



藤黄酸大鼠在体肠吸收动力学的研究

王小潘, 吕慧侠, Ayman Y Waddad, 喻樊, 周建平*

(中国药科大学 药剂教研室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究藤黄酸(gambogic acid, GA)肠吸收动力学。方法:采用大鼠在体单向肠灌注实验,以高效液相色谱法测定灌流液中药物含量,研究 GA 在大鼠不同肠段吸收特性,并考察不同药物浓度对大鼠肠吸收的影响。结果:GA 在十二指肠的吸收速率明显高于其他肠段($P < 0.05$),增加药物浓度,GA 在十二指肠的吸收速率常数基本保持不变。结论:GA 在整个肠段都有不同程度的吸收,且在十二指肠的吸收速率最快,其吸收机制为被动扩散。

[关键词] 藤黄酸;单向肠灌注;肠吸收动力学

藤黄是藤黄科植物藤黄树 *Garcinia hanbaryi* Hook. f. 所分泌的干燥树脂,我国药学工作者最早发现藤黄具有抗癌作用,并经多次实验提取出其主要的有效成分藤黄酸(gambogic acid, GA)。实验结果显示,GA 能选择性地杀死癌细胞,而对正常的造血系统和白细胞没有影响,这是目前抗肿瘤药物所不具有的特征,为寻找高效低毒抗癌药物提供了新的线索^[1-2]。GA 水溶性较差,且在稀碱、高温、乙醇中不稳定,目前临床试验使用的 GA 注射剂主要是用 L-精氨酸、葡甲胺等作为助溶剂^[3]。但是 GA 静脉注射以后消除半衰期较短(大鼠体内 15 min^[4],犬体内 60 min^[5]),且有大量药物通过胆汁排泄^[6]。另外,近几年中药注射剂不良反应问题得到越来越多的关注。相对于注射给药,口服给药方便易行,病人顺应性较高,且能够降低药物的毒性和临床应用的风险。因此,研究和开发口服有效的 GA 新制剂具有重要的理论和临床意义。目前有关 GA 口服吸收特性的报道较少,本实验采用大鼠在体单向肠灌注法研究 GA 胃肠道吸收特征及其影响因素,以期为其口服制剂的研究和开发提供生物药剂学理论基础。

1 材料

LC-10AT 型高效液相色谱仪、SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司);BT100-2J 恒流泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

GA(自制,纯度 98%),GA 对照品(中国药科大学药化教研室,纯度 99% 实验中所用甲醇、磷酸为色谱级试剂,其他试剂为分析级)。

雄性 SD 大鼠,体重 200 ~ 250 g,购自南京青龙山动物繁殖中心,许可证号 SCXK(苏)2009-0001。

2 方法

2.1 HPLC 分析方法

2.1.1 色谱条件 Hedera ODS-2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-水(94:6),水 pH 用磷酸调节至 3.5;流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 30 °C;进样量 20 μL;检测波长 360 nm。

2.1.2 GA 对照液的配制 精密称取 GA 对照品 25.0 mg,置 250 mL 量瓶中,流动相溶解并定容到刻度,摇匀,即得 100.0 mg · L⁻¹ 的 GA 标准贮备液。

2.1.3 专属性考察 按 2.1.1 项下色谱条件,样品与 GA 对照品在相应位置上有相似的吸收峰,而空白对照则无,表明杂质对测定无干扰。色谱图见图 1。

2.1.4 线性与范围 精密量取 GA 对照液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用流动相定容,得到 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg · L⁻¹ 的 GA 溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积 A 与 GA 质量浓度 C (mg · L⁻¹) 进行线性回归,得回归方程 $A = 20\ 895.69C - 1\ 059.85$, $r = 0.999\ 9$ 。结果表明,GA 在给定的液相条件下在 10 ~ 60 mg · L⁻¹ 与

[稿件编号] 20111213005

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973649, 30901867);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09310-004);国家重点基础研究发展计划(973)项目(2009CB903300);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20090096110002)

[通信作者] * 周建平,教授,博士生导师,主要研究方向为药物新剂型及新制剂, Tel: (025) 83271272, E-mail: zhoujianp60@163.com

[作者简介] 王小潘,硕士研究生, E-mail: hnsqwpx@163.com

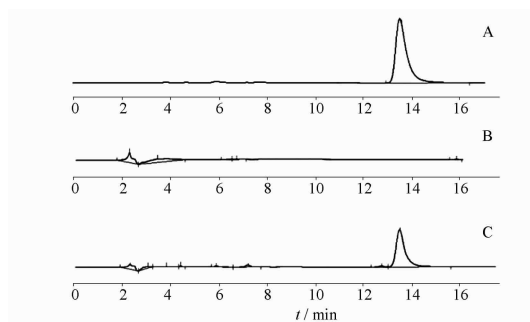


图 1 藤黄酸对照品溶液(A)、空白灌流液(B)、供试液(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of GA standard solution (A), blank perfusate (B) and tested solution (C)

峰面积线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密量取 GA 对照液适量,分别加入一定量流动相,配制高、中、低 3 种质量浓度(10,30,60 mg · L⁻¹)。分别进样 20 μL,考察日内和日间精密度。结果表明日内精密度分别为 0.34%,0.19%,0.26%;日间精密度分别为 3.8%,4.2%,4.9%。

2.1.6 回收率试验 精密量取 GA 对照液适量,分别加入一定量含 0.5% 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯的灌流液,配制成 10,30,60 mg · L⁻¹ 的 3 种质量浓度的 GA 溶液,按 2.1.1 项条件下进样,记录峰面积,代入标准曲线计算相应浓度,计算平均回收率。结果表明,GA 在高、中、低 3 种质量浓度中的平均回收率分别为 98.52%,99.01%,97.20%。

2.2 空白 Krebs-Ringer 灌流液的配制

精密称取氯化钠 7.8 g、氯化钾 0.35 g、氯化钙 0.37 g、碳酸氢钠 1.37 g、磷酸二氢钠 0.32 g、氯化镁 0.02 g、葡萄糖 1.4 g 加约 800 mL 水溶解,调节 pH 7.4,加水到 1 000 mL 即得^[7]。

2.3 灌流液中 GA 稳定性考察

取空白灌流液对大鼠各肠段灌流,收集流出液,用此液配制 50 mg · L⁻¹ 的 GA 溶液 3 份,置 37 °C 水浴孵育 10 h。分别于 0,1,4,6,8 h 各取 1 mL 置 1.5 mL 离心管中,14 000 r · min⁻¹ 高速离心 5 min,得上清液。取此上清液 20 μL 进样,测定灌流液中 GA 浓度,考察其稳定性。

2.4 恒流泵中硅胶管道对 GA 吸附情况的研究

配制 GA 质量浓度为 50 mg · L⁻¹ 的灌流液 3 份,用恒流泵将此灌流液以 0.2 mL · min⁻¹ 的速度

泵入一干燥硅胶管道内,分别于 10,20,30,45,60,90 min 收集流出的灌流液 0.2 mL,置 1.5 mL 离心管中,14 000 r · min⁻¹ 高速离心 5 min,得上清液。取此上清液 20 μL 进样,测定灌流液中 GA 浓度,考察硅胶管道对 GA 吸附情况。

2.5 在体肠单向灌流法

本实验使用恒流泵将待测溶液匀速泵入大鼠肠道内。为消除实验中硅胶管道对 GA 的吸附作用,实验前采用供试液将硅胶管道饱和 30 min,直至出液口 GA 浓度与供试液中 GA 浓度相等。手术前大鼠禁食 16 h,自由饮水,按大鼠体重腹腔注射 5 mL · kg⁻¹ 的 30% 乌拉坦溶液麻醉并固定。在大鼠腹部正中切开约 3 cm,小心分离出十二指肠、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 °C 的生理盐水轻缓地将肠内容物冲洗干净,再用空气将生理盐水排净,然后用 Krebs-Ringer 磷酸缓冲液冲洗 30 min。实验时取一定浓度的 GA 溶液(预热至 37 °C)100 mL,先以 2.0 mL · min⁻¹ 的流速灌流 10 min,排除肠内气泡,再将流速调为约 0.2 mL · min⁻¹,开始计时。灌流 30 min 后,于 30 ~ 50,50 ~ 70,70 ~ 90,90 ~ 110,110 ~ 130 min 时间段,用预先称量的西林瓶收集灌流流出液,并称取西林瓶和灌流流出液的总质量。最后将大鼠处死,剪下被灌流肠段,准确测量其长度和内径。

大鼠各个肠段的选择:十二指肠段自幽门 1 cm 处开始向下取 10 cm,空肠段距幽门 15 cm 处开始向下取 10 cm,回肠段自盲肠上行 20 cm 处开始向下取 10 cm,结肠段从盲肠后段开始向下取 10 cm^[8]。

2.6 灌流液体积的校正及数据处理

小肠不仅吸收药物,也吸收和分泌水分,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。本实验采用重量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。具体步骤为,精密量取供试液 1.00 mL 放入已经称重的干净玻璃瓶中,称量液体的质量,算出其密度 ρ_{in} 。从接收液样品中精密量取 1.00 mL,放入已经称重的干净玻璃瓶中,称量液体的质量,计算出接收液的平均密度 ρ_{out} 。 $V_{in} = M_{in}/\rho_{in}$; $V_{out} = M_{out}/\rho_{out}$; 式中 M_{in} , M_{out} 分别为一定时间内进出肠道灌流液的质量。按下式计算药物吸收速率常数 (K_a) 和药物表观渗透系数 (P_{app}), 式中 V_{in} 和 V_{out} 分别为灌入和收集的供试液体积 (mL); C_{in} 和 C_{out} 分别为进口

和出口处缓冲液中的药物质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); L 和 r 分别为被考察肠段长度 (cm) 和半径 (cm); Q_{in} 为灌注速度 ($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$); K_a 和 P_{app} 为 5 个时间段 (30 ~ 130 min) 样品的平均值。

$$P_{\text{app}} = \frac{-Q_{\text{in}} \ln\left(\frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \times \frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{in}}}\right)}{2\pi r L}$$

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \times \frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{in}}}\right) \times \frac{Q_{\text{in}}}{\pi r^2 L}$$

肠吸收数据处理后用统计分析软件 SPSS 15.0 进行方差分析。

3 结果

3.1 GA 在灌流液中的稳定性

各个时间点药物浓度 RSD 为 1.2%, 见图 2。结果表明 8 h 内所测溶液的浓度无明显变化, 供试液中 GA 稳定性良好。

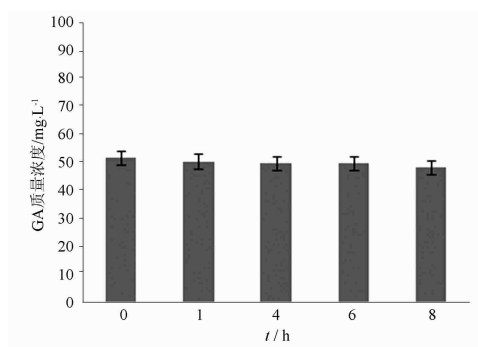


图 2 灌流液中 GA 的稳定性
Fig. 2 Stability of GA in perfusate

3.2 恒流泵中硅胶管道对 GA 吸附情况

前 30 min 收集到的灌流液中药物浓度稍低于所配溶液的浓度, 表明硅胶管道对 GA 确实存在一定的吸附作用。但是, 30 min 后收集的灌流液中药物浓度逐渐达到平衡, 且平衡浓度与配制的溶液浓度大致相同, 说明 30 min 时硅胶管道对 GA 的吸附作用以达到饱和, 因此这种吸附作用不会影响灌流液中药物浓度, 见图 3。

3.3 不同肠段 GA 的肠吸收特性

采用 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 溶液对大鼠各个肠段灌流, 考察不同肠段吸收速率常数和表观渗透系数, 结果见表 1。GA 在全肠段都有不同程度的吸收, 其中在不同肠段中的吸收速率常数 K_a 大小顺序是十二指肠 > 空肠 ≈ 回肠 > 结肠, 表观渗透系数 P_{app} 大小

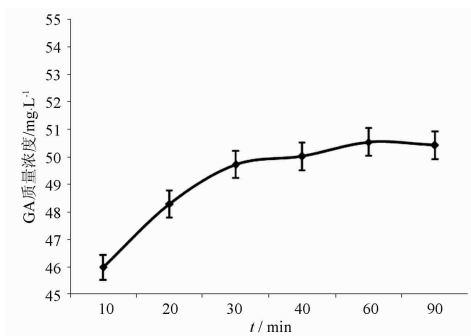


图 3 硅胶管流出液中 GA 浓度随时间的变化
Fig. 3 GA concentration in perfusate from silicone tube at different time intervals

顺序是十二指肠 > 空肠 ≈ 回肠 ≈ 结肠。对各肠段参数进行方差分析, 结果表明, 十二指肠的吸收速率和渗透性显著高于其他肠段 ($P < 0.05$), 空肠、回肠、结肠之间无显著性差异。这与大多数药物在肠道内的吸收性质类似。

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

Table 1 Absorption parameters of GA in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

肠段	$K_a / \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$P_{\text{app}} / \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$
十二指肠	8.76 ± 0.23	12.28 ± 0.70
空肠	3.47 ± 0.26	5.86 ± 0.76
回肠	3.11 ± 0.33	4.52 ± 0.59
结肠	2.40 ± 0.25	5.24 ± 0.65

3.4 药物浓度对 GA 的肠吸收的影响

用灌流液分别配制高、中、低 ($20, 50, 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 种不同质量浓度的 GA 溶液, 按 2.3 项下的方法对十二指肠灌流, 分别计算 K_a 和 P_{app} , 结果见表 2。方差分析结果表明, 在 $20 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 在十二指肠的吸收速率常数和表观渗透系数均无显著性差异, 说明药物不存在自身浓度抑制现象。因此, 初步判断药物吸收机制可能为被动扩散。

4 讨论

目前研究药物在肠内吸收的实验方法主要有体外法、在体法、体内法等。体外法包括组织流动室法、外翻肠囊法、外翻环法、体外细胞培养模型。在体法主要指肠道灌流实验模型, 该方法相对于各种离体和体内模型, 保证了肠道神经、内分泌功能的完好无损以及血液和淋巴的供应不变, 受外界环境影响小。这种方法一个主要的缺点是对受试动物的数



表 2 质量浓度对 GA 溶液十二指肠吸收参数的影响
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of GA concentrations on absorption parameters in duodenum($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_a / \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$P_{app} / \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$
20	7.53 ± 0.29	10.68 ± 0.60
50	8.76 ± 0.23	12.28 ± 0.70
80	8.41 ± 0.42	15.85 ± 1.43

目有要求,即必须具有一定数量的实验动物以保证足够小的变异。因此本实验每个肠段都采用了 5 只大鼠的实验数据,保证了数据的可靠性。目前国内比较倾向于使用循环灌流法,然而循环灌流法流速大(2~5 mL·min⁻¹),时间长(4~6 h),易破坏肠壁;故本实验采用低流速的单向灌流。灌流速度在一定程度上代表了肠道蠕动的生理状态。健康志愿者体内灌流速度多选用 2~3 mL·min⁻¹,由于大鼠肠道直径约为人体肠道的 1/10,因此本实验选择了更接近人体空腹状态的大鼠肠灌流速度为 0.20 mL·min⁻¹[9]。

肠道吸收是一个肠腔与黏膜双向转运的动态平衡过程,肠段灌流的方法基于灌流后药物浓度的变化;在灌流过程中,不仅有药物的吸收还存在水分的吸收,肠腔内水分的改变会显著影响药物浓度,故须对因水分吸收而导致灌流液体积的变化进行校正。一般测定水分吸收的方法有酚红法、¹⁴C 标记法和质量法,前 2 种方法是利用其不被肠吸收的特性来标示灌流液体积的变化,然而¹⁴C 具有放射性而较少使用,酚红会干扰一些药物的转运和分析且其在肠道也存在一定量的吸收,故本实验采用具有较高准确度的质量法来标定灌流液体积的变化^[10]。

目前,国内外对 GA 剂型的研究大都集中在静脉注射给药,较少有口服给药的研究,有关肠吸收特征的研究尚未见报道。GA 属于难溶性药物,做肠灌流实验时须采用适当的方法将其溶解,一开始使用比较常用的精氨酸增溶的方法配制溶液,但采用该方法配制的溶液在 Krebs-Ringer 中会变浑浊。而改用 0.5% 的聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯溶液溶解 GA,效果较好。具体配制方法为取一定量的药

物于 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 甲醇溶解,加入 5% 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯溶液超声溶解并定容到刻度后,转移至 100 mL 量瓶中,Krebs-Ringer 磷酸缓冲液定容到刻度,摇匀即得。

当某药物在大鼠平均 P_{app} 小于 $0.03 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 或大于 $0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,可以推测该药物在人体内分别为吸收差或者吸收完全^[10]。从以上实验结果可知,GA 在本实验条件下各个肠段 P_{app} 均大于 $0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,说明其在整个肠段吸收良好,推测其属于高渗透性药物,同时与其他肠段相比,十二指肠的吸收速率常数最高,表明药物在此肠段具有较好的吸收,因此本实验结果对 GA 口服制剂的设计具有一定的理论价值。

[参考文献]

- [1] Liu W, Guo Q L, You Q D, et al. Anticancer effect and apoptosis induction of gambogic acid in human gastric cancer line BGC-823[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11:3655.
- [2] Yu J, Guo Q L, You Q D, et al. Gambogic acid-induced G2/M phase cell-cycle arrest via disturbing CDK7-mediated phosphorylation of CDC2/p34 in human gastric carcinoma BGC-823 cells [J]. Carcinogenesis, 2007,28:632.
- [3] 周政涛,王金万. 注射用藤黄酸 I 期临床耐受性研究[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(1):79.
- [4] 郝琨,柳晓泉,王广基. 藤黄酸在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(4):338.
- [5] 郝琨,柳晓泉,王广基. 犬血浆中藤黄酸 HPLC 测定及其药代动力学[J]. 中国天然药物, 2005, 3(5):312.
- [6] Zhang L, You Q D, Liang Y, et al. Identification of gambogic acid metabolites in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry-ion trap-time-of-flight[J]. Chin J Nat Med, 2009, 7(5):376.
- [7] 何占坤,唐方. 外翻肠囊法研究橙皮苷肠吸收动力学[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18):2576.
- [8] 刘馨,张建军,周建平. 马洛替酯单向灌流法大鼠在体肠吸收机制研究[J]. 抗感染药学, 2011, 8(2):100.
- [9] 陈新民,李俊松,李文,等. 五味子有效成分的大鼠在体单向灌流肠吸收[J]. 药学学报, 2010, 45(5):652.
- [10] 吴迪,张岩,姚慧敏,等. 单向灌流法研究磷酸川芎嗪的大鼠在体肠吸收[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(9):695.
- [11] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum[J]. Pharm Res, 1996, 13(9):336.

Study on intestinal absorption kinetics of gambogic acid in rats

WANG Xiaopan, LV Huixia, Ayman Y Waddad, YU Fan, ZHOU Jianping*

(Department of Pharmaceutics of China Pharmaceutical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the intestinal absorption kinetics of gambogic acid (GA) in rats. **Method:** *In situ* single-way intestinal perfusion model was established to study the intestinal absorption kinetics of GA in different absorption segments, and the concentration of GA in the perfusate was determined by HPLC. The effect of drug concentrations on intestinal absorption was also detected. **Result:** GA showed a higher absorption rate than other intestinal segments ($P < 0.05$) and kept unchanged in duodenum after addition in drug concentration. **Conclusion:** GA can be absorbed in all intestinal segments in rats with the higher absorption rate in duodenum. Its mechanism is passive diffusion.

[Key words] gambogic acid; single-way perfusion; intestinal absorption kinetics

doi:10.4268/cjcm20121410

[责任编辑 马超一]

封面图片简介

穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, 别名榄核莲、一见喜。爵床科一年生草本, 高 50 ~ 100 cm, 全株味极苦。茎直立, 多分枝, 具四棱, 节稍膨大。叶对生, 卵状矩圆形至矩圆形披针形, 长 2 ~ 11 cm, 宽 0.5 ~ 2.5 cm, 先端渐尖, 基部楔形, 全缘或浅波状, 上面深绿色, 下面灰绿色, 侧脉 3 ~ 4 对; 叶柄短或近无柄。圆锥花序顶生或腋生; 花萼 5 深裂, 外被腺毛; 花冠淡紫白色, 唇形, 上唇外弯, 2 齿裂, 下唇直立, 3 浅裂, 雄蕊 2, 药室一大一小, 大的被髯毛, 花丝一侧有柔毛; 子房 2 室。蒴果长椭圆形, 长约 1.5 cm, 两侧呈压扁状, 中央具一纵沟。花期 8 ~ 9 月, 果期 10 月。

药用干燥的地上部分。味苦, 性寒。归心、肺、大肠、膀胱经。清热解毒, 凉血, 消肿。用于感冒发热, 咽喉肿痛, 口舌生疮, 顿咳劳嗽, 泄泻痢疾, 热淋涩痛, 痈肿疮疡, 毒蛇咬伤。