

雷公藤甲素大鼠在体肠吸收特性研究

薛 璟^{1,2}, 贾晓斌^{1,2}, 谭晓斌¹, 王静静¹, 陈 彦¹, 张陆勇³

(1. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210045; 3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 考察雷公藤甲素在大鼠肠道的吸收情况, 为其安全合理应用提供生物药剂学依据。方法 采用大鼠在体肠灌流实验, 利用超高效液相色谱 (UPLC) 法测定雷公藤甲素的量, 分别研究吸收部位和药物浓度对雷公藤甲素吸收的影响。结果 4、8.3、20 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素灌流液在各肠段的有效渗透系数 (P_{eff}) 和 10 cm 肠段吸收百分比 (10 cm % ABS) 依次为十二指肠 > 结肠 > 空肠 > 回肠, 各肠段之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。不同质量浓度 (4 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$) 的雷公藤甲素在肠道内的吸收无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 雷公藤甲素在大鼠肠道内有较好的肠吸收, 对肠段无明显的吸收部位选择性, 一定范围内的药物浓度对雷公藤甲素的 P_{eff} 和 10 cm % ABS 无影响, 初步判断其吸收机制为被动扩散。

关键词: 雷公藤甲素; 超高效液相色谱; 在体肠灌流; 吸收

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)01-0086-04

Studies on rat intestinal absorption of triptolide in situ

XU E Jing^{1,2}, JIA Xiao-bin^{1,2}, TAN Xiao-bin¹, WANG Jing-jing¹, CHEN Yan¹, ZHANG Lu-yong³

(1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, the State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

2. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210045, China;

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To investigate the rat intestinal absorption behavior of triptolide and provide the biopharmaceutic basis for reasonable application. **Methods** The intestinal absorption of triptolide was detected by the *in situ* single pass intestine perfusion method. The content of triptolide in the perfusate was determined by UPLC. **Results** The effective permeability coefficients (P_{eff}) and absorption percentage of 10 cm intestinal segments (10 cm % ABS) of triptolide had no significant difference ($P > 0.05$) at concentration of 4, 8.3, and 20 $\mu\text{mol/L}$ in four different regions of intestine of rat, which showed duodenum > colon > jejunum > ileum. The P_{eff} and 10 cm % ABS of triptolide had no significant difference ($P > 0.05$) among the concentration ranges of 4—20 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Triptolide could be well absorbed in general intestinal tract without specific absorption site. The concentration of triptolide has no influence on its P_{eff} and 10 cm % ABS in the certain range, which preliminarily judges that triptolide is absorbed by passive diffusion mechanism.

Key words: triptolide; UPLC; *in situ* intestinal perfusion; absorption

雷公藤甲素又名雷公藤内酯醇 (triptolide), 是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f 中分离出的环氧二萜内酯类成分, 具有免疫抑制、抗炎、抗生育及抗肿瘤等生物活性^[1,2], 既是雷公藤的主要有效成分之一, 同时又是雷公藤引起不良反应的主要成分^[3]。本研究采用大鼠在体单向肠灌流的方法建立了雷公藤甲素肠吸收模型, 采用 UPLC 法测定雷公藤甲素的量, 并对其吸收特性

进行研究, 以期雷公藤甲素的安全合理应用提供生物药剂学依据。

1 材料

1.1 仪器: AcQuity™ 超高效液相色谱仪, 二元泵, DAD 检测器 (Waters 科技公司, 美国); Mettler Toledo 分析天平 (Mettler Toledo 分析仪器有限公司); Anke 离心机 TGL-16G (上海安亭科学仪器厂); 数显恒温搅拌循环水箱 HH-60 (常州国华仪

收稿日期: 2009-04-17

基金项目: 中医药行业科研专项基金资助项目 (200707008)

作者简介: 薛璟 (1985—), 女, 江苏苏州人, 南京中医药大学药学院 2007 级药剂学硕士, 研究方向为药物新剂型与生物药剂学。

Tel: (025) 85637809 E-mail: szxuejing@hotmail.com

*通讯作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025) 85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

器厂);pH计(Mettler-Toledo公司);恒流泵 PHD 2000 Infuse/withdraw Pump (Harvard Apparatus Inc. 美国)。

1.2 药品与试剂:雷公藤甲素(南京泽朗医药科技有限公司,质量分数>98%);泼尼松龙对照品(中国药品生物制品检定所,批号100153-199603);乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物:SD大鼠,雄性,体质量为280~300g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号:SCXX(沪)2007-0005。

2 方法与结果

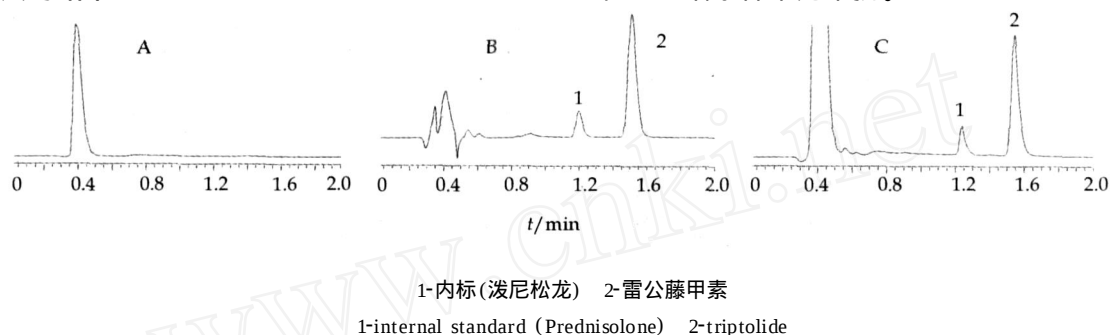


图1 空白肠灌流液(A)、雷公藤甲素与内标对照品溶液(B)和供试液(C)的UPLC图

Fig. 1 UPLC Chromatograms of blank perfusion solution (A), triptolide and internal standard (B), and sample (C)

2.1.2 溶液的配制:雷公藤甲素储备液的配制:精密称取雷公藤甲素9.00 mg置10 mL量瓶,用甲醇溶解定容至刻度,即得2.5 mmol/L的雷公藤甲素储备液。泼尼松龙内标液的配制:精密称取泼尼松龙18.23 mg,加入甲醇定容至10 mL,即得5 mmol/L储备液。使用前用甲醇稀释至20 μmol/L,备用。HBSS溶液的配制:精密称取CaCl₂ 0.14 g、MgSO₄·7H₂O 0.245 g、KCl 0.4 g、NaCl 9.164 g、KH₂PO₄ 0.06 g、Na₂HPO₄·12H₂O 0.126 g、D-葡萄糖4.5 g、NaHCO₃ 0.37 g、HEPES 5.96 g,加水稀释至1 000 mL,用5 mol/L NaOH调节pH值至7.4。

2.1.3 样品处理:分别精密移取各肠段不同时间段的流出液400 μL,置于1.5 mL离心管中,加入100 μL内标溶液,涡旋混匀,14 000 r/min离心15 min后,取上清液进样测定。

2.1.4 雷公藤甲素标准曲线的制备:将雷公藤甲素储备液用HBSS溶液分别稀释成0.625、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、25.00 μmol/L的系列标准溶液,取上述各溶液400 μL,与100 μL内标溶液混匀离心后取上清液进样。以浓度(μmol/L)为横坐标,雷公藤甲素与内标峰面积比为纵坐标,进行线

2.1 灌流液中雷公藤甲素定量测定

2.1.1 色谱条件:仪器为Waters AcQuity™ Ultra Performance LC,色谱柱为BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-水(30:70),柱温:35℃,样品室:4℃,体积流量:0.3 mL/min;进样量:5 μL;检测波长:220、246 nm。分别取空白肠灌流液、雷公藤甲素与内标对照品溶液,以及含有药物的供试液灌流后收集液,0.22 μm微孔滤膜滤过,UPLC测定,色谱图见图1。结果表明,雷公藤甲素与内标的保留时间分别为1.459、1.173 min,供试液主峰位置与对照品保留时间一致,空白肠灌流液在此色谱条件下无干扰。

性回归。计算回归方程: $Y = 0.2093X - 0.0128$, $r^2 = 0.9999$ 。雷公藤甲素在0.625~25 μmol/L线性良好。

2.1.5 回收率的测定:精密吸取雷公藤甲素储备液适量,用空白肠灌流液配制成低、中、高(1.25、5.00、20.00 μmol/L)3个添加浓度,按“样品处理”项下方法操作,在上述色谱条件下测定,以标准曲线计算浓度,以测定浓度与加入浓度之比计算回收率。结果3个浓度的回收率分别为(104.46±1.70)%、(99.53±0.31)%、(99.64±0.37)% (n=5)。

2.1.6 精密度的考察:取2.1.5项下3个浓度的待测溶液,以1 d内测定同一样品5次的结果计算日内精密度,以连续5 d测定同一样品的结果计算日间精密度。根据标准曲线分别计算雷公藤甲素的浓度,结果日内精密度RSD为0.71%、0.31%、0.37%,日间精密度RSD分别为1.37%、1.06%、0.45%。

2.1.7 稳定性考察:精密量取雷公藤甲素储备液适量,分别用不同pH值(5.5、6.6、7.4、8.0)的HBSS溶液稀释成4、10、20 μmol/L 3个浓度。将上述配制的不同pH值的溶液用塞子封闭,置于37℃恒温水浴中,分别于0、1、2、4、8、12、24 h取

样,按“样品处理”项下方法操作,在上述色谱条件下测定,以药物残留百分比自然对数值对时间作图,按一级动力学方程求得不同 pH 值时的降解反应常数。结果 4、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的雷公藤甲素在 pH 5.5~8.0 范围内的降解反应常数分别为 $(0.68 \sim 1.26) \times 10^{-3}$ 、 $(0.17 \sim 6.75) \times 10^{-3}$ 、 $(1.34 \sim 4.53) \times 10^{-3}$,表明不同浓度的雷公藤甲素在 pH 5.5~8.0 范围内降解很少,24 h 内均比较稳定。

2.2 大鼠在体肠吸收实验^[4]:实验前将大鼠禁食过夜(自由饮水),im 0.2 g/mL 乌拉坦溶液麻醉(5 mL/kg),固定,沿腹中线切口 4 cm 打开腹腔,分别在十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段插入导管,用线结扎固定,插管后将小肠部分小心放回肠腔,尽可能避免卷曲和扭结。切口用等渗生理盐水浸润的纱布覆盖以保湿,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温的生理盐水以 5 mL/min 的体积流量将肠内容物冲洗干净。将进口管隔离,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 循环水浴中保持灌注温度恒定。取预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的供试药液 50 mL,以 0.2 mL/min 的体积流量灌流,平衡 30 min 后,每隔 30 min 分段收集流出液,并精确称定流出液质量,实验结束后,测量各肠段长度。出口管中药物浓度采用 2.1 项下方法检测。

2.3 数据分析^[5]:小肠不仅吸收药物,也吸收和分泌水份,导致灌流液体积变化,因此,不能用直接测定药物浓度的方法计算药物的吸收。本实验采用质量分析法对灌流液的流入和流出的体积进行校正,消除其体积变化的影响。药物的肠壁有效渗透系数(P_{eff}^*)计算公式如下:

$$C_{\text{out (corr)}} = C_{\text{out}} \times Q_{\text{out}} / Q_{\text{in}}$$

$$P_{\text{eff}}^* = (1 - C_{\text{out (corr)}} / C_{\text{in}}) / 4 Gz$$

$$P_{\text{aq}}^* = [A \cdot (Gz)^{1/3}]^{-1}$$

$$A = 10.0 Gz + 1.01 \quad 0.004 \leq Gz \leq 0.01$$

$$A = 4.5 Gz + 1.065 \quad 0.01 \leq Gz \leq 0.03$$

$$A = 2.5 Gz + 1.125 \quad 0.03 \leq Gz$$

式中 $C_{\text{out (corr)}}$ 为出口溶液的校正浓度, C_{out} 为出口处的药物浓度 (nmol/L), Q_{out} 为出口溶液的流出流速 (nmol/L), Q_{in} 为入口溶液的流速 (nmol/L)。 Gz ($Gz = \pi DL / 2Q$) 为流速 (Q)、小肠长度 (L) 和扩散系数 (D) 无因次的渗透性换算因子, A 为小肠持水性因子

2.4 药物在不同肠段吸收情况的考察:用 HBSS 溶液配制雷公藤甲素浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的供试品溶液,按照 2.2 项下操作,考察其在大鼠十二指肠、空肠、回肠和结肠中的吸收情况。实验考察的分段肠段区间均取约 10 cm,各肠段区间如下:十二指肠段为距幽门 1 cm 处开始往下取 10 cm;空肠段为距

幽门 15 cm 处开始往下取 10 cm;回肠段为从回盲连接处 2 cm 开始上行取 10 cm;结肠段为从回盲连接处 2 cm 开始往下取 10 cm。计算雷公藤甲素在各个肠段的 P_{eff}^* 和 10 cm 肠段吸收百分比 (10 cm % ABS),结果见表 1。可见,雷公藤甲素在各肠段的 P_{eff}^* 和 10 cm % ABS 按十二指肠、结肠、空肠和回肠的顺序依次降低。经 SPSS 13.0 统计软件分析,结果表明雷公藤甲素在各肠段之间的 P_{eff}^* 和 10 cm % ABS 两两比较均无显著性差异 ($P > 0.05$),说明雷公藤甲素在肠道内无明显的特定吸收部位。

表 1 雷公藤甲素在大鼠不同肠段的 P_{eff}^* 和 10 cm % ABS 值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 1 P_{eff}^* and 10 cm % ABS value of triptolide at various intestine segments in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

肠 段	P_{eff}^*	(10 cm % ABS) / %
十二指肠	2.34 $\pm$ 0.10	42.62 $\pm$ 5.28
空肠	1.74 $\pm$ 0.26	32.13 $\pm$ 5.98
回肠	1.67 $\pm$ 0.26	31.77 $\pm$ 5.51
结肠	1.95 $\pm$ 0.23	36.74 $\pm$ 4.36

2.5 不同药物浓度对肠吸收的影响:取大鼠 12 只,每只分别取 4 个肠段各约 10 cm,用低 (4 $\mu\text{mol/L}$)、中 (8.3 $\mu\text{mol/L}$)、高 (20 $\mu\text{mol/L}$) 3 种浓度的灌流液按 2.2 项下方法分别灌流,计算 P_{eff}^* 和 10 cm % ABS,结果见表 2。经 SPSS 13.0 统计软件分析,结果表明雷公藤甲素在浓度为 4~20 $\mu\text{mol/L}$ 的吸收参数均无显著性差异 ($P > 0.05$),提示雷公藤甲素的肠吸收不受自身浓度的影响,主要表现为被动扩散机制。

3 讨论

药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄 (ADME)

表 2 不同浓度雷公藤甲素灌流对大鼠肠段中的吸收的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2 Effects of triptolide perfusion at different concentration on its absorption in various intestine segments of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

肠 段	C ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	P_{eff}^*	(10 cm % ABS) / %
十二指肠	4	2.29 $\pm$ 0.42	43.68 $\pm$ 7.07
	8.3	2.30 $\pm$ 0.43	43.36 $\pm$ 8.02
	20	2.34 $\pm$ 0.10	42.62 $\pm$ 5.28
空肠	4	1.65 $\pm$ 0.46	31.06 $\pm$ 8.67
	8.3	1.85 $\pm$ 0.32	34.83 $\pm$ 5.99
	20	1.74 $\pm$ 0.26	32.13 $\pm$ 5.98
回肠	4	1.40 $\pm$ 0.39	25.06 $\pm$ 7.42
	8.3	1.31 $\pm$ 0.34	24.70 $\pm$ 6.47
	20	1.67 $\pm$ 0.26	31.77 $\pm$ 5.51
结肠	4	2.16 $\pm$ 0.16	41.60 $\pm$ 3.92
	8.3	2.15 $\pm$ 0.28	40.54 $\pm$ 5.21
	20	1.95 $\pm$ 0.23	36.74 $\pm$ 4.36

及毒性是药物的基本性质,决定了药物的安全性及有效性,是研究药物药效及毒性的基础和关键。雷公藤作为一种常用中药,临床广泛用于治疗类风湿性关节炎、肾小球疾病、皮肤病及其他疾病。雷公藤甲素是雷公藤中活性最高的环氧二萜内酯化合物,是雷公藤的主要成分之一,同时也是雷公藤引起不良反应的主要成分,对心、肝、骨髓、胸腺、脾、肾及生殖系统等都有一定的毒性^[6]。目前上市的雷公藤制剂一般多以雷公藤甲素的量为质控指标,采用口服的形式用药,因此了解雷公藤甲素口服后体内的吸收情况,对安全用药具有重要的指导意义。

3.1 大鼠单向在体肠灌流的应用:评价药物在肠道吸收(透过性)的方法有离体法、在体法和体内法等多种方法。本实验采用大鼠单向在体肠灌流法,以较低的体积流量(0.2 mL/min)对4段肠段分别进行单向灌流,考察药物在不同肠段的吸收,该方法在保证肠道神经与内分泌输入的完好无损,以及血液和淋巴液的供应的同时,实验条件与口服给药后药物接触的肠道环境较接近,吸收速率稳定,与人体有良好的相关性^[5]。

3.2 质量分析法的应用:大鼠在体肠灌流实验方法基于测量灌流前后肠腔内药物浓度的变化,而小肠在吸收药物的同时也吸收或分泌水份,肠腔内的水份改变显著影响药物的浓度,因此有必要对其进行校正。校正方法主要有酚红标示法、¹⁴C-PEG标示法以及质量法。然而有文献报道,酚红本身能部分被吸收以及对某些化合物的肠道转运或分析测定有干扰,而¹⁴C-PEG存在放射性和安全性问题^[7],故本实验采用更为准确的质量分析法,用预先称质量的具塞离心管收集一段时间的灌流液,实验结束后称质量,通过计算质量差对灌流液的浓度进行校正^[8]。

3.3 UPLC检测方法的应用:UPLC是近年来新兴的色谱技术,它的色谱柱使用1.7 μm的填料作固定相,使塔板数和分离度大大提高,并且缩短了分析时间。它在精密度、准确性等方面与HPLC相近,但灵敏度要高于HPLC,且分析时间短,流动相消

耗也较少^[9]。本实验首次建立了UPLC检测雷公藤甲素的分析方法,能够快速、准确地分析检测样品。

3.4 雷公藤甲素的肠吸收特性:文献报道雷公藤甲素在大鼠体内生物利用度高,口服绝对生物利用度为72.08%^[10]。本实验考查了低、中、高3种浓度(4、8、20 μmol/L)的雷公藤甲素在十二指肠、空肠、回肠以及结肠的吸收情况,测得雷公藤甲素在各肠段的 P_{eff} 值在(1.31 ± 0.34) ~ (2.34 ± 0.10), 10 cm % ABS值在(24.70 ± 6.47) % ~ (43.68 ± 7.07) %,各肠段吸收参数无显著性差异,结果表明雷公藤甲素吸收较好,且在肠道内无明显的吸收部位选择性;在不同药物浓度条件下,雷公藤甲素在小肠的吸收参数无显著性差异,初步确定吸收机制为被动扩散。

参考文献:

- [1] 涂胜豪,陈红波,盛冬云,等. 雷公藤甲素对健康人外周血单个核细胞分泌TNF-α的抑制作用与TNF-α基因多态性的关系[J]. 中草药, 2006, 37(4): 568-571.
- [2] 涂胜豪,胡永红,曾克勤,等. 雷公藤甲素对胶原诱导的关节炎大鼠关节局部热休克蛋白和主要组织相容性复合体分子表达的影响[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1193-1196.
- [3] 薛璟,贾晓斌,谭晓斌,等. 雷公藤的肝毒性研究及ADME/Tox评价思路[J]. 中草药, 2009, 40(4): 655-658.
- [4] Chen J, Lin H M, Hu M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2003, 304: 1228-1235.
- [5] 赵艳红,贾晓斌,陈彦,等. 淫羊藿黄酮类化合物的大鼠在体肠吸收研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3): 188-191.
- [6] 刘明星,董静,杨亚江,等. 雷公藤甲素的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 170-174.
- [7] 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.
- [8] 谭晓斌,贾晓斌. 刺五加苷B的大鼠在体肠吸收特性研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 346-350.
- [9] 陈肖家,李绍平,王一涛,等. HPLC、UPLC、CZE测定淫羊藿中黄酮类成分含量的比较研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(8): 624-628.
- [10] Shao F, Wang G J, Xie H T, et al. Pharmacokinetic study of triptolide, a constituent of immunosuppressive Chinese herb medicine in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 702-707.