[J]. 中草药,1990,21(7):294-295.
[3] 李子燕,李 良,张洪彬. 中间五味子化学成分的研究 [J]. 中草药,1996,27(1):3-4.
[4] Lin T J, Liu G T, Pan Y. Protective effect of schisanhenol against oxygen radical induced mitochondrial toxicity on rat heart and liver [J]. *Biomed Environ Sci*, 1992, 5: 57-64.
[5] 李 莉,吴若钰. 五味子酚对氧自由基损伤小鼠淋巴细胞的保护作用 [J]. 药学学报,1997,32(3):178-182.
[6] 李 莉,刘耕陶. 五味子酚对氧自由基引起大鼠脑突触体和线粒体损伤的保护作用 [J]. 药学学报,1998,33(2):81-86.
[7] 陈道峰,蒋仕丽,章蕴毅. 五味子酚在制备治疗缺血性脑中风药物中的用途 [P]. 中国专利:CN1723879,2006.01.25.
[8] Chen M, Kilgore N, Lee K H, *et al*. Rubrisandrins A and B, lignans and related anti-HIV compounds from *Schisandra rubriflora* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(12): 1697-1701.
[9] Chen D F, Zhang S X, Kozuka M, *et al*. Interiotherins C and D, two new lignans from *Kadsura interior* and antitumor-promoting effects of related neolignans on Epstein-Barr virus activation [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(9): 1242-1245.
[10] 钮心懿,边振甲,任志鸿. 薄层紫外扫描法测定五味子醇甲在大鼠体内的代谢及脑内分布[J]. 药学学报,1983,18(7):491-495.

大鼠在体肠吸收穿心莲内酯的特征研究

叶 玲,刘 薇,唐 斓,夏笔军,龚 耘,刘中秋*
(南方医科大学药学院,广东 广州 510515)

摘 要:**目的** 为探讨穿心莲内酯生物利用度低的原因,考察穿心莲内酯肠道吸收特性,肝肠循环和肠道酶代谢特点。**方法** 采用大鼠在体肠灌流模型。运用 HPLC 法测定肠灌流液、胆汁以及经肠道酶降解后样品中穿心莲内酯的量。**结果** 穿心莲内酯在不同肠段的吸收率,以十二指肠最高,达 40 %,而在结肠最低,仅有 10 %。穿心莲内酯在十二指肠灌流液中的生物降解最显著 (1 h 降解约 50 %),在回肠、结肠中则几乎无降解反应。穿心莲内酯有胆汁排泄,其排泄量为灌流药物总量的 0.76 %。**结论** 穿心莲内酯在大鼠肠道的吸收较差,而在十二指肠中吸收表现较好是由于存在较强的肠道酶代谢作用。同时,穿心莲内酯存在明显的肝肠循环。穿心莲内酯生物利用度低的原因与肠吸收差、肠道酶代谢作用强和肝肠循环有关。

关键词:穿心莲内酯;大鼠在体肠灌流;肠道酶;吸收
中图分类号:R286.02 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2010)02-0219-04

Absorption characteristics of andrographolide in rat intestine in situ

YE Ling, LIU Wei, TANG Lan, XIA Bi-jun, GONG Yun, LIU Zhong-qiu
(School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To investigate the causes of poor bioavailability of andrographolide, the absorption characteristics, hepatic-enteric recycling, and metabolism of andrographolide in rat intestines were observed. **Methods** A single-pass "four-site" rat intestinal perfusion model *in situ* was employed. The concentration of andrographolide in perfusates, bile, and *in vitro* incubation samples for metabolites of andrographolide by the intestinal enzymes, respectively, was determined by HPLC. **Results** In the perfusion model, maximal absorption of andrographolide occurred in the duodenum with a 40 % absorption rate, whereas only 10 % of andrographolide was absorbed in the colon. Moreover, andrographolide was rapidly hydrolyzed (about 50 % in 1 h) in the duodenum perfusates but was not hydrolyzed at all in the colon and ileum perfusates. On the other hand, andrographolide was excreted by bile with a total of 3.04 % prefused amount of andrographolide. **Conclusion** The poor absorption, rapidly hydrolysis, and hepatic-enteric recycling in the intestine all contribute to the poor bioavailability of andrographolide.

Key words: andrographolide; the rat intestinal perfusion *in situ*; intestinal enzymes; absorption

* **收稿日期**:2009-04-12
基金项目:国家"十一五"支撑计划项目(2006BAI11B08-04);广东省高等学校自然科学研究重点项目(06Z008);广州市科学技术局应用基础项目(2007J-C0021)
作者简介:叶 玲(1984-),女,广东阳春人,2007 级博士研究生,从事药物吸收与代谢研究。
Tel:(020)61648597 E-mail:lotus623@126.com
*通讯作者 刘中秋 Tel:(020)61648596 E-mail:liuzq@fimmu.com

穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (*Burm*. f.) Nees 的干燥地上部分,具有清热解毒、凉血、消肿、抗菌等作用[1]。穿心莲叶中主要含二萜类内酯化合物,其中穿心莲内酯的量最高。穿心莲内酯亦是穿心莲的活性成分之一,具有利胆、消炎等作用[1]。但穿心莲内酯水溶性差,体外溶出慢,导致体内吸收差,从而引起生物利用度低[2~4]。为探讨穿心莲内酯肠吸收特征以及影响其生物利用度低的生物学因素,本实验采用大鼠肠灌流模型研究了穿心莲内酯在不同肠段的吸收特点、肝肠循环行为以及肠道酶的代谢作用。

1 仪器与材料

安捷伦 HP1200 型高效液相色谱仪和可变波长检测器(美国);十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯);冷冻高速离心机(德国 Eppendorf);多通道注射泵(美国哈佛仪器公司);pH 计(德国梅特勒-托利多);纯水蒸馏器(美国 Millpore 公司)。

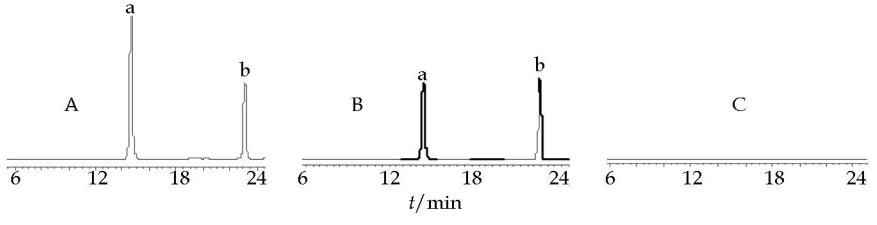
穿心莲对照品(南京替斯艾么中药研究所,批号 TCM005-080316,质量分数 98 %以上);睾丸酮(日本东京 Nacalai Tesque 公司,批号 32811-61,质量分数 98 %以上);HBSS (Hanks' Balanced Salts)缓冲盐粉末(美国 Sigma 公司);甲醇等均为分析纯。

Sprague-Dawley (SD)大鼠,雄性,由南方医科大学动物实验中心提供,合格证:SCXK (粤) 2006-0015。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Alltima C_{18} (250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-水(B);梯度洗脱,0~6 min,A 相从 5 %变成 20 %,6~7 min,A 相从 20 %变成 35 %,7~15 min,A 相维持 35 %,15~16 min,A 相从 35 %变成 60 %;体积流量:1 mL/min;进样体积:200 μL;检测波长为 225 nm。以睾丸酮为内标物,HPLC 色谱峰见图 1。

2.2 贮备液的制备:精密称取穿心莲内酯对照品 22.41 mg,定容于 4 mL 乙醇中,得 16 mmol/L 穿心莲内酯贮备溶液。



a-穿心莲内酯 b-睾丸酮

a-andrographolide b-testosterone

图 1 对照品(A)、样品(B)及阴性样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A), sample (B), and negative sample (C)

2.3 HBSS 溶液配制:称取 HBSS 粉末 9.8 g,溶于蒸馏水中,制成 1 000 mL,备用。

2.4 标准曲线的绘制:精密吸取不同体积穿心莲内酯贮备溶液,用 HBSS 溶液(pH 6.5)稀释定容,再分别加入睾丸酮甲醇溶液(内标液),得浓度为 4、8、16、32、64、128 μmol/L 系列对照品溶液,进样测定,记录峰面积。以穿心莲内酯与内标睾丸酮峰面积之比对浓度进行回归,得回归方程 $A = 0.0318\ C + 0.002\ 8$ ($r = 0.999\ 8$)。表明穿心莲内酯在 4~128 μmol/L 线性关系良好。

2.5 精密度试验:配制含穿心莲内酯 4、32、128 μmol/L 灌流液样品,测定 5 次,计算日内和日间 RSD,见表 1。

2.6 回收率试验:精密吸取穿心莲内酯贮备溶液,用空白 HBSS 缓冲液稀释成 4、32、128 μmol/L,进行测定 5 次,将所得的峰面积比代入回归方程计算浓度,以所得浓度与实际浓度的比值作为相对回收率,结果见表 2。

表 1 穿心莲内酯日内日间精密度

Table 1 Precision of andrographolide in inter- and intra-day ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

加入量/	日内			日间		
(μmol·L^{-1})	测得值/ (μmol·L^{-1})	精密度/ %	RSD/ %	测得值/ (μmol·L^{-1})	精密度/ %	RSD/ %
4	3.77 ±0.09	94.25	2.43	4.14 ±0.06	103.50	6.2
32	33.05 ±0.16	103.28	0.48	32.43 ±0.40	101.34	3.7
128	128.34 ±1.28	100.27	0.10	130.48 ±3.79	101.94	2.9

2.7 大鼠在体灌流试验:精密称取一定体积穿心莲内酯对照品储备液贮备液,用 HBSS 溶液(pH 6.5)

表 2 穿心莲内酯的回收率($\bar{x}\pm s$, n = 5)

Table 2 Recovery of andrographolide ($\bar{x}\pm s$, n = 5)

浓度/ (μmol·L⁻¹)	回收率/ %	RSD/ %
4	94.25 ±2.39	2.43
32	103.27 ±0.50	0.49
128	100.27 ±1.00	0.49

稀释定容,得浓度为 80 μmol/L 灌流液,备用。术前大鼠禁食 16 h,自由饮水,腹腔注射乌拉坦溶液麻醉,固定麻醉动物,置于小电热毯上,保持正常的体温。沿腹中线切口 4 cm 打开腹腔,靠近十二指肠处插入胆汁导管,分别在十二指肠、空肠、回肠和结肠两端插聚乙烯管,用无菌的手术线固定,实验时用等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖肠组织表面以保湿,用等渗生理盐水冲洗肠内容物后换灌流液,用一恒速多通道注射泵灌流肠腔,灌流速度为 0.25 mL/min,平衡 30 min 后,每隔 30 min 收集出口管中灌流液,灌注前收集一次胆汁和血浆样品,随后每隔 30 min 收集一份。实验共收集 4 次流出液,实验结束后,测量肠段长度。出口管中药物浓度 HPLC 检测;胆汁样品用缓冲液按 1∶4 稀释,HPLC 检测[5~7]。

大鼠肠灌流实验中,收集各肠段流出液的同时,设空白管,收集空白灌流液,精确称重,以校正水分变化对结果的影响。分别在十二指肠、空肠、回肠和结肠 4 个肠段回流,考察穿心莲内酯在大鼠各肠段的吸收率,计算肠段吸收量(M_{ab})和吸收率。

$$M_{ab} = Q\tau(CA_{in} - CA_{out})$$

$$\text{吸收率} = M_{ab}/M_{原} \times 100\ \%$$

M_{ab}为穿心莲内酯的吸收量,$M_{原}$为灌流前溶液,Q为灌流的速度,τ单一样品收集的时间段(30 min),CA_{in}为进口溶液的浓度(μmol/L),CA_{out}为出口溶液的浓度(μmol/L)

两组间数据的比较采用单向方差分析,结果见表 3。

表 3 大鼠在不同 4 段肠道的穿心莲内酯吸收率($\bar{x}\pm s$, n = 4)

Table 3 Absorption rate of andrographolide in various four intestinal segments in rats ($\bar{x}\pm s$, n = 4)

肠 段	吸收率/ %
十二指肠	42.96 ±5.74
空肠	24.68 ±6.69
回肠	10.59 ±4.09
结肠	9.17 ±4.32

可知不同肠段药物的吸收率按十二指肠、空肠,回肠和结肠依次下降。十二指肠的吸收率为 42 %,分别与空肠、回肠、结肠的吸收率两两比较均具有显著性差异($P < 0.05$),空肠分别与回肠和结肠段相比,也有明显差异($P < 0.05$),回肠和结肠段相比,不具有显著性差异($P > 0.05$),在结肠中吸收率最低,仅为 10 %。结果表明,穿心莲内酯在十二指肠的吸收最好,其次为空肠;在回肠和结肠吸收较差。

2.8 胆汁中穿心莲内酯的测定:用 80 μmol/L 穿心莲内酯灌流液对大鼠肠段进行灌流后,采用 HPLC 法在胆汁中能检测出穿心莲内酯。在不同时间点的胆汁样品中检测穿心莲内酯的结果见图 2。可见在灌流过程中,穿心莲内酯进入胆汁的量逐渐增加,在 60 min 时达到平衡,计算可知,进入胆汁的总量占灌流总量的 0.76 %。

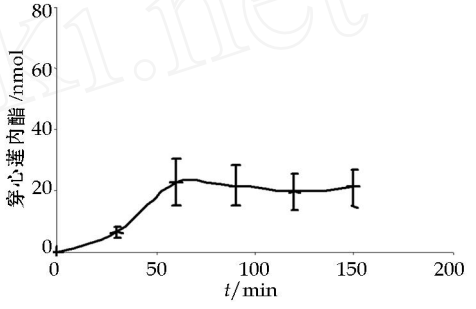


图 2 不同时间在胆汁中检测出的穿心莲内酯

Fig. 2 Contents of andrographolide in bile at different times

2.9 穿心莲内酯在不同 pH 值肠循环液中稳定性考察:分别用稀盐酸和稀氢氧化钠调节 80 μmol/L 供试液的 pH 值为 5.0、6.5、7.4、9.0,在相同实验条件下不经肠段直接循环,分别于 0、1、2、4、6、8 h 取样,测定穿心莲内酯在循环液中的浓度变化,见表 4。结果表明穿心莲内酯在不同 pH 值的肠灌流液中 8 h 内浓度没有变化。

2.10 穿心莲内酯在含肠道酶肠循环液中稳定性考察:分别取空白灌流液 60 mL 对大鼠各肠段循环灌流 1 h,流速为 1 mL/min,用此溶液配制 80 μmol/L 穿心莲内酯,密闭容器,置 37 ℃水浴中,分别于 0、1、2、4、6、8 h 取样,测定穿心莲内酯在循环液中的变化,结果见表 4。可见肠道酶对穿心莲内酯有水解作用,其中十二指肠和空肠酶的水解作用较强。特别是在十二指肠中,1 h 内穿心莲内酯被水解了约 50 %,8 h 内几乎完全被水解;空肠中,8 h 内被水解了约 50 %。而在回肠和结肠中,肠道酶对穿心莲同内酯的水解作用较弱,8 h 内几乎无水解作用。

3 讨论

研究药物胃肠道吸收的实验方法大致可分为体外试验法、在体试验法和体内试验法[8]。药物的吸收行为与特征常采用动物实验特别的大小鼠进行预测,其大鼠吸收行为与人体吸收行为的相关性已被

表 4 穿心莲内酯在不同 pH 值的灌流液中的稳定性($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 4 Stability of andrographolide in solution of intestinal perfusates at different pH values ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

pH 值	各时间点穿心莲/ (μmol ·L⁻¹)					
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
5. 0	80	81. 09 ±1. 31	78. 97 ±2. 34	79. 48 ±2. 57	77. 89 ±1. 58	77. 24 ±2. 30
6. 5	80	79. 58 ±1. 28	80. 58 ±1. 23	78. 56 ±1. 25	79. 57 ±2. 37	77. 74 ±1. 52
7. 4	80	80. 16 ±2. 57	79. 48 ±2. 56	78. 97 ±2. 39	77. 89 ±1. 58	78. 26 ±1. 38
9. 0	80	82. 88 ±1. 51	81. 31 ±2. 25	79. 54 ±1. 32	78. 56 ±1. 00	79. 22 ±2. 32

表 5 穿心莲内酯在含肠道酶循环液中的稳定性($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 5 Stability of andrographolide in solution of intestinal perfusates containing intestinal enzymes ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

肠 段	各时间点穿心莲/ (μmol ·L⁻¹)					
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
十二指肠	80	39. 54 ±02. 5	26. 31 ±0. 35	13. 78 ±0. 15	9. 92 ±0. 19	2. 98 ±0. 32
空肠	80	62. 13 ±0. 81	55. 39 ±1. 32	47. 65 ±0. 05	44. 70 ±0. 47	43. 96 ±0. 25
回肠	80	77. 89 ±1. 11	77. 51 ±0. 93	76. 26 ±1. 53	75. 89 ±0. 65	75. 43 ±1. 98
结肠	80	79. 19 ±1. 48	77. 45 ±0. 68	75. 81 ±0. 71	75. 45 ±2. 27	75. 06 ±0. 29

文献所证实[9],其实验结果可外推动至人。在体大鼠肠灌流实验能较好的保持大鼠的正常生理状态,保持肠道中的代谢酶,是一种研究药物吸收的常用方法。采用 4 段肠同时灌流法,可较准确的预测药物在不同肠段的吸收特征,能为研究肠道给药系统提供依据。

穿心莲内酯的溶解性差,亲水性弱,导致了其生物利用度低[2,3]。本实验采用在体大鼠肠灌模型研究了穿心莲内酯的肠道吸收行为与特征。结果表明,穿心莲内酯主要在十二指肠和空肠吸收,而在回肠与结肠则吸收较少,但总的吸收量均不高。同时,十二指肠和回肠段的肠道酶对穿心莲的水解作用较强,而在结肠与回肠则较弱,该结果说明,肠道细菌对穿心莲内酯的水解作用较弱,因为肠道菌主要含在结肠道中[5,7]。因此,可推测穿心莲内酯的生物利用度主要是由于肠道吸收和肠道代谢酶的作用。

在该肠灌流模型中,笔者试验了穿心莲内酯的肝肠循环,结果显示在胆汁中能检测到穿心莲内酯,说明它存在肝肠循环,即穿心莲内酯能被胆汁排回到肠腔,再经肠腔吸收,而形成肝肠循环。肝肠循环也是穿心莲内酯生物利用度低的另一原因。

因此,本实验结果提示穿心莲内酯肠道的吸收较差,而在十二指肠中吸收表现较好是由于存在较强的肠道酶代谢作用。同时,穿心莲内酯存在明显的肝肠循环。穿心莲内酯生物利用度低的原因与肠吸收差、肠道酶代谢作用强和肝肠循环有关。

参考文献:

[1] 何恩其,赵 烽. 穿心莲的药理作用及研究进展[J]. 中医药导报,2007,13(5):107-108.

[2] 洪 馨,宓穗卿,叶少梅,等. 穿心莲胶囊与穿心莲丸生物利用度的比较研究[J]. 中药新药与临床药理,2000,11(1):8-10.

[3] 于波涛,张志荣,刘文胜,等. 穿心莲内酯体外稳定性研究[J]. 中成药,2002,24(5):331-333.

[4] 周 兰,赵朝伟. 穿心莲内酯片的体外溶出度研究[J]. 制剂技术,2005,14(8):57.

[5] Hu M, Roland K, Ge L, *et al*. Determination of absorption characteristics of AG337, a novel thymidylate synthase inhibitor, using a perfused rat intestinal model [J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87: 886-890.

[6] Hu M, Sinko P J, DeMeere A L J, *et al*. Membrane permeability parameters for some amino acids and-lactam antibiotics: application of the boundary layer approach [J]. *J Theor Bio*, 1988, 131:107-114.

[7] Liu Z Q, Jing Z H, Liu L, *et al*. Mechanisms responsible for poor oral bioavailability of paeoniflorin: role of Intestinal disposition and interactions with sinomenine [J]. *Pharm Res*. 2007, 23:2768-2779.

[8] Yu L X, Lipka E, Crison J R, *et al*. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption [J]. *Adv Drug Del Rev*. 1996, 19(3):359-376.

[9] Schurgers N, Bijdeneljk J, Tukker J J, *et al*. Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in the anesthetized rat in situ [J]. *J Pharm Sci*, 1986, 75(2): 117-119.