

单向灌流法研究丹参提取物中丹参素和原儿茶醛大鼠肠吸收特性

潘德城¹, 孙婷婷¹, 孙勇兵², 张国松², 饶小勇², 何双凤², 杨世林², 罗晓健^{1,2*}

1. 江西中医学院, 江西 南昌 330006

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 研究丹参提取物中丹参素和原儿茶醛的大鼠在体肠吸收动力学特征。**方法** 采用大鼠在体肠单向灌流装置, 并用质量法校正灌流液体积, 考察灌流液体积流量、灌流液 pH 值、胆管结扎、丹参提取物质量浓度、吸收部位以及 P-糖蛋白 (P-gp) 对丹参素和原儿茶醛吸收的影响, 以 HPLC 法分别测定丹参素和原儿茶醛。**结果** 在灌流体积流量 0.2~0.8 mL/min, 随着灌流体积流量的增大, 丹参素和原儿茶醛的吸收速率常数 (K_a) 和表观吸收系数 (P_{app}) 均呈线性增大; 在考察 pH 值为 7.4、6.8、5.5 时, 供试液的 pH 值对丹参素和原儿茶醛的吸收有显著影响 ($P < 0.05$), 丹参素和原儿茶醛的 K_a 和 P_{app} 均随 pH 值的降低而升高, pH 5.5 和 pH 6.8 的吸收无显著差异, 而 pH 5.5 与 pH 7.4 吸收有显著差异 ($P < 0.05$); 胆管结扎组与不结扎组的丹参素和原儿茶醛的 K_a 和 P_{app} 均无显著差异; 在不同吸收部位, 丹参素的 K_a 和 P_{app} 分别按照十二指肠、空肠、回肠和结肠的顺序依次下降, 原儿茶醛则下降趋势不明显, 全肠段都有很好的吸收; 在丹参提取物质量浓度 0.8、1.5、2.2 mg/mL 时小肠中丹参素的 K_a 和 P_{app} 随质量浓度升高而降低, 而原儿茶醛吸收参数则无明显变化; 含 P-gp 抑制剂组与不含 P-gp 抑制剂组相比, 丹参素和原儿茶醛的 K_a 和 P_{app} 均无显著差异。**结论** 灌流体积流量对丹参素和原儿茶醛的吸收有显著影响; 随着 pH 值的降低, 丹参素和原儿茶醛的吸收增加; 胆管结扎与否对吸收没有显著影响; 丹参素和原儿茶醛在整个肠段都有一定吸收, 丹参素在肠上端吸收要比下端好; 随着丹参提取物质量浓度的增大, 原儿茶醛的 K_a 和 P_{app} 无明显变化, 故其在肠道的吸收呈一级动力学过程, 推测其吸收机制为被动扩散; 而丹参素的 K_a 和 P_{app} 有明显减小的趋势, 推测其吸收机制除被动扩散外, 还可能主动吸收或易化扩散; 丹参素和原儿茶醛均不受 P-gp 的外排吸收影响。

关键词: 丹参提取物; 丹参素; 原儿茶醛; 单向灌流; 吸收动力学

中图分类号: R285.5; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0944-07

Rat intestinal absorption trait of danshensu and protocatechuic aldehyde in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract by single pass perfusion

PAN De-cheng¹, SUN Ting-ting¹, SUN Yong-bing², ZHANG Guo-song², RAO Xiao-yong², HE Shuang-feng², YANG Shi-lin², LUO Xiao-jian^{1,2}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: **Objective** To investigate the rat intestinal absorption kinetics of danshensu (DS) and protocatechuic aldehyde (PA) in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract. **Methods** *In situ* single pass intestinal perfusion model was employed to investigate the effects of perfusion rate, perfusion solution pH value, bile duct ligation, drug concentrations, absorption sites and P-glycoprotein (P-gp) on absorption of DS and PA, and perfusion volume was corrected by gravimetric method. Meanwhile, the concentration of DS and PA in the perfusate were determined by HPLC. **Results** The drug absorption constant (K_a) and apparent absorption coefficient (P_{app}) of DS and PA increased linearly along with the increasing perfusion rates among the ranges of 0.2—0.8 mL/min. pH value of perfusion solution affected drug absorption ($P < 0.05$), K_a and P_{app} of DS and PA decreased with increasing pH value at pH values of 7.4, 6.8, and 5.5. And at pH value of 5.5 and 6.8, the absorption had no significant difference, but there was significant difference at pH value between 5.5 and 7.4 ($P < 0.05$). There was no significant difference in K_a and P_{app} value between bile duct ligation group and no ligation group. At different absorption sites, K_a and P_{app} of DS in the duodenum, jejunum, ileum, and colon sequence have a downward

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (C0302050207); 江西省教育厅高校科技项目 (GJJ08324)

作者简介: 潘德城 (1987—), 男, 江西赣州人, 2009 级硕士研究生, 研究方向为中药新剂型。

Tel: (0791)7119617 E-mail: pandecheng1987@126.com

*通讯作者 罗晓健 Tel: (0791)7119619 E-mail: luoxj98@126.com

trend, but not for PA, while PA could be absorbed well at all intestinal segments. In the drug concentrations of 0.8, 1.5, and 2.2 mg/mL, K_a and P_{app} of DS decreased with higher concentrations, and PA absorption parameter has non-obvious changes. There was no significant difference in K_a and P_{app} between the presence of P-gp inhibitor and no P-gp inhibitor. **Conclusion** Perfusion rate and pH value have significant influence on absorption of DS and PA. Two water-soluble ingredients could be absorbed at all intestinal segments and DS has better absorption at former intestinal segments. The concentration of the extract has no influence on its absorption parameters of PA, which preliminarily demonstrates that PA is absorbed by passive diffusion mechanism. However, absorption of DS is affected by concentration, indicating that in addition to passive diffusion, it may also have active absorption or facilitation diffusion in absorption process of DS. Moreover, two ingredients are not affected by P-gp efflux.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract; danshensu (DS); protocatechuic aldehyde (PA); single pass perfusion; absorption kinetics

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎, 含有丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A、丹酚酸 B、原儿茶酸和迷迭香酸及其甲酯等成分^[1-2], 具有改善微循环、抗氧化、抗凝、降血压和抗血栓等药理作用^[2-4], 临床常用于冠心病、心绞痛等症的治疗。口服给药时, 肠道是药物吸收的主要部位, 因此研究药物在肠道的吸收情况对于明确药物在体内的作用途径及吸收机制具有重要意义。目前关于丹参中活性成分的单体在肠道吸收情况的研究已有报道^[5-9], 但研究这些活性成分在化学成分复杂的提取物中的肠吸收机制的较少, 而这种研究更符合药物真实的吸收情况。本实验采用大鼠在体单向灌流模型^[10-12], 通过稳定性预试验, 选取丹参素、原儿茶醛作为指标成分, 研究其在大鼠肠吸收情况, 以期对丹参新制剂的研发提供生物药剂学依据。

1 仪器与材料

LEAD—1 型电子蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司); Agilent 1100 型高效液相色谱仪、二极管阵列检测器(DAD)(美国惠普公司); 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); AL104 分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

丹参素对照品(批号 110855-200507)、原儿茶醛对照品(批号 110810-200506), 中国药品生物制品检定所; 丹参药材购于安徽亳州中正中药饮片有限公司, 经江西中医学院龚千峰教授鉴定为正品。

Kreb-Ringer's 营养液(K 氏液, 每 1 L 含 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、CaCl₂ 0.37 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、NaHCO₃ 1.37 g、MgCl₂ 0.02 g、葡萄糖 1.4 g), 生理盐水(批号 06111613, 开开援生制药股份有限公司), 戊巴比妥钠(批号 020919, 北京化学试剂公司)。

雄性 SD 大鼠, 体质量(210±20) g, 江西中医学院清洁级实验动物中心提供, 合格证号:

SCXXK(赣) 2005-0001。

2 方法与结果

2.1 丹参提取物的制备

取丹参药材约 100 g, 加水 500 mL, 煎煮 2 次(1.5、1 h), 合并煎液, 滤过, 滤液减压浓缩至含生药 1.3 g/mL, 加乙醇使其体积分数为 70%, 冷藏(4℃) 24 h, 滤过, 减压回收乙醇, 浓缩至含生药 2.5 g/mL, 再加乙醇, 使乙醇体积分数达 85%, 冷藏 24 h, 滤过, 减压回收乙醇, 加水至 200 mL, 冷藏 24 h, 滤过, 喷雾干燥, 收集干粉备用。精密称取喷干物 30 mg, 置于 25 mL 量瓶中加水溶解, 并稀释至刻度, 按照“2.2”项下色谱条件, 测得喷干粉中丹参素、原儿茶醛的质量分数分别为 4.03%、1.06%。

2.2 丹参素、原儿茶醛的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS₂ C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 大连依利特分析仪器有限公司); 流动相为水-甲醇-二甲基甲酰胺-冰醋酸(90:4:4:2); 柱温 35℃; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 280 nm; 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品储备液的制备 精密称取丹参素对照品 7.14 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用 K 氏液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 71.4 μg/mL 丹参素对照品储备液。精密称取原儿茶醛对照品 5.32 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用 K 氏液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 212.8 μg/mL 原儿茶醛对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 收集大鼠灌流 6 h 后的空白肠灌流液, 以此肠灌流液配制质量浓度为 1.5 mg/mL 的丹参提取物溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.2.4 专属性试验 分别取丹参素对照品溶液、原儿茶醛对照品溶液、供试品溶液及空白肠灌流液依法测定, 色谱图见图 1。丹参素和原儿茶醛的保留时间分别为 8.6 min 和 15.6 min, 供试品溶液主峰保

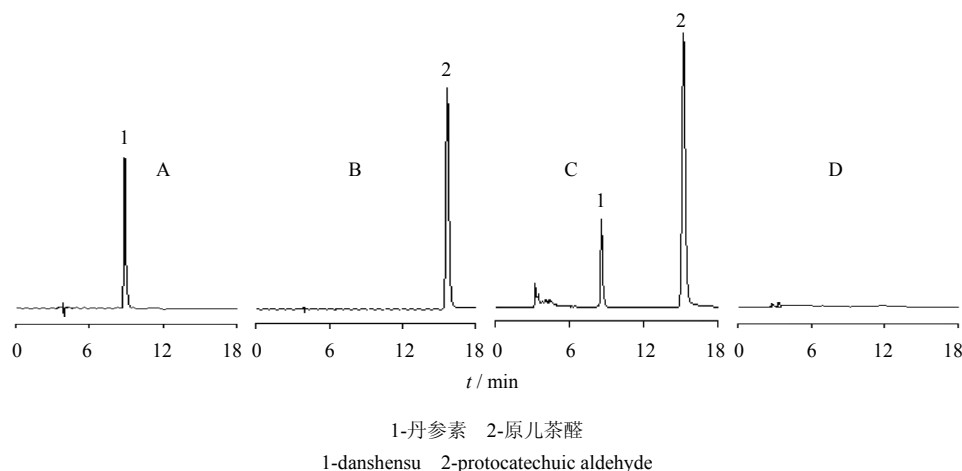


图1 丹参素对照品(A)、原儿茶醛对照品(B)、供试品(C)和空白肠灌流液(D)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of DS (A), PA (B), sample (C), and blank intestinal perfusate (D)

留时间与对照品溶液一致, 空白灌流液无干扰。

2.2.5 线性关系的考察 分别精密量取丹参素对照品储备液和原儿茶醛对照品储备液 0.25、0.5、1、2、4、8 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 K 氏液稀释并定容至刻度, 分别得到一系列质量浓度的丹参素和原儿茶醛对照品溶液。各进样 10 μ L, 测定, 分别以峰面积积分值对对照品质量浓度进行线性回归, 得回归方程: 丹参素 $Y=725.73X+0.6667$ ($R^2=0.9993$), 表明丹参素在 1.8~57.1 μ g/mL 线性关系良好; 原儿茶醛 $Y=5904.6X-28.071$ ($R^2=0.9999$), 表明原儿茶醛在 5.32~170.2 μ g/mL 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 分别精密称取丹参素对照品和原儿茶醛对照品适量, 用空白肠灌流液稀释至不同倍数, 得高、中、低 (丹参素依次为 7.14、14.28、29.54 μ g/mL; 原儿茶醛依次为 21.17、42.98、84.42 μ g/mL) 3 个质量浓度的对照品溶液, 于 1 d 中不同时间取样, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 进样 10 μ L, 测定, 以 1 d 内测定的 5 次结果计算精密度。计算得丹参素峰面积的 RSD 分别为 3.70%、1.18%、1.82%; 原儿茶醛峰面积的 RSD 分别为 2.93%、1.47%、2.21%。

2.2.7 回收率试验 分别精密称取丹参素和原儿茶醛对照品适量, 先用 1%冰醋酸溶解, 定容至 25 mL。精密吸取 1 mL, 用空白肠灌流液稀释至不同倍数, 得高、中、低 3 个质量浓度 (丹参素依次为 7.14、14.28、29.54 μ g/mL; 原儿茶醛依次为 21.17、42.98、84.42 μ g/mL) 的供试品溶液, 各依法测定 3 次, 计算回收率。丹参素和原儿茶醛的平均回收率分别为 101.39%、100.05%, RSD 分别为 2.17%、2.23%。

2.2.8 稳定性试验 分别用 K 氏液和空白肠灌流液配制 1.5 mg/mL 的丹参提取物溶液各 3 份, 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 6 h, 分别于 1、2、3、4、5、6 h 取样, 进行 HPLC 分析, 在 K 氏液和空白肠灌流液中计算得丹参素峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.4%; 原儿茶醛峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.6%。表明在 37 $^{\circ}$ C 水浴中放置 6 h, 样品中丹参素和原儿茶醛基本稳定 (RSD<2%)。

2.3 大鼠在体单向灌流肠吸收^[13]

2.3.1 手术方法 实验前用供试液将管路 (不包含被考察肠段) 饱和一段时间, 直至出口药液质量浓度与供试液质量浓度相等, 以消除实验过程中管路对药物的吸附作用。将禁食一夜 (自由饮水) 的大鼠称定质量, ip 戊巴比妥钠 (剂量为 0.4 mg/kg), 麻醉后加以固定。沿腹中线打开腹腔 (长约 3 cm)。分离出待考察的肠段, 取约 10 cm 于两端切口, 于切口处插管 (出口液插管约 3 cm), 结扎, 并用 37 $^{\circ}$ C 预热的生理盐水轻缓地将肠内容物冲洗干净。将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿, 在红外灯下对大鼠保温。将大鼠连接到灌流装置中。

2.3.2 操作方法 进口处用已测定质量的装有供试液的小瓶进行灌流, 开动蠕动泵, 体积流量 0.2 mL/min, 每隔 15 min 在出口处用另一已测定质量的小瓶收集一次 (同时更换下一个供试液小瓶和收集液小瓶), 称量此时供试液小瓶和收集液小瓶的质量, 并测定丹参素、原儿茶醛的质量浓度。实验持续时间为 105 min (15 min $\times$ 7)。最后将大鼠处死, 剪下被灌流的肠段, 测量其长度和直径。

2.3.3 数据处理^[7] 净水流量 (NWF)、药物吸收速

率常数 (K_a)、药物表观吸收系数 (P_{app}) 的计算如下:

$$NWF = (Q_{in} - Q_{out}) / l$$

$$K_a = [1 - C_{out}Q_{out} / (C_{in}Q_{in})] \times Q / V$$

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

Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积 (mL, 假设进出口灌流液的密度均为 1.0 mg/mL); l 和 r 分别为被灌流肠段的长度 (cm) 和横截面半径 (cm); Q 为灌流体积流量 (约 0.2 mL/min), V 为灌流肠段的体积 (cm^3)

根据 Grubbs 法对每组数据中获得的 7 个 K_a 和 P_{app} 值进行偶然误差值的取舍, 取舍后必须保证 3 个以上的 K_a 和 P_{app} 值无显著误差, 最终的 K_a 和 P_{app} 值分别为这几个相近值的平均值。Grubbs 法-G 检验法检验步骤如下: a) 算出包括可疑值在内的平均值; b) 计算可疑值与平均值之差; c) 算出包括可疑值在内的标准偏差 S ; d) 用标准偏差除可疑值与平均值之差, 得 G 值: $G = |X_{可疑} - \bar{X}| / S$; e) 查 G 的临界值表, 若计算的 G 值大于表中查到的临界值, 就可以把可疑值舍弃。

2.4 不同灌流体积流量下丹参素和原儿茶醛的肠吸收情况

将 8 只大鼠随机分成两组, 以小肠 (约为 10 cm) 为灌流部位, 供试液药物质量浓度 (以丹参提取物计) 为 1.5 mg/mL, pH 值 6.8, 灌流体积流量分别为 0.2、0.4、0.8 mL/min。第 1 组灌流体积流量从 0.2 mL/min 逐渐升至 0.8 mL/min; 第 2 组灌流体积流量从 0.8 mL/min 逐渐降至 0.2 mL/min。每次灌流体积流量更换前用 10 mL 供试液对肠道进行清洗, 每种灌流体积流量下持续时间 45 min (15 min $\times$ 3), 用质量法计算 K_a 和 P_{app} , 比较不同灌流体积流量下药物吸收的 K_a 和 P_{app} 值。

由图 2、3 可知, 灌流体积流量对于丹参素和原儿茶醛的吸收参数均有显著影响 ($P < 0.05$)。随着灌流体积流量的增大, 这两种指标成分的 K_a 和 P_{app} 均呈线性增大, 线性方程分别为: 丹参素 K_a $Y = 13.511 X - 2.365$, $R^2 = 0.984 4$; 原儿茶醛 K_a $Y = 11.686 X - 1.76$, $R^2 = 0.987 6$; 丹参素 P_{app} $Y = 18.9 X - 3.41$, $R^2 = 0.982 6$; 原儿茶醛 P_{app} $Y = 16.189 X - 2.545$, $R^2 = 0.985 9$ 。灌流体积流量在一定程度上代表了肠道的蠕动状态, 因此任何影响肠道蠕动状态的因素都可能影响药物在肠道的吸收。为了减少试验误差, 在本实验过程中, 灌流体积流量固定为 0.2 mL/min。

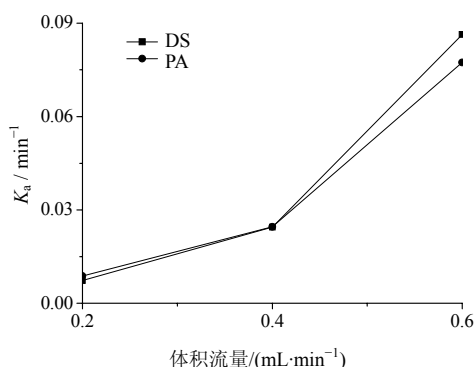


图2 灌流体积流量对丹参素和原儿茶醛 K_a 的影响

Fig. 2 Effect of perfusion flow rate on K_a of DS and PA

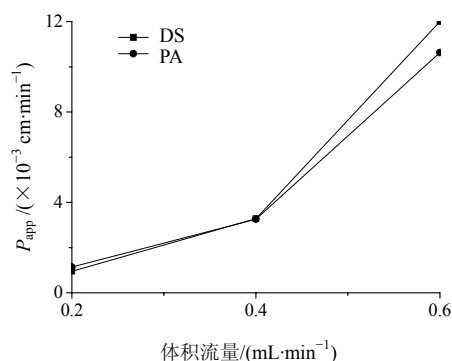


图3 灌流体积流量对丹参素和原儿茶醛 P_{app} 的影响

Fig. 3 Effect of perfusion flow rate on P_{app} of DS and PA

2.5 丹参素和原儿茶醛在不同 pH 值灌流液中的吸收情况

用稀盐酸和稀氢氧化钠调节供试液的 pH 值分别为 7.4、6.8、5.5, 供试液质量浓度 (以丹参提取物计) 1.5 mg/mL, 以小肠 (约 10 cm) 为灌流部位, 体积流量 0.2 mL/min, 每种 pH 值条件下实验持续 105 min (15 min $\times$ 7), 用质量法计算 K_a 和 P_{app} , 比较 3 种不同 pH 值条件下药物在小肠吸收的 K_a 和 P_{app} 值, 结果见表 1。经 ANOVA 分析表明, 在考察 pH 值范围内, 供试液的 pH 值对药物吸收有显著影响 ($P < 0.05$), 丹参素和原儿茶醛的 K_a 和 P_{app} 均随 pH 值的降低而升高, pH 5.5 与 pH 6.8 的吸收无显著差异, 而 pH 5.5 与 7.4 的吸收差异显著 ($P < 0.05$)。

2.6 胆管结扎对丹参素和原儿茶醛小肠吸收的影响

以小肠 (约为 10 cm) 为灌流部位, 供试液药物质量浓度 (以丹参提取物计) 为 1.5 mg/mL, 灌流体积流量 0.2 mL/min, pH 值 6.8, 比较胆管结扎与不结扎条件下小肠吸收的 K_a 和 P_{app} 值, 每组实验持续 105 min (15 min $\times$ 7), 用质量法计算 K_a 和 P_{app} , 结果见表 2。经 ANOVA 分析表明, 胆管结扎组与

表1 丹参素和原儿茶醛在不同 pH 值灌流液中的吸收参数比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 1 Comparison on absorption parameters of DS and PA at different pH values of perfusion solutions ($\bar{x} \pm s, n=4$)

pH 值	丹参素		原儿茶醛	
	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
7.4	0.019 9 $\pm$ 0.007 7	1.85 $\pm$ 0.79	0.063 5 $\pm$ 0.011 9	6.33 $\pm$ 1.04
6.8	0.034 1 $\pm$ 0.006 9	3.60 $\pm$ 0.99	0.087 9 $\pm$ 0.009 5	10.92 $\pm$ 1.25
5.5	0.044 5 $\pm$ 0.014 3	4.47 $\pm$ 1.40	0.114 1 $\pm$ 0.034 6	13.29 $\pm$ 4.06

表2 胆管结扎与否对丹参素和原儿茶醛小肠吸收参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 2 Effect with and without bile duct being ligated on intestinal absorption parameters of DS and PA ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组 别	丹参素		原儿茶醛	
	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
胆管不结扎	0.055 0 $\pm$ 0.013 6	4.75 $\pm$ 1.45	0.145 0 $\pm$ 0.016 0	14.91 $\pm$ 3.12
胆管结扎	0.051 0 $\pm$ 0.006 3	4.43 $\pm$ 0.30	0.137 8 $\pm$ 0.039 6	14.03 $\pm$ 3.78

不结扎组的丹参素和原儿茶醛小肠吸收参数均无显著差异,说明胆管结扎与否对丹参素和原儿茶醛小肠吸收没有显著影响,提示丹参素和原儿茶醛小肠吸收可能不受胆汁排泄与分泌的影响,且不存在肝肠循环。

2.7 丹参素和原儿茶醛在不同吸收部位的吸收情况

各肠段区间如下:十二指肠段(自幽门下 1 cm 处开始往下 10 cm 止),空肠段(自幽门下 15 cm 起往下 10 cm 止),回肠段(自盲肠上行 20 cm 处开始往下 10 cm 止),结肠段(盲肠后端开始往下 10 cm 止),整肠段(自十二指肠上端起至回肠下端起止)。

以 1.5 mg/mL 的丹参提取物溶液对各肠段灌流,体积流量 0.2 mL/min, pH 值 6.8。将各段上的插管分别接上恒流泵,每个肠段试验持续 105 min (15 min $\times$ 7),用质量法计算 K_a 和 P_{app} ,比较各肠段药物吸收的 K_a 和 P_{app} 值,结果见表 3。经 ANOVA 分析表明,对于丹参素, K_a 和 P_{app} 在十二指肠和空肠没有显著差异,其他各肠段之间均有显著差异 ($P<0.05$),吸收按照十二指肠、空肠、回肠和结肠

的顺序依次下降,丹参素的肠上端吸收要比下端好;而原儿茶醛在各肠段均有良好的吸收,不存在吸收特异性部位。

2.8 不同质量浓度丹参提取物对丹参素和原儿茶醛小肠吸收的影响

采用 K 氏液配制质量浓度分别为 0.8、1.5、2.2 mg/mL 的供试液(以丹参提取物计)。以小肠为灌流部位,灌流体积流量 0.2 mL/min, pH 值 6.8,每种质量浓度试验持续 105 min (15 min $\times$ 7),用质量法计算 K_a 和 P_{app} ,比较低、中、高 3 种质量浓度下丹参素和原儿茶醛在小肠吸收的 K_a 和 P_{app} 值,结果见表 4。经 ANOVA 分析表明在考察质量浓度范围内,原儿茶醛在小肠吸收的 K_a 和 P_{app} 无明显变化,提示其主要以被动扩散机制吸收进入体循环;而丹参素的 K_a 和 P_{app} 均随其质量浓度的升高而降低,即丹参素在小肠的吸收有自身浓度抑制作用,考虑其吸收机制除被动扩散外,还可能有主动转运或易化扩散。

2.9 P-糖蛋白(P-gp)对丹参素和原儿茶醛小肠吸收的影响

表3 丹参素和原儿茶醛在不同肠段的吸收参数比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 3 Comparison on absorption parameters of DS and PA in different segments of intestine ($\bar{x} \pm s, n=4$)

吸收部位	丹参素		原儿茶醛	
	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	0.044 1 $\pm$ 0.018 3	3.80 $\pm$ 1.20	0.135 2 $\pm$ 0.040 4	13.43 $\pm$ 2.59
空肠	0.034 6 $\pm$ 0.003 7	3.38 $\pm$ 0.70	0.088 5 $\pm$ 0.028 7	10.61 $\pm$ 3.60
回肠	0.013 9 $\pm$ 0.005 9	1.24 $\pm$ 0.40	0.106 3 $\pm$ 0.004 6	10.96 $\pm$ 1.47
结肠	0.008 2 $\pm$ 0.002 1	0.73 $\pm$ 0.24	0.090 1 $\pm$ 0.013 8	9.11 $\pm$ 1.75

表 4 灌流液中丹参提取物浓度对丹参素和原儿茶醛小肠吸收参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 4 Effect of extract concentration in perfusion on intestinal absorption parameters of DS and PA ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

提取物/(mg·mL ⁻¹)	丹参素		原儿茶醛	
	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
0.8	0.031 5 ± 0.007 5	2.66 ± 0.67	0.086 2 ± 0.026 6	8.26 ± 2.46
1.5	0.018 8 ± 0.008 1	1.89 ± 0.72	0.082 3 ± 0.024 4	9.68 ± 2.54
2.2	0.009 3 ± 0.005 9	1.28 ± 0.14	0.091 6 ± 0.029 6	9.37 ± 2.40

P-gp 是肠细胞上的转运蛋白 (也称“药物溢出泵”), 它可将其底物药物从肠上皮细胞转运回至肠腔而阻碍药物吸收。以盐酸维拉帕米作为 P-gp 抑制剂, 配制含 0.5 mmol/L 维拉帕米的供试液组和不含维拉帕米的空白供试液组, 其质量浓度 (以丹参提取物计) 均为 1.5 mg/mL, 以小肠 (约 10 cm) 为灌流部位, 体积流量 0.2 mL/min, pH 值 6.8, 进行灌

流, 每组试验持续 105 min (15 min × 7), 用质量法计算 K_a 和 P_{app} , 结果见表 5。经 ANOVA 分析表明, 不加维拉帕米组和加维拉帕米组丹参素和原儿茶醛的小肠吸收参数 K_a 和 P_{app} 值无显著差异 (表 5), 说明 P-gp 对丹参素和原儿茶醛基本无外排作用, 对其吸收没有显著影响, 丹参素和原儿茶醛不是 P-gp 的底物。

表 5 P-gp 对丹参素和原儿茶醛小肠吸收的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)表 5 Effect of P-gp on intestinal absorption parameters of DS and PA ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组 别	丹参素		原儿茶醛	
	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	K_a/min^{-1}	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
不加维拉帕米	0.052 9 ± 0.008 4	4.80 ± 0.76	0.132 1 ± 0.020 6	13.94 ± 2.35
加维拉帕米	0.057 4 ± 0.011 5	5.32 ± 1.24	0.113 9 ± 0.003 1	12.58 ± 1.97

3 讨论

与传统的“在体循环法”^[14]相比, 单向灌流法的实验条件与口服给药后药物接触的肠道环境更接近, 因为口服给药后溶解的药物并不存在肠内循环过程。文献报道^[15]健康志愿者体内肠灌流技术中多采用灌流体积流量 2~3 mL/min, 由于大鼠肠道直径约为人体肠道直径的 1/10, 因而选用较低灌流体积流量的单向灌流法比在体循环法更能符合人体的实际情况。由于该方法的灌流时间只有十几分钟, 可以避免一些相对不稳定药物由于在肠道内较长时间循环含量降低而对吸收结果造成的干扰。

肠的吸收过程中, 不仅吸收药物, 也吸收或分泌水分, 导致供试液体积发生变化, 故不能用直接测定药物质量浓度的方法计算剩余的药量。目前多采用肠道不吸收的酚红作为灌流液体积的标识物。然而, 在长时间的灌流过程中, 酚红也存在一定程度的肠吸收, 另外酚红本身还可能干扰某些化合物在肠道的转运和分析测定。本实验采用的质量法^[15]不涉及“标识物”的测定, 避免了空白灌流液给紫外吸收带来的干扰, 数据更精确, 与传统的酚红法相比大大减少了工作量。

HPLC 法同时测定制剂中丹参素、原儿茶醛已有报道^[16]。经对比, 选用水-甲醇-二甲基甲酰胺-冰醋酸 (90:4:4:2) 为流动相。丹参素分子结构中有邻二酚羟基, 易被氧化成苯醌而变色, 其水溶液不稳定, 宜现配现用。用 1%冰醋酸制备的对照品溶液, 质量浓度在 3 周内基本不变。采用本实验所建立的色谱条件亦可同时测定丹参提取物中丹酚酸 B 的量, 但预试验表明丹酚酸 B 在结肠灌流液中不稳定, 2 h 降低 30%。故本实验选取在肠灌流液中相对稳定的丹参素和原儿茶醛作为检测丹参提取物肠吸收的指标成分。

实验结果表明, 2 种指标成分均随供试液 pH 值的降低而呈现吸收增加的趋势, 这符合 pH 分配假说^[17]。丹参素和原儿茶醛均属于弱酸性物质, 当 pH 值降低时其解离程度下降, 使分子型药物比例上升, 有利于药物透膜吸收。丹参素和原儿茶醛在全肠段均有一定吸收, 丹参素在小肠的吸收随提取物质量浓度的增大而减小, 这可能与丹参提取物中丹酚酸 B 等物质的结构有关。丹酚酸 B 为丹参素的四聚体, 且不稳定, 很可能在消化酶等的作用下分解为丹参素, 从而使得经过肠道吸收后的灌流液中丹参素的

质量浓度增大;也可能是由于其吸收有自身质量浓度的抑制作用,故考虑其在小肠的吸收机制可能为主动吸收或易化扩散。而原儿茶醛在小肠的吸收不受其质量浓度变化的影响,推测其在肠道的吸收机制为被动扩散,这与已报道的采用大鼠在体循环法测定的原儿茶醛的吸收机制一致^[7]。同时,两种成分都不受胆管结扎和 P-gp 外排的影响。

本研究采用大鼠在体单向灌流肠吸收实验与质量法相结合,操作简单,能迅速获取实验数据,是研究药物在肠道吸收的有效方法之一。本实验结果表明,丹参提取物中的 2 种水溶性成分在各肠段均有一定的吸收,为研究开发丹参新制剂提供了生物药剂学依据。

参考文献

- [1] 刘德茂,史德胜. 双丹口服液中丹酚酸 B 和丹参素的稳定性研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 102-104.
- [2] 赵娜,郭治昕,赵雪,等. 丹参的化学成分与药理作用 [J]. 国外医药:植物药分册, 2007, 22(4): 155-160.
- [3] 陈磊,陆茵,郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 476-479.
- [4] 赵广荣,田莉莉,王长松. 丹参素的抗癌活性研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 180-182.
- [5] 张向荣,潘卫三. 丹参酚酸 A 在大鼠小肠的吸收动力学研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(1): 14-16.
- [6] 水文波,贺庆,邵青,等. 高效液相色谱-质谱联用法研究丹酚酸 B 的大鼠小肠吸收 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(7): 545-547.
- [7] 江敏,张恩娟. 原儿茶醛大鼠小肠吸收机理的研究 [J]. 中国药房, 2003, 14(9): 528-530.
- [8] 袁媛,蒋学华,周静,等. 丹参酮 II_A 在大鼠体肠的吸收机理 [J]. 华西药理学杂志, 2002, 17(4): 246-248.
- [9] 毕惠嫦,关溯,陈孝,等. 隐丹参酮在小肠吸收机制的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2005, 21(2): 107-110.
- [10] Lane M E, Levis K A, Corrigan O I. Effect of intestinal fluid flux on ibuprofen absorption in the rat intestine [J]. *Int J Pharm*, 2006, 309(1/2): 60-66.
- [11] Jain R, Duvvuri S, Kansara V, et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, 336(2): 233-240.
- [12] 祝诚诚,何新. 药物肠道吸收研究方法 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 222-227.
- [13] 聂淑芳. 长春西汀包合物及其缓释制剂的设计与评价 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [14] 陆彬. 药剂学实验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [15] Armitage P, Hills M. The two-period crossover trial [J]. *The Statistician*, 1982, 31(2): 119-131.
- [16] 张雪,褚文静,刘伟娜,等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定冠心宁注射液中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B [J]. 中草药, 2010, 41(2): 234-236.
- [17] 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 Deliv Rev*, 1996, 19(3): 359-376.

天津中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《中草药》杂志、*Chinese Herbal Medicines* (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com