

吸收促进剂对芍药苷大鼠肠道吸收的促进作用研究

易 军, 吴秋平, 张凤玲, 黄燕芬

广东药学院药科学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 考察不同吸收促进剂对芍药苷在大鼠十二指肠吸收过程的影响, 筛选最佳吸收促进剂。**方法** 利用大鼠在体单向肠灌注模型, 采用 HPLC 法测定灌流液中芍药苷含量, 分别考察聚山梨酯 80、羟丙基- β -环糊精、癸酸钠、去氧胆酸钠和当归提取物对吸收的促进作用。**结果** 羟丙基- β -环糊精和当归提取物能显著提高芍药苷的肠道吸收速率, 其次是癸酸钠和聚山梨酯 80, 而去氧胆酸钠则没有作用。**结论** 羟丙基- β -环糊精和当归提取物可作为芍药苷口服制剂的吸收促进剂使用, 中药当归配伍芍药使用是合理、有效的。

关键词: 芍药苷; 吸收促进剂; 大鼠在体单向肠灌注; 当归

中图分类号: R943.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)02-0141-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.010

Promotion of enhancers on duodenal absorption of paeoniflorin in rats

YI Jun, WU Qiu-ping, ZHANG Feng-ling, HUANG Yan-fen

College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different enhancers on the transport properties of paeoniflorin in rat duodenum, in order to select the best absorption enhancers. **Methods** *In situ* single-pass intestinal perfusion model was performed to study the absorption of paeoniflorin. The concentration of paeoniflorin was determined by HPLC. Tween 80, HP- β -CD, sodium caprate, sodium deoxycholate, and angelica extract were chosen as the enhancers. **Results** HP- β -CD and angelica extract significantly improved the rate of duodenal absorption of paeoniflorin, followed by sodium caprate and Tween 80, and sodium deoxycholate had no effect. **Conclusion** HP- β -CD and angelica extract would be used as enhancers in oral paeoniflorin formulations. Angelica and peony pairs are reasonable and effective.

Key words: paeoniflorin; absorption enhancer; *in situ* rat single-pass intestinal perfusion; angelica

芍药, 性微寒、味苦酸, 有养血柔肝、缓中止痛、敛阴收汗的功效。芍药苷是芍药的主要有效成分之一, 是一种单萜类糖苷化合物。现代研究认为, 芍药苷具有镇静、解痉、抗炎、抗应激性溃疡病、治疗缺血性脑血管疾病、保肝、抗肿瘤及增强免疫力等作用。

芍药苷的药动学研究表明, 其口服生物利用度极低^[1]。本研究根据大鼠小肠的生理状况与人相似, 采用在体肠吸收模型, 并引入当归提取物作为吸收促进剂之一, 与其他几种常见肠道吸收促进剂一起, 进行芍药苷的吸收速率和表观吸收系数的比较研究, 筛选肠道吸收促进剂, 为芍药苷口服给药制剂提供生物药剂学依据。

1 材料与仪器

1.1 试药

白芍提取物(含芍药苷 31.2%, 西安开来生物工程有限公司, 批号 K111105); 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110736-20052); 当归提取物(含阿魏酸 45.8%, 南京泽朗植提生物科技有限公司, 批号 110521); 聚山梨酯 80(化学纯, 天津市永大化学试剂开发中心); 羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD, 药用级, 西安德力生物化工有限公司); 癸酸钠(东京化成工业株式会社, 批号 H11013000); 去氧胆酸钠(上海金穗生物科技有限公司, 批号 110425)。甲醇(色谱纯, 百灵威公司); 冰乙酸(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司)。

收稿日期: 2013-11-13

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031700060); 广东药学院大学生创新训练项目(1057313015)

作者简介: 易 军(1970—), 女, 湖南武冈人, 副教授, 主要从事药物制剂研究工作。

1.2 仪器

HPLC (日本 SHIMADZU); AY120 电子天平 (日本 SHIMADZU); TGL—20B 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.3 动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 (200 ± 20) g, 广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (粤) 2008-0020。

2 方法与结果

2.1 灌流液的配制

精密称取白芍提取物适量, 用生理盐水溶解并定容至 100 mL, 得含芍药苷 $654.57 \mu\text{g/mL}$ 的白芍储备液; 精密量取白芍储备液 10 mL, 用生理盐水定容至 100 mL, 得到质量浓度为 $65.46 \mu\text{g/mL}$ 的白芍灌流液。

2.2 含不同吸收促进剂的灌流液的制备

精密称取聚山梨酯 80、HP- β -CD、去氧胆酸钠、癸酸钠、当归提取物等各种吸收促进剂适量, 加入适量生理盐水溶解, 再加入白芍储备液 10 mL, 用生理盐水定容至 100 mL, 得含不同吸收促进剂的灌流液, 见表 3。

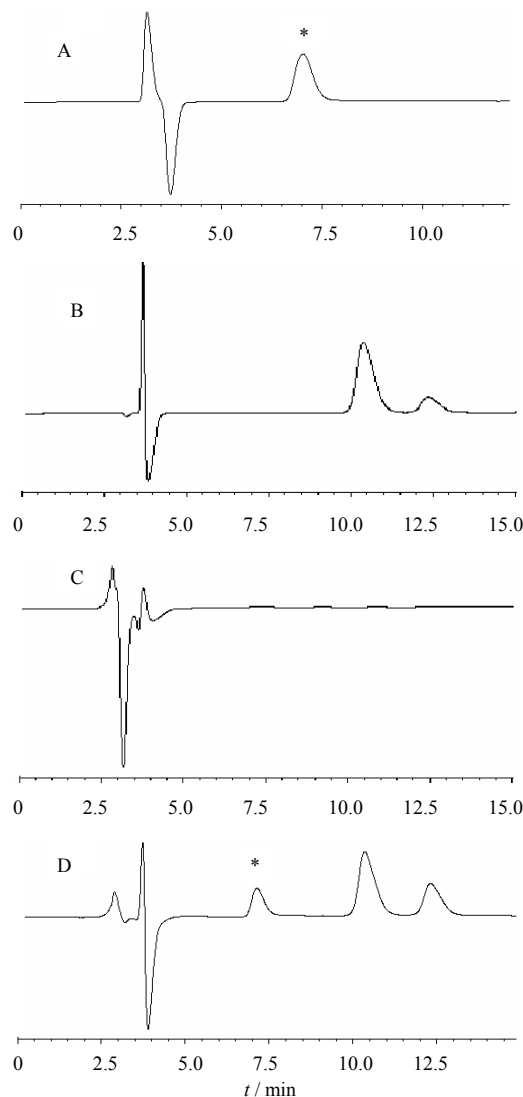
2.3 样品的采集

手术前大鼠禁食 12 h, 自由饮水, ip 1%戊巴比妥钠溶液 (5 mL/kg) 麻醉, 背位固定, 保持体温。沿腹中线打开腹腔约 3 cm, 取十二指肠约 10 cm, 距幽门 1 cm 处于两端切口后, 插管并结扎, 用 37°C 恒温的生理盐水以 5 mL/min 流速将肠内容物冲洗干净, 再用空气将生理盐水排空, 用预热至 37°C 的灌流液以 0.2 mL/min 流速灌流管路及肠段, 平衡 30 min 后开始计时, 进口处用已知质量的装有供试液的小瓶进行灌流, 每隔 15 min 在出口处用另一已知质量的小瓶收集 (同时迅速更换下一个供试液小瓶和收集液小瓶), 精密称定质量, 记录灌流液和收集液质量, 同时取收集液, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 分取上清液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤, 取续滤液 $20 \mu\text{L}$ 进样分析测定收集液中芍药苷的量。实验持续 90 min, 实验结束时, 剪下被测肠段, 测量其长度与内径^[2]。

2.4 肠灌流液中芍药苷的测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil-柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为甲醇-0.5%乙酸 ($40:60$); 体积流量 1.0 mL/min ; 进样量 $20 \mu\text{L}$; 检测波长 230 nm 。

2.4.2 专属性 在上述色谱条件下, 大鼠空白肠灌流液、芍药苷肠灌流液、芍药苷对照品等样品的色谱图见图 1, 芍药苷的保留时间约为 7 min, 空白肠液中的内源性物质不干扰芍药苷的测定, 当归提取物主要成分的保留时间为 10~13 min, 不干扰芍药苷测定。其余吸收促进剂 HP- β -CD、去氧胆酸钠、聚山梨酯 80 和癸酸钠在此色谱条件下均不出峰。该法专属性良好。



*-芍药苷

*-paeoniflorin

图1 芍药苷对照品(A)、当归提取物(B)、空白肠灌流液(C)、芍药苷+当归提取物(D)的HPLC谱图

Fig. 1 HPLC of paeoniflorin reference substance (A), angelica extract (B), blank intestinal perfusate (C), and paeoniflorin+angelica extract (D)

2.4.3 标准曲线 精密称取芍药苷对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 制成质量浓度为 $839.10 \mu\text{g/mL}$ 的

芍药苷储备液；精密吸取适量，以甲醇稀释制成芍药苷质量浓度分别为 3.28、6.56、13.11、26.22、52.44、104.89、209.77、419.55 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液，分别吸取 20 μL 注入液相色谱仪，以芍药苷的峰面积对质量浓度进行线性回归，得到直线方程 $A = 15\,140\,C + 4\,331.2$, $r = 0.999\,7$ ，结果表明，在 3.28~419.55 $\mu\text{g/mL}$ 测得峰面积与芍药苷质量浓度线性良好。

2.4.4 相对回收率与精密度 取芍药苷储备液适量，以空白肠液稀释，配制浓度分别为 400、50、4 $\mu\text{g/mL}$ 的高、中、低 3 个质量浓度的样品，按“2.4.1”项下检测。每个浓度进样 5 次，计算各个样品的回收率。高、中、低 3 个浓度的回收率分别为 96.78%、96.83%、93.76%，RSD 值分别为 2.57%、2.30%、2.86%。取相对回收率样品，每个样品于同 1 天内连续测定 5 次，考察日内精密度，结果高、中、低 3 个质量浓度 RSD 值分别为 1.44%、2.56%、2.84%；取相对回收率样品，每个样品在连续的 5 d 内各测定 1 次，考察日间精密度，结果高、中、低 3 个质量浓度 RSD 值分别为 1.42%、2.79%、2.97%。日内和日间精密度均符合要求。

2.4.5 样品稳定性 取“2.4.4”项下质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温，于第 0、1、2、4 h 取样，测定芍药苷，RSD 值为 1.86%，

说明在实验过程中芍药苷保持稳定^[3]。

2.5 数据处理

采用重量校正法对数据进行处理^[3]，根据下列公式计算药物的吸收速率常数 K_a 和表观吸收系数 P_{app} ：

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out}}Q_{\text{out}}}{C_{\text{in}}Q_{\text{in}}}\right) \frac{Q}{V}$$

$$P_{\text{app}} = \frac{-Q \ln \left(\frac{C_{\text{out}}Q_{\text{out}}}{C_{\text{in}}Q_{\text{in}}} \right)}{2\pi r l}$$

其中， Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠段灌入的灌流液和收集液的体积 (mL) (根据质量进行校正，假定进出口灌流液密度为 1.0 g/mL)； l 和 r 分别为灌流肠段的长度 (cm) 和横截面半径 (cm)， Q 为灌流体积流量 (mL/min)， C_{in} 和 C_{out} 分别为灌流液和收集液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)， V 为灌流肠段的体积 (cm^3)。

2.6 不同吸收促进剂对芍药苷吸收速率的影响

不同吸收促进剂对芍药苷在十二指肠吸收速率与表观吸收系数显示了不同的作用，见表 1、2。结果表明，除去氧胆酸钠外，其余吸收促进剂对芍药苷均具有显著的促进肠道吸收作用。其中，HP- β -CD、当归提取物的作用最为显著，其次为癸酸钠和聚山梨酯 80。而且，当归提取物的促吸收作用与浓度无关，但其余吸收促进剂的效果均与本身浓度相关。

表 1 吸收促进剂对芍药苷在十二指肠 K_a 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 K_a of paeoniflorin in duodenum effected by different enhancers

吸收促进剂	质量分数/%	$K_a / (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	促渗比 ER	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	促渗比 ER
对照	—	22.00 $\pm$ 1.04	1.0	14.92 $\pm$ 1.06	1.0
聚山梨酯 80	0.5	34.20 $\pm$ 2.95**	1.6	26.19 $\pm$ 1.56***	1.8
	1.0	39.29 $\pm$ 3.96**	1.8	30.57 $\pm$ 1.65***	2.0
	2.0	19.35 $\pm$ 3.54	0.9	18.96 $\pm$ 2.00***	1.3
	2.5	251.80 $\pm$ 20.68**	11.4	230.70 $\pm$ 19.79***	15.5
HP- β -CD	5.0	290.60 $\pm$ 29.32**	13.2	292.51 $\pm$ 25.66***	19.6
	10.0	89.27 $\pm$ 7.56**	4.1	77.41 $\pm$ 8.13***	5.2
	0.2	26.76 $\pm$ 3.33	1.2	26.19 $\pm$ 4.76***	1.8
癸酸钠	0.5	46.74 $\pm$ 6.95*	2.1	50.13 $\pm$ 5.99***	3.4
	1.0	48.87 $\pm$ 6.86*	2.2	54.72 $\pm$ 5.22***	3.7
	0.5	20.99 $\pm$ 2.99	0.9	15.87 $\pm$ 1.87	1.1
去氧胆酸钠	1.0	15.27 $\pm$ 1.47**	0.7	12.47 $\pm$ 3.36*	0.8
	2.0	9.20 $\pm$ 1.60**	0.4	7.23 $\pm$ 1.17***	0.5
	2.5	92.02 $\pm$ 4.81***	4.2	80.43 $\pm$ 5.34***	5.4
当归提取物 (以阿魏酸计)	5.0	94.37 $\pm$ 6.98**	4.3	82.12 $\pm$ 8.65***	5.5
	10.0	97.43 $\pm$ 7.90**	4.4	85.90 $\pm$ 6.93***	5.8

与对照组比较：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ vs control group

4 讨论

常见的肠道吸收促进剂类型包括表面活性剂、生物高分子聚合物、胆酸盐、脂肪酸及其盐、中药成分类等,各种吸收促进剂作用机制不同,使用浓度亦不相同。本研究选择了聚山梨酯 80^[4]、HP- β -CD^[5]、去氧胆酸钠^[6]、癸酸钠^[7-8]作为以上几种化学吸收促进剂的代表,并根据文献报道,选择了它们的使用浓度。而中药成分类吸收促进剂则选择了芍药的常用药对当归^[9],当归的用量以芍药-当归药对的常用配伍剂量为依据,并以当归的主要成分阿魏酸作为其含量指标。

聚山梨酯 80 属于非离子型表面活性剂,可引起黏膜上皮细胞的脂质成分流动性的增加,其促渗效应是对黏膜的直接作用、药物扩散性质、胶团等多种作用的综合效果^[10]; HP- β -CD 可以通过增加药物在肠道黏膜表面的有效浓度而增加药物的渗透性,同时,环糊精还可以降低黏液层黏度,并包合提取黏膜组织中的成分如胆固醇、磷脂等,从而改变吸收部位的脂质屏障,促进药物的吸收^[5]; 癸酸钠由于可以活化磷脂酶 C, 增加三磷酸肌醇,从而引起钙离子释放,提高细胞内部钙离子浓度,导致依赖钙调蛋白的肌动蛋白收缩,从而放松紧密连接,增加细胞旁路转运^[11]; 去氧胆酸钠可以促使黏膜上皮细胞释放膜磷脂与蛋白质,从而促进药物肠道黏膜转运^[4]。

本研究结果显示,化学吸收促进剂方面,聚山梨酯 80、HP- β -CD 和癸酸钠显著提高了芍药苷的肠道吸收,而去氧胆酸钠则抑制了芍药苷的吸收,结合各吸收促进剂的促吸收机制,说明芍药苷在肠道的转运机制主要为跨膜被动转运,改变小肠上皮细胞的脂质屏障,是促进芍药苷吸收的有效途径。紧密连接的放松也可部分增加芍药苷的吸收。而去氧胆酸钠对小肠吸收的抑制作用可能是由于其对上皮细胞膜的溶解和乳化作用阻碍了芍药苷向黏膜层的扩散。

当归常配伍芍药使用。本研究发现,当归提取物对芍药苷的肠道吸收具有显著的促进作用,但其

促吸收机制尚有待研究;本研究的结果从肠道转运的角度,证实了当归配伍芍药使用是合理、有效的,据此推测,当归“引药入血分”的功能与其吸收促进作用有一定关系。

本研究结果表明,HP- β -CD 和当归提取物显著提高了芍药苷的肠道吸收,且两者的安全使用范围较宽,它们在芍药苷的口服制剂中可作为吸收促进剂使用。

参考文献

- [1] 陈彦,周蕾,辛然,等. 多途径综合分析比较芍药苷及芍药苷提取物的吸收差异 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 2012-2016.
- [2] 颜晓燕,曾维凤,李敏,等. 白花丹醌大鼠在体胃肠吸收动力学初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 622-624.
- [3] Abuasal B S, Qosa H, Sylvester P W, *et al.* Comparison of the intestinal absorption and bioavailability of γ -tocotrienol and α -tocopherol: *in vitro*, *in situ* and *in vivo* studies [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2012, 33: 246-256.
- [4] 赖玲,刘华钢,秦艳娥,等. 吸收促进剂对三七总皂苷小肠吸收的影响 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(10): 909-913.
- [5] 何仲贵. 环糊精包合物技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [6] 黄惠锋,张淼,唐星. 各种吸收促进剂对黄芩苷鼻腔吸收的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(5): 347-351.
- [7] 许颖,倪京满,马子娇,等. 氢溴酸高乌甲素大鼠在体胃肠的吸收动力学研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(21): 1995-2000.
- [8] 吴诚,王玲,刘丽宏. 提高难透膜水溶性药物口服生物利用度的方法研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(4): 298-302.
- [9] 胥庆华. 中药药对大全 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996.
- [10] 侯雪梅,李国栋,李卫华. 化学促渗剂及其机理的探讨 [J]. 上海医药, 2008, 29(5): 231-235.
- [11] 金朝辉,马音,唐尧. 口服吸收促进剂研究进展概述 [J]. 华西医学, 2008, 23(4): 940-942.