

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01288

水飞蓟宾磷脂复合物大鼠肠吸收特性

杨秋霞¹, 马福家², 张兰兰³, 陈建明^{1*}

1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

2. 解放军第455医院药剂科, 上海 200052

3. 天士力现代中药研究所, 天津 300402

[摘要] **目的:** 考察水飞蓟宾磷脂复合物在大鼠全小肠段及各分肠段的吸收。**方法:** 运用大鼠在体肠灌注实验, 采用高效液相色谱法测定肠灌注液中药物和酚红的浓度, 以吸收百分率和肠壁通透系数为指标, 考察水飞蓟宾磷脂复合物的肠吸收特性和肠壁通透性。**结果:** 水飞蓟宾磷脂复合物在小肠中的吸收呈一级动力学特征, 6 h时在肠道中约有70%被吸收, 吸收速率常数 K_a 值为 $(0.193 \pm 0.012) \text{ h}^{-1}$; 分肠段实验中, 各肠段(十二指肠、空肠、回肠、结肠)的吸收百分率和肠壁通透系数均无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论:** 水飞蓟宾磷脂复合物在全肠道均有吸收。

[关键词] 水飞蓟宾; 磷脂复合物; 肠吸收; 在体肠灌注

[中图分类号] R 943.44 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)11-1288-04

Absorption characteristics of silybin-phospholipid complex by rat intestine

YANG Qiu-xia¹, MA Fu-jia², ZHANG Lan-lan³, CHEN Jian-ming^{1*}

1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052

3. Modern TCM Institute, Tasly Pharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300402

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the intestinal absorption of silybin-phospholipid complex by the whole and different segments of rat's intestine. **Methods:** An *in situ* intestinal perfusion model was employed in the present research; and absorption percent and intestinal wall permeability coefficient (K_e) were taken as indices. HPLC method was used to determine the concentrations of silybin and phenol red in the perfusate to calculate the absorption indices. **Results:** The absorption of silybin-phospholipid complex was a first-order process, about 70% of it was absorbed after 6 h, with the absorption rate constants (K_a) being $(0.193 \pm 0.012) \text{ h}^{-1}$. The absorption rate and K_e for silybin-phospholipid complex were similar between different intestinal segments (Duodenum, Jejunum, Ileum, and Colon) ($P > 0.05$). **Conclusion:** Silybin-phospholipid complex can be absorbed in the whole intestinal segments.

[KEY WORDS] silybin; phospholipid complex; intestinal absorption; *in situ* intestine perfusion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(11):1288-1291]

水飞蓟宾(silybin或silibinin)是从菊科植物水飞蓟(*Silybum marianum* Gaertn)果实中提取分离得到的一种黄酮类化合物,有良好的治疗高血脂症、消除自由基、抗肝脂质过氧化作用,是疗效确切的肝损伤修复药^[1-2]。但由于其脂水均不溶,口服吸收差,生物利用度很低,临床疗效差。为此,国内外正积极开发研制其新剂型,增加其溶解速度或改变其溶出和吸收特性,以提高水飞蓟宾的生物利用度。目前,国外研究较多的是水飞蓟宾磷脂复合物,其与

普通水飞蓟宾制剂相比脂溶性增大、活性增强,更容易透过细胞膜,生物利用度提高^[3]。现已有水飞蓟宾磷脂复合物口服生物利用度和药代动力学以及药效学方面的研究报道,但未见有文献对其肠吸收特性进行系统研究。口服药物吸收作用的研究,可通过离体、在体、体内等多种途径来进行,其中在体实验方法实用性好,已形成了多种方案,如肠段结扎、肠管插管、肠血管灌注、肠肝血灌注等,且动物在体吸收特点与人体吸收的相关性也已有实验证实^[4-5]。

[收稿日期] 2009-06-15 **[接受日期]** 2009-09-14

[作者简介] 杨秋霞,硕士生. E-mail: victory95@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871291, E-mail: yjcjm@163.com

因此本文运用大鼠在体肠循环模型考察了水飞蓟宾磷脂复合物肠吸收的特点, 以期水飞蓟宾新剂型的开发提供科学依据。

1 仪器、试剂和动物

1.1 仪器 HL-2 型恒流泵(上海精科实业有限公司); Agilent 1100 series 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Agilent 化学工作站(G1311A 泵, G1314A 紫外检测器, 美国安捷伦公司); 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 药品及试剂 水飞蓟宾对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110856-200604, 纯度 > 99.0%); 水飞蓟宾磷脂复合物(天津天士力制药股份有限公司, 含水飞蓟宾 35%); 酚红(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080728); 水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20080416); 磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080912); 三乙胺(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080603); 氯化钠(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080828); 氯化钾(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080716); 氯化钙(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080818); 氯化镁(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080725); 磷酸二氢钠(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080429); 葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司, 批号: T20080411); 碳酸氢钠(上海虹光化工厂有限公司, 批号: 080712)。Krebs-Ringer 缓冲液(K-R 缓冲液): 每 1 000 ml 溶液中含 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, MgCl₂ 0.22 g, NaH₂PO₄ 0.22 g, 葡萄糖 1.4 g, NaHCO₃ 1.37 g。甲醇(Merck, 色谱纯), 其他试剂和试剂均为分析纯。

1.3 实验动物 SD 大鼠, 雄性, 体质量 200~220 g, 第二军医大学实验动物中心提供。

2 方法和结果

2.1 试液的配制 供试药液 I: 精密称取水飞蓟宾磷脂复合物适量, 用 K-R 缓冲液配制成水飞蓟宾浓度约为 20 μg/ml 的肠试液。供试药液 II: 分别精密称取水飞蓟宾磷脂复合物、酚红适量, 用 K-R 缓冲液配制成水飞蓟宾、酚红二者浓度均为 20 μg/ml 左右的肠试液。

2.2 检测水飞蓟宾的 HPLC 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm,)。流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(0.01% 三乙胺, 用 H₃PO₄ 调节 pH=4)-甲醇(45:55)。检测波长: 288 nm, 流速 1 ml/min, 进样量: 20 μl。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 同 2.4.3 项的操作方法, 对大鼠全小肠道插管, 用空白 K-R 缓冲液 100 ml 循环 6 h, 得空白肠循环液, 离心后, 取上清液 20 μl 进样, 考察空白肠循环液对测定方法有无干扰。结果表明无干扰(图 1)。

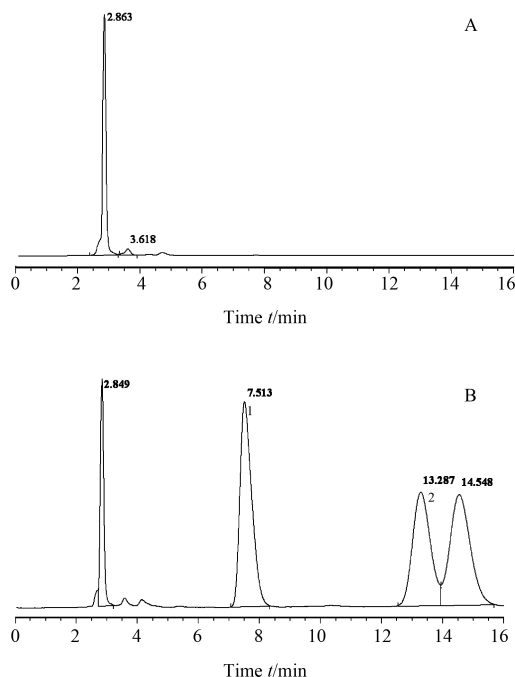


图 1 空白 K-R 缓冲液 (A) 以及供试药液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of blank K-R buffer solution (A) and sample solution (B)

1: Phenol red; 2: Silybin

2.3.2 标准曲线的制备 酚红标准曲线的制备: 用 K-R 缓冲液配制浓度为 10、20、30、40、50、60 μg/ml 的酚红试液, 进样 20 μl, 测其峰面积, 以峰面积对浓度进行线性回归, 回归方程为 $Y = 22.031X - 8.79$, $r = 0.9999$ ($n = 6$), 线性范围 10~60 μg/ml。

精密称取水飞蓟宾标准品, 用甲醇配成含水飞蓟宾 200 μg/ml 的标准母液, 然后准确吸取适量, 配成浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20 μg/ml 的一系列标准液, 取 20 μl 进样, 以浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程为 $Y = 43.267X + 1.2189$, $r = 0.9999$ ($n = 6$), 线性范围 0.5~20 μg/ml; 按信噪比 (S/N) = 3 计, 水飞蓟宾的最低检测限为 0.1 μg/ml; 以信噪比 (S/N) = 10 计, 水飞蓟宾的最低定量限为 0.4 μg/ml。

2.3.3 方法回收率和精密度 用 K-R 缓冲液配制低(0.5 μg/ml)、中(5 μg/ml)、高(20 μg/ml)浓度的

水飞蓟宾溶液,按照“2.2”项下的色谱条件测定峰面积,代入标准曲线方程中求得浓度,以测得浓度和理论浓度比较计算方法回收率。水飞蓟宾的平均回收率为(99.87±1.19)%,RSD为1.19%,方法回收率较好。

日内精密性:精密吸取低(0.5 μg/ml)、中(5 μg/ml)、高(20 μg/ml)浓度的标准液各20 μl,重复进样6次,根据标准曲线计算其浓度,计算RSD值。日间精密性:精密吸取低(0.5 μg/ml)、中(5 μg/ml)、高(20 μg/ml)浓度的标准液各20 μl,于3 d内每日测定,根据标准曲线计算其浓度,计算RSD值。日内精密性RSD分别为3.01%、2.30%、1.77%(n=6),日间精密性的RSD为2.47%、2.02%、1.69%(n=6),该方法的精密性较好。

2.4 大鼠在体肠循环实验

2.4.1 空白K-R缓冲液对药物稳定性的影响 用空白K-R缓冲液配制3份药液,浓度分别为18.47、7.29、3.69 μg/ml,置(37±0.5)℃水浴中孵育,分别于2、6 h取样测定孵育前后的药物浓度,考察药物在空白K-R缓冲液中的稳定性。结果RSD<1%,表明稳定性良好。

2.4.2 肠壁物理吸附的影响 剪取清洗后的大鼠各肠段约10 cm(共4段),用玻璃棒将黏膜层翻出,置50 ml已知浓度的供试药液I中(37±0.5)℃孵育,分别于2、6 h取样测定孵育前后的药物浓度,考察大鼠肠壁对药物的物理吸附。结果RSD在0.9%~1.11%之间,可以认为大鼠肠壁对药物基本无物理吸附。

2.4.3 大鼠在体小肠循环实验 参照大鼠在体循环实验方法^[6-7],选实验前禁食16 h(自由饮水)的大鼠4只,体质量200~220 g,腹腔注射10%水合氯醛溶液(3 ml/kg)麻醉,然后固定在手术台板上,沿腹中线剪开腹部,结扎胆管。自十二指肠上部及回肠下端各插入玻璃插管,扎紧,用37℃生理盐水洗净肠内容物,用空白K-R缓冲液以1 ml/min流速平衡30 min,排空回流液,改用200 ml供试药液II(含酚红20 μg/ml)以流速1 ml/min回流,分别于0.5、1、1.5、2、3、4、6 h取样2 ml待测,同时补加空白K-R缓冲液2 ml。所取样品溶液离心后,取上清液20 μl注入液相色谱仪,记录峰面积并代入标准曲线方程计算水飞蓟宾浓度。

测得循环药液中水飞蓟宾的剩余量: $X=C \times V$ 。其中C:肠循环液中水飞蓟宾浓度;V:利用酚红浓度计算得到的肠循环液体积,初始药量为 X_0 ,其吸收百分率为^[8]:吸收百分率(%) = $(X_0 - X) / X_0 \times 100\%$ 。

以小肠内剩余药量的对数(lnX)对取样时间t作图,得到一条直线,从直线斜率可求吸收速率常数 K_a (h^{-1})^[9-10]。公式为: $\ln X = \ln X_0 - K_a t$ 。

在体小肠循环6 h后,4只大鼠有(69.64±3.07)%的药物被肠道吸收。以剩余药量的对数值(lnX)对取样时间t作图,得一直线 $\ln X = -0.0193t + 8.4027$ ($r=0.9972$),且剩余药量的对数值随时间线性下降(图2),说明水飞蓟宾磷脂复合物在小肠中的吸收呈现一级动力学过程,求得吸收速率常数 $K_a=(0.1930 \pm 0.012) h^{-1}$ 。

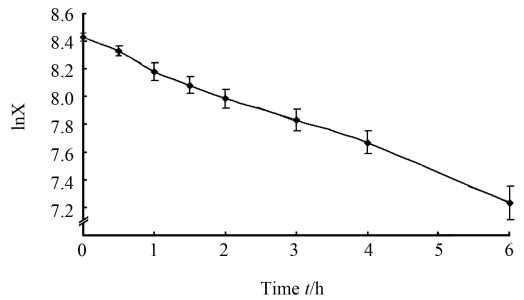


图2 水飞蓟宾磷脂复合物在体小肠吸收曲线
Fig 2 Absorption curve of silybin-phospholipid complex in rats intestine
n=4, $\bar{x} \pm s$

2.4.4 大鼠在体分肠段循环实验^[10] 选实验前禁食16 h(自由饮水)的大鼠16只,体质量200~220 g,腹腔注射10%水合氯醛溶液(3 ml/kg)麻醉后固定在手术台板上,沿腹中线剪开腹部,选择所要考察的肠段:自幽门向下取10 cm为十二指肠段,距幽门15 cm处向下取10 cm为空肠段,距盲肠20 cm处向上取10 cm为回肠段,从盲肠向下取10 cm为结肠段。在各肠段两端剪切后插管,结扎。

先用37℃生理盐水冲洗肠道内容物,充分洗涤后,再送入空气使洗涤液尽量流尽。然后用37℃空白K-R缓冲液以1 ml/min平衡10~20 min,再用空气排出回流液,接着用含水飞蓟宾20 μg/ml左右的供试药液I 50 ml回流2 h,流速1 ml/min。结束后,用空气排出药液,将所得回流液移入100 ml容量瓶中,另用空白K-R缓冲液冲洗肠道5 min后,并入容量瓶。用空白K-R缓冲液定容,混匀。取样品溶液离心后,取上清液20 μl注入液相色谱仪。记录峰面积并代入标准曲线计算水飞蓟宾浓度。

实验结束后,将肠段沿插管两端剪下,测量肠段长度L,求算单位吸收量和单位吸收率,以肠壁通透系数 K_e 表示肠壁通透性。单位吸收量 = $(m_0 - m) \times 10 / Lt$ 。单位吸收率(%) = $100\% \times [(m_0 - m) / m_0] \times$

$10/Lt$ 。肠壁通透系数 $K_e = (V/Lt) \times \ln(m_0/m)^{[11]}$ 。式中 m_0, m 分别为初始药量和终末药量, L 为肠段长度, t 为循环时间, V 为循环液体积。

对水飞蓟宾磷脂复合物在大鼠各肠段的吸收结果进行方差分析, 表明其在十二指肠、空肠、回肠以及结肠 4 个肠段的吸收百分率和肠壁通透系数均无显著性差异 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 水飞蓟宾磷脂复合物在大鼠各肠段的吸收及肠壁通透性

Tab 1 Absorption and permeability for silybin-phospholipid complex by different intestine segments

($n=4, \bar{x} \pm s$)

Intestinal segment	Absorption amount ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Absorption percent (%)	Permeability coefficient K_e ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)
Duodenum	0.097 ± 0.014	10.07 ± 2.86	0.597 ± 0.194
Jejunum	0.096 ± 0.025	10.19 ± 2.22	0.586 ± 0.148
Ileum	0.097 ± 0.043	10.14 ± 4.28	0.589 ± 0.266
Colon	0.095 ± 0.029	10.11 ± 5.54	0.553 ± 0.326

3 讨论

采用大鼠在体小肠吸收法, 实验中不损伤大的血管和神经, 药物透过上皮细胞后即被血液运走, 同时它又能消除胃内容物及消化管固有运动等因素的影响^[12]。通过直接测定药物在肠腔内的药物浓度的消失量来计算药物在肠道内的吸收率和吸收量, 其特点是能真实地反映药物在消化道内的吸收情况。

在肠回流过程中, 由于小肠会吸收部分水分, 导致循环液体积改变而使循环液中药物浓度升高, 影响测定结果, 故采用离子型化合物酚红进行体积标定。酚红为大分子络合物, 不被小肠吸收, 当小肠吸收水分后, 酚红浓度会增加。因此, 可以通过酚红浓度的变化来校正小肠中水的吸收量, 可准确计算药物的吸收量^[9]。

药物从肠壁吸收进入血液时, 需要经过非搅动水层和肠膜两个主要吸收屏障^[9, 13]。药物流经肠道时, 药物的吸收, 使其在肠道各部位的浓度均不相同, 且是流速与肠腔半径的函数^[13], 增大循环速度可使肠道各部位的浓度接近相等; 但是肠道非流动水层的屏障厚度与循环速度有关, 流速较大时将使非流动水层变薄, 而使吸收人为增加, 偏离正常条件^[14]。因此本实验采用较为常用的 1 ml/min 流速循环。

了解药物在胃肠道的吸收转运情况可以减少剂型设计的盲目性, 为剂型开发提供科学依据, 是制剂处方前工作的必要环节。磷脂复合物能通过提高其

在生物膜中的溶解性, 增加肠壁通透性, 从而促进其所载的药物在肠道中的吸收^[11]。本研究通过大鼠在体肠循环的方法, 对水飞蓟宾磷脂复合物的肠道吸收情况进行初步研究。结果表明十二指肠、空肠、回肠、结肠之间的吸收速度没有显著性差异 ($P > 0.05$), 即水飞蓟宾磷脂复合物在整个肠段均有吸收, 此可为水飞蓟宾新剂型的研制提供科学依据。

[参考文献]

- [1] Kaur M, Agarwal R. Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: how close we are to bedside [J]? *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224: 350-359.
- [2] Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin-new effects and applications [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005, 149: 29-41.
- [3] 赵 暖, 栗立标. 水飞蓟宾-磷脂复合物的药代动力学和药效学研究进展 [J]. *药学进展*, 2006, 30: 295-299.
- [4] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *J Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175: 880-885.
- [5] Dackson K, Stone J A, Palin K J, Charman W N. Evaluation of the mass balance assumption with respect to the two-resistance model of intestinal absorption by using *in situ* single-pass intestinal perfusion of theophylline in rats [J]. *J Pharm Sci*, 1992, 81: 321-325.
- [6] Liu Y, Zhang P, Feng N P, Zhang X, Wu S, Zhao J H. Optimization and *in situ* intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin [J]. *Int J Pharm*, 2009, 365: 136-142.
- [7] 王 娟, 宋洪涛, 周 欣, 张 倩. 西罗莫司大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. *中国药房*, 2009, 20: 27-30.
- [8] Ling W, Rui L C, Hua J X. *In situ* intestinal absorption behaviors of tanshinone II A from its inclusion complex with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30: 1918-1922.
- [9] 冯 亮, 蒋学华, 周 静, 杨俊毅. 三七皂苷 R1 和人参皂苷 Rg1 的大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41: 1097-1102.
- [10] Li H L, Zhao X B, Ma Y Q, Zhai G X, Li L B, Lou H X. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles [J]. *J Contr Rel*, 2008, 133: 238-244.
- [11] 唐晓养, 杨祥良. 灯盏花素磷脂复合物改善大鼠小肠吸收的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30: 222-225.
- [12] 沈 凯, 王景田. 药物肠吸收实验研究方法进展 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12: 988-991.
- [13] 丁江生, 张钧寿. 灯盏花素大鼠小肠吸收特性的研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34: 65-69.
- [14] Riad L E, Sawchuk R J. Absorptive clearance of carbamazepine and selected metabolites in rabbit intestine [J]. *Pharm Res*, 1991, 8: 1050-1055.