

羟基积雪草苷在大鼠肠内吸收的研究

夏丽文¹, 董培良²

1. 哈药集团制药六厂, 黑龙江 哈尔滨 150056

2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 研究羟基积雪草苷在大鼠肠段各段的吸收特征, 探究其在肠道的吸收机制, 为设计药物的剂型和给药途径提供理论基础。 **方法** 利用大鼠在体循环肠灌流模型和方法, 探明羟基积雪草苷的肠道吸收部位和吸收特征, 以及不同表面活性剂对其肠吸收的影响。 **结果** 羟基积雪草苷在大鼠小肠段吸收强于大肠段, 其吸收速率回肠 > 空肠 ≥ 十二指肠 > 结肠。而不同浓度的羟基积雪草苷溶液回肠吸收率和吸收速率常数无显著差异。在 3 种不同表面活性剂中, 聚山梨酯-80 对羟基积雪草苷的回肠吸收具有显著的促进作用。 **结论** 羟基积雪草苷的肠吸收主要集中在小肠中段, 且吸收机制推测为被动扩散, 表面活性剂聚山梨酯-80 可以促进其回肠吸收。

关键词: 羟基积雪草苷; 在体循环肠灌流; 被动扩散

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2011)01-0022-04

Absorption mechanism of madecassoside in intestinal of rats

XIA Li-wen¹, DONG Pei-liang²

1. Sixth Pharmaceutical Factory, Harbin Pharmaceutical Group, Harbin 150056, China

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the absorptive characteristics of madecassoside in different intestinal segments of rats, to observe its intestinal absorption mechanism, and to provide rational foundation for its dosage form and administration route design. **Methods** *In situ* intestinal perfusion model was used to study the best absorptive site, absorptive characteristics, and transport behavior influenced by three different surfactants. **Results** The results showed that the absorption of madecassoside in small intestine was much higher than that in large intestine, and the rank order of intestinal permeability was ileum > jejunum > duodenum > colon; There was no significant difference of absorption parameters of madecassoside at various concentrations; Among three surfactants, Tween-80 could significantly improve the intestinal absorption of madecassoside. **Conclusion** Main absorptive segments are middle site of small intestine, transport mechanism is similar to passive diffusion, and Tween-80 could enhance madecassoside absorption in ileum.

Key words: madecassoside; *in situ* intestinal perfusion; passive diffusion

积雪草为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urb. 的干燥全草, 别名落得打、崩大碗、半边钱。味苦、性辛、寒, 归肝、脾、肾经, 具有清热利湿、解毒消肿的功效, 用于湿热黄疸、中暑腹泻、砂淋血淋、痈肿疮毒、跌打损伤。现代药理学研究表明积雪草中总皂苷具有增加脑内神经递质水平^[1]和对抗肝纤维化^[2]的作用, 因此要开发成口服制剂需要了解其皂苷类成分的肠吸收情况。积雪草中含有的三萜皂苷类成分主要是积雪草苷和羟基积雪草苷^[3], 总皂苷中的羟基积雪草苷具有急性肝损伤保护作用^[4], 积雪草苷对急性肺损伤有保护作

用^[5]。通过文献检索发现积雪草苷的肠吸收研究已有报道^[6], 而羟基积雪草苷的肠吸收研究目前仍然未见报道。笔者通过采用大鼠在体循环肠灌流模型研究羟基积雪草苷在肠道的吸收部位和吸收特征, 为制剂开发提供生物药剂学参考。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); BS-124S 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司); HL-2 型恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂); 752 型紫外-可见分光光度计 (上海菁华科

收稿日期: 2010-10-05

作者简介: 夏丽文 (1972—), 高级工程师, 执业药师, 研究方向为药物制剂开发。Tel: 13936003041 E-mail: xia_liwen@126.com

技仪器公司)。

1.2 试药与试剂

羟基积雪草苷对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号110756-200210);羟基积雪草苷样品(自制,质量分数为91.3%);乌拉坦(分析纯,上海精析化工科技有限公司);苯酚红(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,Tedia公司);泊洛沙姆(Poloxamer,远城集团合中生化学原料药制造厂);聚山梨酯-80(分析纯,上海大众药业);十二烷基硫酸钠(SDS,珠海万博化工),其他试剂均为分析纯。

Krebs-Ringer 试剂(简称K-R试剂):取NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, NaHCO₃ 1.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, Glucose 1.4 g, 用水定容至1 000 mL, 调pH值为7.4, 即得。

空白肠循环液:在K-R试剂中加入适量苯酚红, 配制成含苯酚红20.0 μg/mL的肠循环液。

1.3 动物

SD大鼠, 雄性, 体质量200~250 g, 哈尔滨医科大学动物实验中心提供。

2 方法

2.1 HPLC 条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(27:73), 体积流量1.0 mL/min, 柱温25 °C, 检测波长204 nm, 进样量10 μL。羟基积雪草苷对照品、样品和空白肠循环液的HPLC图谱见图1, 可见在以上色谱条件下, 空白肠循环液中所含物质对羟基积雪草苷测定无干扰。

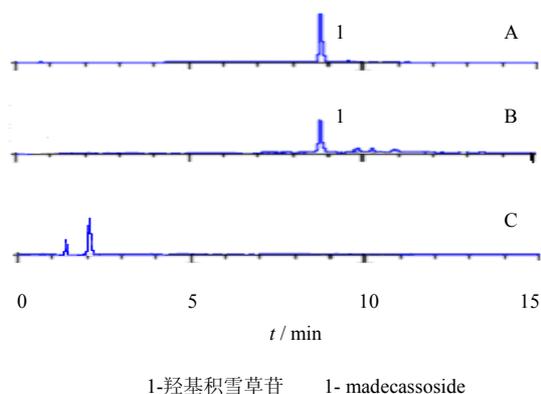


图1 对照品溶液(A)、样品溶液(B)和空白肠循环液(C) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference solution (A), sample solution (B), and blank intestinal perfusion solution (C)

2.2 肠循环液中酚红测定方法

取肠循环液0.5 mL, 置于10 mL试管中, 加入0.2 mol/L氢氧化钠溶液5 mL。以K-R试剂0.5 mL加0.2 mol/L氢氧化钠溶液5 mL作为空白, 使用紫外-可见分光光度计在558 nm处测定吸光度。

2.3 大鼠在体肠吸收实验^[5]

实验前将禁食18 h的大鼠称质量后, ip 20%的乌拉坦溶液6.5 mL/kg(剂量为1.3 g/kg)进行麻醉, 背位固定于操作台上, 保持37 °C体温, 沿着腹中线切开腹部约3 cm, 对考察的肠段(10 cm)于两端切口后, 用37 °C生理盐水将肠内容物冲洗干净, 再用空气将生理盐水排空, 插管并结扎。取预热至37 °C空白肠循环液循环10 min, 接着用50 mL含羟基积雪草苷肠循环液(预热至37 °C)以2.0 mL/min的体积流量循环10 min后, 将体积流量调整为1 mL/min, 分别于0、15、30、45、60、75、90 min取样1.0 mL, 0.45 μm孔径滤膜滤过后, 分为2份, 分别用于测定该时间点的羟基积雪草苷和苯酚红的质量浓度。同时向供试液瓶中补加等量含酚红20.0 μg/mL的K-R试剂。按照“2.1”和“2.2”项下的条件测定取样液中羟基积雪草苷和苯酚红质量浓度, 并根据苯酚红质量浓度计算出循环液的体积, 根据每个时间点药物浓度和循环液体积计算出肠循环液中的剩余药量(X), 以lnX对取样时间t做线性回归, 由直线的斜率求出吸收速率常数(K_a); 由90 min剩余药量的变化值对零时间剩余药量的比, 得90 min的药物吸收率(PA), 即 $PA = (M_0 - M_{90}) / M_0 \times 100\%$, 其中M₀为0 min时肠循环液中羟基积雪草苷的量, M₉₀为循环结束时(90 min)肠循环液中剩余羟基积雪草苷的量。

2.4 统计分析

采用SPSS 13.0统计分析软件对实验所得数据进行t检验。

3 结果

3.1 酚红测定方法学考察

3.1.1 线性关系考察 取苯酚红5.0 mg, 用K-R试剂溶解并定容至50 mL量瓶中, 得100 μg/mL的酚红贮备液。分别吸取该酚红贮备液1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 置10 mL量瓶中, 用K-R试剂定容至刻度, 得质量浓度分别为10、15、20、30、40、50 μg/mL酚红溶液。从上述溶液中各吸取0.5 mL, 置10 mL试管中, 加入0.2 mol/L氢氧化钠溶液5 mL。以0.5 mL K-R试剂加5 mL 0.2 mol/L氢

氧化钠溶液作为空白,用紫外-可见分光光度计在 558 nm 处测定吸光度 (A),以 A 对酚红质量浓度 C ($\mu\text{g/mL}$) 进行线性回归,得回归方程为 $A=0.0211C-0.0167$, $R^2=0.9993$ 。在 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 具有良好的线性关系。

3.1.2 专属性 分别取 K-R 试剂、空白肠循环液(含酚红 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 K-R 试剂)和羟基积雪草苷对照品溶液,按照“2.2”项下方法显色后,于 200~650 nm 处进行扫描。观察各种溶液在 558 nm 处的吸收情况,见图 2。可见酚红在 558 nm 处有最大吸收,而其他溶液成分在此波长处无吸收,对酚红测定无干扰,证明此酚红测定方法专属性较强。

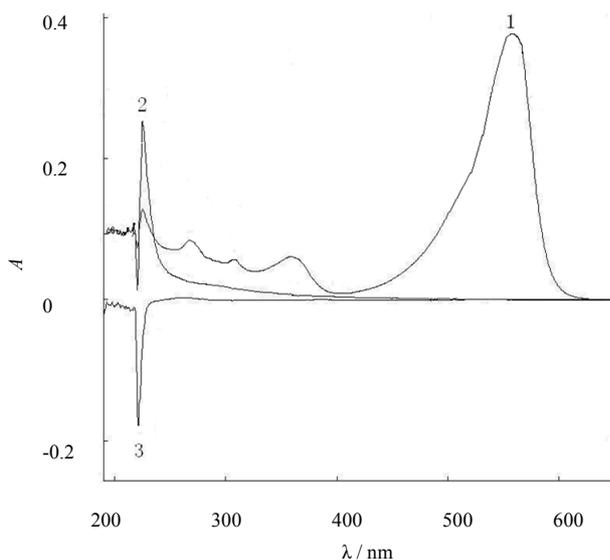


图 2 空白肠循环液(1)、羟基积雪草苷对照品溶液(2)和 K-R 试剂(3)紫外扫描图

Fig. 2 UV scanograms of blank intestinal perfusion solution (1), madecassoside reference solution (2) and blank K-R reagent (3)

3.2 羟基积雪草苷测定方法学考察

3.2.1 线性范围 精密称取羟基积雪草苷对照品 7.5 mg,用 K-R 试剂定容至 10 mL 量瓶中,得 0.75 mg/mL 对照品溶液。再分别用 K-R 试剂稀释为 0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/mL 的对照品溶液。分别过 0.45 μm 的微孔滤膜,取续滤液 10 μL 按照“2.1”项下的条件进样测定。以峰面积对羟基积雪草苷质量浓度做线性回归,得回归方程为 $A=32861.037C+2590.133$ ($R^2=0.9992$),表明羟基积雪草苷在 0.1~0.75 mg/mL 线性关系良好。

3.2.2 稳定性试验 用在大鼠全肠段循环 2 h 后的

空白肠循环液配制 0.2 mg/mL 的羟基积雪草苷对照品溶液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下孵育 2 h,分别于 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h 取样后按照“2.1”项下的条件进样测定。羟基积雪草苷峰面积的 RSD 为 0.93%。表明羟基积雪草苷在肠循环液内 2 h 内保持稳定。

3.2.3 精密度试验 用空白肠循环液配制 0.2 mg/mL 羟基积雪草苷对照品溶液,按照“2.1”项下的条件连续进样测定 6 次,结果羟基积雪草苷峰面积的 RSD 为 0.88%。

3.2.4 加样回收率试验 用空白肠循环液配制 0.2 mg/mL 羟基积雪草苷对照品溶液,进行加样回收率实验,按照“2.1”项下的条件测定 6 份样品,得羟基积雪草苷的平均加样回收率为 101.25%,RSD 为 1.22%。表明该法适用于肠循环液中羟基积雪草苷的定量测定。

3.3 羟基积雪草苷在不同肠段的吸收

用空白肠循环液配制 0.2 mg/mL 的羟基积雪草苷样品溶液,按照“2.3”项下的方法进行大鼠肠灌注实验,考察羟基积雪草苷在大鼠不同肠段的吸收情况。其中大鼠不同肠段的选择方法为:十二指肠自幽门 1 cm 处开始;空肠自幽门 15 cm 处开始;回肠自盲肠上行 20 cm 处开始;结肠自盲肠后端开始。每个肠段均取 10 cm。

从表 1 结果可见,羟基积雪草苷在大鼠各肠段中的吸收以回肠最好,其次是空肠和十二指肠,结肠吸收最差。原因可能是结肠肠壁较厚,且毛细血管分布较少。其中回肠与空肠、结肠和十二指肠比较, K_a 和 PA 均有显著差异 ($P<0.05$);空肠与十二指肠比较无显著差异;结肠与其他 3 个肠段比较均有显著差异 ($P<0.05$)。

表 1 羟基积雪草苷在不同肠段吸收比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Absorptive comparison of madecassoside in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s$)

肠段	$PA/\%$	K_a/min
十二指肠	17.825 7 \pm 3.190 3	0.002 1 \pm 0.000 2
空肠	18.037 4 \pm 1.995 6	0.002 0 \pm 0.000 1
回肠	32.625 8 \pm 2.048 6	0.003 2 \pm 0.000 2
结肠	7.857 2 \pm 0.459 2	0.000 5 \pm 0.000 1

3.4 质量浓度对羟基积雪草苷肠吸收的影响

用空白肠循环液配制 0.1、0.25、0.5 mg/mL 羟基积雪草苷样品溶液,按照“2.3”项下方法进行大鼠肠灌注实验,考察羟基积雪草苷在以上 3 种质量

浓度下在回肠的吸收情况。结果(表2)表明,在高、中、低3种质量浓度条件下,PA和Ka均无显著差异,表明在该质量浓度范围内羟基积雪草苷无吸收饱和现象,推测其在回肠的吸收方式为被动扩散。

表2 质量浓度对羟基积雪草苷回肠吸收影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Influence of concentration on ileal absorption of madecassoside ($\bar{x} \pm s$)

质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	PA / %	Ka / min
0.10	31.990 3±2.048 2	0.003 1±0.000 3
0.25	33.068 2±3.001 1	0.003 5±0.000 3
0.50	30.836 6±5.005 2	0.003 2±0.000 4

3.5 不同表面活性剂对羟基积雪草苷肠吸收的影响

分别用含0.5%聚山梨酯-80、0.5% SDS和0.5% Poloxamer的空白肠循环液配制0.25 mg/mL的羟基积雪草苷样品溶液,按照“2.3”项下的方法进行大鼠肠灌流实验,考察在以上3种含不同表面活性剂肠灌流液中的回肠吸收情况。见表3。结果表明,在肠灌流液中含有0.5%聚山梨酯-80的条件下,羟基积雪草苷的回肠吸收参数PA和Ka与空白组比较均具有显著差异($P \leq 0.05$),而0.5%的SDS和0.5%的Poloxamer对羟基积雪草苷的回肠吸收没有显著影响。

表3 不同表面活性剂对羟基积雪草苷回肠吸收影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of different surfactants on ileal absorption of madecassoside ($\bar{x} \pm s$)

组别	PA / %	Ka / min
对照组	33.068 2±3.001 1	0.003 5±0.000 3
0.5% 聚山梨酯-80	42.217 6±3.838 5*	0.004 4±0.000 4*
0.5% SDS	34.271 6±3.010 1	0.003 6±0.000 3
0.5% Poloxamer	35.002 0±3.052 1	0.003 6±0.000 4

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

本实验所建立的HPLC方法测定肠循环液中的羟基积雪草苷的量,在线性范围内具有较好的精密度和稳定性,表明该方法可以快速、准确地测定药物的量,因此可以准确判断肠循环液中的药物残留量。因为在体肠吸收研究中,肠循环液中的水分会不断地被肠道所吸收,本实验中肠循环液中的水分

损失量采用酚红测定的方法进行标定,因为酚红本身在肠道中不被吸收,因此肠循环液中酚红浓度的变化可以间接反映肠循环液的体积变化。

本实验研究结果显示,羟基积雪草苷在小肠部位吸收较好,而在属于大肠的结肠段吸收较差。结肠段的药物吸收要明显少于回肠、十二指肠和空肠。因此在做药物剂型设计的时候,要充分考虑羟基积雪草苷的肠吸收位置,盲目地开发结肠定位给药会造成羟基积雪草苷的生物利用度降低。另外,不同质量浓度的羟基积雪草苷溶液在回肠段的吸收程度无显著差异,随着质量浓度的升高吸收率和吸收速率常数没有明显下降,因此可以初步推断羟基积雪草苷在大鼠回肠的吸收方式为被动扩散。更加详细和深入了解羟基积雪草苷经口给药在大鼠体内的吸收和利用情况,可采用循环肠灌流后测定血中药物浓度的方法进行研究。

从3种表面活性剂对羟基积雪草苷回肠吸收影响研究中,可以发现聚山梨酯-80、SDS和Poloxamer对其回肠吸收均有一定的促进作用,但只有聚山梨酯-80组对空白组比较具有显著差异。至于表面活性剂对羟基积雪草苷肠吸收促进作用的详细机制需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 陈瑶,韩婷,芮耀诚,等. 积雪草总苷对实验性抑郁大鼠血清皮质酮和单胺类神经递质的影响[J]. 中药材, 2005, 28(6): 492-496.
- [2] 明志君,刘世增,曹莉,等. 积雪草总苷抗DMN诱导大鼠肝纤维化的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 731-735.
- [3] 陈瑶,蒋毅,秦路平,等. RE-HPLC测定积雪草中积雪草甙、羟基积雪草甙的含量[J]. 中成药, 2000, 22(3): 227-228.
- [4] 李洪忠,万敬员,张力,等. 羟基积雪草苷对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1525-1527.
- [5] 章卓,万敬员,罗福玲,等. 积雪草苷对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的影响[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1196-1199.
- [6] 黄怀鹏,刘彩霞. 积雪草苷大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 1056-1058.
- [7] 孙洁胤,周芝芳,刘放. 5-Fu大鼠在体肠道吸收动力学和结肠吸收促进剂的研究[J]. 中国现代应用药理学杂志, 2003, 20(5): 386-389.