

- [2] Chen B Y, Li H, Xiong A J. The effects of *Panax notoginseng* saponins on the damage of hippocampus CA1 following cerebral ischemia-reperfusion in rat [J]. *J Hunan Coll Tradit Chin Med* (湖南中医学院学报), 2004, 24(4): 4-6.
- [3] Liu J H, Yi F Y, Wang T, et al. The protective effects of *Panax notoginseng* saponins on the damage of cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Chin Clin Neurosci* (中国临床神经科学), 2002, 10(1): 90.
- [4] Manns J R, Hopkins R O, Squire L R. Semantic memory and the human hippocampus [J]. *Neuron*, 2003, 38(1): 127-133.
- [5] Parton A, Coulthard E, Husain M. Neuropharmacological modulation of cognitive deficits after brain damage [J]. *Curr Opin Neurol*, 2005, 18(6): 675-680.
- [6] Martone M E, Hu B R, Ellisman M H. Alterations of hippocampal postsynaptic densities following transient ischemia [J]. *Hippocampus*, 2000, 10(5): 610-616.
- [7] Manabe T, Wyllie D J, Perkel D J, et al. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus [J]. *J Neurophysiol*, 1993, 70(4): 1451-1459.
- [8] Slemmer J E, De Zeeuw C I, Weber J T. Don't get too excited: mechanisms of glutamate-mediated Purkinje cell death [J]. *Prog Brain Res*, 2005, 148(1): 367-390.
- [9] Meldrum B S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology [J]. *J Nutr*, 2000, 130(4S Suppl): 1007S-1015S.
- [10] Yue W D, Zhang Y H, Li Y R, et al. Effects and mechanisms of morphine on synaptic transmission of hippocampal neurons of rat [J]. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 2003, 19(2): 150-153.
- [11] Yano S, Morioka M, Kuratsu J, et al. Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca^{2+} for drug development: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in ischemic neuronal death [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 97(3): 351-354.
- [12] Zhou W F, Ruau D Y, Xu Y Z, et al. The effect of chronic lead exposure on long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus *in vitro* [J]. *Brain Res*, 1999, 818(1): 153-159.
- [13] Debanne D, Guerineau N C, Gahwiler B H, et al. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release [J]. *J Physiol*, 1996, 491(Pt1): 163-176.

灯盏花素大鼠在体肠吸收动力学研究

许英爱, 范国荣*, 高 申, 洪战英

(第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要:目的 研究灯盏花素在大鼠肠道的吸收动力学。方法 进行大鼠在体肠循环灌流肠吸收实验, HPLC 法测定灯盏花乙素, 研究灯盏花素在小肠和结肠的吸收情况, 并分别考察不同质量浓度和不同 pH 对小肠吸收的影响。结果 胆管结扎与胆管不结扎的实验组之间, 吸收速率常数 (k_a) 和吸收百分率均有显著性差异, 在小肠和结肠的 k_a 分别为 (0.1071 ± 0.0130) 和 $(0.0707 \pm 0.0089) h^{-1}$; 灯盏花素在不同质量浓度下, 未发现饱和现象, 其 k_a 几乎保持不变, 在 pH 6.0~7.4, 灯盏花素的吸收不受 pH 的影响。结论 灯盏花素在小肠的吸收多于在结肠的吸收, 其吸收机制为被动扩散, 吸收过程为一级动力学过程, 提示灯盏花素可以被制成口服缓释剂型。

关键词: 灯盏花素; 在体; 肠吸收

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)07-1036-04

Absorption kinetics of breviscapine in intestine of rats *in situ*

XU Ying-ai, FAN Guo-rong, GAO Shen, HONG Zhan-ying

(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the intestinal absorption kinetics of breviscapine in rats. **Methods** The intestinal absorption in small intestine and colon of rats *in situ* was investigated using circular perfusion and HPLC methods. The *in situ* absorption of scutellarin in the small intestine was studied and the effects on the intestinal absorption were observed at the various concentrations and different pH values using the same methods. **Results** The results showed that there were significant differences in both absorptive percentage and absorption rate constant (k_a) in the small intestine between the experimental groups of rats with and without bile duct being ligated. The absorption rate constants in small intestine

收稿日期: 2006-11-14

基金项目: 上海市药物(中药)代谢研究技术平台建设 (03JC14005)

作者简介: 许英爱 (1974—), 女, 在读博士研究生。

* 通讯作者 范国荣 Tel: (021) 25070388 E-mail: guofan@yahoo.com.cn

and colon were (0.1071 ± 0.0130) and $(0.0707 \pm 0.0089) \text{ h}^{-1}$, respectively. No saturation phenomenon occurred and k_a was almost kept unchanged at different concentrations of breviscapine. The absorption of breviscapine was not influenced by pH values ranging from 6.0 to 7.4. **Conclusion** The results indicates that breviscapine is absorbed more in small intestine than in colon. The absorption of breviscapine complied with the passive diffusion mechanism and first order kinetics. In conclusion, these results suggest that breviscapine could be prepared in oral sustained-release dosage form.

Key words: breviscapine; *in situ*; intestinal absorption

灯盏花素是灯盏花甲素和灯盏花乙素(4',5,6-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸苷,又名野黄芩苷,scutellarin)的混合物,其主要成分为灯盏乙素^[1],约占95%,其口服制剂的生物利用度低^[2],并且在体内消除迅速^[3,4]。20世纪70年代经临床验证对高血压、脑溢血、脑血栓形成、脑栓塞多发性神经炎、慢性蛛网膜炎及其后遗症具有较好疗效,并对风湿病、冠心病也有一定疗效^[5]。因此引起人们对该成分研究的广泛兴趣。为了探明其肠吸收情况,本实验采用大鼠在体肠循环灌流的方法,在结扎胆管与不结扎胆管、不同pH条件和不同质量浓度条件下对灯盏花素的小肠吸收动力学和结扎胆管的条件下结肠吸收动力学进行研究,为灯盏花素新剂型的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物:SD大鼠,雌雄各半,体重220~250g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

1.2 仪器与试剂:HL-2型恒流泵(上海沪西分析仪器有限公司);日本岛津LC-10ATVP高效液相色谱仪;Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm,美国安捷伦公司);0.45 μm微孔滤膜(上海安谱科学仪器有限公司)。灯盏花素原料药(含灯盏乙素96.28%,云南玉溪万方天然药物有限公司);灯盏花乙素(野黄芩苷,质量分数>98%,中国药品生物制品检定所);乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司);含无水Na₂SO₃的Lock's缓冲液,pH 6.0、6.8、7.4(每1 000 mL内含无水Na₂SO₃ 2 g,用1.0 mol/L HCl调pH);甲醇、醋酸(色谱级,美国),其他试剂均为分析纯。

1.3 供试药液的配制:精密称取灯盏花素10 mg,用100 mL含无水Na₂SO₃的Lock's缓冲液(pH 6.8)溶解、定容,即得质量浓度为100 μg/mL的供试液。

1.4 大鼠在体灌流肠吸收实验:选实验前禁食16~18 h(自由饮水)的大鼠,术前1 h ip 20%乌拉坦0.6 mL/100 g麻醉后固定在手术台板上,体温保持在37℃。沿腹中线剪开腹部,开口约3 cm,

结扎胆管组结扎胆管。小肠段是自幽门1 cm处开始量取约30 cm的肠段,结肠段是自盲肠后段开始。在所考察肠段的两端各插入直径约0.5 cm的塑料管插管,扎紧,用40 mL、37℃生理盐水冲洗净肠内容物,用空气将生理盐水排净。取40 mL保持在37℃的供试药液,以4 mL/min快速循环10 min,取样1 mL,补加1 mL含无水Na₂SO₃的Lock's缓冲液,此时记时为0 min,将流速调至2 mL/min,分别于回流30、60、90、120、150、180 min取样1 mL,同时补加等体积的含无水Na₂SO₃的Lock's缓冲液。所取回流液经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,进行测定。实验结束后,在一玻璃板上滴加37℃空白回流液,将各肠段沿插管两端剪下,轻放于液滴中,测量肠段长度,并测量剩余回流液的体积。

1.5 回流液体积的计算:用pH 6.8含Na₂SO₃的Lock's缓冲液循环,先使大鼠小肠充满缓冲液,记下最初循环液总体积V₀,以后每隔30 min记录循环液体积V。循环液体积减少的量(V-V₀)近似等于水分吸收的量。

1.6 不同pH条件下灯盏花素的肠吸收:分别选用pH值为6.0、6.8、7.4的100 μg/mL的供试药液40 mL同法循环3 h,将大鼠胆管结扎,其他步骤同1.4项。

1.7 不同质量浓度条件下灯盏花素的肠吸收:分别用质量浓度为50、100、150 μg/mL的供试药液40 mL(pH 6.8)同法循环3 h,将大鼠胆管结扎,其他步骤同1.4项。

1.8 回流液中灯盏花乙素的HPLC测定

1.8.1 色谱条件:色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水-冰醋酸(35:61:4);检测波长335 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;灵敏度0.05 AUFS;进样量20 μL。

1.8.2 灯盏花乙素标准曲线的制备:配制质量浓度为1 mg/mL灯盏花乙素溶液,精密吸取适量配成质量浓度为5、10、20、50、100、200、300 μg/mL的供

试品溶液,分别测定峰面积。以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,得线性方程: $A=18\,957.472\,8\,C-68\,692.581\,2$, $r=0.999\,8$ 。

1.8.3 空白肠循环液对测定方法的影响:用 pH 6.8 含无水 Na_2SO_3 的 Lock's 缓冲液 100 mL 循环 3 h,得空白肠循环液,用 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,按 HPLC 法测定,考察空白肠循环液对测定方法是否有干扰。结果表明,空白肠循环液对测定方法无干扰。

1.8.4 空白肠循环液对灯盏花素的化学降解:用空白肠循环液配制灯盏花素药液各 3 份,于 $(37\pm 0.5)\,^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h,测定孵育前后的灯盏花乙素的质量浓度,计算得到 3 份灯盏花素药液孵育后灯盏花乙素质量浓度的剩余百分率分别为 99.2%、99.6%、98.8%,平均剩余百分率为 99.23%,可认为灯盏花素在空白肠循环液中基本无化学降解。

1.8.5 回收率的测定:用空白肠循环液配制 $1\,\text{mg/mL}$ 的灯盏花乙素溶液,精密吸取适量配成质量浓度为 $5, 50, 300\,\mu\text{g/mL}$ 的溶液,分别测定峰面积,求得回收率。灯盏花乙素低、中、高 3 个质量浓度 ($5, 50, 300\,\mu\text{g/mL}$) 的平均回收率分别为 100.5%、99.6%、100.2%,说明该方法准确可靠。

1.8.6 方法精密度的测定:按 1.8.5 项的方法,测定日内和日间精密度。测得灯盏花乙素低、中、高 3 个质量浓度 ($5, 50, 300\,\mu\text{g/mL}$) 的日内精密度 RSD 分别为 0.5%、0.7%、1.1% ($n=5$),日间精密度 RSD 分别为 0.7%、1.0%、0.4% ($n=5$),表明该方法的精密度较好。

2 结果

2.1 循环液中水分吸收情况考察:以循环液中水分的累积吸收量 ($V-V_0$) 对灌流时间 (t) 进行线性回归,得到方程为 $(V-V_0)=1.96\,t-0.11$, $r=0.999\,6$,即水分的累积吸收量与时间呈近似正比关系。可以认为单位时间小肠对水分的吸收量近似保持恒定,为灯盏花素吸收动力学研究提供了依据。

2.2 在体小肠吸收:大鼠在体小肠循环灌流 3 h 后,以剩余药量的对数值对取样时间做图,求得吸收速率常数 (k_a) 和 3 h 药物吸收率。表 1 为胆管不结扎组和胆管结扎组的实验结果。灯盏花素在大鼠小肠吸收较差,3 h 内平均吸收率为 16%~27%。方差分析结果表明:胆管结扎与否对灯盏花素的小肠吸收有显著影响 ($P<0.01$),因此,在研究不同质量浓度和不同 pH 条件下灯盏花素的小肠吸收时,将大鼠的胆管结扎。

2.3 不同质量浓度条件下灯盏花素的小肠吸收:实验数据按 2.2 项的方法处理,求出不同质量浓度下循环后的药物吸收量和 k_a ,结果见表 2。不同质量浓度下循环后,药物吸收量随质量浓度的增加而增加,而 k_a 基本不变,提示其吸收是被动扩散的结果。

2.4 不同 pH 条件下灯盏花素的小肠吸收:实验数据按 2.2 项方法处理,求出不同 pH 条件下循环后的药物吸收量和 k_a ,结果见表 3。灯盏花素在 pH 值为 6.0、6.8、7.4 的吸收量和 k_a 均无明显差异,说明在 pH 6.0~7.4 灯盏花素的吸收不受 pH 影响。

表 1 胆管不结扎组和胆管结扎组灯盏花素大鼠在体小肠的 k_a 和灯盏花素吸收百分率 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 1 k_a and absorption percentages of breviscapine *in situ* in small intestine of rats without and with bile duct being ligated ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组 别	k_a/h^{-1}	吸收率/%
胆管不结扎	$0.076\,9\pm 0.015\,5$	20.06 ± 2.87
胆管结扎	$0.101\,6\pm 0.006\,6$	25.75 ± 1.10

表 2 不同质量浓度条件下灯盏花素的大鼠在体小肠吸收量和 k_a ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 2 Uptaking amount and k_a of breviscapine *in situ* in small intestine of rats at different concentrations ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	吸收量/ μg	k_a/h^{-1}
50	511.5 ± 42.6	$0.107\,8\pm 0.015\,1$
100	849.8 ± 141.2	$0.101\,6\pm 0.006\,6$
150	$1\,157.9\pm 53.0$	$0.103\,0\pm 0.009\,3$

表 3 不同 pH 条件下灯盏花素的大鼠在体小肠吸收量和 k_a ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 Uptaking amount and k_a of breviscapine *in situ* in small intestine of rats at different pH values ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

pH	吸收量/ μg	k_a/h^{-1}
6.0	908.4 ± 63.9	$0.092\,8\pm 0.007\,3$
6.8	849.8 ± 141.2	$0.101\,6\pm 0.006\,6$
7.4	872.9 ± 76.3	$0.091\,1\pm 0.008\,2$

2.5 灯盏花素在大鼠小肠与结肠的吸收:大鼠在小肠与结肠的 k_a 分别为 $(0.107\,1\pm 0.013\,0)$ 、 $(0.070\,7\pm 0.008\,9)\,\text{h}^{-1}$ ($n=5$),说明灯盏花素可在全肠道被吸收,在小肠和结肠的吸收有显著的差别,在结肠吸收速率比小肠小得多。

3 讨论

研究药物小肠吸收的实验方法主要有体内法、在体法和离体法。体内法能够真实反映药物体内的总体吸收情况。但口服药物在血液中出现速率,除了与小肠对其吸收有关外,还与胃肠道的排空、运动状态以及药物在体内的分布、代谢、排泄、药物与靶

细胞结合的程度及数量等因素有关。 k_a 值实际上反映了以上各种因素的综合作用,不能完全代表药物在小肠内的吸收速率。在体法实验中不切断血管与神经,且能避免胃内容物排出及消化管固有运动的生理影响,因而能够真实地反映药物的吸收情况。离体法使小肠完全离体,不受循环系统和消化系统的影响,此法适用于研究药物的吸收机制,考察影响吸收的因素及进行处方筛选。但由于实验中切断了小肠的血管和神经,循环液的流速较大,故这种实验是非生理性的,与实际的吸收有区别。笔者应用大鼠在体肠吸收实验,可以给样本应用体内法不能承受的剂量,容易通过控制或改变实验条件来观察受试药物在肠中的整个消除过程和影响因素。

以小肠内剩余药量的对数($\ln X$)对取样时间(t)做图,可得一条直线,从直线斜率可求得 k_a 。^[6]本实验中, $\ln X$ 对 t 进行线性回归,相关系数均 ≥ 0.9 ,所以灯盏花素的大鼠肠吸收属于一级动力学过程,不存在饱和现象,吸收机制为被动扩散。

药物浓度的变化对水在黏膜吸收的速率有一定影响,因而需采用同浓度的药液平衡30 min,使肠道对水分的吸收达到稳定,此时药物吸收速率也趋于稳定,而更符合Fick's方程。大鼠在体吸收实验应能代表药物在正常剂量下的吸收。成年人正常服用灯盏花素的剂量为120 mg/d,根据人与大鼠之间的体表面积换算法,得到大鼠正常服用剂量为1.08 mg/100 g^[7]。本实验灯盏花素质量浓度确定为50~150 $\mu\text{g/mL}$,即40 mL循环液含药物2~6 mg,基本可以代表药物在正常剂量下的吸收情况。

本实验结果表明灯盏花素在肠内 k_a 较小,吸收较慢(4 h吸收率仅为20%左右)。原因可能是其水溶性较小,且脂溶性亦较小,故不易透过生物膜所致。若想制成理想的新型口服给药系统,还需通过制剂手段提高其在胃肠道的吸收率。通过了解灯盏花素在胃肠道的吸收转运情况,可以减少剂型设计的盲目性,为剂型开发提供科学依据,是制剂处方前工作的必要环节。由实验结果可知,灯盏花素在结肠吸收量和吸收速率比小肠小得多,两者间有非常显著性差异,但由于药物在结肠停留时间比在小肠停留时间长得多,且结肠部位各种酶少,所以提示可通过加入促进剂的方法使结肠吸收增加,对于促进剂能否增加结肠吸收还有待进一步研究。

References:

- [1] Zhang R W. Isolation and identifications of flavonoids in Dengzhanhua [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1988, 19(5): 7-9.
- [2] Ge Q H, Zhou Z, Zhi X J, et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of breviscapine in Beagle dogs [J]. *J Chin Pharm* (中国药学杂志), 2003, 34: 618-620.
- [3] Li S H, Jiang X H, Lan K, et al. Pharmacokinetics of scutellarin in dogs [J]. *J Chin Pharm* (中国药学杂志), 2003, 12: 127-130.
- [4] Liu Y M, Lin A H, Chen H, et al. Study on pharmacokinetics of scutellarin in rabbits [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38: 775-778.
- [5] Cui J M, Wu S. The advance on the research of breviscapine [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(3): 255-258.
- [6] Lu B. *Pharmaceutical Experiments* (药剂学实验) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [7] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment of Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.

淫羊藿总黄酮对动物实验性心肌缺血及血液流变学的影响

王秋娟¹, 潘志伟¹, 岳攀¹, 孔令义²

(1. 中国药科大学 生理学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 210038)

摘要:目的 观察淫羊藿总黄酮(TFHE)对动物实验性心肌缺血及血液流变学的影响。方法 以垂体后叶素制备大鼠急性心肌缺血模型和用高分子右旋糖酐制备大鼠急性血瘀模型,观察TFHE对急性心肌缺血模型大鼠心电图J点及急性血瘀模型大鼠血液流变学等指标的影响;观察TFHE对小鼠凝血时间的影响。结果 TFHE高、中、低剂量(24、12、6 mg/kg)组均能明显对抗急性心肌缺血大鼠心电图J点的偏移,能有效预防急性血瘀模型大鼠的全血黏度(高、中、低切变率)、红细胞压积以及纤维蛋白原量的升高;TFHE高、低剂量(34、17 mg/kg)能明显延长小鼠凝血时间。结论 TFHE对缺血心肌有一定的保护作用,可能与其改善血液流变学、降低血液黏度、防止血液凝固、改善冠脉循环有关。

收稿日期:2006-09-14

作者简介:王秋娟(1943—),女,江苏苏州人,教授,博士生导师,长期从事心血管药理的研究,在该领域已发表论文80余篇,获新药证书8份及发明专利证书5份。Tel: (025) 83271341 E-mail: qjwangnj@sina.com.cn