

· 药理 ·

大鼠在体单向肠灌注法进行丹参素、丹酚酸 B 的肠吸收研究

张英丰², 李玉洁¹, 杨庆¹, 翁小刚¹, 董宇³, 朱晓新^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 广州中医药大学, 广州 510006;
3. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 考察丹参水溶性成分-丹参素和丹酚酸 B 的肠吸收特性。方法: 采用大鼠在体单向肠灌注法, 测定不同质量浓度丹参素和丹酚酸 B 在不同肠段、不同浓度的吸收分数(F_a , %) 和表观渗透系数(P_{app})。结果: 丹参素和丹酚酸 B 在各肠段的吸收均比较差, 十二指肠和空肠吸收较回肠和结肠略好, 质量浓度、肠段对 F_a 和 P_{app} 无明显影响。结论: 丹参素和丹酚酸 B 在全肠道以被动扩散方式吸收, 且吸收比较差, 无特定吸收部位, 不受药物浓度的影响。

[关键词] 丹参素; 丹酚酸 B; 肠吸收; 在体单向肠灌注

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0096-05

Intestine Absorption Study on Danshensu and Salvianolic Acid B with Rat *in situ* Single Pass Perfusion Model

ZHANG Ying-feng², LI Yu-jie¹, YANG Qing¹, WENG Xiao-gang¹, DONG Yu³, ZHU Xiao-xin^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;
2. The Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To study the absorption of salvianolic acid B and danshensu. **Method:** In situ single pass perfusion model was used and the concentration of salvianolic acid B and danshensu in perfusate were determined by HPLC in combination with ultraviolet detector. **Result:** The apparent penetration coefficient(P_{app}) and absorption percentage(F_a) of danshensu and salvianolic acid B were all low at different concentration in four different regions of intestine of rat (duodenum, jejunum, ileum, colon). The absorption rate of danshensu was faster than salvianolic acid B in this study. The values of the F_a and the P_{app} were not significantly affected by concentration of perfusion solution and intestinal segments. **Conclusion:** The intestine absorption characteristics of salvianolic acid B and danshensu was poor at all segments of intestine in rats where there is no special absorption site and showed the passive diffusion process.

[Key words] danshensu; salvianolic acid B; intestine absorption; *in situ* single pass perfusion model

小肠是药物吸收的主要部位, 也是口服药物进

入血液循环的主要屏障, 故口服药物制剂的处方筛选及评价中, 需要对药物进行肠吸收研究。药物肠吸收的研究方法有多种: 离体、在体、体内试验等。在体肠吸收没有损坏研究部位的淋巴和血液循环系统, 因此试验结果的可靠度明显优于离体实验。在体单向肠灌注以较低流速、较小肠黏膜损伤等特点, 近来成为药物肠吸收的主要研究模型^[1]。

丹参素和丹酚酸 B 是丹参药材主要的水溶性活

[收稿日期] 20100330(003)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30930114); 国家自然科学基金项目(30701097); 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI08B04-4); 中国博士后基金项目(20070420509)

[通讯作者] * 朱晓新, 研究员, 博导, Tel: 010-64015008, E-mail: zhuxx59@yahoo.com.cn

性成分,具有改善微循环、抗心肌缺血、抑制血栓形成等功效,是含丹参制剂的主要质控指标。虽然丹参用药历史悠久,但未见丹参素和丹酚酸 B 的肠吸收研究。

本文建立大鼠在体单向肠灌注模型^[2],拟采用酚红法对灌注液前后体积的变化进行校正,研究丹参水溶性提取物丹参素、丹酚酸 B 在大鼠不同肠段的肠吸收特性。

1 材料

1.1 仪器 Waters2695 高效液相色谱仪(四元泵,2489 紫外-可见可变波长检测器,自动进样器,在线真空脱气机,Empower 色谱工作站);ST21 索福台式高速冷冻离心机(美国杜邦公司);HSS-1 数字式超级恒温水槽(成都仪器厂);BP211D 1/10 万电子分析天平和 BS210S 1/万电子分析天平(德国 Sartorius 公司);8453E 紫外分光光度计(美国 Agilent 公司);PHS-3WB 精密 pH 计(上海理达公司);BQ50-1J 四通道蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

1.2 试药 丹酚酸 B 对照品(批号 111562-200603,中国药品生物制品检定所);丹参素对照品(110855-200508,中国药品生物制品检定所);酚红(北京欣经科生物技术有限公司分装);NaOH 及其他化学试剂均为分析纯;高纯水(自制);丹参水溶性提取物(中国中医科学院中药研究所化学室提取,经 HPLC 测定,提取物中丹参素质量浓度为 $16.32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,丹酚酸 B 的质量浓度 $357.262 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.3 动物 雄性 Wistar 大鼠,(250 ± 10)g,动物合格证号 SCXK(京)11-00-0006。

2 方法

2.1 色谱条件 丹酚酸 B:菲罗门 Gemini C₁₈ 宽 pH 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相(水-乙腈 71:29,加入体积分数为 0.1% 的无水甲酸调节 pH 约 3.2);柱温室温;检测波长 286 nm;流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。丹参素:Phenomenex Synerigi Hydro-RP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,4 μm);流动相(水-甲醇 90:10,加入体积分数为 0.1% 的无水甲酸调节 pH 约 3.2);柱温 30 °C;检测波长 281 nm;流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.2 Krebs-Ringer's 肠营养液配制 配制 Krebs-Ringer's 肠营养液,使其每 1 L 含 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, NaHCO₃ 1.37 g, 葡萄糖 1.4 g(葡萄糖放置一段时间后易变质,因此在临用前添

加)。酚红液的配制:称取酚红 20 mg 溶于 1 L 的 K-R 溶液中,混匀即可。灌注液的配制:称取定量的丹参水溶性提取物粉末溶于定量酚红液中,密闭搅拌 10 min 即得低、中、高浓度的丹参水溶性提取物药液(丹参素浓度分别为 $5.44, 21.76, 43.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;丹酚酸 B 浓度分别为 $0.127, 0.507, 1.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.3 对照品溶液的制备 丹参素对照品液的制备:精密称定 3.50 mg 丹参素于 10 mL 量瓶内,1% 醋酸定容,稀释 10 倍,得到 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品液。精密称定 1.71 mg 丹酚酸 B 于 5 mL 量瓶内,甲醇-水(75:25,含有 0.1% 甲酸)溶液溶解,得到 $0.342 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品液。

2.4 方法学考察

2.4.1 丹参素及丹酚酸 B 标准曲线的制备 精密吸取丹参素对照品液 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.25 μL, 进样,记录色谱图和峰面积。分别进样丹酚酸 B 对照品液 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1 μL, 记录峰面积。

2.4.2 分析方法的专属性考察 分别对丹参素及丹酚酸 B 对照品、空白肠营养液、空白肠营养液 + 对照品及在体单向肠灌注样品进样,考察在丹参素及丹酚酸 B 出峰处是否存在干扰。

2.4.3 精密度试验 分别对丹参素和丹酚酸 B 对照品液 1 d 内连续进样 5 次,连续进样 5 d,每次进样 5 μL,记录峰面积。

2.4.4 稳定性试验 分别取高浓度下单向肠灌注样品,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16 h 内进样,均进样 5 μL,记录丹参素和丹酚酸 B 峰面积。

2.4.5 丹参素、丹酚酸 B 在空白灌注液中的稳定性考察 取空白灌注液对大鼠肠段灌注,收集流出液,用此液配制一定浓度丹酚酸 B、丹参素酚红溶液,密封,置 37 °C 恒温水浴中,分别于 0, 1, 2, 3, 6 h 测定丹酚酸 B 及丹参素含量。

2.5 灌注液中酚红浓度的测定

2.5.1 酚红标准曲线的建立 精密称定 3.07 mg 酚红于 50 mL 量瓶内,K-R 溶液定容,得到浓度为 $61.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酚红对照品储备液。分别取酚红储备液 7.5, 6.25, 5, 4, 2, 1.5 mL 至 10 mL 量瓶内,K-R 溶液补足至刻度,得到浓度为 $46.05, 38.775, 30.7, 24.56, 15.35, 9.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,取 0.5 mL 对照品加 5 mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 液,在 558 nm 测定吸光度(A)。

2.5.2 酚红分析方法的专属性考察 取含酚红和

提取物 Krebs-Ringer's 溶液、不含酚红的提取物 K-R 溶液以及酚红 Krebs-Ringer's 溶液各 0.5 mL, 加入 0.2 mol·L⁻¹ 溶液 5.0 mL, 混匀, 以 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 作空白对照, 于 200 ~ 800 nm 进行可光扫描, 确定测定波长及方法的专属性。

2.6 大鼠在体单向肠灌注试验 试验前将大鼠禁食 15 h, 过夜(自由饮水), 腹腔注射 1 mL·kg⁻¹ 20% 乌拉坦溶液, 麻醉固定。沿腹中线打开腹腔, 小心分离出待测肠段, 将十二指肠、空肠、回肠、结肠各肠段(约 10 cm, 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, 肠段长度以试验结束后测得的实测值为准)于两端切口, 用预热至 37 °C 的生理盐水将内容物冲洗干净, 插管, 结扎, 再用空气将生理盐水排净, 装好装置。

取低、中、高浓度的丹参水溶性提取物药液(预热至 37 °C) 250 mL, 先以 1.0 mL·min⁻¹ 的流速灌注 10 min 使其平衡, 再将流速调为 0.2 mL·min⁻¹, 开始计时, 于 60 ~ 75, 75 ~ 90, 90 ~ 105, 105 ~ 120 min 时间段收集灌注液样品。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), 计算药物吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})。

分别吸取 0.5 mL 肠灌注液样品, 加入 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 5 mL, 以 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液作为空白, 测定 558 nm 吸收度, 计算酚红回收率及稳态时净水流量。

吸取灌注液 1 mL, 12 000 r·min⁻¹ 15 min 高速离心, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液按照上述色谱条件进样分析。将各成分测定波长处得到的药物峰面积分别代入各自标准曲线方程, 计算相应浓度。试验重复 4 次。

2.7 数据分析 试验中, 肠段不仅吸收药物而且吸收水分。因在体肠吸收试验可能有水分被肠道吸收或者肠管分泌水分进入肠腔, 结果造成灌注液体积发生改变, 故采用难以吸收的酚红来标示样品体积, 同时计算稳态时净水流量(NWF), 用酚红及稳态时净水流量校正肠灌注液的体积, 计算出药物在体肠吸收量。

稳态时净水流量(NWF, μL·min⁻¹·cm⁻¹), 可以用式(1)计算

$$NWF = \frac{(1 - PR_{out}/PR_{in})Q}{L} \quad (1)$$

式中 PR_{in} 和 PR_{out} 分别表示肠腔内外灌注液中酚红

(Phenol Red, PR) 的浓度, Q 为灌注速度, L 为被灌注肠段的长度。

酚红的回收率(PR_{recovery})可以用式(2)计算:

$$PR_{recovery} = \sum PR_{out} / \sum PR_{in} \quad (2)$$

式中 $\sum PR_{in}$ 和 $\sum PR_{out}$ 分别表示稳态时灌注液进入和离开肠腔酚红的累计量。

丹参素、丹酚酸 B 在肠腔的吸收分数(F_a)及表观吸收系数(P_{app})可以用式(3)和(4)估算:

$$F_a = 1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{PR_{in}}{PR_{out}} \quad (3)$$

式中 C_{in} 和 C_{out} 分别表示进出口检测物浓度, F_a 为 4 个时间段样品的平均值。

$$P_{app} = -\frac{Q}{L} \cdot \ln(1 - F_a) \quad (4)$$

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 进行分析, 各組间数据比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为具有统计学意义。采用 Origin 8.0 软件进行绘图。

3 结果

3.1 标准曲线的建立

3.1.1 丹参素、丹酚酸 B 标准曲线的建立 以峰面积(Y)对丹参素进样量(X, ng)回归, 得到标准曲线 Y = 583.61X - 10 470 (R² = 0.999 4), 进样量在 8.75 ~ 700 ng 线性较好; 以峰面积(A)对丹酚酸 B 进样量(X, μg)回归, 得到标准曲线 Y = 931 526 X - 173 884 (R² = 0.999 9), 进样量在 0.342 ~ 6.84 μg 线性较好。

3.1.2 酚红标准曲线的建立 以 A 对酚红质量浓度 C(mg·L⁻¹)进行线性回归, 得标准曲线方程, A = 0.014 7C - 0.050 4 (R² = 0.995 2), 酚红浓度在 9.21 ~ 46.05 mg·L⁻¹ 线性较好。

3.2 专属性试验结果

3.2.1 丹参素及丹酚酸 B 的专属性试验结果 通过对比色谱图, 丹参素保留时间 t_R 约 18.3 min, 丹酚酸 B 保留时间 t_R 约 9.8 min。在丹参素及丹酚酸 B 出峰位置无干扰, 表明分析方法可行, 专属性比较高。

3.2.2 酚红测定的专属性试验结果 结果表明酚红在 NaOH 溶液的作用下, 最大吸收峰红移至 558 nm, 而丹参素与丹酚酸 B 对照品液的吸收峰虽然有所红移, 但在可见区域(>400 nm)里无吸收; 提取物在 NaOH 溶液的作用下, 在酚红最大吸收峰处无吸收, 样品扫描图谱表明, 在可见区域只有酚红吸收峰, 显示紫外分光光度法测定酚红浓度可行, 不受提

取物中丹参素、丹酚酸 B 及其他物质的干扰,专属性比较高。

3.3 精密度试验 丹参素日内和日间峰面积 RSD 分别为 0.43%,0.87%;丹酚酸 B 日内和日间峰面积 RSD 值分别为 0.65%,1.77%,表明精密度较好。

3.4 样品稳定性 肠灌流样品中,丹参素和丹酚酸 B 在 16 h 内峰面积 RSD 分别为 0.89%,1.86%,稳定性较好。

3.5 丹参素、丹酚酸 B 在空白灌流液中的稳定性考察 结果表明 37℃ 下温育 6 h 时,丹参素和丹酚酸 B 的稳定性较好,峰面积 RSD 分别为 0.98%,2.11%,说明在单向肠灌流试验的全过程中,丹参素和丹酚酸 B 的储备液稳定性符合要求。

3.6 肠吸收参数的计算

3.6.1 稳态时酚红回收率 (PR_{recovery}) 及净水流量 (NWF) 灌流试验时,低、中、高浓度丹参提取物酚红液中,酚红的回收率及肠道对水分的吸收和分泌

作用分别见表 1~2。

表 1 不同浓度下酚红的 PR_{recovery} ($\bar{x} \pm s, n=4$) %

灌流液浓度	十二指肠	空肠	回肠	结肠
低	105.93 ± 2.59	106.25 ± 2.35	93.43 ± 1.91	95.46 ± 2.45
中	102.12 ± 3.75	99.42 ± 3.64	103.21 ± 3.99	100.78 ± 1.26
高	104.48 ± 1.46	106.35 ± 3.75	96.63 ± 4.94	99.42 ± 4.96

表 2 不同浓度下各肠段的净水流量 ($NWF, \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

灌流液浓度	十二指肠	空肠	回肠	结肠
低	-1.22 ± 0.84	-0.78 ± 0.35	1.02 ± 0.48	0.80 ± 0.48
中	-0.97 ± 0.28	-1.23 ± 0.05	1.31 ± 0.56	0.81 ± 0.29
高	-1.11 ± 0.65	-0.75 ± 0.40	1.16 ± 0.85	0.72 ± 0.54

注:正值表明净水分泌,负值表明净水吸收。

3.6.2 丹参素在体肠灌流的吸收参数 见表 3。

3.6.3 丹酚酸 B 在体肠灌流的吸收参数 见表 4。

表 3 不同浓度丹参素大鼠各肠段在体肠吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

丹参素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	参数	十二指肠	空肠	回肠	结肠
5.44	$F_a/\%$	17.75 ± 1.98	17.35 ± 2.89	7.74 ± 0.74	8.82 ± 1.07
	$P_{\text{app}}/\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	2.96 ± 0.39	2.92 ± 0.23	1.55 ± 0.12	1.85 ± 0.21
21.76	$F_a/\%$	14.48 ± 2.05	11.12 ± 1.32	9.55 ± 2.28	9.70 ± 2.39
	$P_{\text{app}}/\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	2.61 ± 0.64	2.49 ± 0.34	1.57 ± 0.35	1.96 ± 0.52
43.52	$F_a/\%$	14.15 ± 1.41	12.52 ± 1.91	8.03 ± 0.09	7.86 ± 0.19
	$P_{\text{app}}/\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	2.04 ± 0.21	2.06 ± 0.41	1.58 ± 0.10	1.61 ± 0.04

表 4 不同浓度丹酚酸 B 大鼠各肠段在体肠吸收参数表 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

丹酚酸 B/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	参数	十二指肠	空肠	回肠	结肠
0.127	$F_a/\%$	14.55 ± 0.90	13.11 ± 2.24	4.99 ± 0.54	5.37 ± 0.59
	$P_{\text{app}}/\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	2.38 ± 0.19	2.16 ± 0.24	0.91 ± 0.06	1.08 ± 0.08
0.507	$F_a/\%$	9.39 ± 1.31	10.01 ± 0.88	7.24 ± 2.10	6.05 ± 1.32
	$P_{\text{app}}/\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	1.68 ± 0.37	2.10 ± 0.61	1.12 ± 0.27	1.14 ± 0.26
1.013	$F_a/\%$	11.73 ± 2.27	8.48 ± 0.64	4.46 ± 0.59	6.03 ± 2.65
	$P_{\text{app}}/\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	1.67 ± 0.34	1.18 ± 0.09	0.77 ± 0.11	0.97 ± 0.18

由在体肠灌流试验结果可知:高、中、低浓度下的丹参素和丹酚酸 B 灌流液表观吸收系数均非常低,回肠、结肠与十二指肠、空肠相比,吸收速率明显低于前者,具有显著性差异 ($P < 0.05$),表明在小肠的上端吸收相对较好;从吸收分数看,丹参素和丹酚酸 B 的吸收较差 ($< 20\%$),尤以丹酚酸 B 吸收为差。在所研究的质量浓度范围内,药物吸收无自身浓度抑制作用,在肠黏膜的转运均为被动扩散过程。

4 讨论

目前国内多采用在体肠循环技术研究药物在在体肠的吸收情况。试验中通过在灌注液中加入不被肠吸收的物质-酚红等标示灌注体积的变化,长时间、高流速的在体肠循环试验会导致肠黏膜损伤,通透性增加,给结果带来较大误差^[2]。在体单向肠灌流模型以较低灌流速 ($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、较短的灌流时间 ($\leq 2 \text{ h}$) 对肠黏膜损伤小,更接近人体空腹状态

的实际情况,近年来得到了广泛应用。

在体肠循环实验要求被测药物保持稳定、充分溶解,至少也要混合均匀,否则会在灌流过程中堵塞管路。药物对管壁的非特异性吸附也会产生试验误差,故试验时需要管路和肠管预平衡一段时间,使对管壁的吸附达到饱和,也使机体适应灌流过程。

采用单向肠灌流模型要考虑剂量设计。口服药物一次给药时,药物缓慢、有序地通过胃肠道各肠断被吸收,消化道的每一部分只是在特定时间内接触药物,但是对于单向肠灌流模型而言,特定肠道在灌流时间内始终接触药物,使药物的吸收量大大增加。故对于有毒性或毒性较大的药物,可能导致动物死亡或损伤脏器,在进行单向肠灌流试验时必须考虑药物的毒性及剂量设置。

有研究发现,酚红在肠道内也有少量吸收。重量法是目前代替酚红进行肠吸收或分泌水分的校正方法^[3]。通过精密称重肠灌流液流入与流出质量之差,判断肠道的吸水或泌水情况,大大减轻了分析测试工作量,且可避免标示物本身对某些化合物的肠道转运或分析的干扰^[4]。

丹参素与丹酚酸 B 均为弱酸性药物,在酸性、中性及碱性条件下的吸收均不一致,故有必要考察不同 pH 条件下的肠吸收速率^[5-6],而且肠道菌群和肠道酶对其代谢分解也会造成灌流液中药物浓度的

减小。

数据显示,丹参素和丹酚酸 B 肠道内无特定吸收部位,吸收比较差,可能有生物利用度较差的问题。为验证试验结果,还应结合测定大鼠灌胃给药后门静脉及体循环血药浓度,进行多角度考察。

[参考文献]

- [1] 董宇,杨庆,朱晓新,等. 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.
- [2] 游剑,李青坡,于英伟,等. 运用单向灌流模型研究莪术油中三成分对大鼠在体肠的吸收[J]. 药学学报,2004,39(10):849.
- [3] 聂淑芳,潘卫三,杨星钢,等. 对大鼠在体肠单向灌流技术中重量法的评价[J]. 中国新药杂志,2005,14(10):1176.
- [4] 周萍,蒋惠娣. 单向灌流模型研究木犀草素对大鼠在体肠的吸收[J]. 现代食品与药品杂志,2007,17(4):29.
- [5] 杜秋,狄留庆,单进军,等. 在体单向肠灌流模型研究瑞香素的大鼠肠吸收特性[J]. 药学学报,2009,44(8):922.
- [6] 许蕾,杨中林. 大鼠在体单向灌流法研究橙皮苷肠道吸收性质[J]. 中国药学杂志,2009,44(8):594.

[责任编辑 邹晓翠]