国胜实验仪器厂); Anke TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); LIBROR AEL-40SM 电子分析天平(日本 SHIMADZU 公司)。

1.2 药品与试剂

大叶茜草素(中国药品生物制品检定所), 羟基

茜草素(sigma 公司), 酚红(上海三爱思试剂有限公司), HEPES, 甲醇(色谱纯), 重蒸水(自制), 三氟乙酸(色谱纯), 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 300 ~ 350 g, 由南京市江宁区青龙山动物实验中心提供, 许可证号 SCXK(苏)2009-0001。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)的配制 称取 HEPES 5.976 g, KCl 0.402 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.247 g, NaCl 9.170 g, KH₂PO₄ 0.063 g, NaHCO₃ 0.374 g, CaCl₂ 0.149 g, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 0.128 g, D-葡萄糖 4.505 g, 溶于超纯水, 定容至 1 L 调 pH 7.40。

2.1.2 大叶茜草素及羟基茜草素储备液的配制 精密称取大叶茜草素、羟基茜草素对照品适量, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 用无水乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成 2.47, 1.69 g·L⁻¹ 的储备液。

2.1.3 酚红储备液的配制 精密称取酚红适量, 置于 50 mL 量瓶中, 用空白 HBSS 溶液溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成 1.05 g·L⁻¹ 的酚红储备液。

2.1.4 肠循环液的配制 精密移取供试品储备液适量, 用 37 °C 含酚红(20 mg·L⁻¹) 的 HBSS 溶液稀释成大叶茜草素 12.33, 24.66, 49.32 mg·L⁻¹ 和羟基茜草素 8.455, 16.91, 33.82 mg·L⁻¹ 肠循环液。

2.2 灌流液中酚红的测定

取含酚红的 HBSS 溶液、含大叶茜草素及羟基茜草素和酚红的 HBSS 溶液以及不含酚红的大叶茜

[稿件编号] 20111217002

[基金项目] 国家中医药局公益性行业科研专项(HY11076631)

[通信作者] * 丁安伟, 博士生导师, Tel: (025) 85811523, E-mail: awding105@163.com

[作者简介] 王侃, 硕士研究生, Tel: 13770779778, E-mail: wangkan86@hotmail.com

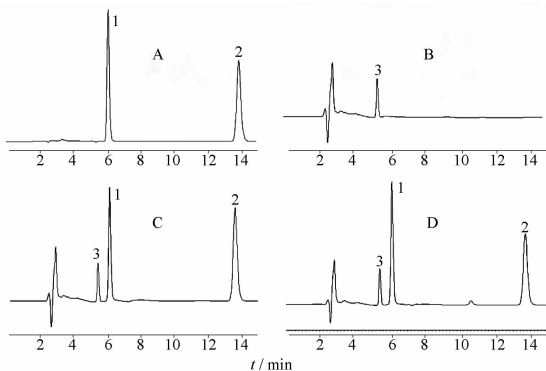


草素、羟基茜草素的 HBSS 溶液各 0.5 mL 于 10 mL 试管中,加入 1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液 5.0 mL,混匀。于 400 ~ 700 nm 进行可见光扫描,在 558 nm 下只有酚红有吸收,确定测定波长及方法的专属性。精密量取一定量的酚红,用空白 HBSS 溶液配成 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg · L⁻¹ 的系列标准溶液,分别吸取 0.5 mL 于 10 mL 试管中,加入 1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液 5.0 mL,混匀,以同浓度的 NaOH 溶液为空白,在 558 nm 处测定其吸光度(A),以酚红的吸光度(A)对质量浓度(C, mg · L⁻¹)进行线性回归,得标准曲线方程 $A = 0.017C + 0.017, r = 0.9999$,表明酚红在 5 ~ 50 mg · L⁻¹ 线性关系良好。取肠循环液 0.5 mL,加入 1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 5.0 mL,混匀,以同浓度的 NaOH 溶液为空白,在 558 nm 处测定其吸光度,根据标准曲线方程,计算酚红的浓度。

2.3 灌流液中大叶茜草素及羟基茜草素的测定

2.3.1 色谱条件 Hanbon Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为酸水(0.5% 三氟乙酸溶液-甲醇 17:83); 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 256 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.3.2 专属性考察 取标准供试液、空白肠灌流液、含 2.1.2 中供试品的空白肠灌流液、肠灌流后的样品溶液,按 2.3.1 得相对应的色谱图,见图 1。



A. 标准供试液; B. 空白肠循环液; C. 含供试液的空白肠循环液; D. 肠循环后样品溶液; 1. 羟基茜草素; 2. 大叶茜草素; 3. 酚红。

图 1 大叶茜草素及羟基茜草素的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mollugin and purpurin

2.3.3 茜草有效成分在不同 pH 下的 HBSS 溶液稳定性考察 采用 HCl 和 NaOH 溶液调节 HBSS 液得到 pH 分别为 6.00, 7.40, 8.04, 加入大叶茜草素 24.66 mg · L⁻¹ 和羟基茜草素 16.91 mg · L⁻¹ 37 °C

水浴条件下放置,分别于 0, 3 h 取样,测定含量。以峰面积计算降解残存百分率,见表 1, 2。大叶茜草素及羟基茜草素在 pH 6.00, 7.40, 8.04 中均比较稳定,所以选择与肠溶液 pH 最接近的 7.40。

表 1 不同 pH 下对大叶茜草素在含有酚红的 HBSS 溶液中的稳定性影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Influence of pH on the stability of mollugin in HBSS contained phenol red($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH	3 h 降解残存率 %
6.00	103.45 ± 1.32
7.40	98.67 ± 0.79
8.04	96.12 ± 1.33

表 2 不同 pH 下对羟基茜草素在含有酚红的 HBSS 溶液中的稳定性影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Influence of pH on the stability of purpurin in HBSS contained phenol red($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH	3 h 降解残存率 %
6.00	99.12 ± 1.42
7.40	102.13 ± 0.54
8.04	106.12 ± 1.54

2.3.4 茜草有效成分在空白大鼠肠灌流液中稳定性考察 取空白大鼠肠灌流液,精密吸取供试储备液,配制成大叶茜草素 24.66 mg · L⁻¹ 和羟基茜草素 16.91 mg · L⁻¹ 药液,置于密闭容器中,于 37 °C 的水浴中放置,分别于 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h 取样测定,测得大叶茜草素的质量浓度 RSD 1.3%, 羟基茜草素的质量浓度 RSD 2.2%。

2.3.5 标准曲线的制备 分别精密吸取一定量的样品储备液,用空白 HBSS 溶液稀释成大叶茜草素质量浓度为 78.91, 39.47, 19.73, 9.864, 4.932, 2.477 mg · L⁻¹ 及羟基茜草素质量浓度为 54.11, 27.06, 13.53, 6.764, 3.382, 1.691 mg · L⁻¹ 的系列标准混合溶液。在上述色谱条件下,分别进样 20 μL,记录峰面积。分别以大叶茜草素和羟基茜草素浓度(X, mg · L⁻¹)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,得其标准曲线方程 $Y = 179.48X - 141.9, r = 0.9999, Y = 240.25X + 419.2, r = 0.9999$,表明大叶茜草素和羟基茜草素在 78.91 ~ 2.477 mg · L⁻¹, 54.11 ~ 1.691 mg · L⁻¹ 线性良好。

2.3.6 精密度试验 按 2.3.5 配制成含大叶茜草



素为 12.33, 24.66, 49.32 mg · L⁻¹ 和羟基茜草素为 8.455, 16.91, 33.82 mg · L⁻¹ 的 3 个不同质量浓度的供试液, 每个浓度分别测 5 次。以 1 d 内测得 5 次计算日内精密密度, 以连续 5 d 测定同一样品的峰面积测得日间精密密度。所测得大叶茜草素质量浓度日内精密密度的 RSD 分别为 1.4%, 0.8%, 1.0%, 日间精密密度的 RSD 分别为 1.5%, 1.8%, 1.4%。所测得羟基茜草素日内精密密度 RSD 为 1.0%, 0.9%, 0.7%, 日间精密密度 RSD 为 1.5%, 1.6%, 2.6%。

2.3.7 回收率试验 按 2.3.5 项方法下操作, 配制成含大叶茜草素 12.33, 24.66, 49.32 mg · L⁻¹ 和羟基茜草素 8.455, 16.91, 33.82 mg · L⁻¹ 的 3 个不同质量浓度下的供试液, 每一浓度分别测 3 次, 记录峰面积, 计算测得量, 与加入量相比计算方法回收率。低、中、高浓度供试液中大叶茜草素的回收率为 (99.43 ± 1.46)%, (100.07 ± 0.75)%, (99.67 ± 1.21)%, 羟基茜草素的回收率为 (99.69 ± 1.15)%, (99.78 ± 0.69)%, (100.10 ± 1.32)%, 符合生物样品含量测定要求。

2.4 数据分析^[4]

用酚红法对灌流液的流入和流出的体积进行校正, 消除体积变化引起的影响。在体大鼠单向肠灌流试验中所测得出口处样品的浓度用公式 (1) 校正。

$$C_{\text{out(corrected)}} = \frac{C_{\text{out}} \text{PR}_{\text{in}}}{\text{PR}_{\text{out}}} \quad (1)$$

大叶茜草素及羟基茜草素的有效渗透系数 P_{eff} 用公式 (2), 吸收速率参数 K_a 用公式 (3)。

$$P_{\text{eff}} = \frac{Q \ln(C_{\text{in}}/C_{\text{out(corrected)}})}{2\pi rL} \quad (2)$$

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out(corrected)}}}{C_{\text{in}}}\right) Q / \pi r^2 L \quad (3)$$

表 3 不同浓度大叶茜草素在各肠段的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Absorption parameters of three concentrations of mollugin in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	参数	十二指肠	空肠	回肠	结肠
低浓度	$K_a / \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0.749 ± 0.10 ^{1,2)}	0.656 ± 0.07 ^{1,2)}	0.634 ± 0.07 ^{1,2)}	1.40 ± 0.06 ²⁾
	$P_{\text{eff}} / \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	0.969 ± 0.16 ^{1,2)}	0.742 ± 0.09 ^{1,2)}	0.723 ± 0.10 ^{1,2)}	1.60 ± 0.10 ²⁾
中浓度	$K_a / \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	1.35 ± 0.22 ¹⁾	0.750 ± 0.11 ¹⁾	0.993 ± 0.01 ¹⁾	1.78 ± 0.11
	$P_{\text{eff}} / \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	1.26 ± 0.04 ¹⁾	0.804 ± 0.03 ¹⁾	0.957 ± 0.02 ¹⁾	2.06 ± 0.06
高浓度	$K_a / \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	1.78 ± 0.06 ^{1,2)}	0.659 ± 0.05 ¹⁾	0.909 ± 0.03 ¹⁾	4.77 ± 0.13 ²⁾
	$P_{\text{eff}} / \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	1.30 ± 0.09 ¹⁾	0.835 ± 0.12 ¹⁾	1.02 ± 0.13 ¹⁾	3.81 ± 0.16 ²⁾

注: 与结肠组比较¹⁾ $P < 0.05$, 与中剂量组相比²⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

3 讨论

本文采用大鼠在体单向肠灌流法, 保证了肠道

$C_{\text{out(corrected)}}$ 和 C_{out} 分别为出口处经校正后的样品的浓度和实际测得的样品的浓度; C_{in} 灌流液中样品的浓度; $\text{PR}_{\text{in}}, \text{PR}_{\text{out}}$ 分别为入口处和出口处酚红的浓度; Q 为肠道灌流液的流速 ($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$); r 和 L 分别为被灌流肠段的长度和内径 (cm)。

采用 SPSS 16.0 软件, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.5 大鼠在体单向肠灌流试验

取禁食 16 h (自由饮水) 的大鼠, 称重, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 在腹腔中下部, 沿腹中线剪开腹腔, 分离出待考察肠段, 即十二指肠、空肠、回肠, 结肠, 取约 10 cm 于 2 端切口插管, 结扎, 用预热至 37 °C 的生理盐水将肠内容物冲洗干净, 再用空气将生理盐水排净。试验时取不同浓度的供试液 (预热至 37 °C) 200 mL, 先以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流 10 min, 再将流速调为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 平衡 30 min 后, 于 30 ~ 60, 60 ~ 90, 90 ~ 120, 120 ~ 150 min 时间段收集灌流液样品。取样品 0.5 mL 测定酚红浓度, 其余样品经 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 取续滤液进样, 测定峰面积, 计算各个时间段灌流液样品中大叶茜草素及羟基茜草素的含量。

2.6 茜草有效成分在不同浓度和肠段中吸收

12.33, 24.66, 49.32 mg · L⁻¹ 的大叶茜草素及 8.455, 16.91, 33.82 mg · L⁻¹ 的羟基茜草素在不同肠段的吸收见表 3, 4。在质量浓度范围内供试液随着浓度的升高, 其吸收有上升的趋势。与中浓度比较, 在结肠段 P_{eff} 有显著性差异, 表明大叶茜草素及羟基茜草素在小肠内吸收机制可能为被动吸收。但其吸收需要进一步实验研究证明。

内分泌以及内部神经的完好无损, 保证了血液与淋巴液的供应。对肠道内环境破坏很小, 与口服给药



表 4 不同浓度羟基茜草素在各肠段的吸收参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Absorption parameters of three concentrations of purpurin in different intestinal segments($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	参数	十二指肠	空肠	回肠	结肠
低浓度	$K_a / \times 10^{-3} s^{-1}$	0.331 ± 0.02 ^{1,2)}	0.343 ± 0.01 ^{1,2)}	0.204 ± 0.02 ^{1,2)}	1.05 ± 0.06 ²⁾
	$P_{eff} / \times 10^{-4} cm \cdot s^{-1}$	0.374 ± 0.03 ^{1,2)}	0.353 ± 0.01 ^{1,2)}	0.203 ± 0.02 ^{1,2)}	1.10 ± 0.08 ²⁾
中浓度	$K_a / \times 10^{-3} s^{-1}$	1.54 ± 0.10 ¹⁾	0.720 ± 0.04 ¹⁾	0.947 ± 0.09 ¹⁾	1.91 ± 0.11
	$P_{eff} / \times 10^{-4} cm \cdot s^{-1}$	1.42 ± 0.03 ¹⁾	0.859 ± 0.03 ¹⁾	0.989 ± 0.04 ¹⁾	2.51 ± 0.26
高浓度	$K_a / \times 10^{-3} s^{-1}$	2.15 ± 0.19 ^{1,2)}	0.906 ± 0.07 ^{1,2)}	1.65 ± 0.10 ¹⁾	4.45 ± 0.14 ²⁾
	$P_{eff} / \times 10^{-4} cm \cdot s^{-1}$	1.44 ± 0.15 ¹⁾	0.970 ± 0.10 ¹⁾	1.05 ± 0.10 ¹⁾	3.43 ± 0.16 ²⁾

后肠道吸收过程较接近,吸收速率稳定,与人体有很好的相关性。因此本文用酚红标定法,测定水分的变化以对药物浓度进行校正^[5]。

大叶茜草素及羟基茜草素为茜草中的主要成分,同时是药典中所规定的指标性成分。由文献设定大叶茜草素及羟基茜草素的给药浓度分别为 12.33 ~ 49.32 mg · L⁻¹, 8.455 ~ 33.82 mg · L⁻¹ [2-3]。

本实验表明大叶茜草素及羟基茜草素在大鼠体内的平均 P_{eff} 均大于 $0.2 \times 10^{-4} cm \cdot s^{-1}$, 因此这两个化合物都为高渗透性药物。在相同浓度下大叶茜草素及羟基茜草素在各肠段 P_{eff} 有显著性差异结肠 > 十二指肠 > 回肠 > 空肠。所以判断大叶茜草素与羟基茜草素在结肠部位可能存在特异性吸收,且吸收机制可能为被动吸收。

研究大叶茜草素及羟基茜草素在肠道内的吸收

机制及吸收动力学参数,结果为大叶茜草素及羟基茜草素缓释给药制剂的研究提供了实验依据,对大叶茜草素、羟基茜草素及茜草口服制剂的研究具有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010.
 [2] Mi I U, Sheng J, Ten H H. Natural products research center anti-platelet constituents of formosan rubia akane [J] J Nat Prod, 1994, 57:313.
 [3] Naoko N, Masayuki T, Eisaku Y, et al. Department of applied biological science, purpurin as a specific inhibitor of spermidine-induced autoactivation of the protease plasma hyaluronan-binding protein [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33: 1430.
 [4] 吴雅娜, 栾立标. 独活有效成份大鼠在体单向灌流肠吸收 [J]. 药学报, 2008, 43: 102.
 [5] 谭晓斌, 贾晓斌, 陈彦, 等. 在体肠灌流模型及其在中药研究中的应用 [J]. 中成药, 2007, 29(11): 1665.

Study on intestinal absorption of mollugin and purpurin in rats

WANG Kan¹, CHEN Xing¹, SHAN Mingqiu¹, DING Anwei^{1,2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formula, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the absorption kinetic characteristics of mollugin and purpurin in each intestinal segment of rats. **Method:** The *in situ* single-way perfusion rat model was established to study absorption characteristics of mollugin and purpurin in each intestinal segment of rats. The volume of recirculation fluid was regulated by phenol red. **Result:** Different quality concentrations (12.33, 24.66, 49.32 mg · L⁻¹) of mollugin and (8.455, 16.91, 33.82 mg · L⁻¹) purpurin showed a concentration gradient of absorption dose in each intestinal segment, with the osmotic coefficient increasing to more than $0.2 \times 10^{-4} cm \cdot s^{-1}$. In the same concentration, mollugin and purpurin showed an identical trend of P_{eff} in each intestinal segment in the order of colon > duodenum > ileum > jejunum, with a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Mollugin and purpurin are highly permeable in rat intestinal segments, with absorption in each segment, while the specific absorption existed in the colon segment.

[Key words] mollugin; purpurin; *in situ* rats single-way perfusion model; HPLC

doi:10.4268/cjcm20121234

[责任编辑 陈玲]