

穿山龙提取物中薯蓣皂苷的大鼠在体肠吸收^{*}

柏希慧,刘诗雨,王晶,王昌利,宋道

(陕西中医药大学药学院,咸阳 712046)

摘要 **目的** 考察穿山龙提取物中薯蓣皂苷的在体肠吸收特性。**方法** 运用大鼠在体单向灌流模型,采用高效液相色谱法测定灌流液中薯蓣皂苷含量,分别考察不同肠段、药物浓度和 P-糖蛋白(P-gp)抑制剂对薯蓣皂苷吸收的影响。**结果** 穿山龙提取物中薯蓣皂苷在大鼠全肠段均有吸收,其在不同肠段的吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})从大到小依次为回肠>十二指肠=空肠>结肠;不同质量浓度的薯蓣皂苷(40,80,120 mg·L⁻¹),其 K_a 和 P_{app} 无显著性影响($P>0.05$);含 P-gp 抑制剂组和不含 P-gp 抑制剂组比较,薯蓣皂苷的 K_a 和 P_{app} 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 在实验浓度范围内,穿山龙提取物中薯蓣皂苷的吸收没有浓度依赖性,吸收机制可能为被动扩散;穿山龙提取物中薯蓣皂苷可能是 P-gp 底物。

关键词 穿山龙提取物;薯蓣皂苷;单向灌流模型;P-糖蛋白

中图分类号 R965 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2017)06-0610-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.005

In Vivo Intestinal Absorption Characteristics of Dioscin from *Dioscorea nipponica* Makino Extract in Rat

BAI Xihui, LIU Shiyu, WANG Jing, WANG Changli, SONG Xiao (College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

ABSTRACT **Objective** To study absorption characteristic of dioscin from *Dioscorea nipponica* Makino extract in rat intestine. **Methods** Single-pass intestinal perfusion (SPIP) model was used for rat in situ and HPLC was used to determine the concentrations of dioscin. The effects of different intestinal segments, drug concentration and P-glycoprotein (P-gp) inhibitor on intestinal absorption were investigated. **Results** Dioscin could be absorbed in the whole intestine, the absorption rate constant (K_a) and the apparent coefficient (P_{app}) of dioscin decreased following the sequence of ileum > duodenum = jejunum > colon. Absorption parameters of dioscin had no significant difference at different concentrations (40, 80, 120 mg·L⁻¹). There were significant differences in K_a and P_{app} values between P-gp inhibitor group and no P-gp inhibitor group ($P<0.05$). **Conclusion** The saturate phenomena was not observed under the test range of drug concentration, and the absorption mechanism may be passive diffusion transport. Dioscin in *Dioscorea nipponica* Makino extract may be the substrate of P-gp.

KEY WORDS *Dioscorea nipponica* Makino extract; Dioscin; Single-pass intestine perfusion model; P-glycoprotein

穿山龙为薯蓣科植物穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica* Makino)的干燥根茎,味甘、苦,性温,归肝、肾、肺经,具有祛风除湿、舒筋通络、活血止痛、止咳平

喘的功效,用于风湿痹病、关节肿胀、疼痛麻木、跌扑损伤、闪腰岔气、咳嗽气喘^[1]。其有效成分主要为甾体皂苷类,包括薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷和水溶性皂苷,其中薯蓣皂苷具有抗肿瘤、改善心血管功能、调节免疫、镇咳平喘、抗炎镇痛等作用^[2-3]。目前国内关于穿山龙薯蓣皂苷提取分离、药理作用机制研究较多,而对薯蓣皂苷肠吸收研究较少,笔者在本实验采用大鼠在体单向灌流模型,考察穿山龙提取物中薯蓣皂苷的肠吸收特性,为其生物药剂学研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量(250±20) g, 购自第四军医大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(军)2012-0007。动物饲养于清洁级饲养室, 期间自由饮水、摄食, 室温 20~25℃, 相对湿度 40%~70%, 光照周期 12 h/12 h, 通风良好。

1.2 仪器 戴安 Ultimate 3000 液相色谱仪(包括双三元低压梯度泵、自动进样器、柱温箱、UV 检测器、

收稿日期 2016-08-26 修回日期 2016-10-09

基金项目 *国家自然科学基金资助项目(81373944);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2012KTCQ03-13);陕西省中药基础与新药研究重点实验室/国家中医药管理局中药制剂三级实验室(1008)。

作者简介 柏希慧(1991-),女,陕西西安人,硕士,主要从事中药制剂工艺质量评价体系研究。电话:(0)18220522093, E-mail: 295974924@qq.com。

通信作者 王昌利(1958-),男,教授,主要从事中药制剂工艺质量评价体系研究。电话:(0)13709103433, E-mail: wcl3433@163.com。

通信作者 宋道(1979-),男,博士,副教授,主要从事天然药物纯化及新剂型的研究。电话:(0)15319015083, E-mail: songxiao1999@sohu.com。

Chromleon 工作站); BT100-1F 型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司); KH-400-KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); AR1140 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司, 感量: 0.000 1 g); HH-2 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); X1 型高速离心机(Gene Company Limited)。

1.3 试药 穿山龙提取物(自制, 经 HPLC 法测定薯蓣皂苷含量为 1.25%); 薯蓣皂苷对照品(中国食品药品检定研究院, 含量 $\geq 98\%$, 批号: 111707-201402); 乌拉坦(上海山浦化工有限公司, 批号: 20150303); 盐酸维拉帕米(中国食品药品检定研究院, 批号: 100223-200102); 乙腈(色谱纯, Thermo Fisher Scientific); 水为超纯水。

1.4 穿山龙提取物的制备方法 精密称取一定量穿山龙药材, 用 4.5 倍量 70% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液, 静置, 滤过, 减压回收溶剂, 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥成粉末^[4]。测得薯蓣皂苷含量为 1.25%。

1.5 溶液的配制

1.5.1 Krebs-ringer 试液(K-R 缓冲液) 称取氯化钠(NaCl) 7.8 g, 氯化钾(KCl) 0.35 g, 氯化钙(CaCl_2) 0.37 g, 碳酸氢钠(NaHCO_3) 1.37 g, 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4) 0.32 g, 氯化镁(MgCl_2) 0.02 g, 葡萄糖 1.40 g, 加水溶解并稀释至 1 L, 即得^[5]。

1.5.2 薯蓣皂苷对照品的配制 取薯蓣皂苷对照品 9.9 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成 $990 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的薯蓣皂苷对照品贮备液。

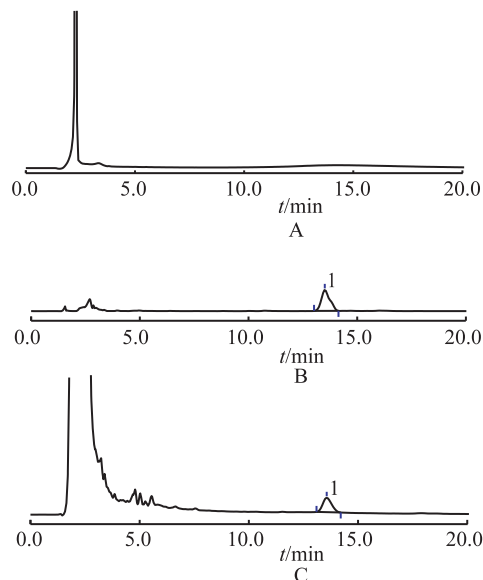
1.5.3 供试液的配制 取穿山龙提取物适量, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 加入少量 K-R 液, 超声溶解, 定容, 得薯蓣皂苷浓度为 40, 80, 120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试液。

1.5.4 空白肠灌流液的制备 用预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.9% 氯化钠溶液将肠内容物冲洗干净, 再用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 K-R 液以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速冲洗肠道 5 min, 然后流速降为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 接着以 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 K-R 液平衡 30 min, 使肠道吸收达到稳定状态。进液口用已知质量的装有灌流液的 5 mL 离心管灌流, 出液口处用另一已知质量的 5 mL 离心管收集流出液, 经灌流后即得。

1.6 分析方法的建立

1.6.1 色谱条件 BDS HYPERSIL C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 水(51:49); 检测波长 203 nm; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

1.6.2 专属性考察 分别取空白肠灌流液、对照品溶液、穿山龙提取物肠灌流液, 分别按照“1.6.1”项条件测定, 记录色谱图。结果见图 1。薯蓣皂苷保留时间约为 13.5 min, 空白肠灌流液在此保留时间处无吸收峰, 表明杂质对测定无干扰, 分析方法的专属性良好。



A. 空白肠灌流液; B. 对照品溶液; C. 穿山龙提取物肠灌流液; 1. 薯蓣皂苷

图 1 3 种溶液的 HPLC 色谱图

A. blank intestinal perfusate; B. control solution; C. intestinal perfusate of *Dioscorea nipponica* Makino extract; 1. dioscin

Fig. 1 HPLC chromatograms of three kinds of solution

1.6.3 线性关系考察 精密吸取对照品贮备液 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL 置 10 mL 量瓶中, K-R 液定容, 制成浓度 9.9, 49.5, 99.0, 148.5, 198.0, 247.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列对照品溶液, 经孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按照“1.6.1”项条件测定。以浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.040 3X - 0.083 6$, $r = 0.999 0$, 表明薯蓣皂苷在 9.9 ~ 247.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

1.6.4 精密度实验 取浓度为 49.5, 99.0, 148.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的薯蓣皂苷对照品溶液, 1 d 内每个质量浓度连续测 5 次, 连续测定 5 d, 计算日内、日间精密度。低、中、高 3 个浓度的日内精密度 RSD 为 0.28%, 0.48%, 0.48%; 日间精密度 RSD 为 0.88%, 1.06%, 0.56%。

1.6.5 方法回收率 取浓度为 49.5, 99.0, 148.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的薯蓣皂苷对照品溶液, 按“1.6.1”项

色谱条件检测,记录峰面积;代入“1.6.3”项回归方程,计算质量浓度,将所得的质量浓度与实际浓度的比值作为方法回收率。低、中、高3种质量浓度的方法回收率分别为102.80%,100.03%,99.60%。

1.6.6 稳定性实验 取灌流后的样品,于0,3,6,12,24 h进样测定,记录峰面积,样品中薯蓣皂苷 RSD 为3.2%,结果表明灌流液样品在24 h内稳定性良好。

1.7 大鼠在体肠灌流实验

1.7.1 实验步骤 选取实验前禁食12 h并自由饮水SD大鼠,腹腔注射20%乌拉坦溶液($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉。沿腹中线打开腹腔,分离出待考察肠段,取约10 cm于两端切口,插管并用细线扎紧。供试液按照“1.5.4”项方法进行灌液,收集流出液。以15 min为一段点,迅速更换一次灌流液和收集液的离心管,共采集8个点,称定质量,计算灌入和收集液质量的变化。实验结束后,剪下被考察肠段,用0.9%氯化钠溶液冲洗干净,测量其长度(L)和横截面半径(r)。实验过程中将伤口用浸有0.9%氯化钠溶液的脱脂棉覆盖保湿,红外灯下保温^[6-7]。

大鼠各肠段的选择^[8]:十二指肠段自幽门1 cm处开始向下取10 cm,空肠段自幽门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。

1.7.2 数据分析 本实验采用重量法对供试液流入和流出的体积进行校正,并计算药物吸收常数(K_a)和表观吸收常数(P_{app})。

$$K_a = \left(1 - \frac{\rho_{\text{out}}}{\rho_{\text{in}}} \times \frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{in}}}\right) \times \frac{Q}{\pi r^2 l}$$

$$P_{\text{app}} = \frac{-Q_{\text{in}} \frac{\rho_{\text{out}}}{\rho_{\text{in}}} \times \frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{in}}}}{2\pi r l}$$

其中, V_{in} 和 V_{out} 分别为肠段灌入的灌流液和收集液的体积(mL)(假定灌流液和收集液的密度相同), l 和 r 分别为灌流肠段的长度(cm)和横截面半径(cm), Q 为灌流速度($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), ρ_{in} 和 ρ_{out} 分别为灌流液和收集液的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.8 统计学方法 采用SPSS 15.0版统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对数据进行单因素方差分析(ANOVA),组间均数差异比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 薯蓣皂苷在不同肠段的吸收 取薯蓣皂苷浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试液,按“1.7.1”项下方法操作,计算薯蓣皂苷在十二指肠、空肠、回肠和结肠的吸收参

数,结果见表1。结果表明薯蓣皂苷在大鼠全肠段均有吸收,其不同肠段的 K_a 、 P_{app} 大小顺序为回肠>十二指肠=空肠>结肠。对各肠段的 K_a 、 P_{app} 进行 t 检验,发现回肠段与其余3个肠段吸收差异有统计学意义($P < 0.05$),结肠段与其余3个肠段吸收差异有统计学意义($P < 0.05$),十二指肠与空肠吸收差异无统计学意义($P > 0.05$)。穿山龙提取物中薯蓣皂苷在回肠的吸收较好,在结肠的吸收较差。

表1 薯蓣皂苷在不同肠段的吸收

Tab. 1 Absorption parameters of dioscin at various segments of intestine $\bar{x} \pm s, n = 5$

肠段	$K_a / (\times 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1})$	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	$2.083 \pm 0.049^{*1}$	$1.785 \pm 0.047^{*1}$
空肠	$1.994 \pm 0.132^{*1}$	$1.658 \pm 0.118^{*1}$
回肠	$4.586 \pm 0.214^{*1*2}$	$3.946 \pm 0.177^{*1*2}$
结肠	1.573 ± 0.159	2.022 ± 0.209

与结肠比较, $^{*1}P < 0.05$;与空肠比较, $^{*2}P < 0.05$

Compared with colon, $^{*1}P < 0.05$; Compared with jejunum, $^{*2}P < 0.05$

2.2 不同药物浓度对肠吸收的影响 取薯蓣皂苷浓度为40,80,120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试液,以回肠为考察肠段,按“1.7.1”项方法操作,考察不同药物浓度对肠吸收的影响,结果见表2。3组数据经 t 检验,发现 K_a 和 P_{app} 均差异无统计学意义($P > 0.05$),提示薯蓣皂苷在大鼠全肠段的吸收无自身浓度抑制作用,吸收机制可能为被动扩散。

表2 不同浓度薯蓣皂苷在大鼠回肠段的吸收参数

Tab. 2 Absorption parameters of dioscin at different concentrations in the ileum of rats $\bar{x} \pm s, n = 5$

浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_a / (\times 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1})$	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
40	4.641 ± 0.156	4.068 ± 0.149
80	4.586 ± 0.214	3.946 ± 0.177
120	4.603 ± 0.133	4.016 ± 0.183

2.3 P-糖蛋白(P-gp)抑制剂对薯蓣皂苷肠吸收的影响 以盐酸维拉帕米作为P-gp抑制剂,用薯蓣皂苷浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 供试液配制108 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸维拉帕米作为供试液。以回肠为考察肠段,按“1.7.1”项下方法操作,考察P-gp抑制剂对薯蓣皂苷肠吸收的影响,结果见表3。结果表明,加入盐酸维拉帕米后,薯蓣皂苷在回肠段的吸收有所增加,经 t 检验发现差异有统计学意义,提示薯蓣皂苷可能是P-gp底物。

表 3 P-gp 抑制剂对薯蓣皂苷在大鼠回肠段吸收的影响
Tab.3 Effect of P-gp inhibitor on absorption of dioscin
in the ileum of rats $\bar{x} \pm s, n = 5$

组别	$K_a / (\times 10^{-2} \text{ min}^{-1})$	$P_{app} / (\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
阴性对照组	4.586 ± 0.214	3.946 ± 0.177
盐酸维拉帕米组	6.468 ± 0.259 ^{*1}	5.840 ± 0.235 ^{*1}

与阴性对照组比较, ^{*1}*P* < 0.05
Compared with negative control group, ^{*1}*P* < 0.05

3 讨论

大鼠在体单向肠灌注模型保证肠道神经以及内分泌输入的完好无损,同时也保证血液及淋巴液的供应,提高生物活性并且具有较好操作性。本实验以较低流速(0.2 mL·min⁻¹)对 4 个肠段进行单向灌注,实验条件与口服给药后药物接触的肠道环境较接近,其吸收速率稳定,与人体肠吸收有良好的相关性^[9]。

目前常用的体积校正方法有酚红法和重量法。但在长时间的灌注过程中,肠道对酚红存在一定程度的吸收,且酚红本身还可能干扰某些化合物在肠道的转运和分析测定。而重量法通过灌注前后的质量差和密度对体积进行校正,真实反映肠道水分吸收情况。因此,本实验采用重量法对体积的变化进行校正^[6]。

P-gp 的外排作用是导致许多药物口服生物利用度低的重要原因。据相关文献报道,P-gp 在空肠、远端回肠、结肠的表达依次增加,但因结肠内存在大量的微生物及水解酶,对实验结果造成误差,所以选择在远端回肠段考察 P-gp 对薯蓣皂苷肠吸收的影响^[7,10]。

本实验通过在体单向灌注流模型研究穿山龙提取物中薯蓣皂苷的大鼠肠吸收特性,结果表明薯蓣皂苷在大鼠全肠段均有吸收,其在回肠段吸收最好;通过研究不同浓度对薯蓣皂苷吸收的影响,发现薯蓣皂苷吸收不受浓度抑制,其吸收机制可能为被动扩散;通过对比

阴性对照组和维拉帕米组的吸收参数,发现薯蓣皂苷可能为 P-gp 底物。

但是,本研究仍有不足之处。本研究考察穿山龙提取物中薯蓣皂苷的大鼠肠吸收特性,并未考察穿山龙提取物中其他成分对薯蓣皂苷吸收的影响。因此,在未来研究工作中,将进一步对比薯蓣皂苷单体与穿山龙提取物中薯蓣皂苷的肠吸收系数差异,研究穿山龙提取物中其他成分对薯蓣皂苷吸收的影响。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:267-268.

[2] 刘克建,张天,邓冬莉,等. 穿山龙化学成分与分离纯化技术研究进展[J]. 广州化工,2013,41(10):21-23.

[3] 张伟峰,刘宝山. 薯蓣皂苷的药理作用研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(6):543-544.

[4] 白曼,马丽娜,张小飞,等. 星点设计-响应面分析法优化穿山龙总皂苷提取工艺[J]. 中南药学,2013,11(1):4-7.

[5] 陈新民,李俊松,李文,等. 五味子有效成分的大鼠在体单向灌注肠吸收[J]. 药学报,2010,45(5):652-658.

[6] 饶小勇,龚明,尹珊,等. 白头翁皂苷 D 在大鼠肠道的吸收行为研究[J]. 中草药,2013,44(24):3515-3519.

[7] 王进荣,王平,杨永茂,等. 单向灌注法评价芦荟大黄素大鼠体内肠吸收的研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(17):2393-2397.

[8] YI Y N, TU L X, HU K L, et al. The construction of puerarin nanocrystals and its pharmacokinetic and *in vivo-in vitro* correlation (IVIVC) studies on beagle dog [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 133: 164-170.

[9] 邓少东,张鹏,林励,等. 单向灌注法研究巴戟天低聚糖的大鼠肠吸收特性[J]. 中国中药杂志,2015,40(1):134-140.

[10] 何明珍,梁起栋,欧阳辉,等. α-常春藤皂苷大鼠在体肠吸收特性研究[J]. 中草药,2014,45(6):807-811.

.....

关于外文字母使用正体的常用情况

①计量单位符号和国际单位制(SI)词头。②数学式中的运算符号、指数和对数函数符号、特殊常数符号、缩写符号等。例如:Σ(连加),ln(自然对数),lg(常用对数),lim(极限),π(圆周率),max(最大值),pH值,AUC(曲线下面积),RSD(相对偏差),t_{1/2}(半衰期)等。③生物学中亚族以上(含亚族)的拉丁文学名及定名人。④化学元素符号。⑤仪器、元件、样品等的型号和代号。⑥用作序号和编号的字母。例如:附录A,组B。⑦外文的人名、地名、书名和机关名以及缩略语、首字母缩写词等。

《医药导报》编辑部