

豆腐果苷在大鼠小肠吸收动力学研究

陈卓¹, 蒋学华¹, 任静¹, 刘大明¹, 李夏²

(1. 四川大学华西药学院 靶向药物教育部重点实验室, 四川 成都 610041; 2. 成都医学院, 四川 成都 610083)

摘要:目的 研究豆腐果苷小肠吸收动力学及吸收促进剂对吸收的影响。方法 以紫外分光光度法、高效液相色谱法分别测定酚红和豆腐果苷质量浓度, 采用大鼠在体肠灌注实验研究吸收过程。结果 4.464、13.393、40.179 $\mu\text{g/mL}$ 不同质量浓度豆腐果苷小肠吸收速率常数 (k_a) 分别为 0.059 7、0.057 7、0.058 3 h^{-1} ; 加入促进剂 0.5% 牛胆盐、1.0% 牛胆盐、十二烷基硫酸钠、卡波姆、冰片时, 豆腐果苷小肠 (k_a) 分别为 0.113、0.163、0.060 2、0.124、0.072 5 h^{-1} 。结论 不同药物质量浓度对豆腐果苷大鼠小肠吸收无显著影响, 药物吸收属于一级动力学过程, 吸收机制为被动扩散; 豆腐果苷在大鼠肠道吸收较差, 吸收促进剂促吸收能力为: 1.0% 牛胆盐 > 卡波姆 > 0.5% 的牛胆盐 > 冰片 > 十二烷基硫酸钠。

关键词:豆腐果苷; 肠吸收; 吸收促进剂

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1851-03

豆腐果苷是从山龙眼科植物萝卜树 *Heliciopsis nilagirica* Beed. 果实中提取的单体成分^[1], 药理实验证实, 其具有较强的止痛、镇静与安眠作用。与苯妥英钠及苯巴比妥合用, 能协同对抗电休克的发生。在药物分类中常将其规划为解热止痛药或镇静药, 其突出的优点是无成瘾性。临床上常用于治疗神经衰弱、神经衰弱综合症、血管性头痛、三叉神经痛^[2~4]。特别是对神经衰弱引起的头痛、头昏、睡眠障碍等显效快, 副作用小, 安全性高。笔者前期实验发现国内上市的豆腐果苷剂型口服生物利用度极低, 其原因尚无报道。仅一篇文献报道豆腐果苷在小肠各段均有少量吸收, 但未提供吸收动力学参数^[5]。本实验采用大鼠在体肠灌注的方法, 使用 3 个剂量对该药在胃肠道的吸收特征进行研究, 并考察吸收促进剂不同种类、不同质量浓度对肠吸收的影响, 为豆腐果苷口服制剂的设计与开发奠定生物药剂学基础, 为该药的临床应用提供信息。

1 材料

1.1 仪器: Lab Alliance 高效液相色谱仪、紫外检测器、泵及柱温箱 (美国 SSI); AnaStar 色谱工作站 (日本岛津); TU-1800 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); HL-2 恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂); W201B 恒温水浴锅 (上海申胜生物技术有限公司); CP225D 型天平 (德国 Sartorius)。

1.2 药品与试剂: 豆腐果苷对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 批号 100385-200401); 豆腐果苷

提取物 (云南医药股份有限公司, 质量分数 99.0%); 卡波姆 934P, 成都英格尔生物工程有限公司; 冰片 (湖南株洲林化工厂); 十二烷基硫酸钠 (天津市化学试剂六厂三分厂); 牛胆盐 (北京奥博星生物技术责任有限公司); 酚红 (山东化学试剂研究所); 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂和试药均为分析纯。

1.3 动物: Wistar 大鼠, 体质量 (200 \pm 20) g, 由四川大学实验动物中心提供, 合格证号: 川实动管质第 10 号), 并经四川大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法

2.1 肠循环液中酚红质量浓度测定

2.1.1 标准曲线的绘制: 精密量取酚红贮备液适量, 用 Krebs-Ringer's 试液配制含酚红 10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准液, 分别取 0.5 mL 加入 0.2 mol/L NaOH 溶液 5 mL, 摇匀, 在 558 nm 处测定吸光度 (A) 值。以酚红质量浓度 (C) 对 A 进行线性回归, 得标准曲线方程: $A=0.0079+0.016C$, $r=0.9999$ 。

2.1.2 测定: 在设定的时间点取样液 0.5 mL, 置洁净试管中, 加入 0.2 mol/L NaOH 溶液 5 mL, 摇匀, 取续滤液于 558 nm 处测定 A 值, 将 A 值代入标准曲线方程, 计算酚红质量浓度。

2.2 肠循环液中药物质量浓度的测定

2.2.1 色谱条件: Diamonsil C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), Diamosil 保护柱; 流动相: 甲醇-醋

收稿日期: 2008-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070935; 30271614)

作者简介: 陈卓 (1975-), 男, 四川成都人, 博士研究生, 从事药物制剂、生物药剂学与药理学研究。

* 通讯作者 蒋学华 Tel: (028)85501370 (028)85503024 E-mail: jxh1013@vip.163.com

酸缓冲盐溶液 (pH 3.6) (18 : 82); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 进样量: 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

2.2.2 标准曲线的绘制: 精密量取豆腐果苷贮备液适量, 用含酚红的 Krebs-Ringer's 试液稀释成含豆腐果苷 0.518 5、1.037、2.074、4.148、10.37、20.74、41.48、51.85 μ g/mL 的系列溶液, 取不同质量浓度溶液各 20 μ L 进样, 测定, 记录色谱图与豆腐果苷峰面积。以豆腐果苷质量浓度 (μ g/mL) 对峰面积进行线性回归, 得标准曲线方程。

2.2.3 测定: 在不同时间点取大鼠在体肠循环液样品续滤液 20 μ L 进样, 测定, 记录色谱图与豆腐果苷峰面积。将得到的豆腐果苷峰面积, 代入随行标准曲线方程, 计算豆腐果苷的质量浓度。

2.3 大鼠在体肠吸收实验

2.3.1 肠灌注液的配制: 取约 10.0 mg 酚红, 精密称定, 置 500 mL 置瓶中, 用 Krebs-Ringer's 试液溶解并定容, 得空白肠循环液。取豆腐果苷对照品约 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并定容, 4 $^{\circ}$ C 冷藏作为贮备液。试验前, 以空白肠循环液稀释配制成不同质量浓度的豆腐果苷肠灌注液。

2.3.2 肠吸收实验方法: 取体重 180~220 g 的 Wistar 大鼠 5 只, 实验前禁食 12 h (自由饮水), ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg, 麻醉后固定。沿腹中线打开腹腔, 自十二指肠上部及回盲肠末端插管, 与蠕动泵的胶管连接, 形成回路。以 2.5 mL/min 进行肠灌注液灌注, 分别在 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0 h 取样并补加空白肠循环液。样品的续滤液用紫外分光光度法测定酚红质量浓度, HPLC 法测定豆腐果苷质量浓度。根据酚红质量浓度计算出供试液的体积, 根据每一时间段药物质量浓度和供试液体积的变化计算出肠循环液中剩余药量 (X)。以 $\ln X$ 对取样时间作图得一直线, 由直线的斜率求出吸收速率常数 (k_a); 由 1 h 剩余药量的变化值对零时间剩余药量的比求出每小时吸收率 (P)^[6]。

不同种类吸收促进剂对豆腐果苷小肠吸收影响按相同方法进行考察。

2.3.3 豆腐果苷在空白肠循环液中稳定性的考察: 取低、中、高质量浓度的小肠循环液, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴中, 分别在 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h 取样, 按 2.2.3 项下操作, 测定豆腐果苷在循环液中量的变化。

3 结果

3.1 肠循环液中豆腐果苷质量浓度的方法学结果

3.1.1 肠循环液的标准曲线: 标准曲线方程为

$Y=463.53X-4346.2, r=0.9999$, 豆腐果苷线性范围为 0.518 5~51.85 μ g/mL, 检测限为 0.020 μ g/mL。

3.1.2 方法回收率和精密性: 配制低、中、高 (4.464、13.393、40.179 μ g/mL) 3 个质量浓度的肠循环液, 分别进样测定峰面积, 按 3.1.1 项下标准曲线方程求得药物质量浓度, 以测得质量浓度与实际质量浓度比值求得方法回收率分别为 98.85%、100.27%、99.98%。每样本测定 5 次, 连续测定 3 d, 求得日内精密性 (RSD) 小于 0.5%, 日间精密性 (RSD) 小于 0.9%。证明该方法适用于药物的测定。

3.1.3 豆腐果苷在肠循环液中的稳定性: 药物在肠循环液中的稳定性实验结果发现, 豆腐果苷在肠循环液中质量浓度没有明显变化 (RSD<1%)。

3.2 在体肠吸收动力学的研究结果及影响因素的考察

3.2.1 药物质量浓度对吸收的影响: 考察豆腐果苷质量浓度分别为 4.464、13.393、40.180 μ g/mL 时的小肠吸收速率常数 (K_a), 吸收半衰期 ($t_{1/2}$) 及平均每小时的吸收率 (P), 结果见表 1。对不同药物质量浓度时的 K_a 进行方差分析, 结果表明在不同药物质量浓度时, K_a 间没有显著性差异。可知在考察范围内质量浓度对药物在小肠的 K_a 没有影响。

表 1 不同质量浓度豆腐果苷的 K_a 、 $t_{1/2}$ 及 P 参数
($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Data of K_a , $t_{1/2}$, and P of helicid at different concentration ($\bar{x} \pm s, n=5$)

豆腐果苷 ρ (μ g \cdot mL ⁻¹)	K_a /h ⁻¹	$t_{1/2}$ /h	P %
4.464	0.059 7 \pm 0.024 2	11.62 \pm 0.476	6.64 \pm 1.52
13.393	0.057 7 \pm 0.002 2	12.02 \pm 0.416	6.20 \pm 1.59
40.180	0.058 3 \pm 0.002 7	11.91 \pm 0.546	6.89 \pm 1.71

3.2.2 吸收促进剂对豆腐果苷吸收的影响: 考察了豆腐果苷中质量浓度 (13.393 μ g/mL) 时分别加入吸收促进剂牛胆盐 (0.5%、1.0%), 十二烷基硫酸钠, 卡波姆、冰片对豆腐果苷小肠吸收的影响, 结果见表 2。对每组吸收促进剂的 K_a 分别与豆腐果苷 (13.393 μ g/mL) 未加促进剂时的对照组进行比较, 可知, 牛胆盐具有较明显的促吸收效果, 1.0% 和 0.5% 的牛胆盐使 K_a 分别增加 2.8 倍和 2.0 倍, 其促吸收效果与质量浓度相关, 质量浓度越大, 促吸收效果越明显; 卡波姆使豆腐果苷的 K_a 增加 2.2 倍; 冰片使豆腐果苷的 K_a 增加 1.3 倍; 十二烷基硫酸钠促吸收效果最差; 促吸收能力强弱顺序为 1.0% 牛胆盐 > 卡波姆 > 0.5% 牛胆盐 > 冰片 > 十二烷基硫酸钠。

表 2 吸收促进剂对豆腐果苷大鼠小肠吸收的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of absorption enhancer on helicid absorption in small intestine of rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	K_a/h^{-1}	$t_{1/2}/h$	P/%
豆腐果苷 (13.393 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.057 7 \pm 0.002 0	12.02 \pm 0.42	6.20 \pm 1.59
0.5% 牛胆盐	0.113 0 \pm 0.037 2	6.65 \pm 2.12	7.89 \pm 1.72
1.0% 牛胆盐	0.163 0 \pm 0.036 3	4.42 \pm 0.99	11.31 \pm 3.33
十二烷基硫酸钠	0.060 2 \pm 0.009 2	11.73 \pm 1.85	6.85 \pm 1.31
卡波姆	0.124 6 \pm 0.028 0	5.82 \pm 1.15	9.94 \pm 2.35
冰片	0.072 5 \pm 0.016 6	8.36 \pm 0.71	8.19 \pm 1.78

4 讨论

酚红在肠吸收实验中用于测定肠对水分的吸收,以计算肠循环液中药物质量浓度的变化。

实验中考察了低、中、高质量浓度豆腐果苷 K_a 。无显著性差异,说明 K_a 不随质量浓度变化,认为豆腐果苷的大鼠小肠吸收属于一级动力学过程,吸收机制为被动扩散。

在本实验研究过程中发现,豆腐果苷不同质量浓度下, $t_{1/2}$ 较长,而 P 只有不到 10%,属于吸收较差的药物。为提高豆腐果苷口服生物利用度,考察了多种吸收促进剂^[7]对豆腐果苷肠吸收的影响。胆酸盐是常规的黏膜吸收促进剂,其作用机制是可逆性调节紧密连接,毒性低。实验考察了两个质量浓度牛胆盐对豆腐果苷小肠吸收的影响情况,结果表明,牛胆盐具有较明显的促吸收效果,且质量浓度越高促吸收效果越明显。卡波姆是生物黏附性高分子聚合物,由于生物黏附性和安全性使其应用前景广阔。作为促进剂,卡波姆能够打开紧密连接,增加旁细胞转运,同时抑酶效应和生物黏附性也可促使药物肠吸收增加。实验结果表明,卡波姆对豆腐果苷有较强的促吸收作用。中医认为,冰片味辛苦、微寒,归心、肝、肺,有开窍醒神、通诸窍等作用,常作为多种中药的

“药引”,但其促吸收机制还未明确。实验考察 0.04% 的冰片即可使豆腐果苷的 K_a 增加 1.3 倍。冰片对豆腐果苷吸收具有促进作用。十二烷基硫酸钠促吸收机制是溶解肠黏膜成分,释放蛋白质和磷脂,影响乳酸脱氢酶和线粒体乳酸脱氢酶的活性,一般来说促吸收效应强但毒性大,在研究中常作为对照物。实验中由于溶解度的关系,为得到澄清供试液,十二烷基硫酸钠浓度仅为 0.7 mmol/L,结果表明,该浓度下对豆腐果苷肠吸收并无影响。

大鼠在体吸收实验应能代表药物在正常剂量下的吸收。成年人正常服用豆腐果苷的剂量约为 50 mg/次,根据人与大鼠之间的体表面积换算法^[8],得到大鼠正常服用剂量为 0.89 mg/次。本实验豆腐果苷质量浓度确定为 4.464~40.179 $\mu\text{g}/\text{mL}$,即循环液含药物 0.22~2.01 mg,基本可以代表药物在正常剂量下的吸收情况。实验结果提示在肠道的吸收较差,但是多种常用吸收促进剂可在一定程度上改善其吸收,这为豆腐果苷剂型设计和开发提供了科学依据,对制剂处方具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 陆保平,常 鸿. 豆腐果中豆腐果苷含量的快速测定 [J]. 中国执业药师, 2007, 12: 34-35.
- [2] 赵 楠,杨红菊,王艳华,等. 豆腐果苷抗神经病理性疼痛药理学评价 [J]. 中国药理通讯, 2005, 22(3): 38-39.
- [3] 张德元,冯 平. 豆腐果苷片治疗紧张型头痛的临床观察 [J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 18(7): 1049-1050.
- [4] 兰胜作,李 杰,熊生才,等. 豆腐果苷片配合睡眠卫生指导治疗失眠症临床观察 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(8): 604-606.
- [5] 卢文芸,陆伟根,陈亭亭,等. 豆腐果素缓释微丸的研究. I. 在大鼠胃肠道的吸收 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(3): 241-244.
- [6] 陆 彬. 药剂学实验 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1994.
- [7] 沈 腾,徐惠南. 肠吸收促进剂的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(9): 476-480.
- [8] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991.

大黄素对大鼠肝移植排斥反应相关细胞因子的影响

林文琴¹,杨 满²,荆 河²,徐贤绸²,童洪飞²,林胜璋^{2*}

(1. 温州医学院附属第一医院,浙江 温州 325027; 2. 温州医学院附属第二医院,浙江 温州 325027)

摘 要:目的 探讨大黄素对肝移植大鼠排斥反应中相关细胞因子表达的影响。方法 采用大鼠原位肝移植模型,随机分为 3 组:对照组、移植组、大黄素组,于术后第 5 天取血。用 ELISA 法检测血清中白细胞介素-2 (IL-2)、 γ -干

收稿日期:2008-03-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30572395)

作者简介:林胜璋(1969),男,教授,硕士,研究方向为肝胆胰外科基础与临床。Tel: 13858864450

* 通讯作者 林胜璋 E-mail: wzf21sz@163.com