

吸收促进剂对葛根素肠吸收的研究

★ 赖珺 廖正根* 梁新丽 赵国巍 (江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330009)

摘要:目的:研究葛根素的吸收机制,筛选葛根素经肠道吸收的最佳位置和考察吸收促进剂对葛根素在大鼠各肠段吸收过程中的影响。方法:采用大鼠外翻肠囊法考察葛根素在各肠段的吸收以及吸收促进剂对葛根素吸收的影响。结果:筛选出0.5%、1%壳聚糖,1:104(V/V)白芷挥发油,0.06%冰片可有效地促进葛根素的肠吸收。结论:葛根素在大鼠小肠主要以主动转运方式吸收,采用吸收促进剂方法提高通透性,将能有效地促进葛根素的吸收,达到提高生物利用度的目的。

关键词:肠吸收;吸收促进剂;葛根素

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Research of absorption enhancers on intestinal absorption of puerarin

LAI Jun, LIAO Zheng-Gen*, LIANG Xin-Li, ZHAO Guo-Wei

Key Laboratory of Modern Preparation of TCM (JiangXi University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To explore the intestinal absorption mechanisms of puerarin, find the optimum intestinal site for puerarin absorption and to investigate the effects of absorption enhancers on intestinal absorption of puerarin. Methods: The intestinal transport of puerarin and the effects of absorption enhancers on intestinal absorption of puerarin is performed by applying everted intestinal sacs method. Results: 0.5% chitosan, 1% chitosan, 1:104 (V/V) oil of Radix Angelicae Dahuricae and 0.06% borneol are the promising candidates enhancing activity for intestinal absorption of puerarin. Conclusion: There existed a saturable transport process for puerarin, absorption enhancer is added to increase the permeability of intestinal membrane, to enhance the absorption of puerarin and increase the bioavailability.

Key words: intestinal absorption; absorption enhancer; puerarin

葛根是我国的传统中药之一,有解肌退热、生津、透疹和升阳止泻等功效。葛根素是中药葛根中提取的一种异黄酮化合物,它具有扩张心脑血管和降低心肌氧耗等多种作用,临床中主要用于防治心脑血管疾病。目前,临床应用的葛根素制剂仅有两种,一为葛根素注射液又名普乐林注射液,另一种为愈风宁心片。葛根素注射液由于给患者带来不便而使其应用受到限制,而口服制剂因其用药方便及病人的顺应性强成为最方便的给药途径之一,但愈风

宁心片因生物利用度低而受到一定的限制。本文采用外翻肠囊法对葛根素肠吸收机理进行实验探讨,并从药用辅料及天然药物中筛选出具有肠吸收促进作用的吸收促进剂,为增加葛根素的肠吸收,提高葛根素的生物利用度奠定理论基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪(美国),包括:四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、G1314B VWD 紫外检测器;Sartorius BS124S 电子分析天平;

* 通讯作者:廖正根,男,汉族,副教授、硕士生导师,从事中药新剂型与新技术研究。E-mail:lyzlyg@163.com

CO₂ 培养箱(HH·CP,上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试药 葛根素(河南省宛西制药股份有限公司,批号 20060101);壳聚糖;丹皮酚;白芷挥发油(自制);冰片;甲醇(色谱纯,MERK),流动相用水为双蒸水(自制);其余试剂均为分析纯。

1.3 实验动物 SD 大鼠,♂,体重(180~220)g,由江西中医学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(赣)2005-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈(5 μm,4.6 mm × 150 mm, Agilent);流动相:甲醇-0.05% H₃PO₄(30:70);检测波长:UV 250 nm;柱温:30 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量均为 50 μl。

2.2 标准曲线的制备 用台氏液将葛根素对照品配制成 2.4×10^{-2} 、 4.9×10^{-2} 、 98.2×10^{-2} 、 196.4×10^{-2} 、 491.0×10^{-2} 、 982.0×10^{-2} μg/ml 的溶液,取 50 μl 进样,以峰面积(Y)对浓度(X)回归,得回归方程为: $Y = 83X + 1.3257$ ($R = 0.9999$),质量浓度在 $2.4 \times 10^{-2} \sim 982.0 \times 10^{-2}$ μg/ml 范围线性良好。

2.3 重复性实验 连续进样 4.95 μg/ml 的葛根素对照品溶液 50 μl 6 次进行测定,测得峰面积的 RSD 为 0.59%,结果表明测定的重复性良好。

2.4 葛根素在肠营养液中稳定性 用空白营养液按外翻肠囊法操作对各肠段进行实验,收集肠内溶液。以此溶液配制浓度为 100 μg/ml 的葛根素溶液,置于 37 ℃ 的水浴中孵育,于 0、1、2、3、4、5、6 h 定时取样,测定葛根素的浓度。

葛根素在肠营养液中的稳定性

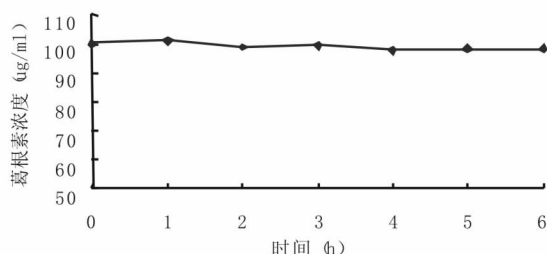


图1 葛根素在肠营养液中稳定性的考察

从图1可以看出葛根素在 37 ℃ 的水浴中孵育,在 6 h 之内都比较稳定。

3 外翻肠囊法

实验前将大鼠禁食过夜(不禁水),用 3% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。沿腹中线打开腹腔后,分别取出小肠和结肠,置于冰浴的台氏液中。分别取十二指肠、空肠、回肠和结肠处约 10 cm,用冰冷的台氏液清洗后,用玻片除取去除肠系膜、脂肪。用小

玻璃棒将肠段轻柔翻转,使小肠黏膜面向外,浆膜侧向内,结扎肠肛侧端,将肠段上端固定于取样口。用注射器从取样口处向肠内注满空白 KR 营养液,作为受药体系。然后将其肠囊垂直放入含有药物溶液的试管中,受药体系液面低于供液体系液面,将试管放入 CO₂ 培养箱中进行实验,控制温度为 37 ℃,CO₂: 空气为 5:95。实验结束时,收集浆膜侧的液体并定容至一定体积进行测定。

3.1 葛根素对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品 4.95 mg,用甲醇溶解并定容置 100 ml 容量瓶中,精密移取 1 ml 置 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配置成浓度为 4.95 μg/ml 的葛根素对照品溶液,按色谱条件测定。

3.2 葛根素肠吸收液的制备 按照 3 项方法,分别以葛根素台氏液和配伍吸收促进剂的葛根素台氏液作为供药体系,按色谱条件测定。

3.3 阴性空白肠液的制备 按照 3 项方法,用空白的台氏液作为供药体系,用 CO₂ 培养箱中培养 1 h,实验结束时收集浆膜侧液体,得到空白肠液,将其高速离心并用 0.45 μg/ml 滤膜过滤得到续滤液,按色谱条件测定,结果显示空白肠液对葛根素的吸收峰无干扰。

4 统计方法

本实验均采用渗透系数 P_{app} (cm/h) 来评价吸收促进剂对葛根素在各肠段的吸收促进作用。对各组间的显著性比较采用统计学软件 SPSS 进行配对比较。

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \times C_0} \quad \{ P_{app} \text{ 为化合物的渗透系数, } dQ/dt \text{ 为}$$

为单位时间内药物转运量, C_0 为供液体系中药物的浓度(μg/ml), A 为肠面积(cm^2)。}

5 葛根素的肠吸收及吸收促进剂的作用

5.1 葛根素在各肠段的吸收 按照 3 项方法,分别以浓度为 50、100、200 和 700 μg/ml 的葛根素营养液对各肠段进行试验。考察葛根素在十二指肠、空肠、回肠以及结肠的吸收情况,确定葛根素的较佳的吸收肠段。结果见表 1。

表1 葛根素在各肠段

吸收的渗透系数($\bar{x} \pm s, n=6$) $\times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$

肠囊外葛根素浓度	十二指肠	空肠	回肠	结肠
50	1.63 ± 0.51	1.59 ± 0.79	0.91 ± 0.72	1.00 ± 0.67
100	1.11 ± 0.17	0.83 ± 0.22 *	0.51 ± 0.17 *	1.08 ± 0.29
200	0.90 ± 0.21	0.64 ± 0.03	0.48 ± 0.09 *	0.68 ± 0.37

* $P < 0.05$ vs 葛根素组。

从表1可以看出,50 和 700 μg/ml 葛根素在各肠段的吸收无显著差异;100 μg/ml 葛根素在十二

指肠的吸收优于空肠和回肠,与结肠比较无显著性差异;200 $\mu\text{g/ml}$ 葛根素在十二指肠的吸收优于回肠,与其他两肠段无显著性差异。说明十二指肠为葛根素的较佳吸收肠段,且随着葛根素浓度的增加,各肠段的对其吸收渗透系数与浓度呈非线性关系,说明葛根素在各肠段的吸收可能存在主动转运过程。

5.2 吸收促进剂对葛根素肠吸收的作用 按照3项方法,考察了不同类型及不同浓度吸收促进剂对100 $\mu\text{g/ml}$ 葛根素在各肠段吸收情况的影响,结果见表2。

表2 吸收促进剂对葛根素在各肠段的吸收渗透系数的影响($\bar{x} \pm s$) ($n=6$) $\times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$

浓度	十二指肠	空肠	回肠	结肠
葛根素	1.11 $\pm$ 0.17	0.83 $\pm$ 0.22	0.51 $\pm$ 0.17	1.08 $\pm$ 0.29
0.5% 壳聚糖	1.29 $\pm$ 0.23	1.38 $\pm$ 0.37 *	1.56 $\pm$ 0.28 *	1.31 $\pm$ 0.24
1% 壳聚糖	0.93 $\pm$ 0.29	1.25 $\pm$ 0.36	1.56 $\pm$ 0.30 *	1.26 $\pm$ 0.14
1:105 (V/V) 白芷挥发油	1.22 $\pm$ 0.30	1.21 $\pm$ 0.38	0.86 $\pm$ 0.31	1.02 $\pm$ 0.24
1:104 (V/V) 白芷挥发油	1.77 $\pm$ 0.20 *	0.70 $\pm$ 0.03	0.98 $\pm$ 0.17	0.82 $\pm$ 0.35
0.03% 冰片	0.98 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.38	0.68 $\pm$ 0.20	0.82 $\pm$ 0.27
0.06% 冰片	1.23 $\pm$ 0.32	1.24 $\pm$ 0.32	1.30 $\pm$ 0.24 *	1.04 $\pm$ 0.28
160 $\mu\text{g/ml}$ 丹皮酚	0.90 $\pm$ 0.27	0.04 $\pm$ 0.03 *	0.03 $\pm$ 0.01 *	0.03 $\pm$ 0.01 *

* $P < 0.05$ vs 葛根素组。

从表2可见,0.5%壳聚糖对100 $\mu\text{g/ml}$ 葛根素在空肠和回肠的吸收具有显著的促进作用;1%壳聚糖对100 $\mu\text{g/ml}$ 葛根素在回肠的吸收具有显著的促进作用;1:105 (V/V) 白芷挥发油对葛根素在各肠段的吸收无显著的促进作用;1:104 (V/V) 白芷挥发油对葛根素在十二指肠的吸收具有显著的促进作用;0.03%冰片对100 $\mu\text{g/ml}$ 葛根素在各肠段的吸收无显著的促进作用;0.06%冰片对100 $\mu\text{g/ml}$ 葛根素在回肠的吸收具有显著的促进作用。

6 讨论

(1)提高生物利用度的方法很多,本文主要从配伍吸收促进剂的角度考察,选择了几种促吸收机制不同的促进剂,并选择了具有心血管治疗作用及吸收促进的天然药物,如冰片、丹皮酚、白芷,研究这些成分对葛根素肠吸收的影响,这具有创新性。壳聚糖已被公认为无毒的食品添加剂,其对药物跨上

皮黏膜细胞的透过能力有很强的促进作用^[1]。冰片也是一种常用的吸收促进剂,其作用机制为使细胞膜上的磷脂双分子层运动更加有序,使膜的通透性增加,从而有利于药物吸收^[2,3],同时冰片对外排P-gp糖蛋白活性存在抑制作用^[4]。白芷挥发油的促吸收机制尚待进一步研究,可能是通过改变生物膜的理化性质和生理结构,如脂水分配系数等。

(2)本文通过比较不同浓度葛根素在各肠段的吸收情况得出葛根素在各肠段的吸收可能存在主动转运过程,同时筛选出十二指肠为葛根素吸收的较佳肠段。已有两篇博士论文对葛根素的吸收机制进行了研究,其中一篇应用大鼠在体法考察了50 $\mu\text{g/ml}$ 葛根素在各肠段的吸收情况,得出了其在肠道上段(十二指肠+空肠)的吸收比下段(回肠+结肠)有较大的吸收,和本文结果一致;另一篇应用大鼠外翻肠囊法考察了不同浓度葛根素在各肠段的吸收情况,得出葛根素在各肠段的吸收存在主动转运的过程,在较低浓度($< 100 \mu\text{g/ml}$)时无显著性差异,而浓度达200 $\mu\text{g/ml}$ 时各肠段具有显著性差异,这一结果和本文一致,但本文中得出葛根素结肠吸收优于回肠吸收和这篇文章结果不符。本试验筛选出对葛根素具有吸收促进作用的促进剂壳聚糖、冰片和白芷挥发油,得出0.5%壳聚糖、1%壳聚糖和0.06%冰片对葛根素在回肠的吸收渗透系数分别可提高到3.0倍、3.0倍和2.5倍;1:104 (V/V) 白芷挥发油对葛根素在十二指肠的吸收渗透系数可提高到1.6倍;但它们对空肠和结肠的促吸收效果均不明显。

参考文献

- [1]张峻颖,黄罗生.壳聚糖及其衍生物在促进药物口服吸收中的应用[J].海峡药学,2004,16(2):24-27.
- [2]樊岚岚,唐由之,卢景,等.冰片对兔角膜上皮细胞膜促渗透作用的实验研究[J].中国中医眼科杂志,1998,8(2):67-69.
- [3]陈新梅,朱家璧,孙卫东,等.吸收促进剂对人参皂苷Rg1鼻腔吸收的促进作用及鼻腔毒性[J].药学报,2006,41(2):149-155.
- [4]李东晓,邓文龙.冰片促透作用研究进展[J].中药药理与临床,2007,23(1):87-89.

(收稿日期:2008-12-08)

欢 迎 投 稿 ! 欢 迎 订 阅 !