

· 药学研究 ·

大鼠在体单向肠灌注模型研究毛蕊异黄酮的吸收特征

周乐¹, 赵晓莉^{1,2*}, 狄留庆^{1,2}, 陈瑶¹

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 研究毛蕊异黄酮肠吸收动力学特征。方法 采用大鼠在体单向肠灌注模型, 以酚红为标示物, 研究毛蕊异黄酮在大鼠不同肠段的吸收特征。结果 毛蕊异黄酮在不同肠段均有吸收, 且在结肠段吸收最好, 不同浓度药物在结肠吸收中存在自身浓度抑制作用。结论 毛蕊异黄酮在小肠中吸收较好, 其吸收机制可能是主动转运。

关键词:毛蕊异黄酮; 单向肠灌注; 肠吸特征**中图分类号:** R283**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-0482(2014)02-0160-04

Study on Absorption Characteristics of Calycosin in Single-pass Intestinal Perfusion Models *in Vivo*

ZHOU Le¹, ZHAO Xiao-li^{1,2*}, DI Liu-qing^{1,2}, CHEN Yao¹

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Engineering Center of Jiangsu Province for Efficient Administration System of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the dynamic characteristics of intestinal absorption of calycosin using signal-pass perfusion model in rats. **METHODS** After one-way intestinal perfusion model of rat *in situ* was set up, by taking phenolsulfonphthalein a maker, the absorption characteristics of different intestinal segments. **RESULTS** Calycosin have a good stability separately in different intestinal segments and in the colon to absorb the best. Different concentrations of drug in the colon absorption in inhibition of its concentration. **CONCLUSION** Calycosin is well absorbed in the small intestine and calycosin absorption may active transport.

KEY WORDS: calycosin; rat single-pass intestinal perfusion; intestine absorption kinetics

毛蕊异黄酮为黄芪药材中黄酮类的代表性的活性成分之一, 目前对毛蕊异黄酮的研究报道多集中在其药理活性上, 包括抗疟原虫、保护血管内皮细胞、抗高血压、抗高血糖、神经保护作用、皮肤美白剂、增强造血功能、雌激素和治疗白血病等多种生物活性^[1-5], 但以毛蕊异黄酮为主要活性成分的药物剂型设计与研究开发尚未报导。

本文采用大鼠单向肠灌注模型研究毛蕊异黄酮的肠吸收特征, 以期为其口服制剂的研究开发提供生物药剂学依据。

1 材料

Waters e2695 高效液相色谱系统, PDA 检测器(美国 Waters 公司); FA1204B 电子分析天平(上海精密科学有限公司); UV-1100 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); BT00-300M 恒流蠕动

泵(保定兰格恒流泵有限公司); HH-2K2 恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司); pH-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器厂)。

毛蕊异黄酮对照品(纯度 98.5%, 四川维克奇公司, 批号: 120510); 毛蕊异黄酮提取物(上海源叶生物科技有限公司, 批号: 20120426); 酚红(上海试剂三厂); 水合氯醛(中国医药集团上海化学试剂公司); 乙腈(Merck 公司, 色谱纯), 甲酸(色谱纯), 其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠, 雌性, 体质量(250±30) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(沪)2007-0005。

2 方法

2.1 HPLC 的分析方法

2.1.1 色谱条件 Thermo C₁₈ (250 mm×4.6 mm,

收稿日期: 2013-10-25; **修稿日期:** 2014-02-10**基金项目:** 国家自然科学基金(81102825, 81073071, 81273655); 江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队支持计划[苏教师(2008)30 号]; 江苏省优势学科建设项目(YSXK-2010)**作者简介:** 周乐(1989—), 女, 江苏南京人, 南京中医药大学 2011 级硕士研究生。* 通信作者: xlee_zhao@163.com

5 μm)色谱柱;流动相:乙腈-0.1%甲酸水(45:55);流速:1.0 mL/min;检测波长:258 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

2.1.2 溶液配制 毛蕊异黄酮对照品储备液的配制:取毛蕊异黄酮对照品适量,精密称定,置于10 mL容量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为4 mg/mL的对照品储备液。

毛蕊异黄酮肠灌流液的配制:取毛蕊异黄酮提取物适量,加入含酚红的 Krebs-Ringer 溶液溶解制得浓度为4 mg/mL的供试品储备液。精密吸取上述供试品储备液,以含酚红的 K-R 试液为溶剂,分别制备质量浓度为5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的肠灌流供试液。

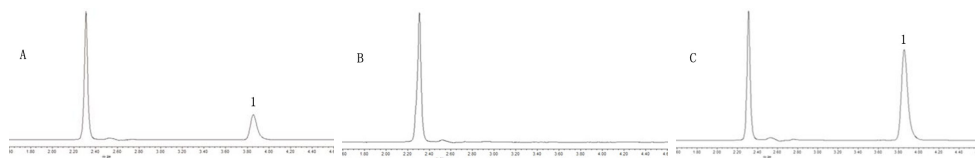
空白的 Krebs-Ringer 溶液的配制:称取 CaCl_2

0.37 g,葡萄糖 1.4 g,分别加少量蒸馏水使溶解,再称取 NaCl 7.8 g、 KCl 0.35 g、 NaHCO_3 1.37 g、 NaH_2PO_4 0.32 g、 MgCl_2 0.02 g,加蒸馏水溶解后与溶解的 CaCl_2 以及葡萄糖混匀,调节 pH 至 7.4,加蒸馏水定容至 1 000 mL。

酚红储备液的配制:取酚红适量,精密称定,置于 10 mL 的容量瓶中,加空白 Krebs-Ringer 溶液溶解并定容,得浓度为 3.02 mg/mL 的酚红 K-R 试液储备液。

2.2 方法学验证

2.2.1 专属性考察 按照 2.1.1 项下的色谱条件,样品与对照品在相应位置上有相似吸收峰,而空白溶液则无,表明杂质对测定无干扰。见图 1。



1.毛蕊异黄酮;A.毛蕊异黄酮对照品液;B.空白灌流液;C.肠灌流后的供试液;AB以空白灌流液为溶液制成。

图1 HPLC 色谱图

2.2.2 标准曲线及线性范围 分别精密吸取毛蕊异黄酮对照品储备液适量,各置 5 mL 量瓶中,加空白的 K-R 液稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液系列,高速离心,按 2.1.1 法进样测定,以质量浓度 C 为横坐标,峰面积 A 为纵坐标进行线性回归,得毛蕊异黄酮标准曲线方程。

分别精密吸取酚红储备液适量,各至 10 mL 量瓶中,加空白的 K-R 液稀释至刻度,摇匀,得到浓度为 10.04、20.08、30.01、40.01、50.01、60.04 $\mu\text{g/mL}$ 的酚红溶液系列。分别吸取 0.5 mL,加入 1 mol/L NaOH 溶液 5 mL,摇匀,以 1 mol/L NaOH 为空白,紫外分光光度法在 558 nm 处测定吸收度。以吸收度 A 对酚红浓度 C 进行线性回归,得酚红的标准曲线方程。

2.2.3 精密度与回收率实验 取浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊异黄酮对照品溶液,重复进样 6 次,记录峰面积,计算仪器精密度。

取浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊异黄酮供试液,加入相同质量的毛蕊异黄酮对照品溶液,混匀,高速离心,按 2.1.1 法进样测定,平行 5 份,计算平均回收

率。

2.3 毛蕊异黄酮在试验条件下的稳定性考察

2.3.1 毛蕊异黄酮在不同 pH HBSS 缓冲液中稳定性考察 采用盐酸和 NaOH 溶液调节 HBSS 缓冲液,用 pH 计测定 pH 值,分别为 6.05、7.43、8.02,配制毛蕊异黄酮低、中、高 3 个浓度(2.5、10、40 $\mu\text{mol/L}$)的供试液。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下放置,分别于 0、3 h 取样,测定毛蕊异黄酮的含量,计算降解残存百分率($n=3, \bar{x} \pm s$)。

2.3.2 毛蕊异黄酮在大鼠空白肠循环液中的稳定性考察 以正常大鼠空白肠循环液(pH 7.43)为溶剂,配制浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊异黄酮溶液,将盛装药液的具塞三角瓶置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中,分别于 0、3 h 取样,测定不同时间点药液中毛蕊异黄酮的含量,计算其降解残存百分率($n=3, \bar{x} \pm s$)。

2.3.3 肠壁对毛蕊异黄酮物理吸附的考察 手术剪取大鼠新鲜小肠段约 40 cm,剖开并用生理盐水冲净,置正常大鼠空白肠循环液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育,分别加入毛蕊异黄酮溶液,使终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{g/mL}$,分别于 0、3 h 取样,测定不同时间点药液中毛蕊异黄酮的含量,计算其降解残存百分率

($n=3, \bar{x} \pm s$)。

2.4 在体单向肠灌流试验

取禁食 12 h(自由饮水)的试验大鼠,按其体重注射 10%水合氯醛溶液麻醉并固定(3.4 mL/kg),沿腹中线打开腹腔约 3 cm,小心分离出待考察肠段,即十二指肠、空肠、回肠和结肠,取约 10 cm 于两端切口插管,结扎,用预热至 37 ℃的生理盐水缓缓将肠内容物冲洗干净,再用空气将生理盐水排净,连接好恒流蠕动泵。实验时取不同浓度的毛蕊异黄酮供试液(预热至 37 ℃)200 mL,先以 1.0 mL/min 的流速灌流 10 min 以排除肠内气泡,再将流速调为 0.2 mL/min,开始计时,预平衡 30 min 后,于 30~60、60~90、90~120、120~150 min 时间段收集灌流液样品。最后将大鼠处死,剪取各个被灌流的肠段,准确测量其长度及肠内径。

将收集的灌流样品高速离心(14 000 r/min, 10 min),取上清液,部分用于测定酚红浓度,另一部分按照 2.1.1 进样测定,计算各个时间段灌流液样品中毛蕊异黄酮的含量。采用上述实验方法考察毛蕊异黄酮在不同肠段的吸收特征及不同药物浓度对吸收的影响。

2.5 灌流液体积的校正及数据分析

本实验采用酚红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。在体大鼠单向肠灌流试验中所测得的出口处的样品的浓度用如下公式校正:

$$C_{out}(\text{corrected}) = \frac{C_{out}PR_{in}}{PR_{out}}$$

毛蕊异黄酮的有效渗透系数 P_{eff} , 吸收速率参数 K_a 用如下公式计算:

$$P_{eff} = \frac{Q \ln(C_{in}/C_{out}(\text{corrected}))}{2\pi rL}$$

$$K_a = (1 - \frac{C_{out}(\text{corrected})}{C_{in}})Q/\pi r^2 L$$

式中: $C_{out}(\text{corrected})$ 和 C_{out} 分别为出口处经校正后的毛蕊异黄酮的浓度和实际测得的毛蕊异黄酮的浓度; C_{in} 灌流液中毛蕊异黄酮的浓度; PR_{in} 、 PR_{out} 分别为入口处和出口处酚红的浓度; Q 为肠道灌流液的流速; L 和 r 分别为被灌流肠段的长度和内径。

肠吸收数据处理后用统计软件 SPSS 16.0 进行 Q 检验分析,当 $P < 0.05$ 时,判定具有显著性差异,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.6 结果

2.6.1 方法学验证 毛蕊异黄酮的标准曲线方程

为: $Y=41\,228X+386.24$, $r=0.999\,9$,表明毛蕊异黄酮在 1.25~40 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。酚红标准曲线方程: $Y=0.014\,2X+0.036\,6$, $r=0.999\,9$,表明酚红在 10.04~60.04 mg/mL 范围内线性关系良好。精密密度为 1.12% ($n=6$)。毛蕊异黄酮在的平均回收率为 98.78%, $RSD=0.81\%$ ($n=5$)。

2.6.2 毛蕊异黄酮在实验条件下的稳定性

高、中、低 3 个浓度(2.5、7、20 $\mu\text{g/mL}$)的毛蕊异黄酮溶液在 pH 分别为 6.05、7.43、8.02, 37 ℃水浴条件下放置,结果表明毛蕊异黄酮在 3 种 pH 条件下均较稳定,为了更好的模拟人肠道环境,本实验将 pH 值设定为 7.43。

高、中、低 3 个浓度(2.5、7、20 $\mu\text{g/mL}$)的毛蕊异黄酮溶液在 pH 为 7.43 的 37 ℃空白大鼠肠循环液中放置 3 h 后,其降解残存百分率分别为(98.56±0.76)%, (99.59±0.31)%, (99.29±0.30)%,结果表明毛蕊异黄酮在大鼠单向灌流实验的 3 h 过程中在肠灌流液中的稳定性良好。

高、中、低 3 个浓度(2.5、7、20 $\mu\text{g/mL}$)的毛蕊异黄酮溶液在 pH 为 7.43 的肠循环液中, 37 ℃与小肠壁共孵育 3 h 后,其降解残存百分率分别为(99.06±0.45)%, (99.57±0.37)%, (99.44±0.29)%,结果表明大鼠肠壁对毛蕊异黄酮仅有极少量的物理吸附,并不影响实验。

2.6.3 毛蕊异黄酮在不同肠段的吸收参数

采用浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊异黄酮溶液单向灌流大鼠各个肠段,考察不同肠段吸收速率常数和表观渗透系数,结果见表 1。毛蕊异黄酮在全肠段都有不同程度的吸收,其中在不同肠段中 K_a 大小顺序是结肠>空肠>十二指肠>回肠, P_{eff} 大小顺序是结肠>空肠>十二指肠>回肠,方差分析结果表明,毛蕊异黄酮在结肠段的吸收速率和渗透性显著高于其他肠段($P < 0.05$),十二指肠、空肠、回肠之间无显著性差异。

表 1 毛蕊异黄酮在不同肠段的吸收参数($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

肠段	$K_a \times 10^{-4} / \text{s}^{-1}$	$P_{eff} \times 10^{-5} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
十二指肠	1.33±0.02	1.69±0.03
空肠	1.66±0.02	1.94±0.02
回肠	1.19±0.01	1.33±0.01
结肠	4.91±0.03*	5.81±0.04*

注:结肠与其他肠段比较, * $P < 0.05$ 。

2.6.4 不同浓度的毛蕊异黄酮在大鼠小肠内的变化规律

用肠空白灌流液分别配制高、中、低 3 种

不同浓度的毛蕊异黄酮溶液(5、10、20 $\mu\text{g/mL}$),按2.4方法对结肠段灌流,收集灌流液进样测定,分别计算 K_a 和 P_{eff} 值,数据见表2,分析结果表明毛蕊异黄酮在5~20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,其吸收速率常数和表观渗透系数有差异,表明毛蕊异黄酮在大鼠小肠内吸收有自身浓度抑制作用,在此浓度范围内可能以主动转运吸收进入体循环。

表2 不同浓度的毛蕊异黄酮在结肠段的
吸收参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$K_a \times 10^{-4}/\text{s}^{-1}$	$P_{\text{eff}} \times 10^{-5}/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
5	$5.39 \pm 0.03^*$	$6.33 \pm 0.02^*$
10	4.91 ± 0.03	5.81 ± 0.04
20	3.17 ± 0.04	3.87 ± 0.05

注:最低浓度与最高浓度比较, * $P<0.05$ 。

3 讨论

小肠的吸收过程,不仅吸收药物也吸收水分,因此供试液的体积会随着实验的时间的增长减小,故不能用直接计算药物浓度的方法计算剩余药量。本实验采用在肠道生理 pH 条件下不被肠道吸收的酚红来标定灌流液的体积,能更为准确地计算剩余药量。此外,在体单向肠灌流实验中采用了较低的灌流速度(0.1~0.2 mL/min)和较短的灌流时间,减小了灌流对肠壁的损伤,避免了酚红被吸收,使酚红可以很好地起到标示体积的作用。

本实验采用的大鼠在体单向肠灌流模型是目前研究药物口服吸收特征的一种重要方法,它相对于体外模型,能够保障肠道神经、内分泌等功能的正常

进行,在一定程度上代表了肠道的自然生理状态。但运用此模型可能会受到动物的个体差异及肠道中存在的菌群及代谢酶对药物的影响,因此,要想更全面、深入的揭示药物的吸收特征,还应结合专属性较高、重现性较好的 Caco-2 细胞等体外吸收模型进行研究,本课题采用 Caco-2 细胞模型研究毛蕊异黄酮吸收特征的文章将于后续报道。

参考文献:

[1] Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, et al. Antiplasmodial activity of isoflavones from Andira inermis[J]. J Ethnopharmacol, 2000, 73:131-135.

[2] Fan Y, Wu DZ, Gong YQ, et al. Effects of calycosin on the impairment of barrier function induced by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells[J]. European J Pharmacol, 2003, 481:33-40.

[3] Wu XL, Wang YY, Cheng J, et al. Calcium channel blocking activity of calycosin, a major active component of Astragali Radix, on rat aorta[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2006, 27(8): 1007-1012.

[4] Ma W, Nomura M, Takahashi-Nishioka T, et al. Combined effects of fangchinoline from Stephania tetrandra Radix and formononetin and calycosin from Astragalus membranaceus Radix on hyperglycemia and hypoinsulinemia in streptozotocin-diabetic mice[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(11) 2079-2083.

[5] Hoo RL, Wong JY, Qiao C, et al. The effective fraction isolated from Radix Astragali alleviates glucose intolerance, insulin resistance and hypertriglyceridemia in db/db diabetic mice through its anti-inflammatory activity[J]. Nutrition Metabolism, 2010, 7:67.

(编辑:董宇)

• 投稿须知 •

标题、作者、单位和脚注 来稿列出标题、作者姓名、工作单位(二级单位)、地名(省市、县)及邮政编码。论文署名不宜过多,应限于对该文能负责并解答有关问题者。不同工作单位的作者,应在姓名右上角加注阿拉伯数字序号,并在工作单位名称之前加与作者姓名序号相同的序号;通信作者应加注“*”号上标。

首页脚注中注明[基金项目](注明项目名称及编号)、[作者简介](第一作者出生日期、性别、籍贯、职称、学历等)、[通信作者](Tel, Fax 或 E-mail)。

• 启事 •

本刊欢迎广大作者网上注册投稿

网址: <http://xb.njutcm.edu.cn>