



白桦脂酸在大鼠体肠吸收动力学的研究

许慧君¹, 任晓华², 杜英峰¹, 张兰桐^{1*}, 李桃¹, 葛莹¹, 王会杰¹

(1. 河北医科大学药学院药物分析教研室, 河北石家庄 050017;

2. 石家庄市中心医院药剂科, 河北石家庄 050000)

[摘要] 目的: 建立同时测定肠循环液中白桦脂酸和酚红浓度的 HPLC-DAD 法, 并探讨白桦脂酸在大鼠各肠段的吸收动力学特征及不同药物浓度对吸收的影响。方法: 采用大鼠在体肠吸收实验模型, 并考察吸收部位、药物浓度和 pH 对药物吸收的影响。结果: 在 75 ~ 125 mg · L⁻¹ 白桦脂酸的吸收速率与质量浓度呈线性关系, K_a 基本保持不变; 各肠段的吸收速率无显著性差异, 十二指肠、空肠、回肠和结肠的 K_a 分别为 (0.151 ± 0.004 9), (0.159 ± 0.005 6), (0.156 ± 0.008 3), (0.149 ± 0.004 1) h⁻¹。结论: 白桦脂酸在小肠中吸收良好, 没有特定吸收部位; 不同浓度对白桦脂酸在大鼠全肠道的吸收无显著影响, 其在肠道的吸收呈一级吸收动力学特征, 吸收机制为被动扩散。白桦脂酸是难溶性药物, 可以通过增加药物的溶出度, 进而提高药物的生物利用度。

[关键词] 白桦脂酸; 肠吸收动力学; 高效液相色谱法

白桦脂酸 (betulinic acid, BA), 五环三萜类有机酸, 该类化合物具有显著的抗肿瘤和抗 HIV 活性^[1-3], 同时还具有作用机制特异、相对分子质量小、低毒性等优点, 有广泛的应用开发前景, 是一类很有潜力的药物先导化合物。但由于 BA 在水中溶解度小, 生物利用度低, 限制了其在临床上的应用。为了改善其生物利用度低的缺点, 有必要改进其剂型, 且探明该药物在肠道各区段的吸收特征对于剂型改造具有十分重要的意义。目前药物吸收机制及吸收部位的研究方法很多, 大致可分为在体、离体和体内 3 大类。本实验采用大鼠在体肠灌注的方法, 对 BA 的吸收部位及吸收动力学进行研究, 其结果可为剂型改造提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。HL-1S 恒流泵 (上海沪西分析仪器厂)。白桦脂酸 (自制, 经 IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 确定结构, 含量大于 98.5%); 乌拉坦 (进口分装); 酚红 (沈阳市试剂三厂); 乙腈为色谱纯; 重蒸水; 其他试剂均为分析纯。

[稿件编号] 20110412015

[基金项目] 河北省自然科学基金石药集团医药联合项目 (C2011206167)

[通信作者] * 张兰桐, 教授, 研究方向为药物代谢研究, Tel: (0311)

86266419, E-mail: zhanglantong@263.net

[作者简介] 许慧君, 讲师, 博士研究生, Tel: 13833197809, E-mail:

xunuonuo19791103@163.com

1.2 溶液配制

Krebs-Ringer's 营养液 (K-R 试液, pH 7.4): 取 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37g, NaHCO₃ 1.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, 葡萄糖 1.4 g, 加水定容至 1 L 即得。空白肠循环液: 精密称取酚红适量, 用 K-R 试液溶解并稀释成酚红质量浓度为 100 mg · L⁻¹ 的溶液即得。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠 (250 ± 20) g, 清洁级, 河北省实验动物中心, 合格证编号为 DK0705-0076。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 乙酸 75:25; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长 203 nm (BA) 和 430 nm (酚红); 进样量 20 μL。

酚红在紫外光区 254 nm 处有最大吸收, 并具有较强的末端吸收; 其在可见光区的 430 nm 处亦有最大吸收。经比较, 最终选择响应值最高、干扰最小的 430 nm 作为酚红的检测波长。本实验采用多波长-高效液相色谱法同时测定肠循环液中 BA 和酚红的含量, 既减少了试验步骤, 又增加了结果的准确性。

2.2 肠循环液的测定

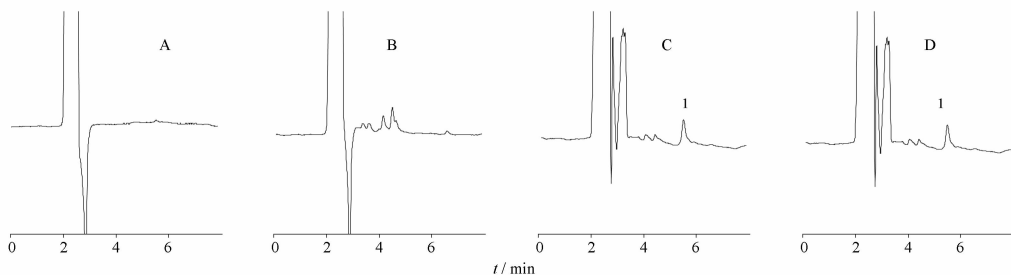
在体肠循环液样品离心 (14 000 r · min⁻¹) 10 min 后, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 分别在 203, 430 nm 处记录 BA 和酚红的峰面

积,以随行的标准曲线计算浓度。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性实验 分别取 K-R 试液、空白肠循环液和空白肠循环液中加入 BA(质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)后的溶液和肠循环液(BA 和酚红质量浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,肠循环 0.5 h 后)进样测定,记录色谱

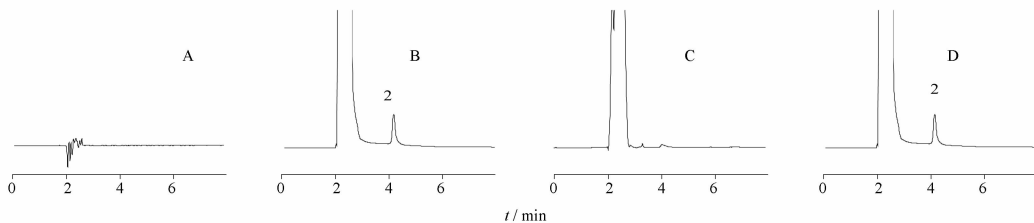
图,见图 1,2。结果表明,BA 和酚红的保留时间分别为 5.8,4.1 min,K-R 试液对 BA 和酚红测定均无干扰。由于酚红具有较强的末端吸收,故在 203 nm 处也有响应,但在 2.1 色谱条件下与 BA 色谱峰分离度良好,没有干扰。在 430 nm 处 BA 无响应,对酚红无干扰,故 BA 和酚红之间不存在相互影响。



A. 空白 K-R 试液;B. K-R 试液加酚红;C. K-R 试液加白桦脂酸;D. 循环 0.5 h 后供试液样品;1. 白桦脂酸。

图1 白桦脂酸 203 nm 处 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of betulic acid in 203 nm



A. 空白 K-R 试液;B. K-R 试液加酚红;C. K-R 试液加白桦脂酸;D. 循环 0.5 h 后供试液样品(D);2. 酚红。

图2 酚红 430 nm 处 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of phenol red in 430 nm

2.3.2 标准曲线 精密称定 BA 和酚红适量,用 K-R 试液溶解并稀释制成 BA 和酚红质量浓度均为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合溶液,采用倍数稀释法,用 K-R 试液分别稀释 2,4,8,16,20 倍。分别进样测定,记录峰面积,以质量浓度 $C(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标,峰面积 A 为纵坐标,线性回归,得 BA 的标准曲线方程为 $A = 2.175 4C + 202.63, r = 0.999 1 (n = 6)$,线性范围 $50 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。酚红的标准曲线方程为 $A = 5.612 1C + 804.16, r = 0.999 3 (n = 6)$,线性范围 $50 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 精密度和准确度 分别制备含 BA 质量浓度为 200,150,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肠循环液质控样品,其中含酚红质量浓度分别为 200,150,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按 2.2 项下操作,测定 BA 和酚红的浓度,每个浓度各 5 份。计算得质控样品中 BA 和酚红的高、中、低浓度

回收率分别为 $(106.9 \pm 1.84)\%$, $(101.7 \pm 1.74)\%$, $(112.0 \pm 1.27)\%$ 和 $(104.2 \pm 1.01)\%$, $(98.59 \pm 0.98)\%$, $(108.6 \pm 2.04)\%$;日内 RSD 分别为 1.37%,1.52%,0.92% 和 0.86%,1.16%,0.69%,日间 RSD 分别为 1.51%,1.04%,1.07% 和 1.26%,1.35%,0.98%。结果表明,本法可用于肠循环液中 BA 和酚红的含量测定。

2.3.4 稳定性考察 用空白肠循环液分别配制高($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、中($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、低($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)质量浓度的 BA 溶液作为供试液(酚红质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中,分别于 0,60,120,240 min 取样,按 2.1 项下色谱条件测定,并计算浓度。结果表明,在 240 min 内 BA 和酚红在肠循环液中测得峰面积 RSD 均小于 2.0%,含量无明显变化,表明 BA 和酚红在肠循环液中稳定。



2.4 大鼠在体肠吸收

2.4.1 实验方法 取实验前禁食 12 ~ 18 h(自由饮水),体重为(250 ± 20) g 的 SD 大鼠,腹腔注射 20% 乌拉坦溶液,麻醉后固定,保持 37 °C 体温,沿腹中线切开腹部,在十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段插入导管,扎紧,插管后将小肠部分小心放回肠腔,尽可能避免卷曲和扭结。按照以下方法对各肠段结扎:十二指肠段自幽门 1 cm 处开始,空肠段自幽门 15 cm 处开始,回肠段为盲肠上行 20 cm 处开始,结肠段为紧邻盲肠至直肠,各段均取 10 cm 左右。全肠为自十二指肠上部至回肠下部。用 37 °C 生理盐水冲净肠内容物,装好回流装置。切口用等渗生理盐水浸润的纱布覆盖以保湿,取 37 °C 的肠循环液(精密称定 BA 适量,用空白肠循环液加适量十二烷基硫酸钠溶解,即得),以 5 mL · min⁻¹ 的流速循环 10 min 后,将流速调为 2.5 mL · min⁻¹,立即取样 1.0 mL,同时补加空白肠循环液 1.0 mL,此时计为 0 时。其后每隔 30 min 取样,每次取出 1.0 mL,循环 3 h 后,终止实验。按 2.2 项下操作,测定各时间点样品中 BA 和酚红的浓度。根据 Fick 方程原理,以肠循环液中剩余药量的对数(lnX)对取样时间(t)作图,得到 1 条直线(方程为 lnX = lnX₀ - K_at),从直线斜率可求吸收速率常数(K_a)。单位时间吸收百分率(P),P = (C₀V₀ - C_tV_t) / (C₀V₀t) × 100% (C₀肠循环液 0 时刻药物浓度;V₀肠循环液 0 时刻药物体积;C_t肠循环液 t 时刻药物浓度;V_t肠循环液 t 时刻药物体积;t 循环液循环时间)。

2.4.2 增溶剂对 BA 小肠吸收的影响 考察了在 BA 100 mg · L⁻¹, 酚红 100 mg · L⁻¹ 的肠循环液(pH 7.4),增溶剂十二烷基硫酸钠浓度分别为 0.1%, 0.2%, 0.5% 的供试液中,样品照 2.2 项下方法处理,BA 在小肠的吸收速率常数与吸收百分率的影响结果见表 1。结果表明,不同十二烷基硫酸钠质量浓度条件下,小肠的吸收速率常数和吸收百分率无显著性差异,表明 BA 的肠吸收不受增溶剂浓度的影响。

2.4.3 灌流液 pH 对药物吸收的影响 采用不同 pH 的肠循环液(6.5, 7.4, 7.9)配制 BA 100 mg · L⁻¹, 酚红 100 mg · L⁻¹, 十二烷基硫酸钠为 0.2% 的供试品溶液,样品 2.2 项下方法处理,计算 BA 在小肠的吸收速率常数与吸收百分率。结果见表 2。结果表明不同 pH 条件下,小肠的吸收速率常数无显著性差异。

2.4.4 不同药物浓度对肠吸收的影响 分别以高(125 mg · L⁻¹)、中(100 mg · L⁻¹)、低(75 mg · L⁻¹)

表 1 不同浓度十二烷基硫酸钠中白桦脂酸的吸收速率和吸收速率常数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 The absorption parameters of betulic acid at different concentrations of SDS in rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

SDS 浓度/%	K _a / × 10 ⁻² h ⁻¹	吸收速率/%
0.1	15.2 ± 0.41	24.19 ± 6.1
0.2	15.9 ± 0.22	25.84 ± 3.9
0.5	15.7 ± 0.36	20.57 ± 4.0

表 2 不同 pH 条件下白桦脂酸的吸收速率和吸收速率常数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 The absorption parameters of betulic acid at different pH in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

pH	K _a / × 10 ⁻² h ⁻¹	吸收速率/%
6.5	15.4 ± 0.26	21.25 ± 5.2
7.4	15.9 ± 0.31	26.37 ± 4.9
7.9	15.2 ± 0.19	23.62 ± 3.7

3 个质量浓度,肠循环液为 pH 7.4,十二烷基硫酸钠为 0.2% 的供试液在小肠全肠段循环,考察浓度因素对 BA 小肠吸收的影响,结果见表 3。BA 质量浓度在 75 ~ 125 mg · L⁻¹ 的吸收速率与质量浓度呈线性关系,吸收参数均无显著性差异,提示 BA 的肠吸收不受自身浓度的影响,主要表现为被动扩散。本实验中,lnX 对 t 进行线性回归,各回归直线的 r 均大于 0.9,表明在全肠内,BA 剩余药量的自然对数与循环时间呈线性关系,故为一级吸收动力学。

表 3 不同浓度白桦脂酸在全肠的吸收速率和吸收速率常数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Uptake and permeability of betulic acid from intestine at different concentrations($\bar{x} \pm s, n=6$)

白桦脂酸质量 浓度/mg · L ⁻¹	K _a / × 10 ⁻² h ⁻¹	吸收速率 /%	r
75	15.4 ± 0.52	25.13 ± 3.1	0.912 6
100	15.9 ± 0.38	26.94 ± 6.4	0.923 7
125	15.1 ± 0.29	21.67 ± 5.6	0.906 1

2.4.5 吸收部位对药物吸收的影响 观察的吸收部位分别为十二指肠、空肠、回肠和结肠。以 BA 100 mg · L⁻¹, 酚红 100 mg · L⁻¹, 十二烷基硫酸钠 0.2%, 肠循环液 pH 7.4 的溶液为供试液,进行在体肠吸收实验。样品照 2.2 项下方法处理,计算得 BA



在各肠段的吸收速率常数 K_a 和单位时间吸收百分率,结果见表4。BA 在小肠各段均有吸收,但不存在显著性差异,吸收速率常数依序为空肠 > 回肠 > 十二指肠 > 结肠。

表4 小肠不同区段白桦脂酸的吸收速率和吸收速度常数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 The absorption parameters of betulinic acid at various intestine segments in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

小肠区段	$K_a / \times 10^{-2} h^{-1}$	吸收速率/%
十二指肠	15.1 ± 0.49	26.14 ± 3.5
空肠	15.9 ± 0.56	24.92 ± 2.4
回肠	15.6 ± 0.83	27.73 ± 1.9
结肠	14.9 ± 0.41	22.39 ± 4.2

3 讨论

本实验采用大鼠在体肠灌注法,通过测定不同时间点循环液中 BA 的浓度来计算药物的吸收速率常数,进而考察 BA 的吸收机制及是否存在特定吸收部位。试验中肠道能吸收或排泄水分,改变灌流液体积,影响测定吸收药量的准确性。酚红为大分子络合

物,其不会被肠道吸收,因此在 BA 循环液中加入一定浓度的酚红,测定不同时间点酚红的含量,根据含量的变化计算不同时间点灌流液的实际体积,结合 BA 在该时间点的含量,准确计算出药物的吸收量。

药物胃肠道吸收动力学研究是处方前研究的重要环节,能够作为针对药物的吸收机制和吸收部位而选用相应剂型的指导。BA 在体肠吸收的结果,可以确定 BA 在肠道的吸收属于一级动力学过程,属于被动扩散。进一步考察各肠段 BA 吸收情况表明,其在整个肠段都有吸收,无特定吸收部位。故 BA 的小肠吸收实验对于以后控缓释剂型的设计具有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] Dasgupta T K, Pezzuto J M. Use of betulinic acid and its derivatives for inhibiting malignant melanoma growth and method of monitoring this; US, 96/29068 [P]. 1996-09-26.

[2] Chang S Y, Nohara T. Two new lupane-triterpene glycosides from leaves of acanthoparar koreanum [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46(1):163.

[3] Kuo H L, Yoshiki K, Fumio H, et al. Inventors betulinic acid derivatives and uses therefor; US, 96/39033 [P]. 1996-12-12.

Study on absorption kinetics of betulinic acid in rat's intestines

XU Huijun¹, REN Xiaohua², DU Yingfeng¹, ZHANG Lantong^{1*}, LI Tao¹, GE Ying¹, WANG Huijie¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Department of Pharmacy, Shijiazhuang Central Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-DAD method for determining concentrations of betulinic acid and phenol red in intestinal circulation liquid, and probe into the absorption kinetic characteristics of betulinic acid at different intestine segments in rats and the effect of different drug concentrations on absorption. **Method:** The rat intestinal absorption model was established to detect the impact of absorption site, drug concentration and pH value on drug absorption. **Result:** Within the range from 75-125 mg · L⁻¹, the absorption rate and the quality concentration of betulinic acid had a linear relation, with K_a value keeping unchanged. The absorption rate for each intestinal segment showed no remarkable difference, with K_a values in duodenum, jejunum, ileum and colon being (0.151 ± 0.004 9), (0.159 ± 0.005 6), (0.156 ± 0.008 3), (0.149 ± 0.004 1) h⁻¹, respectively. **Conclusion:** Betulinic acid is proved to be well absorbed in intestines marked by no specific absorption site in the intestine. The absorption mechanism of the drug conforms to passive transport mechanism and first-order kinetics. The bioavailability of betulinic acid preparation can be increased by enhancing the dissolution rate and the solubility.

[Key words] betulinic acid; intestinal absorption kinetics; HPLC

doi:10.4268/cjcm20120325

[责任编辑 陈玲]