

· 药理 ·

采用离体外翻肠囊模型进行穿心莲内酯的肠吸收特性研究

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: 考察穿心莲内酯的肠吸收特性。方法: 采用离体外翻肠囊模型研究穿心莲内酯在不同肠段、不同浓度下的肠吸收特性, 采用 HPLC-UVD 测定样品浓度, 计算吸收速率常数(K_a)。结果: 随着药液中穿心莲内酯质量浓度上升, 肠吸收速率常数呈线性增加; 各个肠段的吸收速率均无显著性差异。结论: 穿心莲内酯在小肠内不存在特殊的“吸收窗”, 在小肠中均为被动扩散吸收。

[关键词] 穿心莲内酯; 离体外翻肠囊法; 肠吸收

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0107-04

Rat Intestine Absorption Characteristics Study on Andrographolide with Isolated Everted Intestine 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 intestine absorption of andrographolide. **Method:** The isolated everted intestine model was used to study the absorption in different regions of rat intestine (duodenum, jejunum, ileum, colon). The samples were collected at different time and determined with HPLC in combination with ultraviolet detector. **Result:** The intestine absorption rate constant increased along with andrographolide concentration. The absorption rate had no significant difference between different regions of intestines and different andrographolide concentration. **Conclusion:** The absorption of andrographolide showed passive diffusion process and didn't contain a special absorption window.

[Key words] andrographolide; intestine absorption; isolated everted gut model

药物吸收动力学是药代研究的重要内容, 口服药物肠道吸收是影响药物生物利用度的因素之一。了解药物胃肠道吸收机制和吸收部位, 对确定药物

的剂型、指导临床用药具有重要意义。常用的药物肠吸收研究方法有离体外翻肠囊法、在体肠循环法、在体单向肠灌注法等。基于离体实验的外翻肠囊法模型由于影响因素较少、实验条件可控、参数易于分析等特性, 是简便、快速的药物吸收模型^[1-3]。

穿心莲内酯是中药穿心莲中的活性成分, 具有抗炎、抗病原微生物等活性^[4], 疗效确切。对于穿心莲内酯的研究多集中在含量测定与质量控制、制剂研究、肠道菌群代谢等方面, 未见到其肠吸收特性的研究。本实验拟以穿心莲内酯为研究对象, 采用离

[收稿日期] 20100330(002)

[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

体外翻肠囊法考察穿心莲提取物中主要成分——穿心莲内酯肠吸收行为,为指导临床合理用药、产品开发提借鉴。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相提供色谱仪(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(德国索福公司);HSS-1 数字式超级恒温浴槽(成都仪器厂);BP211D 1/10 万电子分析天平、BS210S1/万电子分析天平(德国 Sartorius 公司);

1.2 试药 穿心莲内酯对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110797-200307,);高纯水(自制);O₂-CO₂ 混合气体(95/5,北京东方医用气体有限公司);羧甲基纤维素钠及其他试剂为化学纯;穿心莲提取物(由中国中医科学院中药研究所化学室制备,经 HPLC 测定,穿心莲内酯质量分数为 218.02 mg·g⁻¹)。

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

2 方法

2.1 色谱条件 Phenomenex Synergi Hydro-RP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×250 mm,4 μm);流动相(水-乙腈 40/60);柱温室温;检测波长 228 nm;流速 1 mL·min⁻¹。

2.2 方法学考察

2.2.1 对照品溶液的制备及线性关系考察 精密称定穿心莲内酯对照品 4.38 mg 于 25 mL 量瓶内,甲醇定容,用干燥的刻度吸管精密吸取 1 mL 置于 10 mL 量瓶内,甲醇定容,得到质量浓度为 17.52 mg·L⁻¹ 的穿心莲内酯对照品溶液,4 ℃ 下避光保存。精密吸取穿心莲内酯对照品溶液各 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 μL 进样,记录峰面积。

2.2.2 分析方法的专属性考察 分别对穿心莲内酯对照品、空白肠营养液、空白肠营养液 + 对照品及样品进样,观察在穿心莲内酯的出峰处有无干扰。

2.2.3 精密度试验 将配制好的对照品 1 d 内重复进样 5 次,连续进样 5 d,每次均 5 μL,记录峰面积,评估日内及日间精密度。

2.2.4 稳定性试验 取十二指肠于 20 min 时的肠外翻样品,于 0, 1, 2, 6, 12, 24 h 分别进样,记录峰面积。

2.3 离体外翻肠囊法进行穿心莲内酯的肠吸收试验

2.3.1 穿心莲提取物药液的制备 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

萄糖在临用前添加)。按 0.5% 的比例(g·mL⁻¹)加入定量的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)于 Krebs-Ringer's 肠营养液中,分散均匀。穿心莲提取物粉碎均匀,过 6 号筛,精密称定 40, 120, 360 mg 加入到上述 100 mL 溶液中,磁力搅拌 10 min 并超声 10 min,得到混悬均匀、质量浓度为 87.208, 261.624, 784.872 mg·L⁻¹ 的穿心莲内酯药液。

2.3.2 离体外翻肠囊法进行肠吸收试验 大鼠随机分为 3 个剂量组,每组 4 只,实验前 15 h 禁食,自由饮水。20% 乌拉坦腹腔麻醉(5 μL·g⁻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 K-R 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 穿心莲内酯质量浓度分别为 87.208, 261.624, 784.872 mg·L⁻¹ 的含药 Krebs-Ringer's 肠营养液且维持 37 恒温水浴的玻璃试管中,并持续通氧及二氧化碳混合气体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),计算药物肠吸收速率常数(K_a)。

分别在 20, 40, 60, 80, 100, 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 恒温的 Krebs-Ringer's 肠营养液,继续试验。重复 4 次。

离体外翻肠样品在 4 ℃ 条件下 13 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液约 150 μL 置样品瓶内插管中,进样 10 μL,记录峰面积。

2.4 数据处理 按(式一)计算不同质量浓度下穿心莲内酯各个时间点的单位肠管面积累积吸收量(Q):

$$Q = \frac{C_n \times 2 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 0.2}{A} \quad (\text{式一})$$

以 Q(μg·cm⁻²) 对时间(h) 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。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 对数据进行分析,各组间数据比较采用单因素方差分析(One-way

analysis of variance, ANOVA), $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。采用 SigmaPlot 9.0 软件绘图。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 标准曲线 以峰面积(A)对进样量(X, ng)

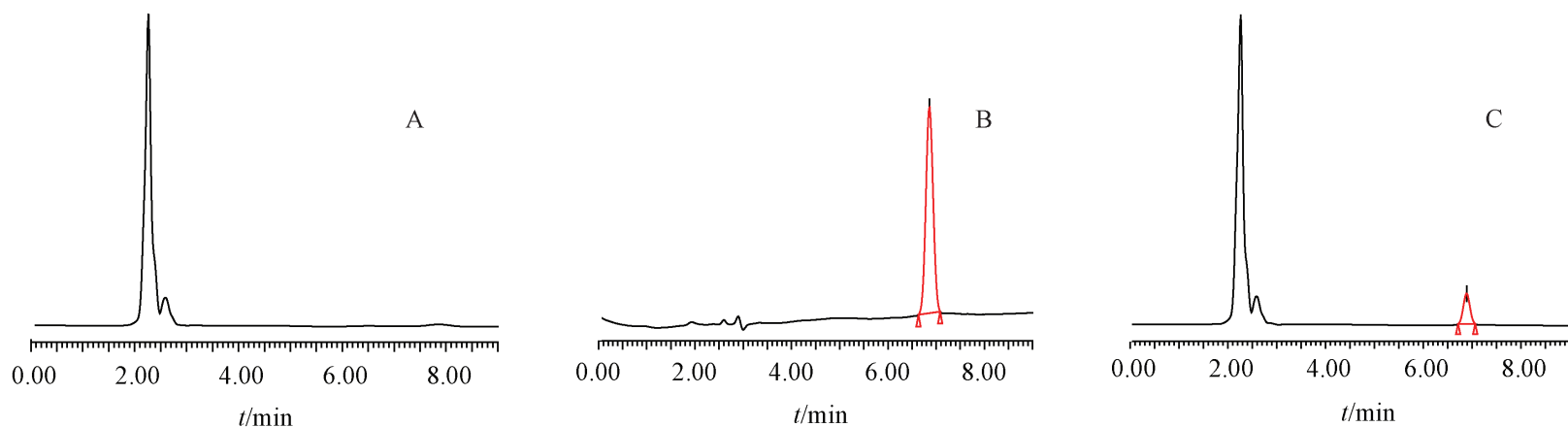


图 1 离体外翻肠囊法中穿心莲内酯的 HPLC

A. 空白基质; B. 标准品; C. 样品。

3.1.2 精密度及稳定性试验 计算得到穿心莲内酯日内及日间峰面积 RSD 分别为 0.672%, 1.24%, 结果表明仪器精密度良好。稳定性考察实验, 穿心莲内酯离体外翻肠囊法样品峰面积 RSD 为 1.43%, 表明样品在 24 h 内稳定性较好。

3.2 离体外翻肠囊法试验 3 种拟合方式中, 以零级拟合较好, 决定系数(R^2) 均达到 0.9 以上。斜率即为单位面积单位时间内的肠吸收速率(K_a)。

3.3 穿心莲内酯肠吸收机制的判断 对每一个肠段, 以累积吸收量(Q) 对时间(t) 作图, 随着药液中穿心莲内酯质量浓度上升, 肠吸收速率常数呈线性增加, 不同肠段的吸收均为零级吸收, 表明穿心莲内酯肠吸收机制为被动扩散吸收。见表 1, 图 2。

3.4 各个肠段吸收速率的比较 以累积吸收量对时间作图, 各个肠段的吸收速率统计学无显著性差异, 但是以十二指肠吸收速率较高, 结肠吸收较差。结果见图 3。

3.5 穿心莲内酯吸收程度的大致判断 离体外翻肠囊法难以精确测定肠吸收分数。穿心莲提取物混悬均匀, 稳定性好, 可以取样终点时离体肠管内样品质量浓度与初始质量浓度比值可粗略的判断其吸收程度。见表 2。

分别对不同浓度下各个肠段的吸收速率常数作单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异性判断标准, 结果表明, 在同一浓度条件下, $P > 0.05$, 统计结果表明各个肠段的吸收速率均无显著性差异, 说明穿心莲内酯在小肠内不存在特殊的“吸收窗”, 但就数值看

进行回归, 得到回归方程为 $A = 1960.3X - 5104.1$ ($R^2 = 0.9998$), 结果表明穿心莲内酯进样量在 1.752 ~ 350.4 ng 呈良好的线性关系。在穿心莲内酯出峰位置无干扰, 分离度及峰形较好, 保留时间 t_R 约 6.6 min, 表明分析方法可行。色谱图见图 1。

表 1 不同质量浓度下各肠段的吸收速率常数 k_a ($\bar{x} \pm s, n=4$)

$\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$

肠段	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程	R^2
十二指肠	87.208	$Q = 0.8525t - 0.1784$	0.9556
	261.624	$Q = 1.8563t - 0.2447$	0.9776
	784.872	$Q = 4.5577t - 0.7147$	0.9954
空肠	87.208	$Q = 0.6481t - 0.0761$	0.9908
	261.624	$Q = 1.7815t - 0.3767$	0.9902
	784.872	$Q = 4.2122t - 0.0657$	0.9925
回肠	87.208	$Q = 0.8006t - 0.1218$	0.9719
	261.624	$Q = 1.8528t - 0.3986$	0.9912
	784.872	$Q = 5.1578t - 0.6531$	0.9949
结肠	87.208	$Q = 0.5112t - 0.0792$	0.9721
	261.624	$Q = 1.1702t - 0.0736$	0.9952
	784.872	$Q = 3.2124t - 0.4294$	0.9908

表 2 取样终点时样品质量浓度与初始质量

浓度比值 ($\bar{x} \pm s, n=4$) %

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	十二指肠	空肠	回肠	结肠
87.208	8.10 \pm 1.77	5.81 \pm 2.27	7.57 \pm 1.30	4.79 \pm 0.36
261.624	5.72 \pm 1.46	5.15 \pm 1.05	5.38 \pm 0.78	3.56 \pm 0.21
784.872	4.33 \pm 0.69	3.95 \pm 0.21	5.08 \pm 1.61	3.23 \pm 0.50

以十二指肠吸收最优。随着穿心莲内酯浓度的增加, 肠吸收速率常数亦随之增加, 说明其在肠道的转运方式为被动转运。

4 讨论

药物的肠吸收模型较多, 比如离体肠吸收试验^[3]、在体单向肠灌注法^[4]、在体肠循环法^[5]、基于 Caco-2 细胞模型^[7] 的药物转运基质研究等。离体外翻肠囊法以其操作简单、重复性好等优点在药物吸收及肠壁转运机制等方面得到了广泛应用; 模型保持了完整的组织和黏膜特性, 结果与实际吸收水平

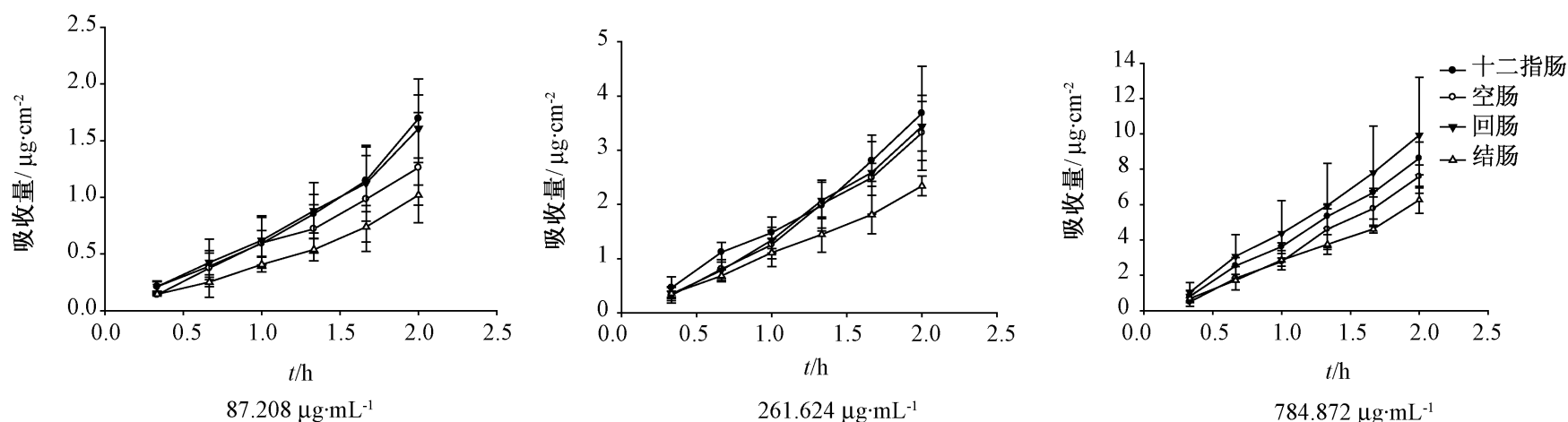


图 2 不同浓度下各个肠段穿心莲内酯肠吸收曲线 ($\bar{x} \pm SD, n=4$)

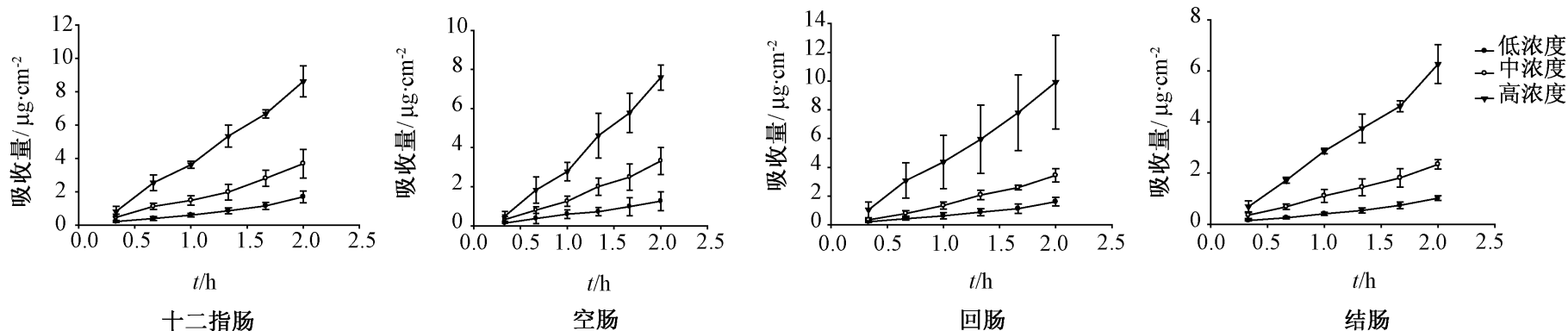


图 3 浓度对各个肠段穿心莲内酯吸收速率的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=4$)

较为接近,给出的数据可靠。目前常用肠外翻模型研究药物的吸收机制,寻找药物肠道的最佳吸收部位,筛选吸收促进剂或药物外排泵,评价药物在吸收环节的相互作用,也可用于肠道外排蛋白和代谢酶的研究。

药物体内吸收是体内多种因素(药物因素、剂型因素、生理因素)综合作用的结果。离体外翻肠囊法虽然简单可控,但与体内真实环境相差较远;体内实验时肠液、酶、胆汁、胰液、食物、肠壁的蠕动等对药物吸收的辅助作用不能体现。受试环境各种因素(pH、离子强度、渗透压、微量的有机溶剂)等也会影响实验,使结果高于真实值。“溶剂牵引作用”在药物肠吸收中起着不可忽视的作用,在离体实验中这种作用可能因为模型本身的特点而被放大。

在实验中也发现,随着实验时间的延长,肠段逐渐丧失活性,药物的载体或外排泵或者特异性吸收机制不能完全得到反映,且肠黏膜的通透性增加,尤其对于离子型或类似离子型的化合物,将大大增加通透速率,产生假阳性结果。一般肠外翻实验维持 3 h 比较合适。

离体外翻肠囊实验中,肠壁对药物的非特异性吸附也是影响结果的一个重要因素;肠道的运动(如分节运动、蠕动等)可抑制对肠壁的吸附,促进药物吸收。药物的分散状态(溶解、混悬、沉淀)也会对吸收造成重大影响,非溶解态的药物本身需要从基

质里溶出、分散、吸收,溶出速率的快慢将极大的影响肠壁吸收的快慢,溶出速率将成为限速步骤。

虽然离体外翻肠囊法有一些模型所固有的缺点,但也是由模型本身的特性所决定,仍不失为药物吸收机制的较好的快速评价方法。

[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] 何盛江,栾立标. 翻转肠囊法研究吸收促进剂对小肠吸收苦参碱的作用[J]. 药学进展, 2004, 28(3): 126.
- [3] 陈颖,郭健新,李正荣,等. 翻转小肠囊法研究环孢素 A 口服纳米脂质体在大鼠小肠的吸收行为[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(2): 137.
- [4] 李曙光,叶再元. 穿心莲内酯的药理活性作用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 984.
- [5] 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.
- [6] 胡慧玲,王战国,何瑶,等. HPLC 同时测定大鼠肠循环液中盐酸小檗碱和酚红的浓度[J]. 成都中医药大学学报, 2008, 31(4): 67.
- [7] 王元佩,张桂春,赵政,等. Caco-2 细胞中二甲双胍的摄取和转运特征[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1565.

[责任编辑 邹晓翠]