

外翻肠囊法比较黄芩苷磷脂复合物与黄芩苷在大鼠小肠的吸收

张琪, 陈忻*, 张楠, 于萍(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

摘要: 目的 比较黄芩苷磷脂复合物和黄芩苷在离体小肠中累积吸收的差异。方法 采用外翻肠囊法制备离体小肠吸收模型, 用 HPLC 测定小肠吸收的黄芩苷。结果 黄芩苷及黄芩苷磷脂复合物在 120 min 内透过肠壁的黄芩苷含量均随着时间的延长而增多; 黄芩苷在小肠的吸收显著多于黄芩苷磷脂复合物($P<0.05$)。结论 黄芩苷在小肠的吸收量大于黄芩苷磷脂复合物, 黄芩苷磷脂复合物增加黄芩苷吸收的部位不在小肠。

关键词: 黄芩苷磷脂复合物; 黄芩苷; 外翻肠囊法; 高效液相色谱法

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)06-0501-04

Small Intestinal Absorption Comparison of Phytosomes of Baicalin and Baicalin by Everted Intestinal Sac Method

ZHANG Qi, CHEN Xin*, ZHANG Nan, YU Ping(College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the accumulative absorption of the phytosomes of baicalin and baicalin via *in vitro* small intestine. **METHODS** Everted intestinal sacs were used and the concentration of baicalin was determined by HPLC. **RESULTS** Within 120 min, the concentration of the phytosomes of baicalin and baicalin were increasing over the time; the accumulative absorption of the baicalin *in vitro* small intestine was obviously higher than that of the phytosomes of baicalin($P<0.05$). **CONCLUSION** The accumulative absorption of the baicalin in small intestine was higher than the absorption of the phytosomes of baicalin, the main site that phytosomes of baicalin increased the absorption of baicalin was not in small intestine.

KEY WORDS: phytosomes of baicalin; baicalin; everted intestinal sac; HPLC

黄芩清热燥湿、泻火解毒、止血安胎, 临床主要用于治疗上呼吸道感染、泌尿系统感染、菌痢、肝炎、高血压等。黄酮类化合物黄芩苷为其主要有效成分, 药理研究表明, 黄芩苷有抑菌、清热、降压、镇静、利尿、利胆、抗炎、抗变态反应等活性, 在肝炎、艾滋病、癌症等疾病治疗方面的应用前景非常广阔^[1]。文献[2]报道, 黄芩苷因其脂溶性、水溶性差等原因造成在体内吸收差, 生物利用度低, 药效不稳定, 从而限制了其临床应用。磷脂复合物是药物与磷脂在一定条件下经过物理化学反应得到的一种复合物。药物形成磷脂复合物后, 其脂溶性与水溶性均得到明显改善, 其亲脂性改善更显著^[3-5]; 其理化性质和药动学研究结果也证明, 正是由于其亲水性和亲脂性的改善, 提高了黄芩苷在体内的吸收, 增加了血浆中的药物浓度和血流丰富组织中的药物浓度, 进而增强了其药理活性^[6]。目前国内外对黄芩

苷的药动学研究很多^[7], 但黄芩苷体内吸收提高的部位并未阐明, 为此, 本实验采用外翻肠囊法比较黄芩苷磷脂复合物和黄芩苷在离体小肠中的吸收, 用 HPLC 测定比较两者透过小肠黏膜的黄芩苷累积吸收量, 以及两者在空肠回肠中的吸收差异, 为其新制剂的开发提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DZF-6210 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); HH.SY11-Ni 电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司); ADL50D 分析天平(美国 OHAUS); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent); Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 外翻肠囊装置 4 套(自制)。

1.2 药品和试剂

黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批

作者简介: 张琪, 女, 硕士生 Tel: 15901119086
Tel: (010)83911635 E-mail: chenxin4283@126.com

E-mail: castleqiz@163.com

*通信作者: 陈忻, 女, 博士, 教授, 硕导

号: 110715-200514, 纯度: 95.2%); 黄芩苷供试品(首都医科大学中医药学院提供, 批号: 081230); 黄芩苷磷脂复合物(首都医科大学中医药学院提供, 黄芩苷磷脂复合物实验测得结合率为96.99%); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司, 批号: 086535); NaCl(分析纯, 北京化工厂, 批号 791211); KCl, CaCl₂, MgCl₂·6H₂O 均购自北京红星化工厂, 分析纯; NaHCO₃, NaH₂PO₄ 均购自北京化学试剂公司, 分析纯; 葡萄糖(分析纯, 北京化工厂, 批号: 831104); 混合氧气(北京颐宝华宸有限公司, 纯度: 95%O₂/5%CO₂)。

台式液: NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, CaCl₂ 0.20 g, NaHCO₃ 1.00 g, NaH₂PO₄ 0.05 g, MgCl₂·6H₂O 0.10 g, 葡萄糖 1.00 g, 调pH 7.2~7.4。

1.3 动物

Wistar 大鼠, ♂, 体重(250±20)g, 由首都医科大学动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(京)2006-0009。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷的 HPLC 测定

2.1.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水-磷酸(47:53:0.2), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 280 nm, 柱温为 25 °C。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称定黄芩苷对照品 0.001 06 g, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇 2 mL 超声溶解 3 min, 甲醇定容, 摇匀, 得 42.4 μg·mL⁻¹ 黄芩苷对照品溶液; 然后依次稀释为 21.2, 10.6, 5.3, 2.12, 1.06 μg·mL⁻¹ 的系列溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 10 μL 进样。记录色谱图和峰面积, 以峰面积(A)对质量浓度(C, μg·mL⁻¹)进行线性回归, 计算标准曲线回归方程和相关系数。

2.2 供试品溶液的制备

准确称取黄芩苷供试品 0.50 g 置于 100 mL 量瓶中, 加适量台式液, 超声溶解 30 min, 用台式液稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的黄芩苷供试品溶液, 待用。称取黄芩苷磷脂复合物 0.52 g 至 100 mL 量瓶中, 加适量台式液, 超声溶解 30 min, 用台式液稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的黄芩苷磷脂复合物供试品溶液, 待用。

2.3 大鼠肠囊外翻吸收实验^[8-9]

2.3.1 外翻肠囊的制备 取健康大鼠, 实验前禁食不禁水 12 h, 脱颈处死, 打开腹腔, 从胃幽门以下 20 cm 开始向下取 15 cm 为空肠, 从回盲瓣以上 5 cm 开始向上取 15 cm 为回肠。

用 0 °C 台式液灌流冲洗, 至流出液不再浑浊, 基本无肠内容物为止。剥离肠段表面的肠系膜和脂肪。将空肠和回肠分为每段长度 5 cm, 将肠管一端结扎于自制塑料套管, 用手指轻柔地将肠管翻转使黏膜面朝外, 用 4 °C 台式液冲洗后结扎另一端, 使之形成囊状肠管。

用注射器向肠管内注入 37 °C 空白台式液 2 mL, 将其放入已有台式液的试管中, 并向试管中通入 95%O₂/5%CO₂ 的混合氧气(2 mL·min⁻¹), 全管放入 37 °C 恒温水浴中, 平衡 5 min。

5 min 后, 将肠管迅速置于盛有 8 mL 37 °C 恒温“2.2”项下的供试品溶液(持续通入混合氧气)的玻璃试管中, 同时开始计时。分别于 30, 45, 60, 90, 120 min 从肠囊内取样 0.4 mL, 同时补足相同体积的空白台式液。

样品置于 1.5 mm 尖头 EP 管中, 于 -20 °C 冷冻保存, 待测。

2.3.2 样品的预处理 测定时将样品室温融化, 于真空干燥箱中干燥 7 h, 加甲醇至 400 μL, 超声处理 15 min, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤至进样小瓶内的内插管中, 取 50 μL 进样分析, 检测黄芩苷含量, 代入标准曲线计算浓度。

2.3.3 计算方法^[9] 黄芩苷累积吸收量按下列公式计算:

$$Q_n = C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i$$

其中, Q_n 为药物各时间点的累积吸收量; n 为取样次数; V 为肠囊内溶液体积; C 为样品浓度; V_i 为取样体积; C_n 为 n 时间点的实际检测浓度。

2.4 结果

2.4.1 标准曲线 黄芩苷标准曲线方程为 $A = 17.279C - 21.985$, $r = 0.9997$, 标准曲线在 1.06~42.4 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.4.2 黄芩苷及其磷脂复合物在小肠的吸收 以 HPLC 测得的峰面积代入标准曲线方程求得黄芩苷的浓度, 结果见表 1; 以“2.3.3”项下方法计算药物累积吸收量, 结果见表 2。

表 1 黄芩苷及其磷脂复合物在小肠不同时间吸收的比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 1 The comparison of absorption at different time between baicalin and its phospholipid complex($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	部位	黄芩苷/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				
		30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
黄芩苷	空肠	0.88±0.25	1.17±0.23	1.99±0.26	2.59±0.11	4.48±1.14
黄芩苷磷脂复合物	空肠	0.58±0.03	0.71±0.34	0.99±0.07	1.09±0.15	1.30±0.24
黄芩苷	回肠	0.95±0.39	1.26±0.73	1.23±0.65	1.90±0.38	2.83±0.56
黄芩苷磷脂复合物	回肠	0.65±0.23	0.60±0.29	0.92±0.24	1.14±0.20	1.49±0.32

表 2 黄芩苷及其磷脂复合物在小肠不同时间累积吸收量的比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 2 The comparison of accumulative absorption at different time between baicalin and its phospholipid complex($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	部位	黄芩苷/ μg				
		30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
黄芩苷	空肠	1.75±0.50	2.66±0.55	4.79±0.56	6.80±0.10	11.59±2.28
黄芩苷磷脂复合物	空肠	1.16±0.05	1.64±0.67	2.50±0.24 ¹⁾	3.09±0.44 ¹⁾	4.43±0.97 ²⁾
黄芩苷	回肠	1.89±0.77	2.90±1.61	3.34±1.73	5.18±1.30	7.36±1.07
黄芩苷磷脂复合物	回肠	1.29±0.46	1.47±0.62	2.34±0.62	3.15±0.65 ³⁾	4.30±0.96 ³⁾

注: 与空肠黄芩苷组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; 与回肠黄芩苷组比较, ³⁾ $P<0.05$

Note: Compared with baicalin (jejunum) group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; compared with baicalin (ileum) group, ³⁾ $P<0.05$

结果显示随时间增加, 小肠吸收黄芩苷的量也同步增加, 在 120 min 内未见饱和现象。在 120 min 内黄芩苷在空肠或回肠的累积吸收量均大于黄芩苷磷脂复合物在相应肠段的吸收量, 有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。黄芩苷在小肠不同部位的吸收趋势为空肠大于回肠, 但无统计学意义。

3 讨论

国内外对于天然活性成分磷脂复合物的研究表明^[6,10-11], 天然活性成分磷脂复合物的药理作用更强, 且迅速、持久。如陈忻等^[12]通过小鼠皮肤毛细血管通透性亢进实验和二甲苯致小鼠耳廓肿胀炎症实验, 证明黄芩苷磷脂复合物的抗炎活性明显强于黄芩苷, 且作用出现更迅速、维持时间更久。目前采用外翻肠囊法观察黄芩苷磷脂复合物与黄芩苷在离体小肠的吸收情况及比较空肠回肠对黄芩苷及其磷脂复合物的吸收差异的报道尚未见到。

外翻肠囊法作为一种离体药物吸收的模型, 最早应用于研究葡萄糖和氨基酸的透膜转运。肠囊外翻吸收模型的优点是操作简单、快捷、廉价^[13]; 可以用来测试吸收促进剂和不同制剂的吸收作用, 找出药物在小肠中的最佳吸收位置。由于外翻肠囊模型保留了完整的组织和黏膜的特性, 可在体外模拟体内生理状态下不同肠段对药物的吸收情况。但肠外翻模型也有不足之处, 如肠管缺乏血液循环和神经控制, 体外时间过长后肠黏膜功能形态容易发生变化。因此, 本试验经过改良, 利用台式液, 并且在实验过程中不断小量通入 95%O₂/5%CO₂ 的混合气体, 以保证肠管在实验期

间肠黏膜能够保持活性。实验证明用该模型研究药物的体外吸收实验结果可靠。

吴建梅等^[14]的研究发现黄芩苷磷脂复合物的吸收特性与黄芩苷相比发生了较大的变化, 其血浆浓度明显增高, 两者的 ρ_{max} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 之间均具有显著性差异, 且复合物的AUC是黄芩苷的 3.13 倍。可以认为, 黄芩苷磷脂复合物通过改善黄芩苷的吸收而提高其生物利用度。本试验的结果证明黄芩苷在小肠的吸收好于黄芩苷磷脂复合物的吸收。这表明黄芩苷磷脂复合物增加黄芩苷吸收的部位不在小肠, 龚明涛等^[15]及刘太明等^[16-17]研究了大鼠灌胃黄芩苷后的体内药动学特征, 结果显示胃和结肠是黄芩苷在大鼠胃肠道的主要吸收部位。进一步考察黄芩苷磷脂复合物生物利用度增加, 吸收因素的贡献可能要关注其在胃及结肠的吸收情况。

有学者^[18-19]研究了葛根素和丹皮酚及其各自的磷脂复合物的体外透皮吸收, 发现两者的渗透速率均大于各自磷脂复合物的渗透速率, 表明天然活性成分的磷脂复合物具有一定的缓释作用。因磷脂复合物改善了黄芩苷的亲水性和亲脂性, 且其亲脂性的改善程度更大^[3], 结合分析本试验结果, 笔者推测黄芩苷磷脂复合物因其脂溶性增大能透过小肠黏膜, 而同样因其较强亲脂性而暂时贮存于小肠黏膜中, 复合物结构中的药物则逐渐释放, 以此方式实现了缓释作用。黄芩苷磷脂复合物在小肠的吸收量不如黄芩苷的结果也从侧面提示这种缓释作用方式。

REFERENCES

- [1] CHEN X Q, QI X J, HE E M. Latest progress on *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Food Drug(食品和药品), 2006, 8(5): 23-27.
- [2] MAO F F, TU X, ZHU J B, et al. Absorption of baicalie in small intestine of rat [J]. J Nanjing Coll Pharm(南京药学院学报), 1984, 15(1): 61-66.
- [3] WU J M, CHEN D W. Study on the physicochemical properties of baicalin phospholipid complex [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2001, 36(3): 173-177.
- [4] TAO Y H, LIU J H, YANG X L. Preparation of hilicid-phospholipid complex and its physic-chemical properties [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2006, 41(22): 1720-1722.
- [5] HUANG G H, ZHANG N, LI A G, et al. Preparation and solubility of breviscapine phospholipid complex [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2005, 36(2): 20-22.
- [6] WU J M, CHEN D W, YU M. Effect of baicalin phospholipids complex on tissue distribution and antihepatitis activity [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2007, 42(6): 432- 436.
- [7] LI Q H, LIU P L, FENG Y F, et al. Pharmacokinetics and salivary distribution of baicalin in Shuanghuanglian at different doses administration [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(1): 3-5.
- [8] SU L. The study of pharmacokinetics of naringin and its intestinal absorption in rats [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2009.
- [9] DONG Y, ZHANG Y F, YANG Q, et al. Absorption of extractive Radix Paeoniae Alba in rat everted gut sacs and its interaction with P-glycoprotein [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(7): 884-888.
- [10] CARINI M, ALDINI G, ROSSONI G, et al. Complexation of *Ginkgo biloba* extract with phosphati-dylcholine improves cardioprotective activity and increases the plasma antioxidant capacity in the rat [J]. Planta Med, 2001, 67(4): 326-330.
- [11] CHEN Z Y, WU Z Z, ZHANG G J, et al. Protective effects of silybin-phosphatidylcholine compound on acute liver damage in mice induced by CCl₄ [J]. Chin New Drug J(中国新药杂志), 2004, 13(4): 319-321.
- [12] CHEN X, ZHANG N, DONG X D, et al. Study on the time-effect relationship of phytosomes of baicalin in anti-inflammatory effect [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2007, 24(5): 359-361.
- [13] KILIC F S, BATU O, SIRMAGUL B, et al. Intestinal absorption of digoxin and interaction with nimodipine in rats [J]. Pol J Pharmacol, 2004, 56(1): 137-141.
- [14] WU J M, CHEN D W, ZHANG R H. Study on the bioavailability of baicalin-phospholipid complex by using HPLC [J]. Biomed Chromatogr, 1999, 13(7): 493-495.
- [15] GONG M T, YU L F, CHEN Q H, et al. Study on oral bioavailability of baicalin in rats [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(17): 1332-1335.
- [16] LIU T M, JIANG X H. Studies on the absorption kinetics of baicalin and baicalein in rats' stomachs and intestines [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(12): 999-1001.
- [17] LIU T M, JIANG X H, ZHANG M J, et al. Absorption characteristics of baicalin and baicalein in rat small intestine [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2006, 41(23): 1784-1787.
- [18] MA Y S, ZHAO H R, LIN Y N. Studies permeation of puerarin and its phospholipid complex through rat skin *in vitro* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2000, 25(5): 274-276.
- [19] MA Y S, ZHAO H R, LIN Y N. Primary study of paeonol and its phospholipid compound on external absorption of through skin [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med(云南中医中药杂志), 1999, 20(4): 36-38.