

雷公藤固体分散体大鼠在体肠吸收研究

吴 珏^{1,2}, 刘志宏¹, 林 兵¹, 林莉莉¹, 周桂芝^{1,2}, 宋洪涛^{1*}

1. 联勤保障部队第九〇〇医院, 福建 福州 350100

2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108

摘要: 目的 研究雷公藤固体分散体的大鼠肠吸收动力学特征, 考察不同肠段、药物浓度、pH值和P-糖蛋白(P-gp)对肠吸收的影响。方法 采用大鼠在体单向肠灌注模型, HPLC法测定各指标成分含量, 重量法校正数据并计算各指标成分的吸收速率常数(K_a)和表观渗透系数(P_{app})。结果 将原料药制成固体分散体后, 雷公藤各成分在全肠段的 K_a 较原料药显著增大($P < 0.05$), 雷公藤各指标成分在各肠段均有吸收且存在一定差异。随着药物浓度的升高, 各指标成分的吸收均具有饱和现象。酸性环境(pH 5.4)有利于各指标成分的吸收, 尤其是酸性成分雷公藤红素。加入P-gp抑制剂后, 雷公藤红素的吸收与不加P-gp抑制剂比较有显著差异($P < 0.05$), 可能为P-gp底物。结论 雷公藤固体分散体各指标成分在全肠段均有吸收, 且具有饱和现象; 酸性环境有利于各成分的吸收, 雷公藤红素吸收过程受药物浓度和P-gp的外排影响, 可能为P-gp底物; 制成固体分散体能显著提高雷公藤各成分的吸收, 提示各指标成分均为生物药剂学系统II类药物, 制剂研发过程中增加药物溶解度或可提高制剂的生物利用度。

关键词: 雷公藤; 固体分散体; 肠吸收动力学; 单向肠灌注; 雷公藤红素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0462-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.028

Intestinal absorption features of *Tripterygium wilfordii* solid dispersion in rats with single-pass intestinal perfusion model

WU Jue^{1,2}, LIU Zhi-hong¹, LIN Bing¹, LIN Li-li¹, ZHOU Gui-zhi^{1,2}, SONG Hong-tao¹

1. 900 Hospital of the Joint Logistics Team, Fuzhou 350100, China

2. College of Pharmacy, Fujian University of Chinese Traditional Medicine, Fuzhou 350108, China

Abstract: Objective To study the intestinal absorption kinetics of *Tripterygium wilfordii* (TW) solid dispersions and the effects of different intestinal segments, drug concentrations, pH value, and P-glycoprotein (P-gp) on intestinal absorption. **Methods** The absorption behavior was investigated *in situ* with a single-pass intestinal perfusion (SPIP) model in rats. The content of each index component was determined by HPLC. The gravimetric method was used to correct the data and calculate the absorption rate constant (K_a) and apparent permeability coefficient (P_{app}) of each index component. **Results** The index components of TW were absorbed in the whole intestine, and the absorption rate constant (K_a) of all the index components of TW solid dispersion was significantly increased than that of extract ($P < 0.05$), and had some differences among different segments. With the increase of drug concentration, the absorption of each index component had saturation phenomenon, which indicated that it may be carrier-mediated transport mechanism. Acidic environment (pH 5.4) was beneficial to the absorption of various index components, especially the acidic content celastrol. After adding P-gp inhibitor, the K_a and P_{app} of celastrol were significantly different from those without P-gp inhibitor ($P < 0.05$), which suggested that it may be the P-gp substrate. **Conclusion** All the index components of TW solid dispersion are absorbed in the whole intestine and have saturation phenomenon, which suggested the absorption may be carrier-mediated transport mechanism. Acidic environment is beneficial to the absorption of all components. The absorption process of celastrol is affected by drug concentration and P-gp inhibitor, which indicated that it may be P-gp substrate. The preparation of solid dispersing can significantly enhance the absorption of various components of TW, suggesting that all the index components are BCS II drugs, and the bioavailability of the preparation may be improved.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; solid dispersion; intestinal absorption kinetics; single-pass intestinal perfusion; celastrol

收稿日期: 2018-06-23

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2017J05135); 福州总医院院立课题(2016L02)

作者简介: 吴珏(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型与制剂新技术。Tel: (0591)22859972 E-mail: jue459@126.com

*通信作者 宋洪涛(1968—), 男, 博士, 主任药师, 从事中药学、药剂学、临床药学研究。Tel: (0591)22859459 E-mail: sohoto@vip.163.com

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 为卫矛科雷公藤属植物, 具有祛风除湿、活血化瘀、清热解毒等功效及较强的抗炎和免疫抑制等药理活性。在临床上, 雷公藤主要用于治疗类风湿性关节炎、肾病综合征等自身免疫性疾病, 疗效显著^[1-6], 但由于雷公藤成分复杂、毒性较大、不良反应发生率高且较为严重, 极大程度地限制了其临床应用^[7-10]。此外, 雷公藤有效成分大多极难溶于水, 本课题组前期已将其制成固体分散体^[11], 可显著增加其体外溶出度。

吸收是药物产生药效及毒副作用的前提和关键, 而小肠是大多数药物吸收的主要部位^[12]。研究药物的肠道吸收情况对评价药物的生物利用度、改进药物的剂型、提高疗效具有重要意义。大鼠在体单向肠灌注模型能较好地模拟人体的体内环境, 相关性良好, 目前已在国内外广泛地应用于中药组分的肠吸收特性研究^[13-26]。本研究通过大鼠在体单向肠灌注法实验, 以二萜类成分雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯, 生物碱类成分雷公藤次碱及三萜类成分雷公藤红素为指标, 对雷公藤固体分散体的吸收特性进行研究, 并考察不同肠段、药物浓度、pH 环境及 P 糖蛋白 (P-gp) 对其吸收的影响, 以期雷公藤制剂设计提供生物药剂学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

对照品雷公藤甲素 (批号 111567-201404, 质量分数 99.8%)、雷公藤内酯酮 (批号 111972-201501, 质量分数 98.3%)、雷公藤红素 (批号 111946-201501, 质量分数 97.0%), 中国食品药品检定研究院; 雷酚内酯 (批号 CHB170704, 质量分数 98.9%, 成都克洛玛生物科技有限公司); 雷公藤次碱 (批号 16122331, 质量分数 98.0%, 上海同田生物科技有限公司); 雷公藤提取物 (自制, 雷公藤药材产自福建泰宁, 经福州总医院药学科陈磊副主任药师鉴定, 为卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的带皮干燥根); 水合氯醛溶液 (福州总医院药学科制剂室); 盐酸维拉帕米片 (广东华南药业集团有限公司); 乙腈、甲醇、甲酸 (上海科丰实业有限公司, 色谱纯); 二氯甲烷 (上海联试化工试剂有限公司, 分析纯); 95%乙醇 (福建省三林药业有限公司, 食用级); 硅胶 (青岛海洋化工有限公司, 100~200 目); 0.9%氯化钠注射液 (福州海王福药制药有限公司); 实验用水均为去离子水; PEG6000 (西陇化工股份有限公司); 泊

洛沙姆 188 (F68 德国巴斯夫股份公司)。

1.2 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (Agilent 科技有限公司); 电子天平 (奥豪斯仪器上海有限公司); AL204 万分之一天平 (梅特勒-托利多上海有限公司); KQ800KDE 型高功率数控超声波清洗器 (江苏昆山超声清洗公司); RE-2000 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); BT100-1J 型蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司); HC-3518 型高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); 电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); FD-2A 型真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司)。

1.3 实验动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 (300±20) g, 合格证号 SCXK (沪) 2018-0003, 由福州总医院比较医学科动物房提供, 实验前在实验环境中适应 1 周。

2 方法

2.1 雷公藤提取物的制备

将雷公藤药材有效部位经简单处理后粉碎得粗粉, 称取粗粉约 1 000 g, 加入 10 倍量 (10 000 mL) 95%乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h。合并提取液, 减压浓缩回收乙醇, 得粗浸膏。取粗浸膏约 20 g, 加入适量甲醇溶解, 按质量比 1:1 加入硅胶 (100~200 目) 拌样, 然后用 10 倍量硅胶 (100~200 目) 装柱, 用二氯甲烷-甲醇 100:1 展开剂洗脱 (10 倍柱床体积), 收集洗脱液, 减压浓缩回收有机试剂, 真空干燥, 即得雷公藤提取物, 得率 2.1%。

2.2 雷公藤固体分散体的制备

按质量比 2:1 精密称取 PEG6000 和 F68 作为联合载体, 于 80 °C 水浴加热熔融后, 精密称取自制雷公藤提取物缓慢加入, 药物与载体的质量比为 1:3, 真空干燥, 研磨过筛, 得雷公藤固体分散体。

2.3 雷公藤指标成分测定

2.3.1 色谱条件 Shiseido-CAPCELL PAK CR 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (含 0.05% 甲酸, A)-0.05% 甲酸水溶液 (B), 进行梯度洗脱: 0~30 min, 20%~40% A; 30~80 min, 40%~48% A; 80~100 min, 48%~50% A; 100~115 min, 50%~62% A; 115~135 min, 62%~90% A; 135~142 min, 90%~100% A; 检测波长为 218 nm, 柱温为 35 °C, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL。

2.3.2 溶液的配制

(1)K-R 缓冲液的配制: 分别精密称取 NaCl 7.8

g、KCl 0.35 g、CaCl₂ 0.37 g、NaHCO₃ 1.37 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、MgCl₂ 0.02 g、葡萄糖 1.4 g，置于 1 000 mL 量瓶中，加入去离子水超声溶解，再用去离子水稀释至刻度，摇匀，即得 K-R 缓冲液。

(2) 空白肠灌流液的配制：将 K-R 缓冲液置于 37 °C 水浴锅中孵育至恒温后，按“2.4”项下进行大鼠在体肠灌流实验，收集流出液，即得空白肠灌流液。

(3) 对照品溶液的配制：分别精密称定对照品雷公藤甲素 0.46 mg、雷公藤内酯酮 1.78 mg、雷酚内酯 0.62 mg、雷公藤次碱 9.13 mg、雷公藤红素 2.71 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入少量乙醇超声溶解，再加入 K-R 缓冲液稀释至刻度，摇匀，即得混合对照品溶液。

(4) 雷公藤提取物肠灌流液的配制：称取雷公藤提取物适量于 100 mL 量瓶中，加入 K-R 缓冲液（含 0.1% 聚山梨酯-20）超声溶解，再用 K-R 缓冲液（含 0.1% 聚山梨酯-20）稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度为 5 mg/mL 的雷公藤提取物肠灌流液。

(5) 固体分散体肠灌流液的配制：称取雷公藤固体分散体适量于 100 mL 量瓶中，加入 K-R 缓冲液超声溶解，加入 K-R 缓冲液稀释至刻度，摇匀，

制成含雷公藤提取物质量浓度为 5 mg/mL 的雷公藤固体分散体肠灌流液。

(6) 供试溶液的制备：收集大鼠在体肠灌流出液后，精密量取 2.5 mL 置于 5 mL 量瓶，用无水乙醇稀释至刻度，混匀，经 0.45 μm 滤膜滤过后，4 °C 冷藏保存备测。

2.3.3 方法学考察

(1) 专属性试验：取空白肠灌流液、对照品溶液、雷公藤提取物肠灌流液、固体分散体肠灌流液分别按“2.3.1”项下条件测定，记录色谱峰。

如图 1 所示，空白肠灌流液在各成分保留时间处均无吸收峰，表明空白肠灌流液对各成分的含量测定无干扰，提取物和固体分散体肠灌流液在该色谱条件下各指标成分可完全分离，该方法专属性良好。

(2) 线性关系考察：精密称定对照品雷公藤甲素 0.46 mg、雷公藤内酯酮 1.78 mg、雷酚内酯 0.62 mg、雷公藤次碱 9.13 mg、雷公藤红素 2.71 mg，置于 10 mL 量瓶，加入 K-R 缓冲液超声溶解后稀释至刻度，摇匀，得到雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤次碱、雷公藤红素质量浓度分别为 46.0、178、62.0、913、217 μg/mL 的混合对照品溶液，将混合对照品稀释成含雷公藤甲素质量浓度为

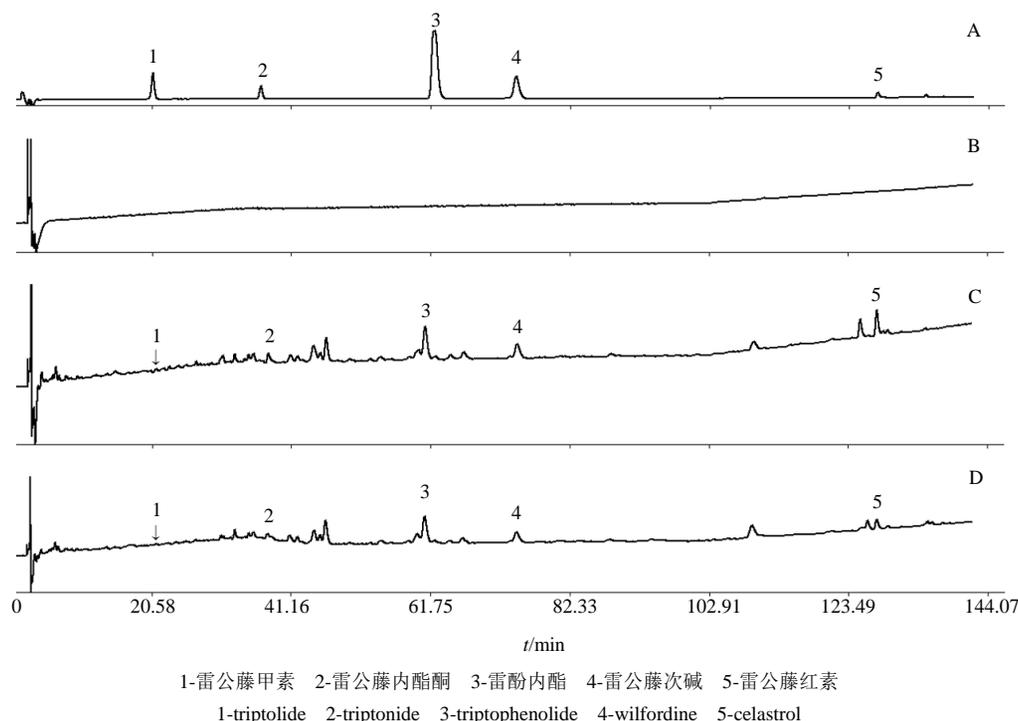


图 1 对照品溶液 (A)、空白肠灌流液 (B)、雷公藤提取物肠灌流液 (C) 和固体分散体肠灌流液 (D) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of reference substances (A), blank intestine perfusate (B), intestine perfusate of TW extract (C), and solid dispersion (D)

1.15、2.30、4.60、6.90、11.5、18.4、23.0 μg/mL 共 7 组系列溶液,按“2.3.1”项下条件测定,以各成分的峰面积对质量浓度进行线性回归,结果见表 1。

(3) 稳定性试验:将固体分散体肠灌流液进行大鼠在体肠吸收实验后,取流出液 3 份按“2.3.2(6)”项下方法处理后,按“2.3.1”项下方法测定(0 h);立即置于 4 °C 冷藏,24 h 后取出按上述方法测定各指标成分的峰面积,与 0 h 的峰面积比值作为剩余百分数,考察其稳定性。

结果显示,雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤次碱和雷公藤红素 24 h 剩余量分别为(98.30±0.23)%、(95.50±0.31)%、(98.90±0.79)%、(95.30%±0.66)%、(98.90±0.09)%,表明雷公藤

各指标成分在 24 h 稳定。

(4) 精密度的试验:分别精密量取混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,用空白肠灌流液稀释成高、中、低 3 个质量浓度的溶液,按“2.3.2(6)”项下方法处理后,按“2.3.1”项下方法进行测定,1 d 内平行测定 6 次,记录色谱峰并计算 RSD 值。结果显示高、中、低 3 个质量浓度各指标成分峰面积 RSD 值均小于 2%,表明该方法精密度的良好。

(5) 回收率的试验:分别配制高(40 mg/mL)、中(20 mg/mL)、低(10 mg/mL)质量浓度的固体分散体肠灌流液,按“2.3.2(6)”项下方法处理后,按“2.3.1”项下方法进行测定,计算回收率及 RSD 值。结果如表 2 所示,表明该方法回收率良好。

表 1 雷公藤提取物各指标成分的线性方程

Table 1 Linear equation of index components of TW extract

指标成分	线性方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
雷公藤甲素	Y=68.521 X-18.408	0.999 6	1.15~ 46.00
雷公藤内酯酮	Y=39.953 X-11.231	0.995 4	4.45~178.00
雷酚内酯	Y=63.379 X-100.050	0.998 3	1.55~ 62.00
雷公藤次碱	Y=15.341 X-525.740	0.998 2	22.83~913.00
雷公藤红素	Y=35.050 X-382.898	0.996 5	217.00~ 5.43

表 2 各指标成分回收率

Table 2 Recovery and precision of index components

指标成分	回收率/%		
	40 mg·mL ⁻¹	20 mg·mL ⁻¹	10 mg·mL ⁻¹
雷公藤甲素	104.21±1.33	104.81±1.51	104.32±1.59
雷公藤内酯酮	102.49±1.21	100.50±1.73	101.40±1.80
雷酚内酯	98.74±3.28	98.38±1.72	105.51±1.41
雷公藤次碱	96.10±2.31	98.97±2.16	102.60±2.98
雷公藤红素	104.40±3.40	102.31±2.77	104.24±3.58

2.4 大鼠在体单向肠灌流实验

大鼠在体肠吸收实验:实验前大鼠禁食 12 h,禁食期间可自由饮水。大鼠 ip 水合氯醛 350 mg/kg 麻醉后,固定,沿腹中线剪开小口,将大鼠肠道暴露,小肠两端插管并结扎。用预热至 37 °C 的生理盐水排净肠道内容物,换成空白 K-R 液平衡 15 min,再更换为含药肠灌流液将管道饱和 15 min,直至出液口溶液与进液口溶液中药物的质量浓度相等,消除实验过程中肠道对药物的吸附作用。降低灌流体积流量至 0.28 mL/min,每 15 分钟更换 1 次灌流液和收集瓶,实验持续 120 min,实验结束后将大鼠处死,剪下灌流肠段,在 37 °C 生理盐水浸润下剪

开肠段,测量其长度(L)和横截面半径(r)。将流出液按“2.3.2(6)”项下方法处理后,按“2.3.1”项下方法测定,记录各指标成分色谱峰的峰面积。

2.5 不同肠段对药物吸收的影响

各肠段区间为十二指肠段:自幽门下 1 cm 处下行 10 cm 止;空肠段:自幽门下 15 cm 处下行 10 cm;回肠段:自盲肠上行 20 cm 处下行 10 cm;结肠段:自盲肠后端始下行 10 cm 止。以固体分散体肠灌流液(含雷公藤提取物质量浓度 20 mg/mL)按“2.4”项下进行各肠段在体单向肠灌流实验,考察不同肠段对药物吸收的影响。

2.6 不同药物质量浓度对肠吸收的影响

称取雷公藤固体分散体适量,用 K-R 液配制成分别含雷公藤提取物质量浓度为 10、20、40 mg/mL 固体分散体肠灌流液(pH 7.0),按“2.4”项下进行在体单向肠灌流实验,考察药物质量浓度对吸收的影响。

2.7 不同 pH 值对肠吸收的影响

分别用稀 HCl 和稀 NaOH 溶液调节 K-R 缓冲液 pH 值为 5.4、6.8、7.4,配制不同 pH 值的固体分散体肠灌流液(含雷公藤提取物 20 mg/mL),按“2.4”

项下进行在体单向肠灌流实验考察 pH 值对药物吸收的影响。

2.8 P-gp 对雷公藤吸收的影响

配制含雷公藤提取物质量浓度为 20 mg/mL 的固体分散体肠灌流液（含盐酸维拉帕米 0.1 mmol/L），选取小肠段按“2.4”项下方法进行在体单向肠灌流实验，考察药物的吸收是否受到 P-gp 外排作用的影响。

2.9 酶降解和物理吸附

2.9.1 酶降解 按“2.3.2（2）”项下方法收集空白肠灌流液，平行配制 3 份固体分散体肠灌流液（含雷公藤提取物 20 mg/mL），密封后置于 37 °C 水浴锅中孵化，分别于 0、15 min 和 2 h 取样，按“2.3.2（6）”项下方法处理后，在“2.3.1”项下方法测定，记录各指标成分色谱峰峰面积，分别以 15 min 和 2 h 各指标成分的峰面积与 0 min 的峰面积的比值作为剩余百分数，考察酶降解的影响。

2.9.2 物理吸附 将禁食不禁水 12 h 的 SD 大鼠麻醉后沿腹中线剪开小口，剪取小肠段，剖开洗净，置于含雷公藤提取物质量浓度为 20 mg/mL 的固体分散体肠灌流液中，37 °C 孵育 2 h，分别在 0、15 min 和 2 h 时取样，按“2.3.2（6）”项下方法处理样品后，按“2.3.1”项下方法测定孵育前、后各指标成分峰面积，以孵育后各指标成分峰面积与孵育前峰面积的比值作为剩余百分数，考察物理吸附的影响。

2.10 数据处理

采用重量法对肠灌流液流入和流出的体积进行校正，并计算药物吸收速率常数 (K_a) 和表观渗透系数 (P_{app})。

$$K_a = (1 - C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in})Q/\pi r^2 L$$

$$P_{app} = [-Q \times \ln(C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in})]/2\pi r L$$

Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠段灌入的灌流液和收集液的体积 (mL)，假定灌流液和收集液的质量浓度为 1.0 g/mL)， Q 为灌流液积流量， C_{in} 和 C_{out} 分别为灌流液和收集液的药液质量浓度 (mg/L)

两两比较结果采用 IBM SPSS Statistics 21 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA) 或 2 个独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 雷公藤固体分散体中指标成分的大鼠肠吸收

图 2 结果表明，固体分散体中各指标成分的 K_a 较原料药均显著增加 ($P < 0.05$)，除雷公藤红素外 P_{app} 均未得到改善，可能由于固体分散体载体均为

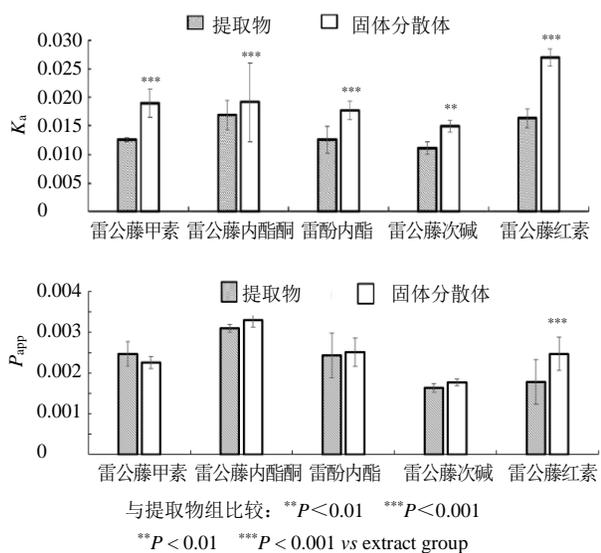


图 2 雷公藤提取物和固体分散体的 K_a 及 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig. 2 K_a and P_{app} of TW extract and TW solid dispersion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

水溶性材料，未能明显改善药物的渗透性。因此制成固体分散体能显著提高雷公藤各成分的吸收，提示各指标成分均为生物药剂学系统 II 类药物，制剂研发过程中增加药物溶解度或可提高制剂的生物利用度。

3.2 不同肠段对药物吸收的影响

雷公藤各指标成分在各肠段的吸收情况见图 3。结果显示，各指标成分在各肠段均有吸收且存在一定差异，雷公藤甲素 K_a 为十二指肠 > 结肠 > 空肠 > 回肠，其中十二指肠 K_a 与结肠、空肠、回肠均存在显著性差异 ($P < 0.05$)，提示雷公藤甲素的主要吸收部位为十二指肠；雷公藤内酯酮 K_a 为十二指肠 > 空肠 > 结肠 > 回肠，其中十二指肠与回肠、结肠存在显著性差异 ($P < 0.05$)，提示雷公藤内酯酮主要吸收部位为十二指肠；雷酚内酯 K_a 为空肠 > 结肠 > 十二指肠 > 回肠，其中空肠与十二指肠和结肠存在显著性差异 ($P < 0.05$)，空肠与回肠存在极显著性差异 ($P < 0.001$)，提示雷酚内酯的主要吸收部位为空肠；雷公藤次碱 K_a 为十二指肠 > 结肠 > 空肠 > 回肠，但各肠段间不存在显著性差异，无特殊吸收部位。雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯和雷公藤次碱 P_{app} 在各肠段均无显著差异；雷公藤红素 K_a 为十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠，其中十二指肠与回肠、结肠以及空肠与回肠、结肠间均存在极显著性差异 ($P < 0.001$)， P_{app} 在十二指肠、空肠较大且与回肠、结肠均存在显著性差异 ($P < 0.05$)，提示

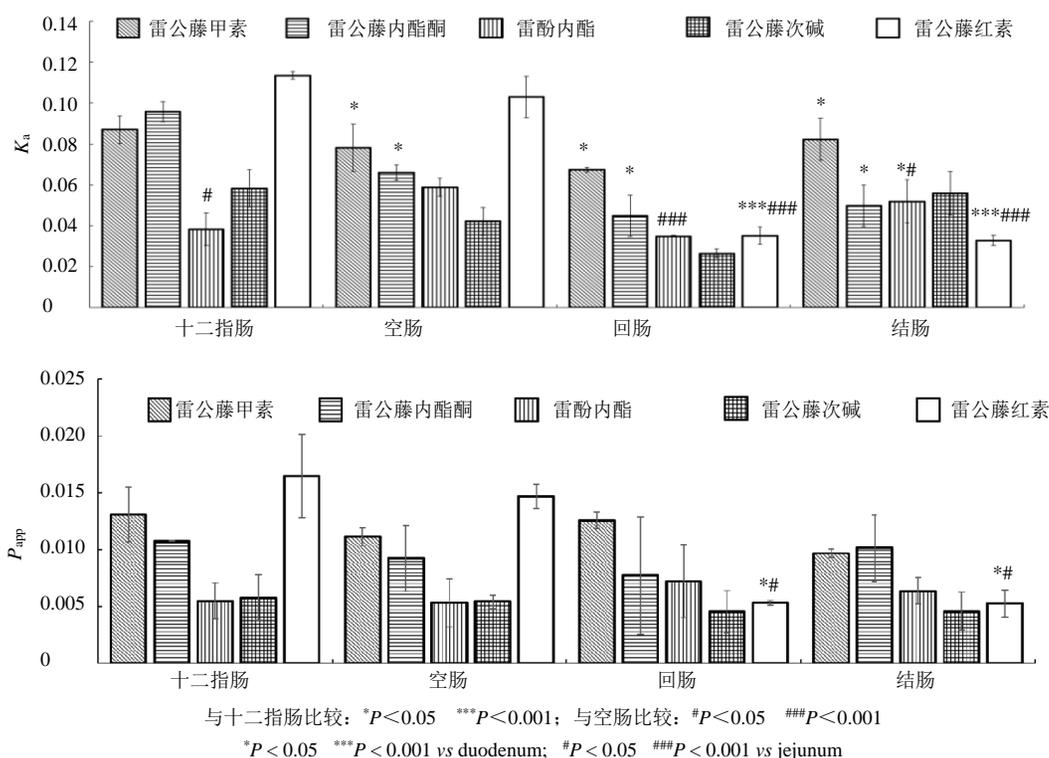


图 3 不同肠段对各指标成分 K_a 及 P_{app} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of different intestinal segments on K_a and P_{app} of index components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

雷公藤红素的主要吸收部位在十二指肠和空肠。

3.3 药物质量浓度对肠吸收的影响

图 4 结果表明, 各指标成分的吸收均具有浓度依赖性, 说明雷公藤各指标成分在小肠的吸收过程可能并非只有被动扩散, 还有载体媒介转运机制。

3.4 不同 pH 值对肠吸收的影响

结果如图 5 所示, 表明酸性环境下各指标成分的 K_a 均高于中性和弱碱性环境, 其中雷公藤红素为弱酸性成分, 在酸性条件下解离度小, 分子型药物比例较高, 更利于吸收。雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯和雷公藤次碱为中性或弱碱性, 在酸

性环境中虽然未解离型比例较低, 但由于未解离型药物快速透膜吸收入血, 解离性药物不断形成未解离型, 保持着解离-未解离的动态平衡, 药物也逐渐被吸收。

3.5 P-gp 对肠吸收的影响

加入维拉帕米后雷公藤各指标成分的肠吸收情况如图 6 所示, 结果显示, 加入维拉帕米 (P-gp 抑制剂) 后, 雷公藤红素吸收显著增加 ($P < 0.05$), 其余指标成分的吸收未见显著影响, 表明雷公藤红素可能为 P-gp 底物。有研究表明^[27], 雷公藤提取物中其他成分对单体肠吸收行为无显著影响, 故推断其余指标成分可能均不是 P-gp 的底物。

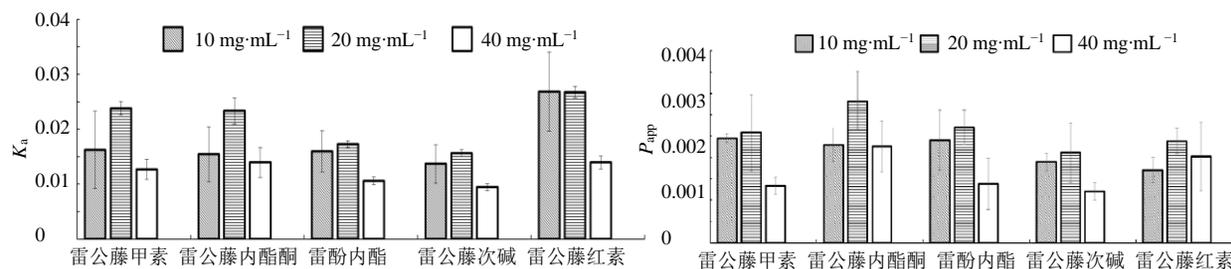


图 4 不同药物质量浓度对各指标成分 K_a 及 P_{app} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of drug concentration on K_a and P_{app} of index components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.6 酶降解和物理吸附

结果如图 7 所示, 在实验时间内各指标成分在大鼠肠道酶作用下的剩余百分数均大于 90%, 表明酶降解不是主要影响因素。雷酚内酯、雷公藤次碱

和雷公藤红素在前 15 min 受物理吸附影响较大, 剩余百分数小于 80%, 在 15 min 后趋于稳定, 在实验中可用含药灌流液饱和 15 min 后再开始收集流出液以校正误差。

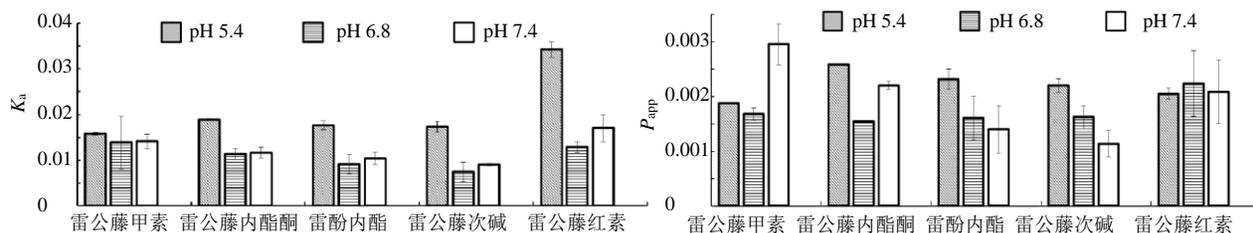
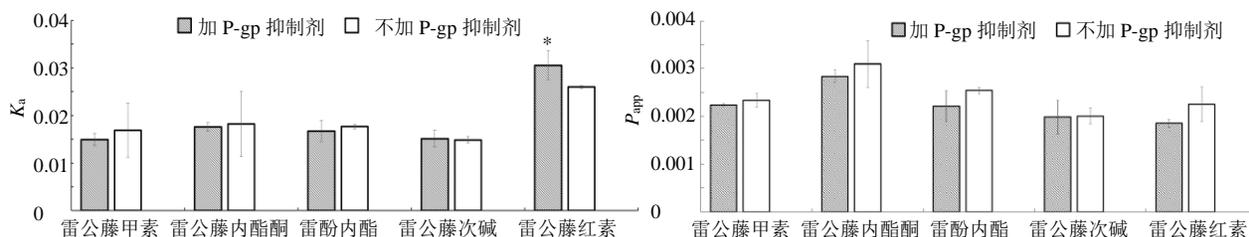


图 5 不同药物 pH 对各指标成分 K_a 及 P_{app} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of pH value on K_a and P_{app} of index components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与不加 P-gp 抑制剂组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs group without P-gp inhibitors

图 6 P-gp 对各指标成分 K_a 及 P_{app} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of P-gp K_a and P_{app} of of index components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

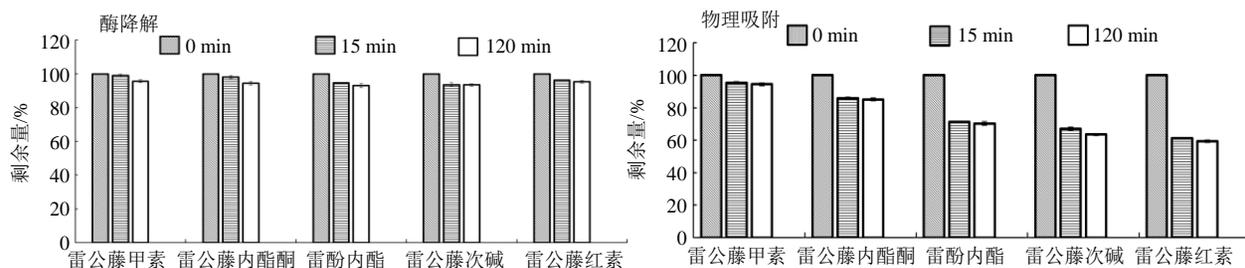


图 7 各指标成分酶降解及物理吸附情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Enzymatic degradation and physical adsorption of index components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

雷公藤主要成分多难溶于水, 在 K-R 缓冲液中无法形成溶液或混悬液, 因此需要加入微量表面活性剂增溶, 以制成溶液或混悬液进行大鼠单向肠灌流实验。预试验中分别在 K-R 缓冲液中加入 0.1% 的聚山梨酯-20、聚山梨酯-80、Span 60、Span 80、F68、Labrasol 和 Cermophor RH40 等表面活性剂以考察不同表面活性剂对雷公藤原料药增溶的效果, 其中加入 1% 聚山梨酯-20 后的 K-R 缓冲液可将雷公藤原料药溶解成均一溶液, 其余表面活性剂均无法形成均一溶液或混悬液, 故选择加入 0.1% 聚山梨酯-20

来增加原料药的溶解度。

研究药物肠吸收动力学的方法主要有体内法、在体法、离体法, 其中在体法保证了血液和淋巴液的提供。在体法又包括循环灌流法和单向灌流法, 循环法由于回流灌流液体积流量大, 可能对肠黏膜损伤较大, 而导致药物吸收增加, 使得测量值与真实值存在一定偏差, 而单向灌流法的实验条件更接近体内肠道环境, 与人体内环境有良好的相关性^[28-29], 故本研究采用单向灌流法考察雷公藤各指标成分的肠吸收特性。

在研究肠道吸收过程中, 肠道不仅吸收药物,

还吸收水分,使灌注液的体积减小,需要测定水分的变化来校正药物的质量浓度。目前校正水分最常用的方法有重量法和酚红法,酚红在肠道具有吸收,且其本身还可能干扰某些化合物的肠道转运或分析测定;而重量法更能直接真实地反映肠道吸收水分的实际情况,从而提高了测量值的准确性^[30]。故本研究采用重量法对吸收前后灌流体积的变化进行校正。

肠道 P-gp 等转运体在性别不同动物体内表达水平存在差异,其中雄性大鼠体内 P-gp 活性高于雌性^[21,31]。故本研究采取雄性大鼠作为研究对象,较好地反映药物吸收差异因素的结果。

雷公藤临床推荐用量为 1.0~1.5 mg/kg,根据人与实验动物间按体表面积折算的等效剂量,大鼠给药剂量为 6.25~9.38 mg/kg,在此给药剂量下各指标成分质量浓度低于检测限,更无法准确定量。预试验考察了给药剂量为 112 (1 mg/mL)、168 (1.5 mg/mL)、224 (2 mg/mL)、280 (2.5 mg/mL)、336 mg/kg (3 mg/mL) 等一系列浓度梯度样品溶液进行测定,当质量浓度最小为 2.5 mg/mL 时各指标成分含量均可准确测得,考虑到样品处理时用无水乙醇稀释了 2 倍,故以 560 mg/kg 作为给药剂量。有研究表明^[32],雷公藤提取物对小鼠的半数致死量 (LD₅₀) 为 16.31g/kg,故此给药剂量在安全范围内。

本实验结果表明,雷公藤固体分散体各指标成分在全肠段均有吸收,且具有饱和现象,可能为载体媒介转运机制;酸性环境有利于各成分的吸收,雷公藤红素吸收过程受药物质量浓度和 P-gp 的外排影响,可能为 P-gp 底物;制成固体分散体能显著提高雷公藤各成分的吸收,提示各指标成分均为生物药剂学系统 II 类药物,制剂研发过程中增加药物溶解度或可提高制剂的生物利用度。

参考文献

[1] 胡攀勇,李振麟,濮社班.雷公藤研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(2): 1-3.
 [2] 吴霞,林兵,王忠震,等.雷公藤的免疫抑制活性及毒性的谱效关系研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 35(7): 547-552.
 [3] 胡德俊,彭泽燕,何东初.雷公藤的药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2018, 37(5): 586-592.
 [4] 刘素晓,闫凤娜,王幼平.雷公藤多苷的抗炎作用与临床应用进展 [J]. 中医临床研究, 2017(32): 131-134.
 [5] Xu X, Li Q J, Xia S, et al. Tripterygium glycosides for treating late-onset rheumatoid arthritis: A systematic

review and Meta-analysis [J]. *Altern Ther Health Med*, 2016, 22(6): 32-39.
 [6] Zhu B, Wang Y, Jardine M, et al. Tripterygium preparations for the treatment of CKD: A systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2013, 62(3): 515-530.
 [7] 孙萍萍,张天娇,许可嘉,等.雷公藤及其制剂临床不良反应分布特点随机对照试验的系统评价 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(9): 1899-1905.
 [8] 张玉萌,朱丽萍.雷公藤制剂致肝毒性、生殖毒性和血液系统毒性不良反应回顾性分析 [J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(3): 173-176.
 [9] 刘雪梅,刘志宏,张晶,等.雷公藤临床应用及不良反应的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2015, 33(2): 110-113.
 [10] 罗岚,江振洲,张陆勇.雷公藤多苷肝毒性发生机制及减毒相关研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1504-1509
 [11] 霍涛涛,张美敬,陶春,等.基于多组分评价的雷公藤提取物固体分散体的制备及体外表征 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 128-134.
 [12] 刘建平.生物药剂学与药物动力学 [M]. 第5版.北京:人民卫生出版社, 2016.
 [13] Sun Y, He X, Yang X, et al. Absorption characteristics of the total alkaloids from *Mahonia bealei* in an in situ single-pass intestinal perfusion assay [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(7): 554-560.
 [14] Li Y, Zhang R, Peng C. Assessment and modulation of forsythiaside absorption with MDCKII cells and validation with in situ intestinal experiment [J]. *Eur J Drug Metab Ph*, 2012, 37(3): 179-186.
 [15] Xie Y, Zeng X, Li G, et al. Assessment of intestinal absorption of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. in rat using in situ absorption models [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36(7): 787-794.
 [16] Iwanaga K, Arimune K, Miyazaki M, et al. Effects of furanocoumarins in Kampo extract-based medicines on rat intestinal absorption of CYP3A and P-glycoprotein substrate drugs *in vivo* [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(6): 1055-1064.
 [17] Fong Y K, Li C R, Wo S K, et al. *In vitro* and *in situ* evaluation of herb-drug interactions during intestinal metabolism and absorption of baicalein [J]. *J Ethnopharm*, 2012, 141(2): 742-753.
 [18] Zhou Y J, Qin D P, Wang Y D, et al. Amelioration of tripterygium wilfordii polycoride on TNBS/ethanol-induced ulcerative colitis via inhibiting lipid peroxidation and its downstream inflammatory mediators [J]. *Chin Herb*

- Med*, 2017, 9(4): 344-352.
- [19] Zhou J, Ma Y H, Zhou Z, *et al.* Intestinal absorption and metabolism of epimedium flavonoids in osteoporosis rats [J]. *Drug Metabol Dispos*, 2015, 43(10): 1590-1600.
- [20] Zhou W, Tan X, Shan J, *et al.* Study on the main components interaction from *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae* and their dissolution *in vitro* and intestinal absorption in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109619.
- [21] 关志宇, 张丽华, 陈丽华, 等. 贝母提取物中贝母甲素和贝母乙素的大鼠肠吸收特性 [J]. *药学学报*, 2013, 48(12): 1836-1843.
- [22] 罗见春, 何丹, 杨梅, 等. 去甲氧基姜黄素羟丙基- β -环糊精在体肠吸收特征 [J]. *第二军医大学学报*, 2016(2): 247-250.
- [23] 顾念, 沈昕怡, 秦超, 等. 他克莫司固体分散体的制备及肠吸收研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(6): 694-701.
- [24] 晏声蕾, 胡江波, 王薛, 等. 吴茱萸碱油包水型复合纳米乳的药代动力学和在体肠吸收 [J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(2): 249-252.
- [25] 张艳, 王平, 王进荣, 等. 在体单向肠灌流模型研究大黄素的大鼠肠吸收特性 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(3): 286-290.
- [26] 张燕, 朱华旭, 郭立玮. 在体单向肠灌流模型研究小檗碱及其在复方配伍环境中的大鼠肠吸收特性 [J]. *药学学报*, 2012, 47(2): 233-238.
- [27] 薛璟. 雷公藤主成分肠吸收动力学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [28] Stappaerts J, Brouwers J, Annaert P, *et al.* *In situ* perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: Challenges and opportunities [J]. *Inter J Pharm*, 2015, 478(2): 665-681.
- [29] Li H, Dong L, Liu Y, *et al.* Comparison of two approaches of intestinal absorption by puerarin [J]. *J Pharmacol Toxicol*, 2014, 70(1): 6-11.
- [30] 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.
- [31] 张慧敏. 贝母甲素性别差异药动学研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2013.
- [32] 雷晴. 昆明山海棠与雷公藤急性毒性及对DHT反应影响的对比研究 [D]. 昆明: 昆明医学院, 2006.