

白头翁皂苷 D 在大鼠肠道的吸收行为研究

饶小勇^{1,2}, 龚明³, 尹珊³, 罗晓健^{2,3}, 简晖^{2,3}, 冯育林^{2,3}, 杨世林^{1,2*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

3. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 考察白头翁皂苷 D 在大鼠肠道的吸收特性。**方法** 采用大鼠在体单向肠灌注模型考察白头翁皂苷 D 在大鼠肠道的吸收情况, HPLC 法测定肠灌注液中的白头翁皂苷 D, 以白头翁皂苷 D 的吸收速率常数 (K_a) 和表观渗透系数 (P_{app}) 为指标, 考察吸收部位、药物浓度、pH 值和 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂对白头翁皂苷 D 吸收的影响。**结果** 白头翁皂苷 D 灌注液在各肠段的 K_a 和 P_{app} 值为结肠>回肠>空肠>十二指肠, 且各肠段之间存在显著差异 ($P<0.05$); 随着 pH 值不断增加, K_a 和 P_{app} 值也随之增加, 且 K_a 和 P_{app} 均存在显著差异 ($P<0.05$); 不同质量浓度 (0.30、0.15、0.08 mg/mL) 的灌注液在结肠的吸收无显著差异; 灌注液中含 P-gp 抑制剂与不含 P-gp 抑制剂的白头翁皂苷 D 的肠吸收存在显著差异 ($P<0.05$)。**结论** 白头翁皂苷 D 在大鼠各肠段均能较好地吸收, 吸收窗主要在结肠; 一定范围内的药物质量浓度对白头翁皂苷 D 的 K_a 和 P_{app} 无明显影响, 初步确定其吸收机制为被动扩散; 白头翁皂苷 D 是 P-gp 的底物, 且存在转运蛋白饱和现象。

关键词: 白头翁皂苷 D; 单向肠灌注; 肠吸收; P-糖蛋白; 转运蛋白饱和

中图分类号: R282.710.5; R969.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)24-3515-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.016

Study on *in situ* intestinal absorption of *Pulsatilla* saponin D in rats

RAO Xiao-yong^{1,2}, GONG Ming³, YIN Shan³, LUO Xiao-jian^{2,3}, JIAN Hui^{2,3}, FENG Yu-lin^{2,3}, YANG Shi-lin^{1,2}

1. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To investigate the intestinal absorption characteristics of *Pulsatilla* saponin D in rats. **Methods** *In situ* single-pass intestinal perfusion model was used to inspect the absorption of *Pulsatilla* saponin D in the intestinal tract of rats. HPLC was used to determine the concentration of *Pulsatilla* saponin D in intestinal perfusion fluid samples. Absorption rate constant (K_a) and apparent permeability coefficient (P_{app}) were used as indexes to investigate the effects of absorption sites, drug concentration, different pH values, and P-glycoprotein (P-gp) inhibitor on *Pulsatilla* saponin D absorption. **Results** There was the significant difference ($P < 0.05$) of intestinal perfusion fluid samples in each intestinal segment and the order of the K_a and P_{app} values of *Pulsatilla* saponin D in each intestinal segment was colon > ileum > jejunum > duodenum. With the pH value increasing, the K_a and P_{app} values also increased and both of them had significant differences ($P < 0.05$). The colon absorption of perfusion fluid at different concentration (0.30, 0.15, and 0.08 mg/mL) had no significant difference ($P > 0.05$); There was significant difference ($P < 0.05$) in K_a and P_{app} values with and without P-gp inhibitor. **Conclusion** *Pulsatilla* saponin D could be well absorbed in whole intestinal segments of rats, and the best intestinal absorption site is colon; The drug concentration in a certain range has no effect on K_a and P_{app} values, which preliminarily confirms that the absorption mechanism of *Pulsatilla* saponin D could be passive diffusion; *Pulsatilla* saponin D may be a substrate of P-gp and possess the saturation phenomenon of transporters.

Key words: *Pulsatilla* saponin D; single-pass intestinal perfusion; intestinal absorption; P-glycoprotein; transporter saturation

白头翁皂苷 D 是从白头翁中分离得到的一种三萜皂苷, 具有很强的抗肿瘤作用^[1-5]。由于皂苷类成分易发生溶血现象, 故常常研制成口服制剂。胃肠道吸收是口服制剂进入体内的第 1 个环节, 因此研

收稿日期: 2013-08-14

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX11102-001-19); 江西省自然科学基金资助项目 (20114BAB215045); 江西省优势科技创新团队计划项目 (2010DQB01700); 江西省教育厅产学研合作项目 (GJJ11006)

作者简介: 饶小勇, 男, 博士研究生, 江西高安人, 研究方向为天然药物活性成分研究。Tel: 18907086080 E-mail: rxy1014@163.com

*通信作者 杨世林 Tel: (0791)87119638 E-mail: slyang3636@126.com

究和明确药物的吸收机制及部位对于指导制剂的处方设计具有重要意义。离体法、在体法和体内法是研究药物肠吸收动力学常用的几种方法^[6-12]。单向灌流模型因具有组织存活率高、吸收速率稳定、与人体有良好的相关性等优点^[13-14]，成为药物吸收研究常用模型。本实验采用单向灌流模型与 HPLC 法相结合的方法，研究白头翁皂苷 D 的肠吸收行为，为其剂型设计提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

白头翁皂苷 D 对照品，中药固体制剂制造技术国家工程研究中心对照品室，经 MS、NMR 鉴定和 HPLC 测定，质量分数 >99%；乌拉坦，国药集团化学试剂有限公司；盐酸维拉帕米对照品（批号 0223-9601），中国药品生物制品检定所；生理盐水，江西科伦药业有限公司；甲醇，色谱纯，上海振兴化工一厂；氯化钠、磷酸二氢钠、葡萄糖，汕头市西陇化工股份有限公司；氯化钾、碳酸氢钠、氯化镁，上海实验试剂有限公司；氯化钙，天津市福晨化学试剂厂；其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

SD 大鼠，雌性，体质量（220±20）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，合格证号：SCXK（湘）2011-0003。

1.3 仪器

HPLC 仪 [包括 Agilent 1260 色谱泵、二级管阵列检测器（DAD）]，美国安捷伦科技公司；KQ—4000B 型超声清洗机，巩义市予华仪器有限责任公司；AL204 电子天平、ML3002E/02 电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；TDL—40B 飞鸽牌台式离心机，上海安亭科学仪器厂制造；Millipore Synergy 超纯水系统，美国密理博公司；HH—2 数显恒温水浴锅，常州国华电器有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 空白肠营养液（K-R 液）的制备^[15] 分别称取氯化钠 7.80 g、氯化钾 0.35 g、磷酸二氢钠 0.32 g、碳酸氢钠 1.37 g、氯化镁 0.02 g，置于 500 mL 蒸馏水中，超声溶解，密闭冷藏；将氯化钙 0.37 g 置于 500 mL 蒸馏水中，超声溶解，密闭冷藏；临用前将后者与前者混均，加入葡萄糖 1.40 g，即得。

2.1.2 白头翁皂苷 D 储备液的制备 精密称取白头翁皂苷 D 对照品 35.59 mg，置 100 mL 量瓶中，加

甲醇适量超声 5 min，溶解，定容至刻度，摇匀，即得 3 559 μg/mL 的白头翁皂苷 D 储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取白头翁皂苷 D 适量，置于 250 mL 烧杯中，加适量 K-R 液，搅拌 12 h，4 000 r/min 离心 10 min，得白头翁皂苷 D 供试品溶液，备用。

2.1.4 空白肠灌流液的制备 取 K-R 液适量，按大鼠在体肠吸收实验方法进行灌流，收集流出液，即得。

2.1.5 白头翁皂苷 D 肠灌流液的制备 取白头翁皂苷 D 供试品溶液适量，按大鼠在体肠吸收实验方法进行灌流，收集流出液，即得。

2.1.6 含盐酸维拉帕米的白头翁皂苷 D 供试品溶液的制备 精密称取盐酸维拉帕米适量，置于 250 mL 烧杯中，加适量白头翁皂苷 D 供试品溶液，搅拌 12 h，离心 10 min，得含盐酸维拉帕米的白头翁皂苷 D 供试品溶液，待用。

2.2 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为依利特 Hypersil ODS₂ C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇-水-甲酸（68：32：0.1），体积流量 1.0 mL/min，检测波长 203 nm，柱温 30 ℃，进样量为 10 μL。

2.2.2 专属性试验 分别取空白肠灌流液，白头翁皂苷 D 肠灌流液、对照品溶液和供试品溶液，滤过，取续滤液依法测定，色谱图见图 1。结果显示，白头翁皂苷 D 肠灌流液中白头翁皂苷 D 完全分离，供试品溶液和白头翁皂苷 D 肠灌流液主峰保留时间与对照品溶液一致，空白灌流液的内源性成分对白头翁皂苷 D 的检测无干扰。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取白头翁皂苷 D 储备液，分别加入 K-R 液，稀释成 28.5、56.9、113.9、170.8、227.8、284.7、341.7 μg/mL 系列质量浓度的对照品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱峰面积。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），绘制标准曲线，得回归方程 $Y=2\,727.2X-7.022\,5$ ， $r=0.999\,9$ ，表明白头翁皂苷 D 在 28.5~341.7 mg/mL 呈良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验 取白头翁皂苷 D 储备液适量，用 K-R 液分别稀释至 71.2、142.4、284.7 μg/mL，按照“2.2.1”项下色谱条件于 1 d 内重复测定 5 次，记录白头翁皂苷 D 峰面积，计算日内精密度；隔天测定 1 次，连续测定 5 d，记录白头翁皂苷 D 峰面积，计算日间精密度。结果 71.2、142.4、284.7 μg/mL

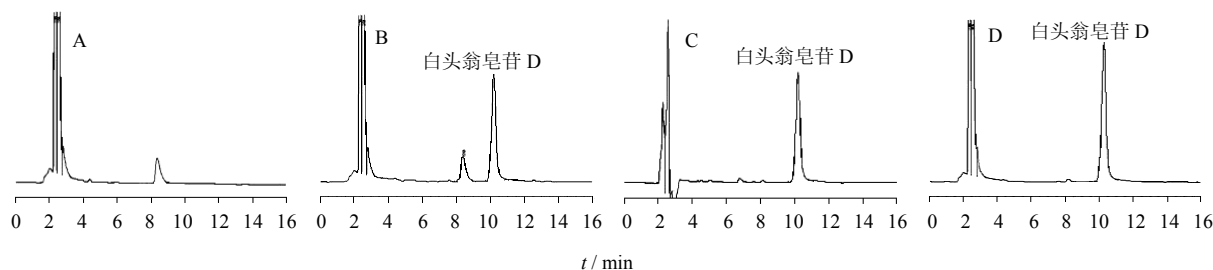


图1 空白肠灌流液 (A)、白头翁皂苷 D 肠灌流液 (B)、对照品 (C) 和供试品 (D) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank intestinal perfusion fluid (A), *Pulsatilla saponin D* intestinal perfusion fluid (B), *Pulsatilla saponin D* reference substances (C), and sample (D)

的白头翁皂苷 D 对照品溶液日内精密度的 RSD 分别为 1.63%、1.82%、1.73%，日间精密度的 RSD 分别为 1.19%、0.74%、0.38%，表明此方法精密度良好。

2.2.5 白头翁皂苷 D 在空白肠灌流液中的稳定性试验 用空白肠灌流液配制质量浓度分别为 0.30、0.15、0.08 mg/mL 的白头翁皂苷 D 肠灌流液，(37±0.5)℃ 恒温水浴中保温 6 h，分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 取样，滤过，按照“2.2.1”项下色谱条件测定白头翁皂苷 D 的峰面积。结果显示，在各时间点，0.30、0.15、0.08 mg/mL 白头翁皂苷 D 峰面积的 RSD 分别为 1.22%、1.50%、1.73%，表明白头翁皂苷 D 在 6 h 内稳定。

2.2.6 含 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂盐酸维拉帕米的白头翁皂苷 D 供试液的稳定性试验 按“2.1.6”项下方法分别配制含 P-gp 抑制剂盐酸维拉帕米的白头翁皂苷 D (0.30、0.15、0.08 mg/mL) 供试液，置于 (37±0.5)℃ 水浴 6 h，分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 取样，滤过，按照“2.2.1”项下色谱条件测定白头翁皂苷 D 的峰面积，分别考察含盐酸维拉帕米的白头翁皂苷 D 供试液的稳定性。结果显示，在各时间点，0.30、0.15、0.08 mg/mL 白头翁皂苷 D 峰面积的 RSD 为 1.52%、1.36%、1.28%，表明白头翁皂苷 D 与盐酸维拉帕米混合温育时，白头翁皂苷 D 的稳定性良好。

2.2.7 回收率试验 精密吸取一定量的白头翁皂苷 D 储备液，用空白肠灌流液配成质量浓度分别为 0.3、0.15、0.075 mg/mL 的白头翁皂苷 D 灌流液，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录白头翁皂苷 D 的峰面积 (A_1)；另取白头翁皂苷 D 储备液，用 K-R 试剂配成相应质量浓度的溶液，进样测定，记录白头翁皂苷 D 的峰面积 (A)，以相应质量浓度的 A_1 与 A 的比值计算绝对回收率。结果白头翁皂

苷 D 0.30、0.15、0.08 mg/mL 的绝对回收率分别为 100.63%、99.17%、99.23% ($n=5$)，RSD 分别为 1.63%、1.12%、1.96%。

2.3 大鼠在体肠吸收实验

2.3.1 方法 为了消除实验过程中管路对药物的吸附作用，于实验开始前用供试液反复冲洗实验管道，直至出液口药液质量浓度与供试液质量浓度相等为止。SD 大鼠实验前禁食过夜 (自由饮水)，ip 20% 乌拉坦溶液 (1.3 g/kg) 麻醉，背位固定于恒温手术台上，用红外灯保持 37℃ 体温，沿腹中线打开腹腔约 3 cm，取需要考察的肠段约 10 cm，两端剪切后用 37℃ 的生理盐水冲洗清除其内容物，排尽肠道内剩余液体，插直径为 0.3 cm 的玻璃管，手术线结扎固定，伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿。将肠管入口处的插管与蠕动泵的胶管相连形成回路，开动蠕动泵，用预热至 37℃ 的供试液以 0.2 mL/min 循环 30 min，立即用装有供试液并已知质量的玻璃小瓶以相同灌流体积流量，同时出口处用已知质量的玻璃小瓶收集流出的灌流液，每隔 15 min 迅速更换 1 次供试液小瓶和收集液小瓶，直至 105 min 结束实验。冷至室温后，称量各个供试液小瓶和收集液小瓶的质量，计算灌入供试液的质量和收集到的流出液质量，按照“2.2.1”项下色谱条件测定收集液中的药物量。实验结束后处死大鼠，将考察的肠段剪下，测量长度 (l) 和内径 (r)。

2.3.2 灌流液体积的校正 采用质量法校正因肠内水份吸收引起灌流液体积的变化。精密量取供试液 0.5 mL，置于已称质量的干净玻璃瓶中，称液体质量，计算入肠液体的密度 (ρ_{in})。从收集液 (45~105 min 内的总收集液) 中精密量取 0.5 mL，放入已经称质量的干净玻璃瓶中，称液体质量，计算收集液的平均密度 (ρ_{out})。装供试液小瓶和装收集液小瓶

的空瓶质量分别为 M_{s0} 、 M_{r0} , 15 min 灌流结束后装供试液小瓶和收集液小瓶的质量分别为 M_{s1} 、 M_{r1} , 入肠液体的质量 (M_{in}) = $M_{s0} - M_{s1}$, 出肠液体的质量 (M_{out}) = $M_{r1} - M_{r0}$, 供试液体积 (V_{in}) = M_{in} / ρ_{in} , 接收液体积 (V_{out}) = M_{out} / ρ_{out} 。 V_{in} 与 V_{out} 的差异就是肠道吸收或分泌的水分体积^[9]。

2.3.3 吸收速率常数 (K_a) 和表观渗透系数 (P_{app}) 计算 采用质量法计算药物 K_a 和 P_{app} ^[16]。

$$K_a = (1 - C_{out} / C_{in} \times V_{out} / V_{in}) \times v / \pi r^2 l$$

$$P_{app} = v \ln (C_{out} / C_{in} \times V_{out} / V_{in}) / 2\pi r l$$

v 为灌流速度, C_{in} 和 C_{out} 分别为进口和出口处供试品溶液中药物质量浓度, l 和 r 分别为被灌流肠段的长度 (cm) 和横截面半径 (cm)

2.3.4 统计学处理 数据均采用 SPSS 19.0 统计软件处理, 并进行单因素方差分析, 均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.4 灌流管路中白头翁皂苷 D 物理吸附考察

按“2.1.3”项下方法配制白头翁皂苷 D 供试品溶液。实验前将灌流管路在供试品溶液中浸泡 12 h, 以实验的灌流速度流过灌流管路, 分别于 0、30、60、90、120 min 进样, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定灌流管路两端白头翁皂苷 D 的峰面积, 根据标准曲线计算白头翁皂苷 D 的质量浓度。结果显示 120 min 后白头翁皂苷 D 剩余质量分数为 99.03%, 符合实验要求。

2.5 供试品溶液在肠壁物理吸附试验

剪取清洗后的大鼠十二指肠、空肠、回肠及结肠各 10 cm, 用玻璃棒将黏膜层翻出, 洗净后置于 50 mL 已知药物质量浓度的白头翁皂苷 D 供试液中, 于 37 °C 孵育 2 h, 取出肠段, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定孵育液中剩余白头翁皂苷 D 的峰面积, 根据标准曲线计算其质量浓度^[17]。结果显示, 孵育液中的药物质量浓度为初始质量浓度的 (98.73 ± 0.62) % ($n=5$), 故可认为大鼠肠壁黏膜对药物基本无物理吸附。

2.6 影响药物肠吸收的因素

2.6.1 吸收部位对肠吸收的影响 实验时对各肠段结扎 (不结扎胆总管): 十二指肠段自幽门 1 cm 处开始, 空肠段自幽门 15 cm 处开始, 回肠段为盲肠上行 20 cm 处开始, 结肠段为紧邻盲肠开始, 各段均向下取 10 cm 左右^[18]。用药物质量浓度为 0.30 mg/mL、pH 值 7.4 的供试液分别灌流, 体积流量 0.2 mL/min。按“2.3.1”项下方法操作, 测定大鼠不同肠段吸收白头翁皂苷 D 的 K_a 和 P_{app} , 考察吸收部位

对白头翁皂苷 D 肠吸收的影响。结果见表 1。各肠段间 K_a 存在显著差异 ($P < 0.05$)。从十二指肠到结肠, 肠段的 pH 值不断升高, 肠道对白头翁皂苷 D 的 K_a 随肠道 pH 值的升高而增加。根据文献报道^[19], $P_{app} < 1.8 \times 10^{-4}$ cm/s 和 $P_{app} > 1.2 \times 10^{-3}$ cm/s 时, 分别表示药物难以吸收和易于吸收, 由表 1 可以看出白头翁皂苷 D 在肠道中吸收较好, 吸收窗主要在结肠。

表 1 吸收部位对白头翁皂苷 D K_a 和 P_{app} 的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects of various absorption sites on K_a and P_{app} values of *Pulsatilla saponin D* ($\bar{x} \pm s, n=5$)

肠 段	$P_{app} / (\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_a / (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$
十二指肠	0.786 ± 0.006	6.37 ± 0.02
空肠	0.816 ± 0.005	6.55 ± 0.03
回肠	1.051 ± 0.012	8.51 ± 0.07
结肠	2.078 ± 0.016	16.50 ± 0.07

2.6.2 药物质量浓度对肠吸收的影响 用 K-R 液精密配制 pH 值 7.4、质量浓度分别为 0.08、0.15、0.30 mg/mL 的白头翁皂苷 D 供试品溶液, 以结肠段为灌流部位, 体积流量 0.2 mL/min。按“2.3.1”项下方法操作, 测定白头翁皂苷 D 肠吸收的 K_a 和 P_{app} 值。结果见表 2。上述药物质量浓度对 K_a 和 P_{app} 值无显著影响, 表明药物在结肠段的吸收不受自身质量浓度的影响, 符合 Fick's 扩散定律, 提示白头翁皂苷 D 主要以被动扩散机制进行体循环。

表 2 药物质量浓度对白头翁皂苷 D K_a 和 P_{app} 值的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effects of different drug concentration on K_a and P_{app} values of *Pulsatilla saponin D* ($\bar{x} \pm s, n=5$)

白头翁皂苷 D / (mg · mL ⁻¹)	$P_{app} /$ ($\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	$K_a /$ ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$)
0.30	2.078 ± 0.016	1.650 ± 0.007
0.15	2.065 ± 0.023	1.650 ± 0.009
0.08	1.940 ± 0.015	1.561 ± 0.009

2.6.3 介质 pH 值对肠吸收的影响 用稀盐酸和稀氢氧化钠调节白头翁皂苷 D 供试品溶液 (若药物能完全溶解, 则质量浓度为 0.50 mg/mL) 的 pH 值分别为 7.4、6.8、5.4, 搅拌 12 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 以结肠段为灌流部位, 体积流量为 0.2 mL/min。按“2.3.1”项下方法操作, 测定白头翁皂苷 D 肠吸收的 K_a 和 P_{app} 值。结果见表 3。不同 pH 条件下的

表3 介质 pH 值对白头翁皂苷 D K_a 和 P_{app} 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effects of different pH values on K_a and P_{app} values of Pulsatilla saponin D ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

pH 值	$P_{app} / (\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_a / (\times 10^{-2} \text{ min}^{-1})$
7.4	1.752 ± 0.011	1.420 ± 0.012
6.8	1.323 ± 0.008	1.060 ± 0.004
5.4	0.861 ± 0.003	0.690 ± 0.007

K_a 和 P_{app} 值均存在显著差异 ($P < 0.05$), 随着 pH 值不断增加, K_a 和 P_{app} 值也随之增加。

2.6.4 P-gp 抑制剂对肠吸收的影响 分别配制含 P-gp 抑制剂盐酸维拉帕米 0.10、0.50、1.00 mmol/L, pH 值为 7.4 的白头翁皂苷 D 供试品溶液和不含盐酸维拉帕米的空白供试品溶液, 白头翁皂苷 D 质量浓度均为 0.15 mg/mL。以结肠为灌流部位, 体积流量 0.2 mL/min, 按“2.3.1”项下方法操作, 测定白头翁皂苷 D 肠吸收的 K_a 和 P_{app} 值。结果见表 4。不加盐酸维拉帕米和加盐酸维拉帕米的白头翁皂苷 D 的结肠 K_a 、 P_{app} 值存在显著差异 ($P < 0.05$); 盐酸维拉帕米 0.50 mmol/L 与 0.10 mmol/L 组间 K_a 、 P_{app} 值存在显著差异 ($P < 0.05$), 但 0.50 mmol/L 与 1.00 mmol/L 组间无显著差异 ($P > 0.05$), 表明白头翁皂苷 D 是 P-gp 的底物, 且存在转运蛋白饱和现象。

表4 盐酸维拉帕米对白头翁皂苷 D K_a 和 P_{app} 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effects of verapamil hydrochloride at different concentration on K_a and P_{app} values of Pulsatilla saponin D ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

盐酸维拉帕米 / (mmol·L ⁻¹)	$P_{app} /$ ($\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	$K_a /$ ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$)
0	2.078 ± 0.016	1.650 ± 0.007
0.10	2.135 ± 0.015	1.711 ± 0.007
0.50	2.572 ± 0.038	2.052 ± 0.027
1.00	2.644 ± 0.022	2.060 ± 0.021

3 讨论

在体肠灌流分为在体单向肠灌流和在体循环肠灌流。由于在体循环肠灌流法灌流时间长 (4~6 h) 且灌流速度 (2~5 mL/min) 较大, 易对肠道黏膜造成损伤, 使肠通透性增加而导致所测药物吸收增加, 造成实验结果与真实情况存在较大误差。单向肠灌流的灌流体积流量为 0.2 mL/min, 可有效避免肠道

黏膜的破坏, 吸收速率稳定, 且与人体肠吸收相关性良好。因此本实验采用在体单向肠灌流对白头翁皂苷 D 的吸收行为进行测定。

在药物吸收过程中, 肠道不仅会吸收药物, 还会吸收或分泌水分, 导致吸收液体积发生变化, 因此实验必须对体积变化进行校正。目前, 单向灌流实验中常用的体积校正方法有质量法和酚红法, 但有研究表明^[9,17], 在长时间的灌流过程中, 肠道对酚红存在一定程度的吸收, 易导致所测吸收参数较实际值偏低, 且酚红本身还可能干扰某些化合物在肠道的转运和分析测定。而质量法能显著减少实验误差, 提高实验数据的准确性, 与传统的酚红法相比大大减少了工作量。所以, 本实验采用质量法对吸收前后灌流液体积的变化进行校正。为了确保灌流液中白头翁皂苷 D 质量浓度的降低是因肠道吸收而不是其他非特异性结合引起的, 本实验考察了灌流管路和大鼠肠壁黏膜对药物的物理吸附, 结果表明用灌流液对灌流管路饱和之后, 灌流管路对白头翁皂苷 D 不存在物理吸附, 且大鼠肠壁黏膜对药物基本无物理吸附, 对实验结果不会产生干扰。

前期研究发现, 白头翁皂苷 D 在水中的饱和溶解度约 4 mg/mL, 参照《中国药典》2010 版可知其属于微溶性成分。结合上述实验结果并依据生物药剂学分类系统分类, 可知白头翁皂苷 D 属于第三类, 即溶解性不好、渗透性好的化合物。根据白头翁皂苷 D 的结构可知其属于弱酸性有机化合物, 随着 pH 值不断增大, 白头翁皂苷 D 易形成盐, 溶解度增大, 且实验结果也显示随着 pH 值的升高, 有利于提高 K_a 、 P_{app} 值。因此可通过制剂手段提高白头翁皂苷 D 溶解度, 以达到改善吸收的目的。

参考文献

- [1] 石宝俊, 李茜, 张晓琦, 等. 中药白头翁地上部分的三萜皂苷成分 [J]. 药学学报, 2007, 42(8): 862-866.
- [2] Son M K, Jung K H, Hong S W, et al. SB365, Pulsatilla saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signaling pathway [J]. Food Chem, 2013, 136(1): 26-33.
- [3] Hong S W, Jung K H, Lee H S, et al. SB365 inhibits angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Cancer Sci, 2012, 103(11): 1929-1937.
- [4] Kim Y, Bang S C, Lee J H, et al. Pulsatilla saponin D: the

- antitumor principle from *pulsatilla koreana* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(9): 915-918.
- [5] 王 征, 张 宁, 孙艳妮, 等. 白头翁寒热药性的细胞评价 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(5): 359-362.
- [6] Stewart B H, Chan O R, Lu R H, *et al.* Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in humans [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(5): 693-699.
- [7] Fagerholm U, Johansson M, Lennemas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [8] Le C P, Dollo G, Chevanne F, *et al.* Influence of hydroxypmpyl- β -cyclodextrin and dimethyl- β -cyclodextrin on diphenhydramine intestinal absorption in a rat *in situ* model [J]. *Int J Pharm*, 1998, 169(2): 221-228.
- [9] 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): 1176-1179.
- [10] 刘 睿, 刘志东, 张伯礼, 等. 丹酚酸 B 在体肠吸收研究 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(10): 852-860.
- [11] 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]. *中药与天然药物*, 2007, 17(4): 29-32.
- [12] 吴雅娜, 栾立标. 独活有效成分大鼠在体单向灌流肠吸收 [J]. *药学报*, 2008, 43(1): 102-107.
- [13] 谭晓斌, 贾晓斌, 陈 彦, 等. 在体肠灌流模型及其在中药研究中的应用 [J]. *中成药*, 2007, 29(11): 1665-1667.
- [14] 程 锦, 狄留庆. 在体肠段灌流模型在中药吸收研究中的应用 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2008, 15(2): 98-100.
- [15] 李沉纹, 罗明和, 李卓恒, 等. 牛蒡子苷大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 727-730.
- [16] 朱玲玲, 李 娟, 王广基. 地西洋大鼠在体肠吸收机理研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2006, 37(6): 507-511.
- [17] 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]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(8): 594-597.
- [18] 潘德城, 孙婷婷, 孙勇兵, 等. 单向灌流法研究丹参提取物中丹参素和原儿茶醛大鼠肠吸收特性 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 944-950.
- [19] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9): 336-342.