

固定化脂质体色谱与动物小肠吸收模型的相关性研究方法及其应用

盛亮洪¹ 李 萍^{*1} 邹汉法²

¹ (中国药科大学现代中药重点实验室、生药学教研室, 南京 210039)

² (中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心, 大连 116011)

摘 要 固定化脂质体色谱 (LC) 是一种新颖的筛选经被动吸收药物的技术, 建立了 LC 与常用的动物小肠吸收模型的相关性研究方法, 考察了当归补血汤在 LC 上有保留的成分的保留值与其在大鼠在体和离体小肠吸收模型中被吸收值的相关性。结果显示, 当归补血汤在 LC 上有保留成分的保留值与其通过大鼠在体小肠灌流和离体小肠实验测得的吸收值具有很好的相关性, 其相关系数分别为 0.9356 和 0.9350; 当归补血汤在 LC 上有保留的成分主要以被动扩散的方式被机体吸收。

关键词 固定化脂质体色谱, 当归补血汤, 活性成分, 相关性分析, 小肠吸收

1 引 言

口服药物只有被人体吸收后才会表现出它的生物活性, 而人体的吸收功能主要由小肠上皮细胞来完成, 因而小肠吸收是口服药物表现其生物活性的关键步骤之一。Beigi 等^[1]首次采用凝胶作为载体, 利用固定化的脂质体固定相 (LC) 用于模拟小肠上皮细胞对药物的被动吸收过程。研究表明, 药物在 LC 上的保留行为与药物在人体的吸收值具有较好的相关性。此后, 该技术得到了不断的发展和完善^[2~4]。目前, 针对中药成分吸收情况的研究, 通常采用天然药物化学的方法从中分离提取单体化合物, 以其进行动物实验研究, 从而获得该化合物的吸收参数。此种方法的操作相当繁琐, 周期长, 且部分成分含量极低, 难以从中获得足够的单体化合物, 若要求得某味中药中全部化学成分的吸收情况, 十分困难。另外, 单体成分的吸收情况与这些成分在总提取物中被吸收的情况可能有所不同。因此, 当前中药多成分协同与药理作用相关性研究手段的缺乏已经成为制约中药现代化、国际化的瓶颈。

本实验首次以中药直接提取物为考察对象, 建立了固定化脂质体色谱与动物小肠吸收模型的相关性研究方法, 研究了当归补血汤在 LC 上有保留成分的保留值与其通过大鼠在体小肠灌流和离体小肠实验测得的吸收值的相关性, 结果表明: 药物在其上的保留行为与其被吸收的程度具有很好的相关性, 能够为中药的活性筛选和药效物质基础的研究提供重要的信息。因此, LC 方法有望成为研究中药中被动吸收成分的新的、有效的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型系列高效液相色谱仪 (美国惠普公司); 旋转薄膜蒸发仪 (瑞士 Büchi 公司); HL-2 恒流泵 (上海沪西分析仪器厂); 硅胶 (5 μ m 30 nm, Chrom Expert 公司)。蛋黄卵磷脂 (华东师范大学化工厂); 当归 (甘肃陇港有限公司), 经李萍教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根; 黄芪, 采自山西浑源, 经李萍教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge 的干燥根; 阿魏酸 (中国药品生物制品检定所); 磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L NaCl 及 10 mmol/L Na₂HPO₄·H₃PO₄, 使用时按所需配制制成不同 pH 的缓冲液); 含 1% 吐温-80 的 K-R 试剂 (NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, Glucose 1.4 g, 加纯净水适量使成 1000 mL, 用 H₃PO₄ 调 pH 7.4); 甲醇 (色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司)。

2004-06-21 收稿; 2004-10-29 接受

本文系国家自然科学基金重大研究计划 (No. 90209045) 和国家杰出青年科学基金 (No. 30325046) 资助项目

2.2 动物

大白鼠,由中国药科大学实验动物中心提供。

2.3 LC 色谱柱的制备

磷脂涂敷法制备 LC 固定相,具体方法参见文献 [3, 5]。

2.4 容量因子^[2,5]

$K_s = (V_R - V_0) / A$, V_R 为药物在固定化脂质体色谱柱上的保留体积, V_0 为药物在无脂质体的色谱柱上的保留体积,实验时由 NaNO_2 测得。A 为固定化磷脂的量。

2.5 样品的制备

2.5.1 当归补血汤 A 取粉碎的当归 10 g, 黄芪 50 g, 加 75%乙醇 720 mL, 浸泡 1 h, 回流提取 1 h, 50℃减压蒸发掉溶剂,用 720 mL 含 1%吐温-80 的 K-R 试剂小肠灌流营养液溶解,过滤,磷酸调 pH 值为 7.4。

2.5.2 当归补血汤 B₁、B₂、B₃、B₄ 和 B₅ 取粉碎的当归 20 g, 黄芪 100 g, 加 75%乙醇 720 mL, 浸泡 1 h, 回流提取 1 h, 50℃减压蒸发掉溶剂,用 720 mL 含 1%吐温-80 的 K-R 小肠灌流营养液溶解,过滤, H_3PO_4 调 pH 值为 7.4, 得样品 B₁;取 B₁ 360 mL, 加入同体积含 1%吐温-80 的 K-R 小肠灌流营养液, H_3PO_4 调 pH 值为 7.4, 得样品 B₂, 依次得样品 B₃、B₄ 和 B₅。

2.6 实验方法

2.6.1 当归补血汤在色谱柱上保留成分的保留值与大鼠在体小肠吸收百分值的相关性实验 取约 200 g 的大鼠 3 只,禁食不禁水 12 h, 麻醉,在大鼠腹部开约 3 cm 的开口,按图 1 做成大鼠在体小肠灌流吸收模型。实验前用生理盐水将小肠冲洗干净。在烧杯中加入 90 mL 当归补血汤提取液 A, 开启恒流泵,以 10 mL/min 流速平衡 5 min, 然后把流速调为 1 mL/min, 用移液管吸取 1 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤,供 LC 色谱分析, 2 h 后, 停止实验, 取出灌流液, 添加含 1%吐温-80 的 K-R 液至 89 mL, 取样 1 mL, 过滤,供 LC 色谱分析。当归补血汤中成分(每个峰)的吸收量 = (灌流前峰面积值 - 灌流 2 h 后峰面积值) / 灌流前峰面积值 × 100%, 计算 3 个大鼠的平均值。

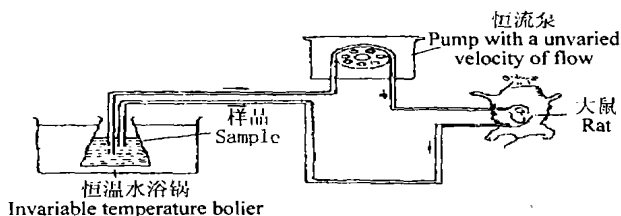


图 1 大鼠在体小肠吸收模型

Fig 1 The device of in situ rat intestine circle

2.6.2 当归补血汤吸收机制的研究 取 200 g

左右的大鼠 15 只,随机分为 5 组,分别选用 B₁、B₂、B₃、B₄ 和 B₅ 供试药液 90 mL 进行实验,其余步骤同 2.6.1。

2.6.3 当归补血汤在色谱柱上保留成分的保留值与大鼠离体小肠吸收百分值的相关性实验 取 200 g 左右的大鼠,禁食不禁水 12 h, 麻醉后打开腹腔,迅速取出约 20 cm 长的空肠,在 37℃的通氧台氏液中冲洗干净后翻转。用棉线将翻转后的空肠结扎成 5 个 3~4 cm 长的小囊,每个小囊中加入 0.5 mL 的含 1%吐温-80 的 K-R 液。将翻转小肠囊分别放入 5 个含 30 mL 当归补血汤提取液 A 的小烧杯中,置于 37℃恒温水浴,持续通氧。1 h 后用取样针取出小囊中的所有内液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,供 LC 色谱分析。当归补血汤所含成分(每个峰)的吸收量 = 小肠囊内成分峰面积 / 烧杯内药物成分峰面积 × 100%。计算 5 个小肠囊的平均值。

3 结果与讨论

3.1 当归补血汤在 LC 色谱柱上保留成分的保留值与其大鼠在体小肠吸收百分值的相关性

与 HPLC 相比,改良的 LC 色谱柱具有如下优势:用 HPLC 进行中药多成分小肠吸收的检测,需要对样品进行复杂的预处理,而样品的处理有可能造成所测成分的含量改变;LC 可以排除大量的可能不被小肠吸收成分的干扰,将含有 1%吐温的空白 K-R 小肠液灌流 2 h 后,取样进行 LC 色谱分析时发现其仅在死时间内有一个峰(图 2A),对当归补血汤的检测没有干扰,因此可以直接用 LC 色谱柱分析当

归补血汤小肠灌流液样品;HPLC难以一次性将 LC 上有保留的峰分离开来,使样品分析时间延长;LC 在短时间内出峰完毕,可以与动物实验保持同步,避免药物长时间放置导致其成分含量的变化。

如图 2 所示,在选定的色谱条件下,当归补血汤有 6 个明显的峰在 LC 色谱柱上有保留,其与生物膜的相互作用的强度随着 K_s 值的增加而增强,即 $1 < 2 < 3 < 4 < 5 < 6$ 。在一定的 K_s 值范围内,药物的吸收值随着 K_s 值的增加而增加^[1,2]。当改变其色谱条件时,当归补血汤中的另一个成分阿魏酸单独与其它成分分离开来(图 2B, 7 号峰,由标准品得知,当 pH 值为 7.4 时,阿魏酸在死时间内出峰)。以这 7 个峰为代表,考察了当归补血汤在大鼠小肠灌流 2 h 后每个峰的峰面积改变,以此作为这些成分被大鼠小肠吸收的相对百分含量。以每个峰的 K_s 为横坐标,以吸收的相对百分含量为纵坐标,对其进行线性相关分析,结果如图 3。从图 3 可以看出,当归补血汤在 LC 色谱柱上的保留成分的保留值与大鼠的在体小肠吸收模型具有较好的相关性($r=0.9356$, $p<0.01$)。随着不同成分的保留时间的延长,其吸收量逐渐增加。

3.2 当归补血汤吸收机制的研究

被动扩散是药物由高浓度一侧透过细胞膜向低浓度一侧转运,不需要载体蛋白的帮助,因而没有饱和现象。LC 由脂质体制备而成,不含有载体蛋白。研究表明,主要依靠主动吸收的药物在 LC 色谱上几乎没有保留。不同浓度下的当归补血汤样品在 LC 色谱柱上有保留的 7 个峰的小肠吸收见表 1。结果表明,在 16 倍浓度范围内,当归补血汤在 LC 色谱柱上的 7 个保留成分的吸收量与浓度呈线性相关,即吸收与浓度呈正比例关系,符合 Ficks 扩散原理。说明当归补血汤在 LC 色谱柱上有保留的成分的小肠吸收表现为典型的被动扩散吸收机制。阿魏酸(分子量 191)在 pH 值为 7.4 的情况下在 LC 上没有保留,然而动物实验显示其在小肠中有一定的吸收,其途径可能是通过细胞间隙的被动扩散。

表 1 当归补血汤在 LC 上的 7 个主要保留峰在不同浓度条件下被吸收的相对百分值

Table 1 The absorbed percent rate of seven peaks of Danggui Buxue Decoction with significant retention on LC on the condition of different concentration

	峰 (peak) 1	峰 (peak) 2	峰 (peak) 3	峰 (peak) 4	峰 (peak) 5	峰 (peak) 6	峰 (peak) 7
B ₁	14.3 ± 1.2	32.0 ± 1.5	21.7 ± 1.8	31.2 ± 1.6	38.9 ± 2.9	31.1 ± 1.6	83.2 ± 1.2
B ₂	14.0 ± 1.0	33.3 ± 2.0	21.7 ± 2.1	33.2 ± 4.5	38.3 ± 2.5	31.1 ± 3.5	84.7 ± 3.6
B ₃	15.0 ± 2.4	32.3 ± 1.7	21.4 ± 2.9	30.6 ± 1.9	39.4 ± 1.5	28.7 ± 2.8	84.9 ± 4.5
B ₄	13.7 ± 2.0	31.4 ± 1.0	20.8 ± 1.6	30.7 ± 0.7	39.2 ± 1.5	30.7 ± 1.0	80.9 ± 3.5
B ₅	15.2 ± 3.0	30.5 ± 1.8	21.6 ± 1.2	30.5 ± 1.0	38.6 ± 2.0	30.6 ± 1.5	81.2 ± 2.4

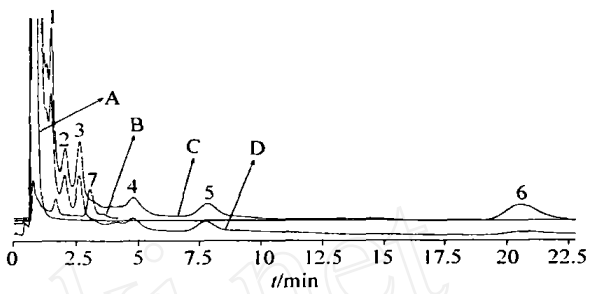


图 2 空白灌流液 (A)、当归补血汤中的阿魏酸 (B)、灌流前当归补血汤 (C) 和灌流后 2h 当归补血汤 (D) 谱图
Fig 2 Chromatogram of rat intestine circle liquid without Danggui Buxue Decoction (A), chromatogram of ferulic acid of Danggui Buxue Decoction (B), chromatogram of Danggui Buxue Decoction before intestine circle (C), chromatogram of Danggui Buxue Decoction after 2h intestine circle (D)

A, C, D. 自制 LC 色谱柱 (immobilized liposome chromatographic (LC) column made in our laboratory); 流动相 (mobile phase): pH 7.4 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 缓冲溶液 (buffer); 流速 (flow rate): 1 mL/min; λ : 210 nm; B. 流动相 (mobile phase): pH 2.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 缓冲溶液 (buffer); λ : 313 nm。

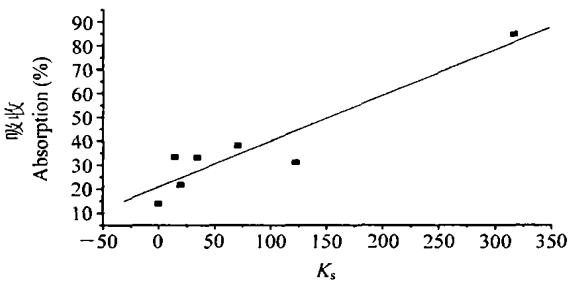


图 3 当归补血汤在 LC 色谱柱上有保留成分的保留值与其在大鼠在体小肠吸收百分值的相关性
Fig 3 Correlation between K_s values of retentive components of Danggui Buxue Decoction on LC and their in situ intestine absorption percentage
 $r=0.9356$; $p<0.01$ 。

3.3 当归补血汤在 LC 色谱柱上有保留成分的保留值与其在大鼠离体小肠吸收百分值的相关性

为了进一步验证当归补血汤在 LC 上所保留的成分是否被吸收进入血液,或者是被吸附在小肠上皮细胞壁而没有穿透过去,采用离体小肠吸收模型来检测药物穿透细胞膜的能力,当归补血汤在 LC 有保留的 7 个峰的 K_s 值与其在离体小肠吸收模型中被吸收含量的相关性分析显示,当归补血汤在 LC 上有保留的成分的 K_s 值与其在离体小肠吸收模型中的被吸收值同样具有较好的相关性 ($r=0.9350$, $p<0.01$)。

综合大鼠在体和离体小肠实验结果说明,当归补血汤在 LC 上有保留的成分的吸收与其在色谱上的保留行为具有显著的相关性。随着其 K_s 值的增加,各成分的吸收有增强的趋势。本实验的 LC 与大鼠在体和离体小肠吸收的相关性研究均显示其相关系数明显高于文献 [3, 5] 的相关性系数值,其原因可能是: (1) 文献中各个药物的吸收值来自于不同的个体,其间存在一定的个体差异,而本实验将当归补血汤中的所有成分一起在同一大鼠上进行检测,有效的排除了这种差异; (2) 文献中的药物存在复杂的吸收机制,即既有被动吸收的药物,又有主动吸收的药物,而主动吸收的药物在 LC 上大多在死时间内出峰,因此对于主动吸收的药物来说,其在 LC 上的保留值与经机体的吸收值之间可能不存在相关性,而本实验进一步证实了 LC 是预测经被动吸收药物的吸收情况的有力工具。

References

- 1 Beigi F, Yang Q, Lundahl P. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 704: 315~321
- 2 Beigi F, Gottschalk I, Hägglund C L, Haneskog L, Brekkan E, Zhang Y, Österberg T, Lundahl P. *J. Pharmaceutics*, **1998**, 164: 129~137
- 3 Mao Xiqin (毛希琴), Zou Hanfa (邹汉法), Luo Quanzhou (罗权舟), Kong Liang (孔亮), Li Xin (厉欣), Sun Naichang (孙乃昌). *Chinese J. Chromatogr. (色谱)*, **2001**, 19(5): 433~435
- 4 Engvall C, Lundahl P. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1031: 107~112
- 5 Mao Xiqin (毛希琴), Zou Hanfa (邹汉法), Luo Quanzhou (罗权舟), Kong Liang (孔亮), Li Xin (厉欣), Sun Naichang (孙乃昌). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2001**, 29(10): 1135~1139

Correlation Between Immobilized Liposome Chromatography and Rat Intestine Absorption Model and Their Application in Traditional Chinese Medicine

Sheng Lianghong¹, Li Ping^{*1}, Zou Hanfa²

¹ (Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine, Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210039)

² (National Chromatographic Research and Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011)

Abstract Immobilized liposome chromatography (LC) can be used to screen and analyze the passive absorption drugs. A new method researching the correlation between the LC and rat intestine model was established, and the method was applied to examine the model for Danggui Buxue Decoction, a classic Traditional Chinese Medicine. The results show that a good correlation is obtained between K_s values of retentive components of Danggui Buxue Decoction which are absorbed by the passive transcellular route on LC and their rat intestine absorption percentage.

Keywords Immobilized liposome chromatography, Danggui Buxue Decoction, bioavailable component, correlation, intestine absorption

(Received 21 June 2004; accepted 29 October 2004)