

离体外翻肠囊法研究安石榴苷的大鼠肠吸收特性

畅静¹, 田莉^{1,2*}, 张慧慧¹, 高晓黎³

- (1. 新疆医科大学 中医学院, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学 药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:考察安石榴苷的肠吸收特性。方法:采用离体外翻肠囊法考察石榴皮多酚中安石榴苷在不同肠段(十二指肠、空肠、回肠、结肠)、不同质量浓度(153.34, 301.70 mg·L⁻¹)下、不同时间点(0, 30, 60, 90, 120 min)的肠吸收特性,采用HPLC法[YMC-Triart C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 甲醇-0.1%磷酸]测定样品浓度。结果:随着药液中安石榴苷浓度的上升,肠吸收速率常数(K_a)也随之增加;安石榴苷在各个肠段的吸收无显著性差异,低浓度时,吸收速率常数回肠>结肠>空肠>十二指肠,高浓度时,空肠>结肠>回肠>十二指肠;各肠段累积吸收量均随药物质量浓度的增加而增加,在高浓度时,安石榴苷在十二指肠、空肠、回肠结肠的累积吸收量分别为(0.60±0.10), (0.64±0.59), (0.71±0.13), (0.73±0.11) μg·cm⁻²。结论:安石榴苷在大鼠肠道内不存在特殊的“吸收窗”,其吸收符合零级动力学方程。

[关键词] 安石榴苷; 离体外翻肠囊法; 肠吸收; 高效液相色谱法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0122-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240122

Rat Intestine Absorption Characteristics of Punicalagins with Isolated Everted Intestine Model

CHANG Jing¹, TIAN Li^{1,2*}, ZHANG Hui-hui¹, GAO Xiao-li³

- (1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

[收稿日期] 20140617(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260668)

[第一作者] 畅静, 硕士, Tel:15199167643, E-mail:305217907@qq.com

[通讯作者] * 田莉, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药民族药新制剂研究与开发, Tel:13201333388, E-mail:tianli109@126.com

[19] 范昕, 张涛, 孙萌, 等. 中药研究中代谢组指纹图谱数据分析的思想与方法[J]. 中国医院统计, 2011, 18(1):28.

[20] 范成杰, 刘友平, 陈鸿平, 等. 乌梅药材中齐墩果酸和熊果酸的高效液相色谱含量测定[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8):1843.

[21] Lu X M, Yi H W, Xu J L, et al. A novel synthetic oleanolic acid derivative with amino acid conjugate suppresses tumour growth by inducing cell cycle arrest [J]. J Pharm Pharmacol, 2007, 59(8):1087.

[22] Rao V S, de Melo C L, Queiroz M G, et al. Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from Sambucus australis, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet [J]. J Med Food, 2011, 14(11):1375.

[23] Checker R, Sandur S K, Sharma D, et al. Potent anti-

inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-kappaB, AP-1 and NF-AT [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31318.

[24] Martin R, Carvalho-Tavares J, Hernandez M, et al. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(2):198.

[25] Ge F, Zeng F, Liu S, et al. In vitro synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against Mycobacterium tuberculosis [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 5):567.

[责任编辑 顾雪竹]

2. Xinjiang Key Laboratory of Famous Prescription and Science of Formula, Urumqi 830011, China;

3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the intestine absorption of punicalagins. **Method:** The isolated everted intestine model was used to study the absorption of different drug concentration ($153.34, 301.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) in different regions of rat intestine (duodenum, jejunum, ileum and colon), and different time (0, 30, 60, 90, 120 min). The sample was determined with HPLC on an YMC-Triart C_{18} column ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) with methanol-0.1% phosphoric acid. **Result:** The intestine absorption rate constant increased along with the increase in concentration of punicalagins. Absorption of index components for punicalagins in different intestinal segments had no significant difference, at low concentration, the absorption rate constant is ileum > colon > jejunum > duodenum, at high concentration, jejunum > colon > ileum > duodenum; every intestine segments cumulative absorption increased along with concentration of punicalagins, at high concentration, every intestine segments cumulative absorption of punicalagins is $(0.60 \pm 0.10), (0.64 \pm 0.59), (0.71 \pm 0.13), (0.73 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$. **Conclusion:** Absorption of punicalagins didn't be a special 'absorption window', punicalagins intestinal absorption followed the Zero-order kinetic equation.

[**Key words**] punicalagins; isolated everted gut model; intestine absorption; HPLC

口服给药是临床最常见的给药途径,其主要吸收部位在小肠。一种药物的口服生物利用度除了本身理化性质的影响外,还取决于肠黏膜的构造及肠内酶的屏障作用。因此,研究药物在肠内的吸收机制和吸收部位,是口服药物研发的必要部分。

安石榴苷是新疆石榴皮多酚中的主要成分,具有抗氧化、抗衰老、抗癌防癌、抗菌、润肤美容、降血压和预防心脑血管疾病的生理活性^[1-2]。本课题组体外 MTT 法结果表明,新疆石榴皮多酚精制物对 MCF-7(人乳腺癌细胞),BEL-7404(人肝癌细胞),PC-3(人前列腺癌细胞),Caco-2(人结肠癌细胞),A375(黑色素瘤细胞),Hela(宫颈癌细胞)等 6 种人源性肿瘤细胞的生长增殖均有不同程度的抑制作用,且抑制率随时间延长而提高^[3]。

安石榴苷分为安石榴苷 A 和 B(α 和 β 异构体),是含有配糖基的鞣花酸多聚体,水溶性好,化学名为 2,3-(S)-六羟基联苯二甲酰基-4,6-(S,S)-并没食子酸连二没食子酰-D-葡萄糖,分子式 $C_{48}H_{28}O_{30}$,相对分子质量 1 084.72。鉴于安石榴苷吸收差,对其体内吸收机制的相关文献及数据几乎空白,要确证抗肿瘤的有效成分是原形药物还是代谢产物,以及如何提高多酚类化合物的口服吸收率和临床疗效,就有必要弄清其主要成分的吸收特性及其与药物效应间的关系,为口服抗肿瘤的新药设计提供实验依据。本实验拟采用离体外翻肠囊吸收模型研究大鼠对安石榴苷的肠吸收特性,以了解其吸收机制和吸收部位,对确定药物的剂型、指导临床合理用药具有重要意义,也有利

于提高石榴皮多酚的生物利用度,更好的发挥疗效。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪 LC-6AD,CBM-20A 色谱工作站,SPD-20A 型紫外检测器,SIL-20A 型自动进样器,CTO-10ASvp 型柱温箱(日本岛津公司),DKZ 系列恒温振荡浴槽(上海恒科学仪器有限公司),XS105 型电子天平(德国,梅特勒-托利多),TDL-40B 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂 安石榴苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-13010903,HPLC $\geq 98\%$),安石榴苷原料药(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-13052405,HPLC $\geq 98\%$),屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司北京饮料分公司,批号 20140409)。甲醇为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,雌性,体重 $(200 \pm 10) \text{ g}$,由新疆医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(新)2011-0004。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性 YMC-Triart C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$);流动相甲醇(A相)-0.1%磷酸(B相)梯度洗脱;梯度洗脱程序:0~10 min,0.1%磷酸 95~85;10~20 min,0.1%磷酸 85~70;20~30 min,0.1%磷酸 70~95;柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$;检测波长 370 nm ;流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量 $10 \mu\text{L}$ 。理论塔板数按安石榴苷的 α -苷和 β -苷峰面

积总和计算不低于 2 000。

2.1.2 安石榴苷药液的配制 用屈臣氏蒸馏水配制 Krebs-Ringer's 肠营养液,使其每 1 L 含 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, NaH_2PO_4 0.32 g, NaHCO_3 1.37 g, 葡萄糖 1.4 g(葡萄糖在临用前添加)。精密称取安石榴苷原料药适量,共 2 份,分别用 Krebs-Ringer's 肠营养液超声溶解,得到质量浓度分别为 153.34, 301.70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的安石榴苷药液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精称安石榴苷对照品适量,用甲醇溶解, Krebs-Ringer's 液定容至刻度,制成 883 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的安石榴苷对照品溶液。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 专属性考察 分别对空白肠营养液、空白肠营养液 + 对照品液、离体肠吸收样品、对照品液进样 10 μL ,见图 1。安石榴苷对照液与安石榴苷肠营养液特征峰保留时间一致,空白肠营养液在此保留时间无干扰,证明此方法可行。

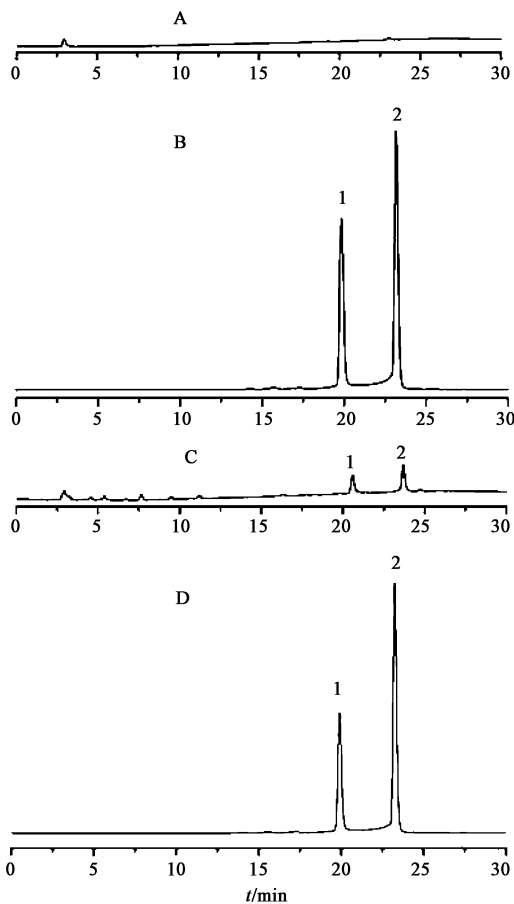
苷对照品各 0.1, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14 μL ,按 2.1.1 项色谱条件进样,记录峰面积。以峰面积(A)对进样量(X, μg)进行回归,得回归方程 $A = 401\,037 X - 15\,487 (R^2 = 0.999\,3)$,结果表明安石榴苷进样量在 0.088 3 ~ 12.362 μg 呈良好的线性关系。

2.1.4.3 精密度与稳定性试验 将配制好的安石榴苷对照品溶液按 2.1.1 项色谱条件重复进样 5 次,每次 10 μL ,记录峰面积,计算精密度峰面积 RSD 1.1%,说明仪器精密度良好。取十二指肠于 15 min 时的离体肠外翻样品,于 0, 30, 60, 90, 120 min 分别进样 10 μL ,记录峰面积。RSD 3.7%,结果表明样品在 2 h 内基本稳定。

2.1.4.4 回收率试验 取安石榴苷对照品液用 Krebs-Ringer's 肠营养液配制高、中、低(180, 84, 61 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)3 个质量浓度溶液,按 2.1.1 项下色谱条件,分别进样 3 次,记录峰面积,计算高、中、低浓度的安石榴苷对照液的回收率分别为 97.43%, 100.56%, 109.77%,平均回收率为 102.59%,RSD 5.1%。符合测定要求。

2.2 离体外翻肠囊法试验^[4] 大鼠随机分为 2 个剂量组,每组 4 只,实验前 15 h 禁食,自由饮水。10% 水合氯醛腹腔麻醉(3 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),待大鼠失去知觉后打开腹腔,分别迅速取出约 10 cm 长的十二指肠、空肠、回肠、结肠(十二指肠段从幽门开始,空肠段离幽门 15 cm 处开始,回肠段自盲肠上行 20 cm 开始,结肠段从盲肠后端开始,长度以试验结束后的实测值为准)。小心将大鼠肠管同肠系膜剥离,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ Krebs-Ringer's 溶液中,冲洗,直到没有内容物流出,小心剥离肠段表面肠系膜和脂肪。冲洗干净后翻转,用手术线分别将翻转后的各肠段结扎成 10 cm 长的小囊,每个小囊中加入 2 mL 空白 Krebs-Ringer's 肠营养液。平衡 5 min 后,将翻转小肠囊分别放入 4 个装有 8 mL 安石榴苷质量浓度分别为 153.34, 301.70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的含药 Krebs-Ringer's 肠营养液且维持 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴的玻璃试管中,恒流泵通空气以保持离体肠管活性。试验结束后处死大鼠,剪下被考察的肠段,测量其长度(L)和内径(r)。

分别在 0, 30, 60, 90, 120 min 时间点,用针管分别吸取各个肠囊中内液 0.2 mL 置于 0.5 mL 的 Ep 管内作为样品,并加入等体积、新鲜且 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温的 Krebs-Ringer's 肠营养液,继续试验。每个浓度各进行 4 次实验。离体肠外翻样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。离心 20 min,取上清液约 150 μL 置



A. 空白肠营养液; B. 空白肠营养液 + 对照品液;
C. 离体肠吸收样品; D. 对照品液; 1. α -苷; 2. β -苷

图 1 大鼠离体外翻肠囊法安石榴苷的 HPLC

2.1.4.2 标准曲线的制备 精密吸取上述安石榴

样品瓶内插管中,进样 10 μL,记录峰面积。

2.3 不同肠段指标成分的吸收状况 根据式 1 计算不同质量浓度下安石榴苷在各时间点的单位肠管面积累积吸收量 $Q(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$:

$$Q = \frac{C_n \times 2 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 0.2}{A} \quad (1)$$

C_n ,第 n 个取样点测得的药物浓度; C_i ,第 i 个取样点测得的药物浓度; A ,离体肠管面积; Q ,单位

面积累积吸收量。

以 $Q(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$ 时间(h)作图进行零级、一级、Higuchi 方程拟合,以决定系数为拟合优劣的判断标准。见表 1。通过 3 种不同动力学方程模拟,得到相关系数 R^2 值。根据 R^2 值可知,零级动力学方程拟合度相对而言优于一级方程和 Higuchi 方程。安石榴苷肠吸收符合零级动力学方程。斜率即为单位面积单位时间内的肠吸收速率(K_a)。

表 1 安石榴苷在各拟合方程中的吸收速率常数($K_a, \bar{x} \pm s, n=4$)

肠段	安石榴苷 /mg·L ⁻¹	$K_a/\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$					
		零级方程	R^2	一级方程	R^2	Higuchi 方程	R^2
十二指肠	153.34	0.055 ± 0.030	0.864 0	0.109 ± 0.068	0.855 3	0.113 ± 0.061	0.797 5
	301.70	0.136 ± 0.043	0.841 6	0.286 ± 0.156	0.772 5	0.275 ± 0.087	0.767 3
空肠	153.34	0.075 ± 0.020	0.887 1	0.114 ± 0.033	0.877 5	0.154 ± 0.041	0.840 3
	301.70	0.220 ± 0.335	0.949 3	0.035 ± 0.004	0.960 2	0.452 ± 0.687	0.922 8
回肠	153.34	0.134 ± 0.070	0.802 1	0.244 ± 0.155	0.783 7	0.270 ± 0.138	0.732 6
	301.70	0.163 ± 0.032	0.796 1	0.467 ± 0.182	0.754 4	0.332 ± 0.067	0.732 4
结肠	153.34	0.092 ± 0.079	0.806 1	0.168 ± 0.177	0.803 2	0.184 ± 0.154	0.765 8
	301.70	0.213 ± 0.067	0.739 9	0.585 ± 0.306	0.701 1	0.427 ± 0.134	0.659 3

2.4 不同肠段的吸收速率比较 以零级动力学方程吸收速率 K_a 为准,比较不同浓度各肠段吸收速率,见表 2。对吸收速率常数 K_a 值各肠段之间进行

组间比较,不同质量浓度均无显著性差异。低浓度时,吸收速率常数回肠 > 结肠 > 空肠 > 十二指肠,高浓度时,空肠 > 结肠 > 回肠 > 十二指肠。

表 2 安石榴苷不同质量浓度下各肠段在零级动力学方程的 $K_a(\bar{x} \pm s, n=4)$

安石榴苷 /mg·L ⁻¹	$K_a/\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
153.34	0.055 ± 0.030	0.075 ± 0.020	0.134 ± 0.070	0.092 ± 0.079
301.70	0.136 ± 0.043	0.220 ± 0.335	0.163 ± 0.032	0.213 ± 0.067

2.5 安石榴苷肠吸收程度的判断 以取样终点(即 2 h 时)肠囊内安石榴苷的质量浓度与肠囊外初始质量浓度比值可粗略判断安石榴苷的吸收程度。在 2 h 时测定的各个肠段样品质量浓度与初始浓度

的比值均 < 10%,表明各个肠段对安石榴苷的吸收并不理想。分别对不同肠段进行比较,相对于其他肠段,回肠吸收程度相对较好,十二指肠吸收较差。见表 3。

表 3 取样终点时样品质量浓度与初始质量浓度比值($\bar{x} \pm s, n=4$)

安石榴苷 /mg·L ⁻¹	质量浓度比/%			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
153.34	3.335 ± 0.008	5.684 ± 0.013	7.987 ± 0.017	6.954 ± 0.035
301.70	4.034 ± 0.005	4.296 ± 0.038	4.790 ± 0.005	5.332 ± 0.011

分别对不同浓度下各个肠段的累计吸收量(表 4)作随机区组方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异性判断标准。结果表明,在同一浓度条件下统计结果表明

各个肠段的累计吸收量均无显著性差异,说明安石榴苷在小肠内不存在特殊“吸收窗”。随着药液浓度的增加,肠吸收速率常数亦随之增加。

表 4 安石榴苷不同质量浓度下各肠段不同时间点单位面积累积吸收量 ($Q, \bar{x} \pm s, n=4$)

肠段	安石榴苷 /mg·L ⁻¹	Q/μg·cm ⁻²			
		30 min	60 min	90 min	120 min
十二指肠	153.34	0.434 ± 0.071	0.442 ± 0.070	0.468 ± 0.074	0.517 ± 0.078
	301.70	0.395 ± 0.063	0.407 ± 0.060	0.465 ± 0.085	0.602 ± 0.102
空肠	153.34	0.278 ± 0.024	0.299 ± 0.027	0.327 ± 0.016	0.393 ± 0.040
	301.70	0.326 ± 0.155	0.348 ± 0.174	0.498 ± 0.380	0.643 ± 0.587
回肠	153.34	0.280 ± 0.021	0.299 ± 0.023	0.326 ± 0.030	0.495 ± 0.123
	301.70	0.450 ± 0.118	0.491 ± 0.142	0.518 ± 0.159	0.713 ± 0.130
结肠	153.34	0.255 ± 0.031	0.271 ± 0.024	0.278 ± 0.023	0.406 ± 0.149
	301.70	0.388 ± 0.026	0.405 ± 0.027	0.446 ± 0.044	0.730 ± 0.114

3 讨论

口服药物需要在体内吸收后才能发挥药效,胃肠道是吸收的主要场所,药物能否通过胃肠道的理化屏障和生化屏障取决于药物的理化性质(如分子大小、极性、亲脂性及剂型等)和胃肠道的外排系统(如 P-糖蛋白等)对药物的处置。离体外翻肠囊法在药物吸收及肠壁转运机制等方面得到了广泛应用,具有操作简便、快速、重复性好等优点。本实验发现,随着时间的增长,肠囊活性逐渐降低导致其膜通透性增加,透过肠壁的药液量也随之增加。故因把实验时间控制在 2 h 以内,以确定肠囊的生理活性。

实验结果表明,同一肠段的安石榴苷药液浓度越大,其吸收速率越大,随着时间的增加,通过肠壁的安石榴苷的量也越多,并且在 2 h 内无吸收饱和现象,故推断其肠吸收方式可能为被动扩散。根据对各个肠段取样终点(2 h)时累计吸收量进行分析,安石榴苷在同一浓度下各个肠段的累计吸收量均无统计学差异,即安石榴苷在大鼠肠道内不存在特殊“吸收窗”。

总体来看,安石榴苷在大鼠肠道内均有吸收,在肠道中可能是通过被动转运进入体内的,但整体吸收效果较差,可能与安石榴苷的分子量大,结构较大,进入体内后不易被吸收入血^[5]、极性或者肠道 P-gp 的底物有关。有必要在采用 P-gp 抑制剂抑制肠道药物外排作用实验来加以验证。下一步将采用在体肠灌注法进一步研究其肠吸收特性,为其剂型的选择提供参考依据。

本文对于安石榴苷色谱条件的选择,由于对照品在 258 nm 和 370 nm 均有紫外吸收,但因为在此梯度洗脱条件下,样品峰在 258 nm 处出现杂质峰干扰,故选择 370 nm 为检测波长。安石榴苷的一对同分异构体(α, β)呈现双峰,反相 HPLC 在判断此类异构体方面有独到之处,故本实验采用 C₁₈反相硅胶柱进行色谱分析。

[参考文献]

- [1] Sumner M D, Elliott-Euer M, Weidne C, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease [J]. *Am J Cardiol*, 2005(96):810.
- [2] Seeram N P, Adams L S, Henning S M, et al. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols found in pomegranate juice [J]. *Nutr Biochem*, 2005, 16(6):360.
- [3] 姜婧. 新疆石榴提取物抗肿瘤活性的基础研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学;2009.
- [4] Cornaire G, Duncan R. Everted rat intestinal sacs: a new model for the quantitation of P-glycoprotein mediated efflux of anticancer agents [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(5A):3157.
- [5] Cerdá B, Llorach R, Cerón J J, et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice [J]. *Eur J Nutrition*, 2003, 42(1):18.

[责任编辑 聂淑琴]