

秦皮甲素大鼠肠吸收动力学

姜宇¹, 何群^{1*}, 赵碧清², 何欣³, 陈本超¹

(1. 湖南中医药大学中药现代化实验室, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 3. 湖南中医药大学第一临床医学院, 长沙 410007)

[摘要] 目的: 探讨秦皮甲素在大鼠各肠段的吸收动力学特征。方法: 以大鼠在体肠灌注模型从吸收部位、药物浓度考察秦皮甲素的肠吸收动力学情况。结果: 秦皮甲素在大鼠各肠段吸收有差异, 十二指肠、空肠、回肠中的 K_a 依次为 0.185 0, 0.186 5, 0.065 7 min^{-1} 。结论: 秦皮甲素在小肠吸收迅速完全, 其吸收呈一级吸收动力学特征且吸收机制为被动转运, 适于制成缓释给药系统。

[关键词] 秦皮甲素; 在体肠灌注; 吸收动力学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0110-04

Absorption Kinetics of Aesculin in Rats

JIANG Yu¹, HE Qun^{1*}, ZHAO Bi-qing², HE Xin³, CHEN Ben-chao¹

(1. Modernization Laboratory of Traditional Chinese Medicine(TCM), Huan University of TCM, Changsha 410208, China;

2. College of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China;

3. First Clinical College, Hunan University of TCM, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the absorption characteristics of aesculin in different intestinal segments of rats. **Method:** The study was performed by intestinal perfusion model in rats to observe the effect of absorption sites and concentrations on absorption kinetics of aesculin. **Result:** Aesculin had specific site in rat's intestine, absorption rate constants were 0.185 0, 0.186 5, 0.065 7 min^{-1} in duodenum, jejunum and ileum respectively. **Conclusion:** Aesculin was rapidly and completely absorbed in whole segments of intestine. The behaviors conformed to passive-transport mechanism and first-order kinetics. All the above indicated that aesculin could be formulated to a sustained-release drug delivery system.

[Key words] aesculin; intestinal perfusion model; absorption kinetics

秦皮甲素为木犀科白蜡树中分离得到的香豆素类成分。文献[1]报道大鼠腹腔注射秦皮甲素后有很强的降低血尿酸作用, 而口服相同剂量无效; 临床口服给药对人原发性高尿酸血症亦无此效应, 提示秦皮甲素可能存在吸收障碍。小肠是药物吸收的主要器官, 探讨秦皮甲素在小肠的吸收情况对秦皮甲素的吸

收机制及剂型设计具有较高的理论意义。为此, 本实验采用大鼠在体肠单向灌注模型对秦皮甲素在大鼠小肠中的吸收动力学进行了研究, 以期对秦皮甲素的药理研究及剂型设计提供生物药剂学依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters 1525 Binary HPLC 泵, Waters 2487 HPLC 检测器, Breeze 色谱工作站(美国 Waters 公司), AUY120 电子分析天平(上海岛津国际贸易有限公司), pH 计(瑞士, METTLER TOLEDO), HL-1 型恒流泵(上海精科实业有限公司)。

1.2 试药 秦皮甲素(质量分数大于 98.5%, 南京泽朗医药科技有限公司, 批号 ZL090321); 秦皮甲素

[收稿日期] 20110111(008)

[第一作者] 姜宇, 硕士, 从事药物剂型与疗效研究, Tel: 0731-84332695, E-mail: nickjames328@126.com

[通讯作者] *何群, 教授, 硕士生导师, 从事药物剂型与疗效研究, Tel: 0731-88458231, E-mail: hequn88@126.com

对照品(质量分数大于99.5%,中国药品生物制品检定所,批号110740-200104);Krebs-Ringer's灌流液^[2](简称K-R灌流液):NaCl 7.80 g,KCl 0.35 g,MgCl₂·6H₂O 0.042 7 g,NaH₂PO₄ 0.22 g,NaHCO₃ 1.37 g,D-Glucose 1.48 g,以上试剂稀释至1 000 mL量瓶定容,即得(pH 7.4)。乙腈为色谱纯,水为新鲜双蒸水,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物 健康成年SD大鼠,雄性,体重180~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(湘)2009-0004。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welchrom XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 乙腈-0.1%磷酸水溶液 10:90,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 334 nm,进样量 10 μL,柱温 30 ℃。

2.2 标准贮备液的制备 精密称取秦皮甲素对照品 4.6 mg 于 50 mL 量瓶中,加入适量甲醇使溶解,加 K-R 试液至刻度,摇匀,得质量浓度为 92 mg·L⁻¹ 的秦皮甲素标准贮备液。

2.3 灌流样品制备及测定 灌流液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,弃初滤液,取续滤液 10 μL 直接注入液相色谱仪,记录峰面积,计算其测定值。

2.4 系统适应性试验 分别取空白灌流液(无秦皮甲素的 K-R 灌流液大鼠小肠灌注 2 h 既得)、秦皮甲素标准溶液、供试液(含秦皮甲素的 K-R 灌流液大鼠小肠灌注 2 h 既得)各 10 μL,考察空白灌流液对供试液中秦皮甲素的含量测定有无干扰,HPLC 见图 1。

2.5 标准曲线的制备 分别精密量取 92 mg·L⁻¹ 的秦皮甲素标准贮备液 4,3,2,1,0.5,0.25,0.1 mL 于 5 mL 量瓶中,加 K-R 试液至刻度,摇匀,分别得到质量浓度为 73.6,55.2,36.8,18.4,9.2,4.6,1.84 mg·L⁻¹ 的系列秦皮甲素标准溶液,分别精密吸取各标准溶液及贮备液 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录峰面积。以秦皮甲素质量浓度 ρ (mg·L⁻¹) 为横坐标,峰面积 A 为纵坐标进行线性回归,得秦皮甲素的线性方程为 $A = 22\ 640\rho + 3\ 072.7$ ($r = 0.999\ 3$),表明秦皮甲素在 1.84~92 mg·L⁻¹ 内呈良好线性关系。

2.6 精密度的考察 取质量浓度分别为 73.6,18.4,4.6 mg·L⁻¹ 的秦皮甲素标准溶液,按 2.1 项下方法测定,每种质量浓度测定 5 次,计算日内、日间精密度。结果见表 1。

2.7 回收率考察 精密称取秦皮甲素对照品 4.6

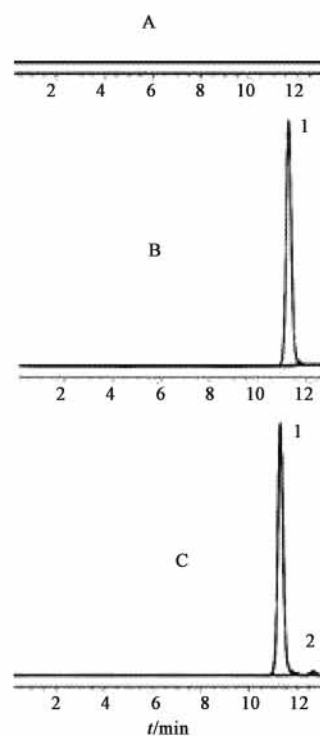


图 1 秦皮甲素 K-R 灌流液 HPLC

A. 空白灌流液;B. 对照品;C. 样品溶液;

1. 秦皮甲素;2. 未知秦皮甲素代谢产物

表 1 秦皮甲素在 K-R 试液中的精密度和回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

类别	加入质量浓度	实测质量浓度	RSD	回收率
	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/%	/%
日内	4.60	4.37 ± 0.05	0.67	95.07
	18.40	18.32 ± 0.13	0.50	99.58
	73.60	74.60 ± 0.84	1.19	101.36
日间	4.60	4.31 ± 0.11	1.63	93.74
	18.40	18.20 ± 0.37	1.03	98.92
	73.60	71.64 ± 0.96	1.78	97.34

mg,按 2.5 标准曲线的制备项下方法配制质量浓度分别为 73.6,18.4,4.6 mg·L⁻¹ 的秦皮甲素标准溶液,按 2.1 项下方法测定,每种浓度测定 5 次,计算回收率。结果见表 1。

2.8 秦皮甲素吸附性及稳定性考察^[3] 为避免除肠吸收以外的其他因素(如药物与容器、管路的非特异性结合或降解)造成灌流液中药物浓度的降低,将灌流所用的硅胶管、PVC 管(固定长度)置于 20 mg·L⁻¹ 的秦皮甲素 K-R 灌流液中;将秦皮甲素以灌注大鼠小肠各肠段 2 h 的空白 K-R 灌流液与各肠道黏膜的匀浆液稀释至 20 mg·L⁻¹ 后置于 37 ℃ 水浴中恒温振荡 2 h。2 h 后取样,以 HPLC 分析灌流液中的药物浓度,计算药物的剩余率($\bar{x} \pm s, n = 3$),结果分

别为:十二指肠(94.49 ± 3.63)%,空肠(93.67 ± 1.61)%,回肠(90.51 ± 2.67)%,设备(96.95 ± 5.89)%。

由表 2 可知,秦皮甲素在十二指肠、空肠匀浆液中稳定性均佳且在仪器管路中吸附较少,可满足试验需求;而在回肠匀浆液中稳定性欠佳。

2.9 秦皮甲素大鼠在体肠灌流试验^[3] 试验前将大鼠禁食过夜(自由饮水),正常光照。选取体重 220 g 左右的 SD 雄性大鼠,腹腔注射乌拉坦溶液麻醉后固定。沿腹中线打开腹腔约 4 cm,注入 37 °C 生理盐水浸润腹腔组织。对考察的肠段于两端切口,插管后用灭菌的手术线固定。试验时用等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖于肠组织表面以保湿,一定距离红外灯照射保持大鼠体温。用 37 °C 恒温的生理盐水以 2 mL·min⁻¹ 的速度将肠内容物冲洗干净,再以空气将生理盐水排空,装好装置。试验前取供试液将管道饱和一段时间,直至液口药物浓度与供试液浓度相等,以消除试验过程中管路对药物的吸附。取预热至 37 °C 的供试药液以 2 mL·min⁻¹ 的流速快速灌注所选肠段,待肠段末端出现流出液后调整流速至 0.2 mL·min⁻¹ 并开始计时。平衡 30 min 后,每隔 15 min 收集流出液,精确量取流出液体积和供试液减少的体积(同时迅速更换下一个供试液小瓶和收集液小瓶),并测定流出液的密度。试验结束后,将所选肠段沿切口完整切下并与组织分离后,置于 37 °C 恒温的等渗生理盐水中。待肠段不再伸缩,将肠段取出迅速以棉线量取其长度,再以直尺测量棉线长度,即得到肠段的长度。

分段肠段区间均取约 10 cm,十二指肠段为距幽

门 1 cm 处开始取 10 cm;空肠段为距幽门 15 cm 处开始取 10 cm;回肠段为盲肠上 20 cm 处开始取 10 cm;同时考察不同药物浓度及不同肠段对秦皮甲素吸收的影响。

2.10 数据处理方法 吸收速率常数(K_a)与表观吸收系数(P_{app})分别按以下公式计算:

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out} \cdot Q_{out}}{C_{in} \cdot Q_{in}}\right) \cdot \frac{Q}{V} \quad (1)$$

$$P_{app} = \frac{-Q \cdot \ln\left(\frac{C_{out} \cdot Q_{out}}{C_{in} \cdot Q_{in}}\right)}{2\pi r l} \quad (2)$$

式中: Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积(mL); C_{in} 、 C_{out} 分别为肠道进出口灌流液的浓度; Q 为灌流速度; l 和 r 分别为被灌流肠段的长度和内径; V 为灌流肠段的体积。 K_a 、 P_{app} 为最后 5~6 个时间段(30~120 min)样品的平均值(根据 Grubbs 法对每个动物获得的 K_a 和 P_{app} 值进行偶然误差值的取舍,取舍后必须保证至少有 3 个以上的 K_a 和 P_{app} 值无显著误差,最终 K_a 和 P_{app} 值分别为这几个相近值的平均值)。

2.11 药物浓度及不同肠段对药物吸收的影响 以质量浓度分别为 20,40,80 mg·L⁻¹ 的秦皮甲素灌流液对大鼠各肠段的吸收特性进行考察,吸收参数见表 2。结果表明在高、中、低浓度下,十二指肠、空肠的吸收参数无显著差异,而回肠部位吸收较慢。秦皮甲素在十二指肠及空肠吸收无自身浓度抑制作用,符合 Fick's 扩散原理,说明秦皮甲素在十二指肠及空肠的吸收表现为被动扩散吸收机制;回肠的吸收参数有显著差异($P < 0.01$),说明药物吸收可能存在自身浓度抑制作用,其吸收机制可能为主动转运。

表 2 秦皮甲素在大鼠各肠段及不同浓度下的吸收特性($\bar{x} \pm s, n = 4$)

秦皮甲素 /mg·L ⁻¹	十二指肠		空肠		回肠	
	$K_a/10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$P_{app}/10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$	$K_a/10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$P_{app}/10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$	$K_a/10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$P_{app}/10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$
20	17.71 ± 1.08	30.75 ± 5.30	14.28 ± 1.18	20.53 ± 5.25	3.65 ± 0.34 ¹⁾	3.62 ± 0.40 ¹⁾
40	17.80 ± 0.90	35.24 ± 3.49	16.25 ± 2.52	23.51 ± 4.57	8.12 ± 1.42 ¹⁾	9.56 ± 2.23 ¹⁾
80	18.50 ± 0.61	34.98 ± 2.58	18.65 ± 4.07	26.34 ± 3.76	6.57 ± 0.64 ¹⁾	7.00 ± 0.77 ¹⁾

3 分析与讨论

3.1 高效液相色谱图分析 图 1-C 中 2 峰应为秦皮甲素的代谢产物,在大鼠肠道各个部分均存在。大鼠稳定性试验及系统适应性试验中均未出现该峰,推测该物质是在大鼠肠道细胞中代谢后由某种机制内排至肠腔。该代谢产物的结构及代谢、转运机制有待进一步阐明。

3.2 吸收机制预测模型的选择 目前评价药物在肠道吸收(透过性)的方法主要有 Caco-2 细胞模型、在体肠单向灌流(原位实验法)等多种方法。Caco-2 细胞模型作为研究小肠表皮细胞转运和代谢的体外模型与体内模型比较具有省时、批间差异小的优点,但其缺少肠壁的黏液层及部分代谢酶、与小肠上皮细胞有一定差别。早期研究表明,对吸收良好的药

物(被动转运),Caco-2 细胞模型是一个研究药物吸收的极好模型,而对于吸收差的药物,Caco-2 细胞模型只能作为体内吸收的一个定性而非定量指标^[4]。

在体肠单向灌流法保证了肠道神经以及内分泌输入的完好无损,同时也保证了血液及淋巴液的供应,提高了生物活性。目前国外普遍采用单向灌流法,该方法以较低的流速(0.2~0.3 mL·min⁻¹)对某一肠段进行单向灌流,其实验条件与口服给药后药物接触的肠道环境较接近,吸收速率稳定,减少了灌流对肠道的损伤,且与人体有良好的相关性。

3.3 样品体积校正方法的选择 灌流试验中,需要在灌流液中加入不被肠吸收的酚红或¹⁴C-PEG 表示灌流液体积的变化,然而由于酚红本身能被肠道部分吸收,而¹⁴C-PEG 存在放射性导致的人体安全问题以及对设备要求较高,故本研究引入质量校正法计算药物吸收速率常数和表观吸收系数,避免了标示物带来的各种问题^[5]。

3.4 秦皮甲素在人体肠吸收特性的预测 采用 eq. 3, eq. 4^[6-8],可由大鼠在体灌流试验所得数据推算出人体肠表观吸收系数($P_{app,man}$)及吸收分数($f_{a,man}$),但仅限于被动吸收机制的药物。式中 t_{rsc} 指肠道平均转运时间(3 h), r 指人肠道半径(1.75 cm)。将本研究所得的最低 P_{app} 值(1.50×10^{-2} cm·min⁻¹,空肠段 20 mg·L⁻¹ 秦皮甲素灌流)代入得 $P_{app,man} = 5.40 \times 10^{-2}$ cm·min⁻¹, $f_{a,man} = 98.11\%$;将最高 P_{app} 值(4.00×10^{-2} cm·min⁻¹,十二指肠段 40 mg·L⁻¹ 流)代入得 $P_{app,man} = 0.144$ cm·min⁻¹, $f_{a,man} \approx 100\%$ 。

$$P_{app,man} = 3.6 \times P_{app,rat} + 3 \times 10^{-6} (R^2 = 1.00) \quad (3)$$

$$f_{a,man} = 1 - e^{-(2 \cdot P_{app,man} \cdot t_{rsc}) / (r \cdot 2.8)} \quad (4)$$

由此可见,秦皮甲素在人体小肠上部吸收完全,其适合制成日服 1 次的缓释给药系统。

3.5 秦皮甲素表观分配系数与大鼠在体肠吸收结论矛盾的解释 作者曾^[9]提出“秦皮甲素的 $\log P_{app} = -0.83 < 0$,可能存在吸收障碍,但在大鼠在体肠试验得出的结论与之相反,导致二者矛盾的原因可能在于:①秦皮甲素具有亲脂的香豆素母体及亲水的葡萄糖基团,其一部分分子可插入磷脂双分子层,导致磷脂双分子层紊乱,从而加速其他部分分子渗透;②使用正丁醇/水溶剂系统不适合预测秦皮甲素在大鼠肠道内的吸收。

3.6 秦皮甲素回肠段吸收情况的说明 秦皮甲素回肠段吸收表现为非被动吸收的可能原因:大鼠小肠远端存在大量的细菌菌落,细菌产生的酶对一

些药物具有一定降解作用。大鼠回肠段稳定性研究中,秦皮甲素在空白灌流液中降解的量占灌流试验中表观吸收量大部分,由此可能造成误差。

3.7 秦皮甲素大鼠小肠吸收机制的判别 秦皮甲素在大鼠小肠上部高、中、低 3 种质量浓度下 K_a 间无统计学差异,证实秦皮甲素在大鼠小肠上部的吸收机制应为单纯扩散,与刘史佳^[10]等利用 Caco-2 细胞模型研究秦皮甲素吸收机制的结论相同。

3.8 不同模型预测秦皮甲素小肠吸收的结果比较 刘史佳^[10]等利用 Caco-2 细胞模型发现秦皮甲素在 $8 \sim 32 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ AP→BL 的表观渗透系数 P_{app} 在 $1 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-5}$ cm/s, $> 1 \times 10^{-5}$ cm/s,说明秦皮甲素吸收良好。作者结论与此相同。

[参考文献]

- [1] Kong L, Zhou J, Wen Y, et al. Aesculin possesses potent hypouricemic action in rodents but is devoid of xanthine oxidase/dehydr-oxygenase inhibitory activity [J]. *Planta Med*, 2002, 68(2):175.
- [2] Song N N, Li Q S, Liu C X, et al. Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 1(25):4064.
- [3] Okudaira N, Tatebayashi T, Speirs G C, et al. A study of the intestinal absorption of an ester-type prodrug, ME3229, in rats: active efflux transport as a cause of poor bioavailability of the active drug [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294(2):580.
- [4] Schurgers N, Bijdendijk J, Tukker J J, et al. Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in the anesthetized rat in situ [J]. *J Pharm Sci*, 1986, 75(2):117.
- [5] Sutton S C, Rinaldi M T, Vukovinsky K E. Comparison of the gravimetric, phenol red, and 14C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model [J]. *AAPS PharmSci*, 2001, 3(3):25.
- [6] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9):1336.
- [7] Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2007, 10(3):368.
- [8] Salphati L, Childers K, Pan L, et al. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(7):1007.
- [9] 姜宇,何群. 秦皮甲素平衡溶解度及表观油/水分配系数的研究 [J]. *中国药房*, 2010, 21(29):2725.
- [10] 刘史佳,居文政,熊宁宁,等. 秦皮甲素在 Caco-2 细胞模型中吸收机制的研究 [J]. *中成药*, 2009(6):852.

[责任编辑 全燕]