

山楂叶总黄酮磷脂复合物大鼠在体肠吸收动力学研究

童丽姣¹, 高敏^{2,3}, 王鑫波¹, 丁慧琴¹, 石森林^{2*} (1. 临安市中医院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 3. 上海睿智化学研究有限公司, 上海 201203)

摘要: 目的 研究山楂叶总黄酮磷脂复合物的大鼠在体小肠吸收动力学特征。方法 采用大鼠在体肠单向灌流模型, 以山楂叶总黄酮原料药为对照, 采用分光光度法测定灌流液中总黄酮含量, 计算肠吸收速率常数(K_a 值)与单位时间吸收转化率(A 值), 考察药物浓度与 pH 值对山楂叶总黄酮磷脂复合物肠吸收的影响。结果 浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的山楂叶总黄酮和山楂叶总黄酮磷脂复合物, K_a 值与 A 值分别为 0.0109 h^{-1} , 1.20% 和 0.0391 h^{-1} , 3.73% ; 药物浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 为 6.0, 7.4, 8.0 的肠循环液, 山楂叶总黄酮和山楂叶总黄酮磷脂复合物的 K_a 值分别为 0.0076 , 0.0109 , 0.0056 h^{-1} 和 0.0376 , 0.0391 , 0.0305 h^{-1} , A 值分别为 0.69% , 1.20% , 0.42% 和 3.19% , 3.73% , 2.81% ; 表明在总黄酮浓度和溶液 pH 相同条件下, 山楂叶总黄酮磷脂复合物的大鼠在体肠吸收明显优于山楂叶总黄酮。结论 磷脂固体分散技术可改善山楂叶总黄酮的小肠吸收。

关键词: 山楂叶总黄酮; 磷脂复合物; 肠吸收; 在体循环肠灌流模型

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)08-0921-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.005

Study on the Adsorption Kinetics of Hawthorn Leaves Flavonoids Phospholipids Complex in Rats Intestine

TONG Lijiao¹, GAO Min^{2,3}, WANG Xinbo¹, DING Huiqin¹, SHI Senlin^{2*} (1. Lin'an Chinese Medical Hospital, Lin'an 311300, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. Shanghai Chempartner Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the adsorption kinetics of hawthorn leaves flavonoids phospholipids complex (HLF-PPC) in rats intestine. **METHODS** The *in situ* rat single-pass intestinal perfusion model was used. The concentration of the index component of HLF-PPC, flavonoids in the perfusate were determined by spectrophotometry, the absorption constant (K_a) and absorption conversion rate in time unit (A) were calculated, and the effects of drug content and pH value were investigated. **RESULTS** Drug concentration of HLF and HLF-PPC were $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the K_a and A values were 0.0109 h^{-1} , 1.20% and 0.0391 h^{-1} , 3.73% ; and when the drug concentration of HLF and HLF-PPC were $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, in pH 6.0, 7.4 or 8.0 of the intestinal loop solution, the K_a values were 0.0076 , 0.0109 , 0.0056 h^{-1} and 0.0376 , 0.0391 , 0.0305 h^{-1} , A values were 0.69% , 1.20% , 0.42% and 3.19% , 3.73% , 2.81% , respectively. That showed the intestinal absorption in rats of HLF-PPC was obviously better than HLF in the same drug concentration and pH value. **CONCLUSION** The solid dispersion technology of phospholipid can improve the intestinal absorption of HLF.

KEY WORDS: hawthorn leaves flavonoids; phospholipid complex; intestinal absorption; intestinal recirculating perfusion

山楂叶提取物(hawthorn leaves extract, HLE), 商品名为益心酮, 其主要药效成分是槲皮素、金丝桃苷、牡荆素鼠李糖苷、芦丁等黄酮类成分^[1]。山楂叶总黄酮具有降低血压、降低血脂、保护心肌、抗心肌梗塞、抑制血小板聚集的药理作用, 临床主要用于治疗心血管疾病^[2-3]。

山楂叶总黄酮在水中溶解度较低, 口服吸收较差, 生物利用度小^[4]。磷脂复合物是某些药物与磷脂在一定条件下复合形成的复合物, 有研究表

明磷脂复合物具有改善原药物溶解性能进而提高其体内吸收的特性^[5]。

为解决山楂叶总黄酮口服吸收差, 生物利用度低的问题, 本课题组前期制备了山楂叶总黄酮磷脂复合物^[6], 发现其可以提高山楂叶总黄酮的油水分配系数^[7]。本实验参考有关文献^[8-9], 采用大鼠在体肠循环灌流模型, 比较了山楂叶总黄酮及其磷脂复合物的肠吸收特征、并考察了 pH 值对山楂叶总黄酮磷脂复合物肠吸收的影响, 以探讨磷脂

基金项目: 浙江省中医药科技项目(2008CA090)

作者简介: 童丽姣, 女, 副主任药师 Tel: 13067738258
博士生导师 Tel: (0571)86613524 E-mail: pjstone@163.com

E-mail: ejiao2008@sina.com

*通信作者: 石森林, 男, 博士, 教授, 博

复合载体技术改善山楂叶总黄酮肠吸收的可行性。

1 材料与仪器

1.1 试药

芦丁对照品(中国药品生物制品检验所,批号:100080-200707,供含量测定用);山楂叶总黄酮(山东临沂爱康药业有限公司,总黄酮含量>80.0%,批号:AKH081201);山楂叶总黄酮磷脂复合物(自制);酚红(上海三爱思试剂有限公司);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氯化铝、氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、葡萄糖、乙醇、甲醇等试剂均为分析纯;水为蒸馏水;Krebs-Ringer 试剂(pH 7.4)(肠溶液,简称 K-R 液):NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, NaHCO₃ 1.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, 葡萄糖 1.4 g, 加适量蒸馏水使成 1 000 mL。

1.2 仪器

UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);KH-250DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创市超声仪器有限公司);JA2003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);XS105 分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);DKS-24 型电热恒温水浴锅(上海经济区沈荡中新电器厂);WH-861 旋涡混合器(太仓市科教器材厂);HL-2 恒流泵(上海精科实业有限公司制造);Avanti J-26 XP 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

1.3 动物

Sprague-Dawley 大鼠,体质量为 200~250 g,♂,浙江中医药大学动物中心提供,实验动物合格证号:SYXK(浙)2008-0115。

2 方法与结果

2.1 肠循环液中酚红的测定

精密量取浓度为 10 μg·mL⁻¹ 的酚红对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分置 10 mL 量瓶中,加入 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL, 摇匀,加水至刻度,密塞,摇匀;以水加相应显色剂为空白,于 558 nm 处测定,以吸光度对浓度进行线性回归,得酚红的标准曲线方程为: $A=0.1969C+0.0056$, $r=0.9999$, 线性范围: 0.528 6~5.286 0 μg·mL⁻¹。肠循环液不同时间样品中,分别移取 0.5 mL,加入 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL,以相应试剂为空白,在 558 nm 测吸光度,将吸光度代入酚红标准曲线求酚红浓度。

2.2 肠循环液中总黄酮的测定方法学的建立

2.2.1 线性范围 精密量取浓度为 50 μg·mL⁻¹ 的芦丁对照品溶液各 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 分别置 10 mL 量瓶中,加入 1%氯化铝溶液 4 mL, 摇匀,再加水至刻度,密塞,摇匀;以水加相应显色剂为空白,于 272 nm 处测定,以吸光度对浓度进行线性回归,得芦丁的标准曲线方程为: $A=0.0413C+0.0097$, $r=0.9997$, 芦丁在 5.134~30.803 μg·mL⁻¹ 内与吸光度呈现良好线性关系。

2.2.2 专属性实验 空白肠循环液:取配制的肠溶液适量,按大鼠在体肠循环实验的方法循环 4 h 后,得空白肠循环液。取空白肠循环液适量,置 10 mL 量瓶中,加 1%氯化铝溶液 4 mL 摇匀,再加水至刻度,密塞,摇匀;以相应试剂为空白在 200~800 nm 内扫描。取空白肠循环液适量,置 10 mL 量瓶中,加 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL 摇匀,再加水至刻度,摇匀;以相应试剂为空白在 200~800 nm 内扫描。结果表明,空白肠循环液在总黄酮和酚红的测定波长下吸收值接近零,对测定无影响。

2.2.3 空白对照的选择 山楂叶总黄酮及其磷脂复合物肠循环液中总黄酮的测定,以相应浓度的酚红溶液加相应的显色剂为空白,于 272 nm 处测定。

2.2.4 方法学考察 分别取一定浓度的山楂叶总黄酮和山楂叶总黄酮磷脂复合物肠循环液,进行精密度、稳定性、重复性和回收率试验。结果表明,山楂叶总黄酮和山楂叶总黄酮磷脂复合物肠循环液精密度试验的 RSD 值分别为 0.11%和 0.11%,稳定性试验的 RSD 值分别 0.66%和 0.70%,重复性试验结果的总黄酮平均含量分别为 32.69%和 4.05%,RSD 值分别为 1.72%和 1.16%,回收率分别为 96.09%~101.64%和 99.58%~103.02%,平均回收率值分别为 98.40%和 100.65%,RSD 值分别为 2.47%和 1.32%。方法学试验结果表明所建立的方法准确、可靠,可用于肠循环液中总黄酮的测定。

2.3 药物在肠循环液中的稳定性

取配制的肠溶液(K-R 液)适量,调节 pH 值分别为 6.0(用稀磷酸溶液调节),7.4,8.0(用饱和碳酸氢钠溶液调节)的 3 种肠溶液适量;按大鼠在体肠循环实验方法循环 4 h 后,分别得 3 种 pH 值的空白肠循环液。

称取山楂叶总黄酮、山楂叶总黄酮磷脂复合

物、酚红适量，分别用上述空白肠循环液溶解，在 37 ℃ 恒温水浴中孵育 4 h，分别于 0，4 h 取样，测定各供试品溶液中酚红和总黄酮的含量，假定 0 h 药物溶液中酚红和总黄酮的含量均为 100%，以 4 h 后的药物溶液含量为指标，考察其稳定性。结果见表 1。

结果表明，上述 3 种 pH 值的山楂叶总黄酮及其磷脂复合物肠循环液在 37 ℃ 恒温条件下，放置 4 h 后，酚红和总黄酮的含量均为最初含量的 98% 以上，稳定性好。

表 1 孵育 4 h 后药物含量变化(n=3)

Tab. 1 The content change of drug after incubation for 4 hours(n=3)

样 品	孵育 4 h 后 酚红含量/%	孵育 4 h 后 总黄酮含量/%
山楂叶总黄酮(pH=6.0)	98.83±0.19	99.03±0.46
山楂叶总黄酮磷脂复合物(pH=6.0)	99.11±0.17	98.99±0.21
山楂叶总黄酮(pH=7.4)	98.95±0.37	99.36±0.30
山楂叶总黄酮磷脂复合物(pH=7.4)	98.57±0.19	98.86±0.40
山楂叶总黄酮(pH=8.0)	98.84±0.18	98.68±0.09
山楂叶总黄酮磷脂复合物(pH=8.0)	98.84±0.18	98.17±0.19

2.4 肠壁物理吸附的影响

剪取清洗后的约 70 cm 长的空白小肠段 3 段，用玻璃棒将黏膜层翻出，置 50 mL 已知药物浓度的肠循环液中，37 ℃ 恒温水浴中孵育 4 h 后，测定孵育前后酚红和总黄酮的浓度；假定孵育前药物溶液中酚红和总黄酮的含量均为 100%，以 4 h 后的药物溶液含量为指标，考察肠壁的物理吸附结果见表 2。

结果表明，在 37 ℃ 恒温条件下，孵育 4 h 后，肠循环液中酚红和总黄酮的含量均为最初含量的 98% 以上，大鼠肠道对肠循环液中酚红和总黄酮基本无物理吸附。

表 2 孵育 4 h 药物含量变化(n=3)

Tab. 2 The content change of drug after incubation for 4 hours(n=3)

样 品	孵育 4 h 后 酚红含量/%	孵育 4 h 后 总黄酮含量/%
山楂叶总黄酮原料	100.50±0.17	100.38±0.13
山楂叶总黄酮磷脂复合物	99.75±0.44	99.23±0.10

2.5 循环路径物理吸附的影响

取 50 mL 已知药物浓度的肠循环液，注入恒流泵的连接管及其延长管中，构成循环通路，流速为 0.2 mL·min⁻¹，循环 4 h，测定循环前后酚红

和总黄酮的浓度；假定循环前药物溶液中酚红和总黄酮的含量均为 100%，以 4 h 后的药物溶液中酚红和总黄酮含量为指标，考察循环路径的吸附。结果见表 3。

结果表明，循环 4 h 后肠循环液中酚红和总黄酮的含量分别为最初含量 98% 以上，循环路径对药物基本无吸附。

表 3 循环 4 h 药物含量变化(n=3)

Tab. 3 The content change of drug after circulation for 4 hours(n=3)

样 品	循环 4 h 后 酚红含量/%	循环 4 h 后 总黄酮含量/%
山楂叶总黄酮	99.18±0.14	99.72±0.74
山楂叶总黄酮磷脂复合物	99.66±0.15	98.87±0.87

2.6 大鼠在体肠吸收实验

2.6.1 小肠循环灌流实验方法 取实验前禁食 12 h(自由饮水)的 SD 大鼠，腹腔注射戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹，麻醉后固定。沿腹中线打开腹腔(约 2.5 cm)，在实验肠管(十二指肠上部和回肠下部)两端各切一小口，在上端小口处插入直径为 0.3 cm 的玻璃管，并用手术线扎紧。用注射器将(37±0.5)℃的生理盐水缓缓注入肠管，洗去肠管内容物至净，再用空气排空肠管内生理盐水。然后在实验肠管下端小口处插入玻璃管，并用手术线扎紧。将肠管两端的玻璃管与恒流泵的胶管连接，形成回路，开动恒流泵。先以 1.0 mL·min⁻¹ 流速循环 10 min 后，将流速调节为 0.2 mL·min⁻¹，立即自装有灌注液的锥形瓶中取样 2 mL，作为测定零时间点药物浓度和酚红浓度的样品，另向锥形瓶中补加同浓度的酚红 K-R 液 2 mL，其后于 15，30 min 之后再每间隔 30 min 亦按同法取样并补加酚红 K-R 液，循环 4 h 后，终止实验。

2.6.2 参数计算 ①吸收速率常数(Ka)、吸收半衰期(t_{1/2})的计算。用 Fick's 方程定量描述消化道吸收药物，药量随时间变化过程用公式 1 描述：

$$-dQ/dt = DkS(C - C_0)/h \quad (1)$$

dQ/dt—分子型药物的透过速率；D—药物在膜中的扩散系数；k—药物在膜/水溶液中的分配系数；h—膜的厚度；C₀—血液中药物浓度(μg·mL⁻¹)；C—消化液中药物浓度(μg·mL⁻¹)。

公式 1 经过一系列处理，得到公式 2。以小肠内剩余药量的对数(lnX)对取样时间 t 作图，得到一直线，从直线的斜率可求吸收速率常数 Ka(h⁻¹)用

公式 2 表示为:

$$K_a = (\ln X_0 - \ln X) / t \quad (2)$$

吸收半衰期 $t_{1/2}(\text{h})$ 用公式 3 表示:

$$t_{1/2} = 0.693 / k_a \quad (3)$$

药物在消化道中单位时间的吸收转化百分数(A), 用公式 4 表示为:

$$A(\%) = (C_0 \times V_0 - C_t \times V_t) / C_0 \times V_0 \times t \quad (4)$$

C_0 —灌注液药物初始浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); V_0 —灌注液初始体积(mL); C_t — t 时刻灌注液药物浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); V_t — t 时刻灌注液体积(mL); t —灌注液循环灌注时间(h)。

2.6.3 磷脂固体分散技术对山楂叶总黄酮肠吸收的影响 分别精密称取山楂叶总黄酮、山楂叶总黄酮磷脂复合物、酚红适量, 用 K-R 液溶解, 总黄酮浓度均为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 酚红浓度均为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别进行整肠段回流, 每组 8 只大鼠。按“2.6.1”项下方法操作, 收集样品, 测定各时间点样品中药物含量, 以取样时间为横坐标, 该点累积吸收量为纵坐标, 绘制山楂叶总黄酮与山楂叶总黄酮磷脂复合物的肠吸收动力学曲线, 结果见图 1。

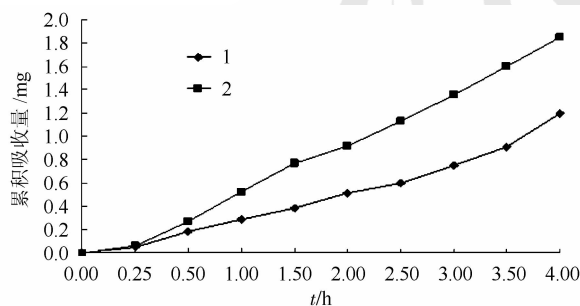


图 1 HLF 与 PPC 大鼠在体肠吸收动力学曲线

1—山楂叶总黄酮; 2—山楂叶总黄酮磷脂复合物。

Fig. 1 The intestinal absorption curve of HLF and PPC *in vivo* of rat

1—hawthorn leaves flavonoids; 2—hawthorn leaves flavonoids phospholipids complex.

按“2.6.2”计算 HLF 与其磷脂复合物的吸收速率常数(K_a)和单位时间的吸收转化百分数(A)等参数, 结果见表 4。

结果表明, 山楂叶总黄酮磷脂复合物的 K_a 、 $t_{1/2}$ 和 A 均高于同浓度山楂叶总黄酮, 两者比较, 均有显著性差异($P<0.05$)。由此可见, 磷脂固体分散技术可以显著提高 HLF 的肠吸收。

2.6.4 pH 值对山楂叶总黄酮磷脂复合物吸收的影响 分别精密称山楂叶总黄酮、山楂叶总黄酮磷脂复合物、酚红适量, 以 K-R 液, 分别配制总黄

表 4 山楂叶总黄酮与其磷脂复合物的肠吸收参数($n=8$)

Tab. 4 Intestinal absorption parameters of hawthorn leaves flavonoids and hawthorn leaves flavonoids phospholipids complex ($n=8$)

样品	K_a/h^{-1}	$t_{1/2}/\text{h}$	$A/\%$
山楂叶总黄酮	0.0109 ± 0.0009	64.03 ± 5.56	1.20 ± 0.003
山楂叶总黄酮 磷脂复合物	$0.0391 \pm 0.0025^{1)}$	$16.67 \pm 1.01^{1)}$	$3.73 \pm 0.003^{1)}$

注: 与山楂叶总黄酮比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Note: Compared with hawthorn leaves flavonoids, $^{1)}P<0.05$.

酮浓度与酚红浓度均为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 值分别为 6.0, 7.4, 8.0 的供试液, 分别进行整肠段回流, 每组 8 只大鼠。按“2.6.1”项下方法操作, 收集样品, 测定各时间点样品中药物含量, 以取样时间为横坐标, 该点累积吸收量为纵坐标, 绘制各 pH 条件山楂叶总黄酮与山楂叶总黄酮磷脂复合物肠吸收动力学曲线, 结果见图 2。

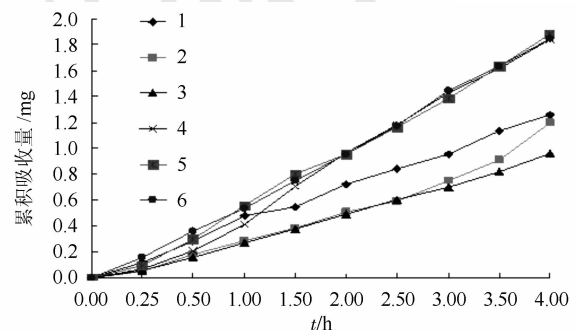


图 2 不同 pH 值组的山楂叶总黄酮与山楂叶总黄酮磷脂复合物大鼠在体肠吸收曲线

1—pH 6.0 的山楂叶总黄酮; 2—pH 7.4 的山楂叶总黄酮; 3—pH 8.0 的山楂叶总黄酮; 4—pH 6.0 的山楂叶总黄酮磷脂复合物; 5—pH 7.4 的山楂叶总黄酮磷脂复合物; 6—pH 8.0 的山楂叶总黄酮磷脂复合物。

Fig. 2 The intestinal absorption curve of different pH value HLF and PPC *in vivo* of rat

1—hawthorn leaves flavonoids at pH 6.0; 2—hawthorn leaves flavonoids at pH 7.4; 3—hawthorn leaves flavonoids at pH 8.0; 4—hawthorn leaves flavonoids phospholipids complex at pH 6.0; 5—hawthorn leaves flavonoids phospholipids complex at pH 7.4; 6—hawthorn leaves flavonoids phospholipids complex at pH 8.0.

按“2.6.2”计算山楂叶总黄酮和山楂叶总黄酮磷脂复合物的吸收速率常数(K_a)和单位时间的吸收转化百分数(A)等参数, 结果见表 5。

结果表明: 肠循环液 pH 值对山楂叶总黄酮及其磷脂复合物的吸收均具有一定影响, 其在 pH 7.4 条件下吸收较好, K_a 和 A 最大, 吸收半衰期 $t_{1/2}$ 最小, 优于 pH 6.0 循环介质, 显著优于 pH 8.0 循环介质($P<0.05$)。各 pH 组山楂叶总黄酮磷脂复合物的肠吸收参数均优于相同 pH 值组山楂叶总黄酮($P<0.05$)。

表 5 不同 pH 值山楂叶总黄酮盒山楂叶总黄酮磷脂复合物的肠吸收参数(n=8)

Tab. 5 Intestinal absorption parameters of different pH value of hawthorn leaves flavonoids and hawthorn leaves flavonoids phospholipids complex(n=8)

样 品	Ka/h ⁻¹	t _{1/2} /h	A/%
山楂叶总黄酮(pH=6.0)	0.0076±0.0003	94.59±3.95	0.69±0.001
山楂叶总黄酮磷脂复合物(pH=6.0)	0.0376±0.0009 ¹⁾	18.46±0.44 ¹⁾	3.19±0.001 ¹⁾
山楂叶总黄酮(pH=7.4)	0.0109±0.0009 ²⁾	64.03±5.56 ²⁾	1.20±0.003 ²⁾
山楂叶总黄酮磷脂复合物(pH=7.4)	0.0391±0.0025 ¹⁾²⁾	16.67±1.01 ¹⁾	3.73±0.003 ¹⁾
山楂叶总黄酮(pH=8.0)	0.0056±0.0003	123.14±5.45	0.42±0.0002
山楂叶总黄酮磷脂复合物(pH=8.0)	0.0305±0.0003 ¹⁾	22.76±0.23 ¹⁾	2.81±0.001 ¹⁾

注：与山楂叶总黄酮组比较，¹⁾P<0.05；与 pH=8.0 比较，²⁾P<0.05。
Note: Compared with hawthorn leaves flavonoids group, ¹⁾P<0.05; compared with pH=8.0, ²⁾P<0.05.

3 讨论

3.1 大鼠在体小肠吸收法的选择

药物的胃肠道吸收特性评价是口服药物制剂处方前研究的关键环节，而小肠是药物口服吸收的主要部位，因此，小肠成为评价药物的口服吸收特性的主要器官。目前，研究药物肠吸收的方法有离体、在体、体内等。

其中，由于在体法应用较多，尤其是大鼠在体小肠吸收法，该法不切断动物血管和神经，不损坏研究部位的淋巴和血液循环系统，药物透过肠上皮细胞后即被血液运走，吸收部位循环液中药物浓度低，能形成漏槽条件，还能避免胃内容物排空及消化管固有运动等因素对吸收实验结果的影响，吸收速率较为稳定，与人体有良好的相关性，是测定药物膜渗透性的很好的方法^[10-11]。再者，该法从肠腔侧取样测定，通过剩余药用量来计算吸收参数，能排除肝首过效应，因而测得的吸收参数能较真实地反映药物的透膜特性^[7]。

3.2 标示体积物质酚红的选择

目前，国内大多采用在体肠循环技术研究药物在体肠的吸收情况。实验中，通过在灌注液中加入不被肠吸收的物质来标示灌注液体积的变化，用得较多的有酚红及¹⁴C-PEG。有研究报道^[12]，在体肠循环实验中长时间循环灌流会导致酚红被小肠吸收，从而给实验结果带来较大误差。造成酚红被吸收的原因可能是由于灌流速度较快(肠循环实验中灌流速度一般为 2.5~5.0 mL·min⁻¹)，远大于正常肠液在肠腔里的运行速度，且灌流时间较长(一般为 3~6 h)，从而容易造成肠黏膜的破损，通透性增加，本来不吸收的一些离子型化合物也能被吸收。本实验在体肠循环灌流实验则采用了较低的灌流速度，先以 1.0 mL·min⁻¹ 流速循环

10 min 后，将流速调节为 0.2 mL·min⁻¹ 灌流 4 h，从而减小了灌流中对肠壁的损伤，可以很好地起到标示体积的作用。

3.3 循环液 pH 条件的选择

小肠内腔 pH 值可能是影响药物吸收的因素之一，各肠段的 pH 各异，在禁食状态下，从十二指肠到空肠到回肠，pH 值由 4.6 逐渐到 6.0，至 8.0，肠道平均 pH 值为 7.4；但是，十二指肠较短，其吸收面积不足总小肠吸收面积的 0.1%，因此设计了 pH 6.0，7.4，8.0 3 个条件，采用整肠段(十二指肠上部至回肠下部)循环灌流法，以山楂叶总黄酮原料药为对照，考察各 pH 条件下山楂叶总黄酮及其磷脂复合物肠吸收情况。结果表明在 pH 为 7.4 时，HLF 与 PPC 的 Ka 和 A 均最大，吸收半衰期 t_{1/2} 最小，在 pH 为 7.4 的肠循环液中总黄酮吸收较好；这可能是因为山楂叶总黄酮中大部分成分以糖苷形式存在，在该 pH 条件下，在肠道糖苷酶作用下，水解的苷元比例较大，从而吸收增加；但是，该假说有待后续进一步研究证实。

本研究结果显示在总黄酮浓度和溶液 pH 相同条件下，山楂叶总黄酮磷脂复合物的肠吸收优于山楂叶总黄酮原料，且有明显改善(P<0.05)，该研究证实了磷脂复合技术可以改善山楂叶总黄酮的小肠吸收。但是，山楂叶总黄酮磷脂复合物的肠吸收量还是较少，未必具有生物学意义，因此，山楂叶总黄酮的生物利用度问题，依然是药物制剂研究的一个课题。

REFERENCES

[1] CHEN S P, ZANG Y R. Progress on studies in hawhorn leaves [J]. J Chengde Med Coll(承德医学院学报), 2003, 20(2): 164-165.
[2] YING X X, LI SH X, LIN Y H. Study on the botanical and

- chemical component of Hawthorn leave [J]. J Liaoning Coll Tradit Chin Med(辽宁中医学院学报), 2001, 3(2): 98-99.
- [3] KUANG R, CHEN N, KANG H, et al. Mechanisms of total flavones of crataegus leaves on experimental atherosclerosis in rabbits [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(4): 372-375.
- [4] OLIVEIRA E J, WATSON D G A, GRANT M H. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and identification of flavonoid glycosides in human plasma [J]. Xenobiotica, 2002, 32(4): 279-287.
- [5] BOMBARDELLI E. Photosome: New cosmetic delivery system [J]. Boll Chim Farm, 1991, 130(11): 431.
- [6] SHI S L, GAO M, TONG L J, et al. Study on preparation of the total flavonoids of hawthorn leaves-phospholipids complex [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2013, 28(1): 243-246.
- [7] WANG X B, GAO M, TONG L J, et al. Study on physicochemical properties of the total flavonoids of hawthorn leaves-phospholipids complex [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2012, 19(3): 240-242.
- [8] REED R, KOLZ C, POTTER B, et al. The mechanistic basis for the disparate effects of angiotensin II on coronary collateral growth [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(1): 61-67.
- [9] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Methodology of Pharmacological Experiment(药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 700-701.
- [10] AMIDON G L, LENNERNAS H, SHAH V P, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. Pharm Res, 1995, 12(3): 413-420.
- [11] FAGERHOLM U, JOHANSSON M, LENNERNAS H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. Pharm Res, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [12] HU Y Q, ZHENG L Y, QIAN C Q, et al. Absorption of phenol red from rat intestine [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 1996, 27(6): 355-359.

收稿日期: 2013-08-09

淫羊藿苷抑制亮氨酸拉链蛋白表达调节糖皮质激素诱导的 MC3T3-E1 成骨基因的表达失衡

林忠, 孙渊*, 金慧, 洪盾, 朱敏, 杨建苗, 林建群, 丁亭亭(浙江省台州医院临床药学实验中心, 浙江 台州 317000)

摘要: 目的 考察成骨细胞 MC3T3-E1 中亮氨酸拉链蛋白(GILZ)的表达与淫羊藿苷(icraiin, ICR)和糖皮质激素地塞米松(dexamethasone, DEX)之间的关系以及对部分成骨相关基因的表达影响。方法 将诱导成熟分化的 MC3T3-E1 细胞分为 3 组, 分别为 DEX 组、ICR 组以及 ICR+DEX 组, 通过 Real-Time RT-PCR 来检测不同组中 GILZ、骨保护素(OPG)、破骨细胞分化因子(RANKL)、骨钙素(OC)和碱性磷酸酶(ALP)mRNA 表达。结果 DEX 能够提升 GILZ、RANKL 和 ALP 的表达, 降低 OPG、OC 的表达, 提高 RANKL/OPG 表达比率。ICR 能够抑制 GILZ、RANKL 和 ALP 的表达, 提升 OPG、OC 的表达, 降低 RANKL/OPG 表达比率。并且 ICR 能够抑制 DEX 诱导的 GILZ、RANKL 和 ALP 表达升高, 逆转 DEX 诱导的 OPG、OC 的表达抑制。同时显著降低了 RANKL/OPG 表达比率。结论 ICR 通过抑制 GILZ 的 mRNA 表达, 降低 RANKL/OPG 的表达比率, 抑制破骨细胞成熟激活。ICR 通过抑制 ALP 表达和提高 OC 表达提高成骨细胞的增殖能力。**关键词:** 淫羊藿苷; 亮氨酸拉链蛋白; 糖皮质激素; MC3T3-E1

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)08-0926-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.006

Icraiin Regulating Expression Imbalance of Glucocorticoid-induced Osteogenesis Genes by Inhibiting GILZ Expression in MC3T3-E1

LIN Zhong, SUN Yuan*, JIN Hui, HONG Dun, ZHU Min, YANG Jianmiao, LIN Jianqun, DING Tingting (Clinical Pharmacy Experimental Center of Taizhou Hospital in Zhejiang Province, Taizhou 317000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the icraiin regulating expression imbalance of glucocorticoid-induced osteogenesis genes by inhibiting GILZ expression in MC3T3-E1. **METHODS** Mature induced differentiation of MC3T3-E1 were divided into 3 groups, respectively dexamethasone(DEX) group, icraiin(ICR) group and ICR+DEX group. The mRNA expression lever

基金项目: 恩泽科研基金(12EZD34); 台州医院青蓝人才培养工程

作者简介: 林忠, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (0576)85487907 E-mail: lz6323@163.com *通信作者: 孙渊, 男, 主管药师 Tel: (0576)85199449 E-mail: linz6285@enzemed.com